

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ТУЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи



РЫБОЧКИН ПАВЕЛ ВЛАДИМИРОВИЧ

**БИОГИБРИДНЫЕ ПАЛЛАДИЕВЫЕ КАТАЛИЗАТОРЫ НА
БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ: СИНТЕЗ, ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И
ПРИМЕНЕНИЕ В РЕАКЦИЯХ КРОСС-СОЧЕТАНИЯ**

1.4.14 – Кинетика и катализ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

к.х.н., доц. Каманина Ольга Александровна

Тула – 2025

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1 Обзор научной литературы по теме работы.....	9
1.1 Нанесённые палладиевые катализаторы	9
1.2 Наночастицы палладия, нанесенные на углеродные материалы	10
1.3 Наночастицы палладия на других носителях	13
1.4 Методы получения наночастиц металлов	14
1.4.1 Физические методы получения наночастиц металлов	14
1.4.2 Химические методы синтеза наночастиц металлов.....	16
1.5 Биологические носители и биологическое формирование наночастиц палладия ..	20
1.5.1 Синтез наночастиц палладия с использованием экстрактов растений	21
1.5.2 Дрожжи, грибы и водоросли в биологическом формировании наночастиц	24
1.5.3 Формирование наночастиц с использованием бактериальных клеток	26
1.5.4 Применение в катализе наночастиц палладия, полученных с использованием бактериальных клеток.....	32
1.6 Наночастицы палладия на бактериях и соответствие принципам «зелёной» химии	38
1.7 Заключение.....	39
Глава 2 Материалы и методы	40
2.1 Реагенты и исходные вещества	40
2.2 Модельные реакции Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры.....	41
2.3 Культивирование бактерий <i>Paracoccus yeii</i> ВКМ В-3302. Определение массы клеток после сушки при комнатной температуре	42
2.4 Общая процедура приготовления катализатора Pd/P. <i>yeii</i> . Варьирование условий приготовления Pd/P. <i>yeii</i>	42
2.5 Приготовление срезов	45
2.6 Исследования методами микроскопии	45
2.7 Определение содержания Pd в катализаторе методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой	47

2.8 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия палладия в катализаторе Pd/P. <i>yei</i>	47
2.9 Активность дегидрогеназы нативных, пастеризованных и автоклавированных клеток.....	48
2.10 Высев бактерий <i>Paracoccus yei</i> ВКМ В-3302 на твёрдую питательную среду....	48
2.11 Влияние бактерий <i>P. yei</i> на проведение модельной реакции Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры	48
2.12 Построение градуировочных зависимостей для количественного анализа реакционных смесей методом хромато-масс-спектрометрией. Анализ проб реакционных смесей	50
2.13 Проверка катализатора Pd/P. <i>yei</i> , приготовленного при варьировании условий, в реакции Мизороки-Хека	51
2.14 Pd/P. <i>yei</i> в реакциях Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры с разными субстратами	52
2.15 Проверка на возможность многократного использования катализатора Pd/P. <i>yei</i> и Pd/P. <i>yei</i> @ORMOSIL и Pd/C	53
2.16 Рентгенофазовый анализ Pd/P. <i>yei</i> перед и после теста на многократное использование	56
2.17 Вымывание палладия с носителя	56
2.18 Исследование кинетики образования продукта реакции Мизороки-Хека.....	57
2.19 Внедрение в кремнийорганический материал	58
2.20 Исследование кремнийорганического материала методом низкотемпературной адсорбции азота	59
Глава 3 Результаты и их обсуждение	60
3.1 Влияние бактерий <i>Paracoccus yei</i> ВКМ В-3302 на модельные реакции Мизороки- Хека и Сузуки-Мияуры (холостые опыты).....	60
3.2 Синтез и характеристика катализатора Pd/P. <i>yei</i>	63
3.3 Катализатор Pd/P. <i>yei</i> в реакциях Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры с различными субстратами.....	79
3.4 Кинетика реакции Мизороки-Хека с катализатором Pd/P. <i>yei</i>	81
3.5 Стабильность работы при повторном использовании катализатора Pd/P. <i>yei</i>	87

3.6 Включение Pd/P. <i>yeei</i> в кремнийорганическую матрицу для предотвращения вымывания наночастиц Pd.....	92
Основные результаты и выводы	99
Благодарность	99
Список литературы.....	101
Список используемых сокращений и условных определений.....	124

Введение

Актуальность темы исследования ¹. Реакции кросс-сочетания, катализируемые наночастицами палладия (НЧ Pd), имеют ключевое значение в промышленном и лабораторном синтезе, так как обеспечивают получение целевого продукта через образование C–C, C–N, C–O связей с высокой селективностью и эффективностью. Наночастицы палладия стабилизируют нанесением на различные неорганические и углеродные носители, что обеспечивает высокую активность и возможность повторного использования катализатора. Различные аллотропные модификации углерода широко используют в качестве носителей НЧ Pd. Известны их достоинства: инертность; варьируемая в широком диапазоне удельная площадь поверхности; контроль свойств поверхности; возможность утилизации после применения катализатора для выделения металла и его повторного использования. К основному недостатку относят недостаточную воспроизводимость функциональных и текстурных характеристик. Получение углеродных материалов сопряжено с значительными затратами энергии на карбонизацию и необходимую активацию поверхности. Известны носители НЧ Pd, представляющие собой оксиды кремния (SiO₂), алюминия (Al₂O₃), титана (TiO₂), церия (CeO₂) и магния (MgO). Перечисленные оксиды обладают своими достоинствами и недостатками, их получение может быть осложнено необходимостью в дорогостоящем оборудовании, высоких температурах и строгом контроле процесса синтеза.

Носители биологической природы – клетки бактерий – альтернатива неорганическим и углеродным носителям. При этом клетки бактерий могут принимать участие в формировании наночастиц металла. Процесс получения НЧ Pd с использованием бактерий удобен и прост по сравнению с традиционными способами. Преимуществом бактериальных носителей являются относительно низкие затраты энергии на производство биомассы (затраты энергии на получение 1 кг: аэробных бактерий – от 42 до 56 МДж [1]; сажи около 75,3 МДж [2]; активированного угля – от 44 до 170 МДж [3]; оксида графена – от 7,2 МДж до 68 ГДж [4, 5]; углеродных нанотрубок – от 2,2 до 9,4 ГДж [6]). Поверхность бактерий хорошо воспроизводима благодаря генетически детерминированным структурам клеток. Некоторые клетки бактерий способны препятствовать агрегации наночастиц палладия, замедляя или останавливая дезактивацию катализатора. Эти достоинства обеспечивают благоприятную перспективу для биоформирования НЧ Pd и применения бактерий в качестве носителей, что позволит относительно просто, с невысокими затратами энергии получать активный катализатор с контролируемым размером наночастиц. Биогибридные катализаторы имеют большие перспективы для улучшения экологической

¹ Исследование выполнено в рамках реализации грантов Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания по теме "Синтез таргетных биологически активных ионных соединений и новых биокomпозитных материалов" (FEWG-2021-0011) и Российского научного фонда № 24-73-10013, <https://rscf.ru/project/24-73-10013/>

устойчивости и промышленного применения, что делает их разработку важной областью исследования в нанотехнологиях и катализе. Большинство работ о формировании наночастиц металла с использованием бактерий ограничены и не фокусируются на детальном исследовании каталитической активности полученных биогибридных материалов (наночастиц металла на бактериальном носителе). Комплексное изучение формирования НЧ Pd при использовании бактерий и создание биогибридных палладиевых катализаторов является сложной, междисциплинарной, при этом актуальной и важной научной задачей.

Некоторые виды микроорганизмов, обитающие в среде богатой ионами и соединениями металлов, адаптированы к их присутствию и способны к биосорбции и биовосстановлению металла до наночастиц. В данной работе предположили, что штамм аэробных бактерий *Paracoccus yeei* В-3302 (выделен из активного ила очистных сооружений г. Тулы, охарактеризован и депонирован во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ) г. Пущино) способен к формированию НЧ Pd из соли металла и может быть носителем наночастиц палладия в катализе.

Цель: разработать биогибридный катализатор на основе аэробных бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 и наночастиц палладия для применения в реакциях тонкого органического синтеза.

Задачи:

1. Синтезировать и охарактеризовать катализатор, состоящий из наночастиц палладия и аэробных бактерий *Paracoccus yeei* (Pd/P. *yeei*).
2. Оценить влияние термически инактивированных и нативных бактерий *Paracoccus yeei* на формирование наночастиц палладия при приготовлении катализатора Pd/P. *yeei*
3. Испытать полученный катализатор Pd/P. *yeei* в реакциях Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры.
4. Повысить срок службы катализатора в реакции Мизороки-Хека, интегрировав Pd/P. *yeei* в кремнийорганический материал, полученный золь-гель методом.
5. Выработать рекомендации по применению биогибридных катализаторов в проектах устойчивого развития (sustainable chemistry).

Научная новизна: Впервые продемонстрирована возможность использования бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 в качестве носителей наноразмерных форм палладия и разработаны новые биогибридные палладиевые катализаторы. Показано, что НЧ Pd формируются снаружи и внутри клетки, средний размер наночастиц внутри бактерий меньше, чем на поверхности. Обнаружено, что живые клетки эффективно способствуют формированию наноразмерных форм палладия и стабилизации наночастиц металла. При использовании в приготовлении катализатора мёртвых (пастеризованных и автоклавированных) клеток *Paracoccus yeei* (P. *yeei*) средний

размер наночастиц увеличивается, что снижает каталитическую активность в реакциях Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры. Продемонстрировано, что использование нитрата палладия приводит к формированию менее эффективного в реакции катализатора, поскольку происходит гибель бактерий *P. yeai*. Путём иммобилизации Pd/*P. yeai* в кремнийорганический материал достигается уменьшение вымывания палладия с биологического носителя, что увеличивает срок службы катализатора.

Практическая значимость работы: Работа вносит практический вклад в разработку биогибридных катализаторов для органического синтеза. Предложенная в работе методика позволяет получать катализатор при комнатной температуре в водной среде, используя аэробные бактерии *P. yeai* для формирования НЧ Pd размером 1–7 нм. Разработана удобная, простая и быстрая процедура синтеза катализатора. Общее время приготовления катализатора составляет 7 мин., после чего он может быть использован в реакциях Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры. Методику можно масштабировать для потенциального увеличения объёмов производства катализатора. Установлено, что активность катализатора Pd/*P. yeai* сопоставима с активностью коммерчески доступного катализатора Pd/C.

Достоверность результатов и выводов обеспечена использованием современных методов анализа (электронная микроскопия, хромато-масс-спектрометрия (ХМС), рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (РФЭС), масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС), микро-рентгенофазовый анализ (микро-РФА), спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и др.) для описания полученного катализатора Pd/*P. yeai* и анализа его активности в реакциях Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры. Достоверность результатов и выводов обеспечена апробацией результатов исследований в форме докладов на профильных научных конференциях и публикацией результатов исследования в профильных рецензируемых научных изданиях.

Апробация работы.

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 4 международных рецензируемых научных журналах и прошли апробацию в форме докладов на всероссийских и международных научных конференциях:

Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2021» г. Москва, 12-23 апреля 2021 года

XXIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2022» г. Москва, 11-22 апреля 2022 года

Конференция-школа «Новые горизонты катализа и органической химии» г. Москва, 19-20 мая 2022 года

Конференция-школа «Фундаментальные открытия, формирующие химию сегодня» г. Москва, 24-25 ноября 2022 года

Научная конференция-школа «Лучшие катализаторы для органического синтеза» г. Москва, 12-14 апреля 2023 года

XXXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» г. Москва, 12-26 апреля 2024 года

Международная научная конференция-школа «Биогбридные системы в химии, биотехнологии и медицине» г. Тула, 22-23 апреля 2024 года

Третий международный симпозиум «Химия для биологии, медицины, экологии и сельского хозяйства» г. Санкт-Петербург, 5-7 июня 2024 года

Положения, выносимые на защиту.

1. Определение локализации наночастиц палладия относительно аэробных бактерий *Paraccocus yeei* ВКМ В-3302, доказательство необходимости применения бактерий с неповреждённой цитоплазматической мембраной для эффективной стабилизации наночастиц палладия.

2. Установлено преимущество использования ацетата перед нитратом палладия для формирования наноразмерных форм Pd на грамотрицательных аэробных бактериях *Paraccocus yeei* ВКМ В-3302.

3. Новый катализатор на основе наночастиц палладия, стабилизированных клетками бактерии *P. yeei*, способен эффективно катализировать реакции Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры, а его активность сопоставима с коммерческим катализатором Pd/C.

4. Подход к снижению вымывания палладия с носителя, путём включения катализатора Pd/P. *yeei* в кремнийорганический материал, что повышает срок его службы.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении работы по разработке методики получения катализатора Pd/P. *yeei* и большей части работы по его описанию, в том числе приготовление катализатора и подготовка его к анализу. Соискатель выполнил большую часть синтетических и кинетических экспериментов, интерпретировал и обобщил значительную часть экспериментальных данных, провёл анализ научной литературы, подготовил публикации. Активно участвовал в написании научных статей. Лично участвовал в апробации результатов научной работы на отечественных и международных конференциях.

Структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов и списка литературы, включающего 272 источника. Материал диссертации изложен на 124 страницах машинописного текста, включает 41 рисунок, 13 схем и 9 таблиц.

Глава 1 Обзор научной литературы по теме работы

1.1 Нанесённые палладиевые катализаторы

Невозможно представить современный органический синтез без применения катализаторов. Они позволяют проводить процесс более селективно, ускорять химические реакции, снижать температуру, необходимую для осуществления реакции. Катализаторы используют в промышленности повсеместно для производства: аммиака (процесс Габера-Боша) – катализатор пористое железо с промоторами (Al_2O_3 , K_2O) [7]; серной кислоты – катализатор V_2O_5 [8]; противоопухолевых препаратов, органических полупроводников, полимеров (реакция Сузуки-Мияуры, Мизороки-Хека) – Pd (0) или комплексов Pd (II) [9]; материалов для электроники, природных соединений (реакция Негиши) – Pd (0) или комплексы Pd (II) [10]; функционализированных полупроводников (реакция Кумады) – Pd (0) или Ni (0) или комплексы этих металлов [11, 12]; синтез красителей и люминесцентных материалов, биоактивных соединений (реакция Соногаширы) – Pd (0) и CuI как со-катализатор [13–15]; анальгетиков, антибиотиков, красителей и пигментов (реакция Бухвальда-Хартвига) – Pd (0) или комплексы Pd (II) [16–19]; получение углеводов из синтез-газа (процесс Фишера-Тропша) – катализаторы на основе железа или кобальта [20–24]. Процессы каталитического крекинга, гидрокрекинга, изомеризации, полимеризации, каталитического риформинга осуществляют с применением катализаторов на носителях с кислотными центрами, представляющих собой цеолиты, глины с нанесёнными металлическими частицами [25–30]. Металлы и их оксиды (Fe_2O_3 , Cr_2O_3 , Ni, Pd, другие металлы на носителях) катализируют реакции гидрирования и дегидрирования [31–33]. Процессы окисления, катализируемые платиной, серебром или оксидом ванадия (V) используют для получения различных веществ органического синтеза (фталевый ангидрид, малеиновый ангидрид) или доокисления соединений в их менее опасную форму (катализаторы дожигания в автомобилях) [34, 35].

Одним из наиболее активных катализаторов являются наноразмерные частицы металлов – наночастицы. Металлические наночастицы, благодаря своим размерам, большому отношению площади поверхности к объёму, значительной энергии поверхности, высокой концентрацией активных центров обладают высокой каталитической активностью и значительно увеличивают скорость химических реакций [36, 37]. Однако в процессе синтеза и применения наночастицы имеют тенденцию к агломерации, что приводит к уменьшению их площади поверхности и падению каталитической активности [38].

Нанесение наночастиц металла на носители – способ их стабилизации и защиты от агломерирования [39]. Применение высокодисперсного металла на носителях вместо использования объёмного металла позволяет дополнительно увеличить площадь поверхности катализатора, что увеличивает сорбцию активных молекул субстрата и вероятность

осуществления реакции. Этот подход имеет особое значение для устойчивого развития, так как носители обеспечивают экономически выгодную стабилизацию металлических наночастиц и облегчают регенерацию катализатора, что позволяет минимизировать отходы и потери металла [40, 41]. Носитель должен обладать следующими свойствами: инертность (не препятствовать образованию целевого продукта и не инициировать побочные реакции), доступность и безопасность [42–44]. Несмотря на то, что эффективность катализатора во многом определяется химическими свойствами активной металлической фазы, нельзя пренебрегать взаимодействием между металлом и носителем. Исследования показали, что материал носителя может существенно влиять на каталитические характеристики и стабильность катализатора [45, 46]. Это объясняется существованием специфических активных центров на границе раздела между металлом и носителем. Среди гетерогенных катализаторов, представляющих собой наночастицы металла на носителе, выделяют катализаторы на основе наночастиц палладия, обладающие эффективностью в широком спектре научных и промышленных применений [47–52].

Палладиевые катализаторы играют ключевую роль в органическом синтезе и промышленном производстве, обеспечивая эффективные и селективные методы создания сложных органических соединений [53–55]. Палладий используют в различных реакциях, включая: реакции кросс-сочетания, окисления и восстановления, циклизации и образования гетероциклов, функционализации C-H связей и модификация молекул на поздних стадиях синтеза [49, 56–59]. Посредством палладиевых катализаторов производят агрохимикаты, лекарства, полимеры, материалы для электроники, сенсоров и др. практически значимых материалов [19, 53, 60].

В настоящее время распространенными носителями для наночастиц палладия являются: аллотропные формы углерода (такие как активированный уголь [61], графен [42, 62], углеродные нанотрубки, нановолокна и наноглобулы [43, 63]), различные модифицированные полимеры [44, 64] в том числе биополимеры [65, 66]. Были изучены носители, представляющие собой оксид железа (III), проявляющий магнитные свойства [67, 68], носители на основе кремниевых материалов [69–71] и другие материалы [72–74].

1.2 Наночастицы палладия, нанесенные на углеродные материалы

К углеродным материалам, на которые наносят наночастицы Pd, относят: активированный уголь, углеродные нанотрубки и нановолокна, оксид графена. Углеродные носители могут быть получены как из ископаемых источников, так и из сельскохозяйственного сырья [75–77].

Производство углеродных носителей требует значительных затрат энергии, которые могут зависеть от используемой методики синтеза. К примеру, удельные энергозатраты на производство углеродных нанотрубок (УНТ) при использовании электрической дуги, солнечных

печей и лазерной абляции могут составлять 2,18, 6,34 или 9,42 ГДж/кг, соответственно [6]. Производство углеродных нановолокон (УНВ) требует в 100 раз меньших энергозатрат по сравнению с производством УНТ [78]. В случае производства 1 кг сажи энергозатраты могут достигать 75,3 МДж/кг [2]. Удельное потребление энергии при производстве активированного угля зависит от исходного материала и составляет от 44 до 170 МДж/кг [3]. Производство оксида графена по методу Хаммерса, помимо энергозатрат, предполагает использование агрессивных соединений (серной кислоты и перманганата калия), что приводит к образованию токсичных соединений и требует дополнительных процессов промывки [4]. В тоже время можно использовать метод химического осаждения из паровой фазы, при котором не происходит образование токсичных соединений. Однако этот метод связан с низким выходом графена и затратами энергии (7,2 МДж/кг [4]) до 68500 МДж/кг [5].

Неоднородность поверхности и наличие различных структурных несовершенств или дефектов в углеродных носителях может влиять на активность и селективность катализатора [79, 80]. Т. к. дефекты существенно влияют на формирование наночастиц металла, их размер, форму, это может привести к непредсказуемому образованию наночастиц с высокой активностью, что отразится на селективности. Вместе с тем, наличие дефектов может улучшить сорбцию наночастиц на носителе, улучшая дисперсность и стабилизируя размер. Контроль над свойствами катализатора путём регулирования структуры углеродных носителей – очень сложная задача на текущем этапе.

Недоступность части металла, называемого «мёртвым», для реагирующих молекул – ещё одна особенность использования углеродных носителей. Если весь нанесённый металл в катализаторе недоступен для молекул, то катализатор полностью теряет свою активность [81]. Причины этого явления могут различны и отличаться на разных типах углеродных субстратов. К примеру, на активированном угле часть металла может быть локализована в микропорах или покрыта органическими стабилизаторами, которые применяли при синтезе (Рисунке 1А и 1Е). Атомы металла могут интеркалировать между слоями графена (Рисунок 1В) [81].

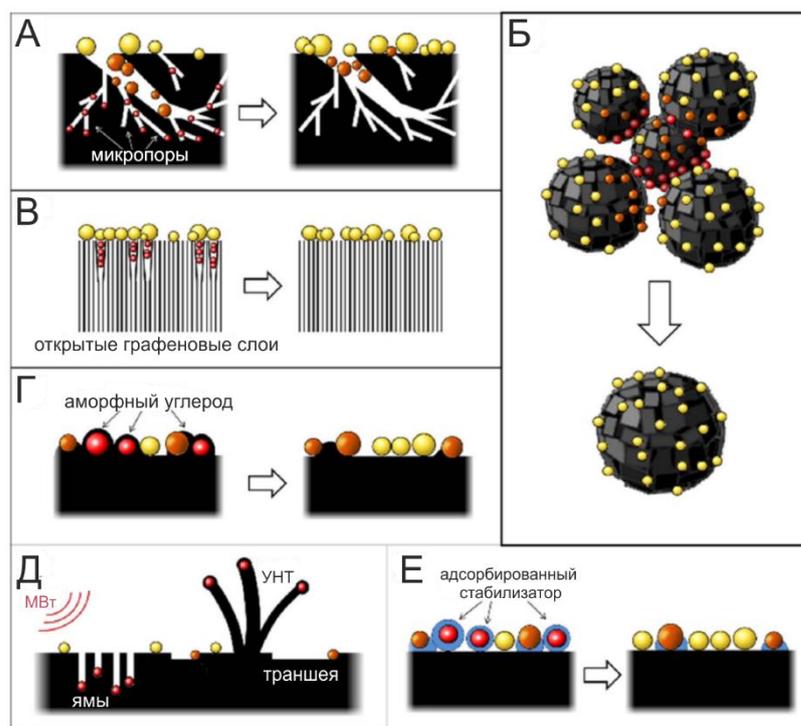


Рисунок 1. Причины образования «мёртвого» металла на углеродных материалах в нанесённых катализаторах и возможности к минимизации их образования: А – блокирование металла в микропорах углеродного носителя; Б – расположение металла в труднодоступных для субстрата участках наноглобул углерода; В – интеркаляция атомов металла между слоями графена; Г – инкапсулирование металлических частиц в аморфный углерод; Д – динамические изменения под воздействием микроволнового излучения; Е – блокирование наночастиц органическими молекулами стабилизатора, адсорбированными во время приготовления катализатора. Жёлтые, оранжевые и красные сферы соответствуют металлу (в форме наночастиц, кластеров, атомов) доступных, частично доступных и недоступных для молекул реагирующих веществ, соответственно [81]

Хотя использование углеродных материалов в качестве носителей для наночастиц металлов обладает рядом преимуществ – большая удельная площадь поверхности, инертность и доступность [82] – весь процесс производства сопровождается большими затратами энергии и ресурсов. Конечный носитель может содержать примеси, являющиеся каталитическими ядами [83–85], а размер наночастиц и их доступность для молекул субстрата зависят не только от метода приготовления катализатора, но и от структуры, наличия дефектов поверхности углеродного носителя [80, 86], поэтому существуют сложности с предсказанием, контролем и воспроизводимостью свойств катализатора.

1.3 Наночастицы палладия на других носителях

Помимо углеродных носителей для наночастиц Pd активно используют оксид кремния (SiO_2) [87, 88], оксид алюминия (Al_2O_3) [89, 90], оксид церия (CeO_2) [91], оксид титана (TiO_2) [92], оксид магния (MgO) [93]. Каждый из носителей имеет свои достоинства и недостатки. Сюда также можно отнести Pd на цеолитах [94, 95] и полимерных носителях [64, 73, 96].

Оксид кремния – пористый и достаточно инертный материал, обладающий высокой удельной площадью поверхности [97], с хорошей химической и термической стабильностью [69]. SiO_2 можно модифицировать для придания определённых свойств [98] или создания упорядоченных структур [99]. Одновременно с этим SiO_2 достаточно хрупкий материал, что может привести к разрушению носителя в условиях механических нагрузок. При высоких температурах может происходить образование силицида палладия (Pd_2Si) [100], что отрицательно скажется на свойствах катализатора.

Al_2O_3 также один из наиболее распространённых носителей наночастиц Pd [101]. Оксид алюминия характеризуется высокими сорбционными свойствами и термической стабильностью [102], и наличием кислотных активных центров [103]. Недостатки оксида алюминия: сильное взаимодействие с палладием может приводить к агломерированию наночастиц и падению их каталитической активности, кислотные центры оксида алюминия могут негативно повлиять на реакции, требующих нейтральной или щелочной среды [104]. Несмотря на прочность Al_2O_3 его свойства сильно зависят от структуры, которая может быть чувствительна к механическим повреждениям. Цеолиты являются эффективной альтернативой, т. к. совмещают достоинства оксида алюминия и оксида кремния, однако процедура синтеза упорядоченных структур непростая и требует контроля [105, 106].

CeO_2 – достаточно активный носитель, устойчивый в широком диапазоне температур (до $800\text{ }^\circ\text{C}$ [107]) с значительными окислительно-восстановительными свойствами [91] и сильным взаимодействием между Pd и носителем [108], что может быть как полезным для катализа, так и иметь негативные последствия. К недостаткам оксида церия относят сложность синтеза. Оксид титана обладает высокой термической стабильностью и способен к фотокатализу [92], однако проявление кислотных свойств, необходимость в дополнительном восстановлении Pd, зависимость свойств носителя от кристаллической фазы требует рационального применения данного носителя. MgO менее распространён в качестве носителя наночастиц Pd, т. к. это хрупкий материал со слабой (относительно SiO_2 и Al_2O_3) адсорбцией, но обладающий основными свойствами и термической стабильностью [109]. Кроме того, его структуры лучше изучены [93]. Полимерные носители представляют собой различные природные или синтетические вещества стабильные в органических растворителях [64].

Наночастицы палладия на оксидных носителях формируют с помощью методов пропитки [103, 110–114], золь-гель метода [115, 116], осаждением из газовой фазы [91, 100, 117, 118] и лазерной абляцией [107].

1.4 Методы получения наночастиц металлов

В синтезе наноматериалов, в том числе наночастиц, выделяют два общих подхода: «сверху-вниз» («top-down») и «снизу-вверх» («bottom-up»). Подход «сверху-вниз» подразумевает дробление/разрушение крупной по размеру структуры-предшественника на наноразмерные части. Обратным «путём» является подход «снизу-вверх», когда атомы и молекулы, формируют или самособираются в наноматериал [119]. Метод «сверху-вниз» позволяет достаточно быстро получать наноматериал в больших количествах, но наноматериал может быть неоднороден. Метод «снизу-вверх» позволяет получать более однородные структуры, но в меньших количествах [119].

1.4.1 Физические методы получения наночастиц металлов

Наночастицы палладия в промышленных масштабах получают физическими или химическими методами. К физическим методам относят: физическое осаждение из паровой фазы, магнетронное распыление, лазерная абляция и электрохимическое диспергирование палладиевого электрода под действием переменного импульсного тока (ПИТ). Физические методы синтеза наночастиц палладия требуют дорогостоящего оборудования и больших затрат энергии, обусловленных поддержанием высоких температур и/или давления [120, 121].

Физическое осаждение из паровой фазы включает в себя этапы: фазовое превращение металла из конденсированной фазы (твёрдой или жидкой) в газообразную фазу; обратный переход в конденсированную на поверхность носителя (Рисунок 2А). Все процессы осуществляются в условиях вакуума [122].

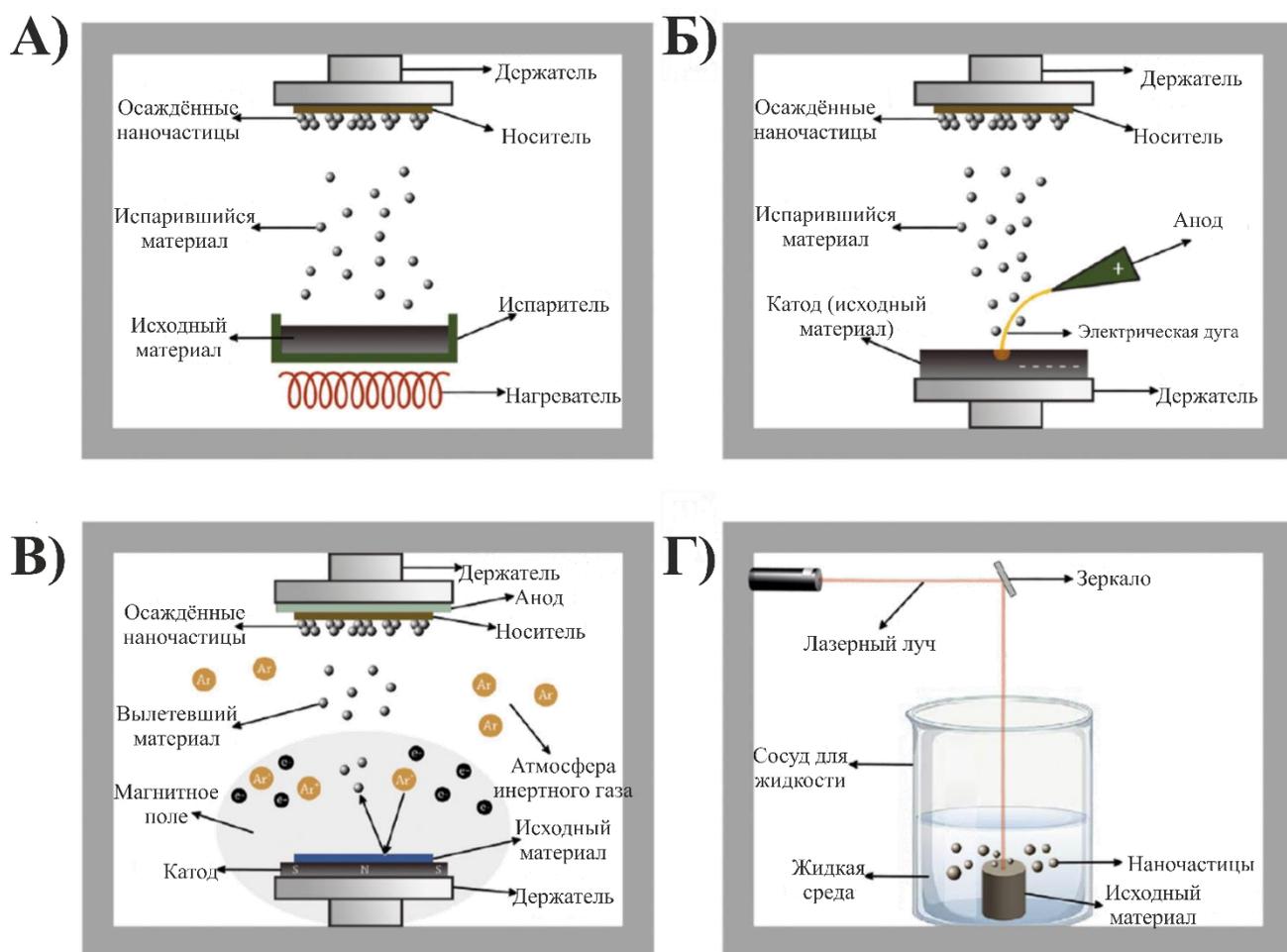


Рисунок 2. Физические методы получения и нанесения наночастиц металлов: А – осаждение из газовой фазы (термический перевод в газовую фазу); Б – осаждение из газовой фазы (перевод в газовую фазу под действием электрической дуги); В – магнетронное распыление; Г – лазерная абляция [123]

Переводить в газовую фазу металл могут термическим испарением, когда металл нагревают, пропуская электрический ток через проводник (Рисунок 2А), или испарять металл с поверхности катода под воздействием сильноточной низковольтной дуги (Рисунок 2Б). Испарившиеся частицы конденсируются и образуют тонкую пленку непосредственно на мишени для осаждения (носителе) [124]. Изменяя параметры осаждения регулируют размер частиц и толщину образующейся плёнки [125].

Распыление – это физический процесс, при котором атомы или молекулы исходного материала наносят на подложку под воздействием высокоэнергетических частиц. Усовершенствованный вариант метода, в котором используют дополнительное сильное магнитное поле, получил название магнетронного распыления [126]. В этом методе в вакуумной камере с инертным газом (часто аргоном), расположен катод, на котором закреплён источник металла, и анод, на котором расположен носитель (Рисунок 2В). В камере создают сильное

электрическое поле. Испущенные с катода электроны, сталкиваясь с атомами инертного газа, приводят к его ионизации. Положительно заряженные атомы газа притягиваются к катоду, что приводит к высокоэнергетическим столкновениям с металлом. В результате происходит вылет одного или нескольких атомов металла. Они движутся к аноду, бомбардируя его поверхность и образуя частицы металла. Магнитное поле необходимо для удержания вокруг источника электронов из катода [127, 128]. На размер частиц влияет давление аргона, чем выше давление, тем меньше размер формирующихся частиц Pd.

Метод основан на воздействии лазерным лучом на материал, что приводит к испарению с его поверхности мелких частиц. Точный контроль размера выделяемых частиц материала обеспечивается контролем интенсивности потока лазерного излучения, длины волны и продолжительности облучения [129]. Существуют различные варианты этого метода в зависимости от атмосферы в камере. К примеру, импульсная лазерная абляция в жидкости подразумевает погружение исходного материала в жидкость (Рисунок 2Г). Распылённый металл, высвобожденный под воздействием лазера, взаимодействует с растворителем, что приводит к зарождению наночастиц или наноплёнок [130].

Электрохимическое диспергирование палладиевого электрода под действием переменного импульсного тока позволяет сформировать катализаторы, содержащие наночастицы Pd (металлическая фаза) и PdO (оксидная фаза) [131]. Метод основан на циклическом чередовании окислительных и восстановительных процессов, вызванных подачей импульсного переменного тока на погружённые в раствор электролита электроды из палладия. Воздействие ПИТ приводит к разрушению поверхности электродов с образованием наночастиц [132], которые оседают на носителе. Метод позволяет получать наночастицы высокой чистоты. Параметры тока, температура, химическая природа электролита и его концентрация влияют на получаемый результат [131].

1.4.2 Химические методы синтеза наночастиц металлов

Химические методы синтеза наночастиц основаны на химическом восстановлении ионов металлов до атомов с нулевой степенью окисления с последующей агломерацией в наночастицы. К химическим методам относят: электрохимическое осаждение; ультразвуковое приготовление; нуклеацию в сверхкритической жидкости; мокрые химические методы – золь-гель метод, восстановление спиртами или другими восстановителями. В большинстве случаев химические методы синтеза включают применение растворителей, восстановителей, стабилизаторов, а так же приводят к образованию побочных продуктов [133, 134].

Формирование наночастиц металлов на углеродных носителях осуществляют различными методами [79, 135–139]. В общем случае для приготовления катализатора используют различные методы пропитки и осаждения.

Можно выделить несколько подходов в химических методах [63]. В первом подходе суспензию носителя и предшественника Pd обрабатывают химическим восстановителем, к примеру водородом или боргидридом натрия. Восстановленный Pd(0) формирует наночастицы, которые адсорбируются на носитель. Необходимость в применении восстановителей или дополнительных реагентов, к примеру стабилизаторов, может привести к загрязнению конечного катализатора, что отразится на его активности и селективности образования целевого продукта. Второй подход включает в себя использование оснований для получения Pd(OH)₂ из соли палладия, который осаждается на углеродный или другой носитель. Необходимым этапом является восстановление до металлического Pd⁰, которое обычно осуществляют в атмосфере водорода [63]. Описанный подход требует специального оборудования для работы H₂ при повышенных давлениях (до 10–20 бар) и температурах (200–500°C), что усложняет получение катализатора. Третий подход отличается от второго тем, что раствором соли или комплексов Pd²⁺ пропитывают углеродный носитель с последующим удалением растворителя [63]. Этап восстановления Pd²⁺ до Pd⁰ также необходим. Альтернативно, можно использовать в качестве прекурсора палладия комплекс Pd⁰, что исключает необходимость процесса восстановления, например, использование трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0) (Pd₂dba₃) [62, 140]. Под термином влажной пропитки подразумевают применение раствора прекурсора, объём которого превышает объём пор носителя, что позволяет получить суспензию. Если объём раствора предшественника не превышает объёма пор носителя, то говорят о сухой пропитке [135].

Метод осаждения подразумевает приготовления коллоидного раствора металлических наночастиц, стабилизированных поверхностно-активными веществами (ПАВ), и их осаждением на носитель. Метод сильной электростатической адсорбции (СЭА) предполагает протонирование гидроксильных групп на поверхности носителя при определённых значениях рН среды. СЭА комбинируют с методом сухой пропитки, чтобы снизить потерю металла [135].

В методе электрохимического осаждения (Рисунок 3А) под действием постоянного электрического тока происходит восстановление катионов металла и осаждение наночастиц металла на электроде электролитической камеры. Для этого межэлектродное пространство заполняют солевым раствором осаждаемого металла. Ионы металла восстанавливаются на катоде до нулевой степени окисления [141, 142], агломерируют и образуют наночастицы.

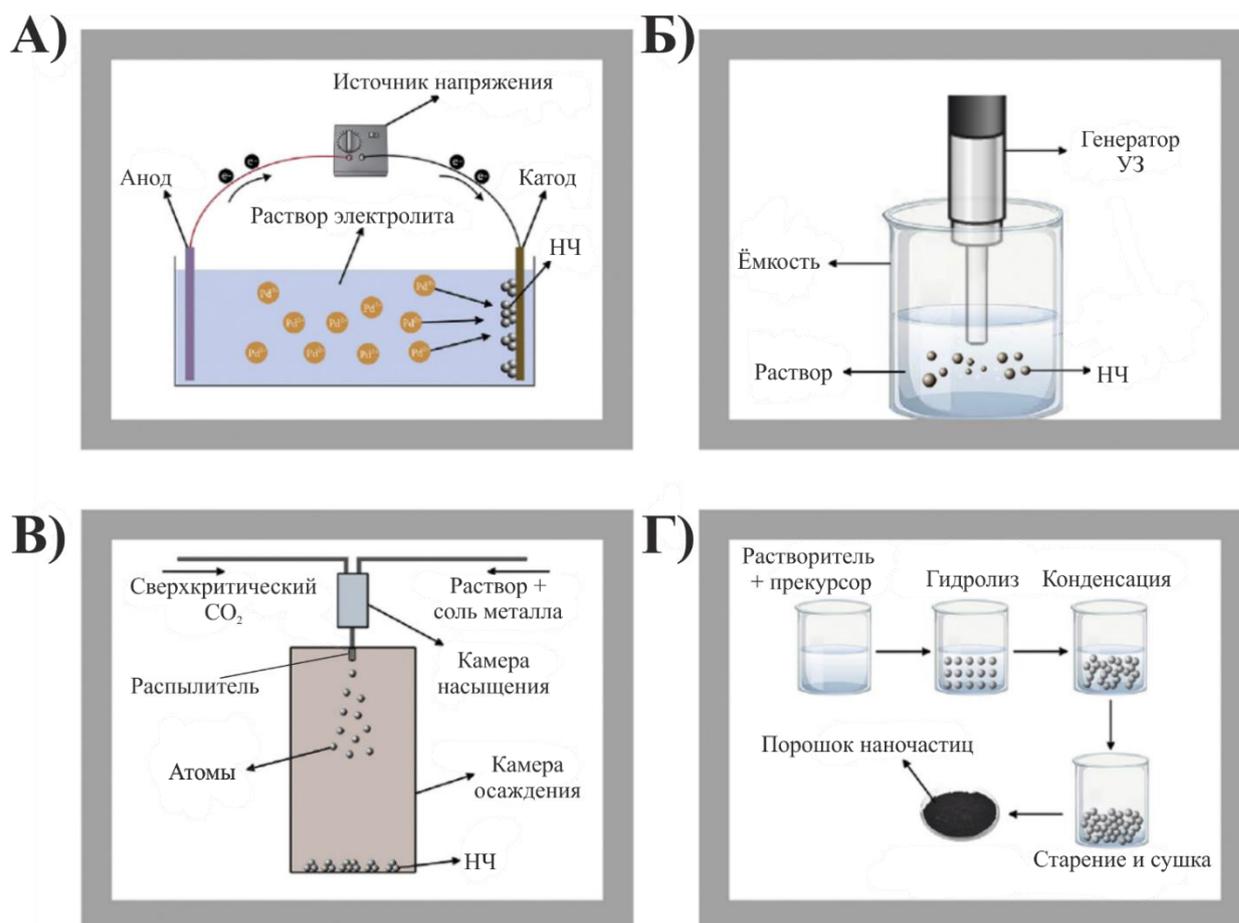


Рисунок 3. Принципы распространённых методов для синтеза наночастиц палладия: А – электрохимическое осаждение; Б – с применением ультразвука; В – в сверхкритической жидкости; Г – золь-гель метод [123]

Контроль размера палладиевых наночастиц при получении данным методом осуществляют внесением химических стабилизаторов. К примеру, поли(*N*-винилпирролидон) (ПВП) способствует процессу формирования наночастиц Pd, ингибируя процесс электроосаждения Pd на катод, что стабилизирует размер наночастиц [143]. Изменяя силу приложенного тока и концентрацию стабилизатора, регулируют размер образующихся наночастиц. При синтезе наночастиц Pd из тетрахлолопалладата натрия было обнаружено, что концентрация ПВП обратно пропорциональна среднему диаметру сформированных наночастиц. Изменение концентрации ПВП с 15 до 30 г/дм³ привело к изменению среднего размера наночастиц с 22,2 до 10,1 нм. Варьируя силу тока, исследователи обнаружили, что чем выше плотность тока, тем меньше размер образующихся наночастиц [143].

Метод формирования наночастиц с применением ультразвука (Рисунок 3Б) подразумевает воздействие мощных ультразвуковых частот (20 кГц – 10 МГц) на раствор с ионами металла [144], в результате возникает акустическая кавитация, которая определяется как образование, рост и разрушение пустот (пузырьков) в жидкости [145]. При достижении

критического размера пузырьки схлопываются, создавая характерные критические и переходные условия сонохимии [145]. В этих условиях в так называемых горячих точках происходят высокоэнергетические химические реакции. В то же время нелетучие прекурсоры могут вступать в химические реакции с радикалами или другими высокоэнергетическими продуктами сонолиза внутри схлопывающихся пузырьков, предоставляя электроны для восстановления катионов металлов, что приводит к зарождению и образованию наночастиц [145]. В некоторых случаях в жидкую фазу добавляют химические восстановители и стабилизаторы, такие как этиленгликоль и поли(N-винилпирролидон), соответственно, чтобы контролировать размер и форму получаемых наночастиц Pd [146]. Как и при электрохимическом осаждении, для регулирования размера наночастиц в раствор необходимо добавить химический стабилизатор. Размер и форму образующихся наночастиц регулируют, изменяя концентрацию стабилизирующего агента, плотность тока, интенсивность ультразвука и длительность интервала между двумя непрерывными ультразвуковыми импульсами [147]. Метод приготовления с применением ультразвука используют для синтеза наночастиц Pd на носителе, например, на алюминиевых носителях. Для этого в раствор обычно добавляют спиртовую добавку, чтобы ускорить восстановление ионов Pd(II). Размер нанесённых наночастиц контролируют, варьируя концентрацию спирта и концентрацию частиц [148, 149].

Формирование наночастиц проводят в сверхкритической жидкости (Рисунок 3В), метод основан на насыщении сверхкритической жидкости твердым металлом и сбросе раствора через сопло в камеру низкого давления, что приводит к зарождению и формированию из газового потока наночастиц [150]. Распространённым вариантом, используемым для синтеза наночастиц Pd, является быстрое расширение сверхкритического раствора, в котором обычно используют сверхкритический диоксид углерода [151]. Получение наночастиц Pd в сверхкритической жидкости может быть использовано для синтеза функционализированных наночастиц Pd на носителе [152, 153]. Для это исходный субстрат для синтеза носителя смешивается с прекурсором Pd в реакторе под давлением. Путём синтеза из сверхкритической жидкости получали функционализированные фторированными и нефторированными алкильными молекулами наночастицы Pd, наночастицы Pd с тиольными группами и др. [152, 154, 155]. Синтез функционализированных наночастиц с использованием этого подхода сравнительно прост, так как ограничивает количество этапов в приготовлении. Размер образующихся наночастиц регулируют, варьируя температуру [152], растворитель, концентрацию предшественника Pd например, гексафторацетилацетоната палладия (II) в процессе синтеза наночастиц палладия на восстановленном оксида графена [153].

Золь-гель метод – метод получения материалов и наноматериалов, в том числе и наночастиц металлов, подразумевающий превращение коллоидного раствора (золя) в состоящий

из дискретных металлических наночастиц гель (Рисунок 3Г). При получении наночастиц металла золь-гель методом выделяют пять различных стадий: гидролиз, конденсация, старение, сушка и прокаливание. Предшественник наночастиц (алкоксид металла) растворяют в воде или органическом растворителе до получения однородного раствора. Добавляют кислоту или основание для инициации стадии гидролиза с образованием коллоидного раствора. После чего растворитель удаляют, происходит конденсация соседних молекул с образованием (-O-) мостика между двумя металлическими центрами (так называемое оксолирование). При конденсации образуется пористая структура – гель. Следующий этап старение, на котором конденсация раствора продолжается медленно и уменьшается пористость. Гель подвергают термической сушке. Высушенный гель прокаливают и измельчают до образования порошков наночастиц [156].

Золь-гель метод часто используют для синтеза гибридов/композитных наночастиц Pd, таких как катализаторов ядро-оболочка Pd@SiO₂ [157, 158]. Наноразмерные ядра Pd формируют путем восстановления тетрахлоропалладата палладия боргидридом натрия в присутствии тетрадецилтриметилбромида аммония в качестве стабилизирующего агента, а кремниевую оболочку формируют золь-гель методом из тетраэтоксисилана (ТЭОС). От концентрации реагентов, молярных соотношений и pH раствора зависит размер наночастиц и толщина оболочек [157].

Физические и химические методы получения наночастиц металлов, в частности палладия, имеют ряд недостатков. Физические методы требуют больших затрат энергии на поддержание высоких температур и давления. Химические методы могут включать применение вредных или опасных растворителей, восстановителей или стабилизаторов, такие как боргидрид натрия и гидразин, или приводить к образованию токсичных загрязняющих веществ и побочных продуктов. Дополнительно химический синтез наночастиц палладия может сопровождаться адсорбцией поверхностно-активных веществ или токсичных молекул на поверхность наночастиц палладия, что может негативно повлиять на каталитическую активность катализатора или сделать невозможным применение наночастиц в биомедицинских и фармацевтических целях [120, 121, 134, 159].

1.5 Биологические носители и биологическое формирование наночастиц палладия

Развитие принципов «зелёной химии», стремление к устойчивому развитию, обеспеченному использованием возобновляемого, экологичного сырья, с невысокими затратами энергии и средств, привело к развитию биологического пути формирования наночастиц, позволяющему получить результат быстро, просто и потенциально безопаснее для окружающей среды. Биологический путь связан с использованием для формирования наночастиц и в качестве

носителей наночастиц организмов или веществ биологической природы [77, 160–162]. Применяют вирусы [163], клетки бактерий и дрожжей [164–167], многоклеточные грибы [168], растения и их экстракты [169, 170], или вещества биологической природы – ферменты [171], нуклеиновые кислоты [172, 173]. Биологический путь формирования наночастиц представляет собой экономически выгодную и экологически безопасную альтернативу традиционным методам, которые часто связаны с использованием токсичных химикатов и высоким энергопотреблением [170]. Кроме того, было показано, что биогенные процессы обеспечивают очень высокий уровень контроля над свойствами наночастиц, такими как размер и форма [120, 121, 134, 159]. Для синтеза наночастиц палладия прекурсор Pd (раствор соли Pd) смешивают либо с растительным экстрактом, либо с бактериальной/водорослевой/грибковой биомассой, синтез обычно проводят при комнатной температуре. Процесс синтеза начинается немедленно и длится не более 2 часов, о чем свидетельствует цвет реакционной среды (цвет обычно меняется на темно-коричневый или черный) [159].

Точный механизм биологического синтеза наночастиц Pd до конца не изучен, это сложная задача, требующая комплексных исследований. Обычно в процессе биосинтеза НЧ Pd выделяют три основных этапа. Первый – восстановление ионов Pd^{2+} до Pd (0) путём взаимодействия иона металла с биологической молекулой, которая получает электроны от дополнительно введённого донора электронов. Второй – восстановленные атомы металла агломерируют, образуя наночастицы. Третий – сформированные наночастицы Pd взаимодействуют с различными функциональными группами компонентов клеток, что способствует стабилизации наночастиц. Синтезированные НЧ могут иметь различные размеры или форму в зависимости от условий реакции.

1.5.1 Синтез наночастиц палладия с использованием экстрактов растений

Синтез наночастиц с применением растений или их экстрактов обусловлен наличием биоактивных соединений, таких как полифенолы, алкалоиды, терпеноиды, флавоноиды (Рисунок 4). Считается, что эти соединения восстанавливают ионы металлов, что приводит к образованию наночастиц [121]. Экстракты различных частей растений: листьев, семян, плодов и корней, были успешно использованы для биологического синтеза наночастиц Pd различных размеров (от 1 до 100 нм) и форм [123].

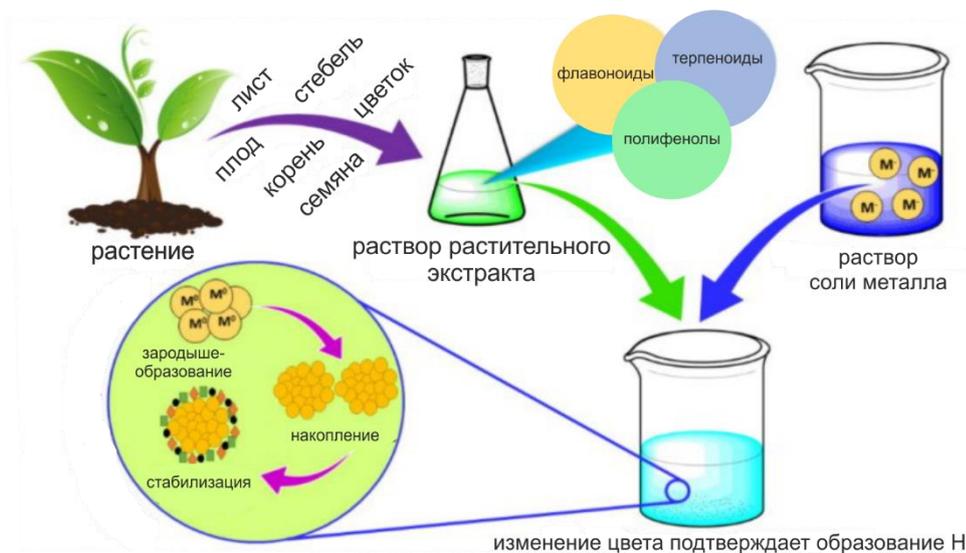


Рисунок 4. Схематическое изображение биосинтеза наночастиц металлов с растительным материалом [174]

В качестве примера синтеза наночастиц с применением растений или их экстрактов можно привести частицы палладия, нанесённые на кожуру граната [175, 176], и синтез Pd/Fe₂O₃ с использованием экстракта ромашки [177]. Таким образом были получены наночастицы Pd, как крупных (20 нм и больше), так и малых размеров. На размер и морфологию наночастиц Pd, полученных с использованием растений, влияют: концентрация предшественника Pd, состав растительного экстракта, продолжительность контакта, температура и pH реакции [120, 121, 134, 159].

Экстракт листьев *Anacardium occidentale* (кешью) был использован для синтеза сферических НЧ Pd размером 2,5–4,5 нм. ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье показала участие растворимых полиолов в восстановлении ионов Pd, а стабилизация наночастиц обусловлена отрицательно заряженными карбоксилатными ионами вместе с белковыми молекулами [178]. Экстракт плодов *Gardenia jasminoides Ellis* (гардения жасминовидная) позволил получить сферические наночастицы Pd размером 3–5 нм. В данном случае ИК-Фурье анализ показал, что антиоксиданты, присутствующие в сыром водном экстракте плодов, участвуют в формировании НЧ Pd, и их свойства – размер, форма и дисперсность – изменялись в зависимости от температуры [179]. Другие примеры включают экстракты клубней *Gloriosa superba* (глюриоза роскошная) [180], листьев *Parthenium hysterophorus* (партениум позднеплодный) [181] и семян *Piper nigrum* (перец чёрный) [182], были получены небольшие сферические наночастицы с узким распределением размера 5–8 нм, 2–6 нм и 2–7 нм, соответственно. Применение растительных экстрактов позволяет получать и более крупные сферические наночастицы Pd с широким распределением по размерам. Средний размер наночастиц Pd, полученных из экстракта кожуры плодов *Annona squamosa* L. (аннона

чешуйчатая) [183] и экстракта кожуры *Citrullus lanatus* (арбуз обыкновенный) [184], составляли 80 нм и 96 нм, соответственно. Широкий диапазон распределения наночастиц палладия был получен при применении экстрактов листьев *Pelargonium graveolens* (пеларгония душистая) [185] и *Prunus* × *yedoensis* (гибрид вишневого дерева *Prunus speciosa* и *Prunus pendula* f. *ascendens*) [186] 50–140 нм и 50–150 нм, соответственно. Причина, по которой одни растительные экстракты дают НЧ Pd с узким распределением по размерам, а другие – с широким, пока остаётся неизвестной. Предполагают, что широкий диапазон размера НЧ обусловлен присутствием нескольких биомолекул, при этом каждая может действовать как восстановитель металла и стабилизатор наночастиц одновременно, приводя к образованию НЧ Pd определённого размера.

Форма полученных с помощью растений НЧ не ограничивается сферическими частицами. Так были получены НЧ Pd цилиндрической формы размером 1–9 нм, используя экстракт коры *Bauhinia variegata* (баухиния пёстрая) [187]. Применяя экстракт листьев *Lithodora hispidula* (Sm.) Griseb (литодора короткощетиноквая), сформированы 22 нм стержнеобразные наночастицы палладия [188]. С помощью экстракта листьев *Rubus glaucus* Benth. (ежевика обыкновенная) получены 55–60 нм наночастицы Pd декаэдрической формы [189], а из экстракта плодов *Terminalia chebula* (терминалия хебула) – 80–100 нм кубической формы [190]. Несферическая форма биологически синтезированных НЧ Pd в этих примерах объяснялась биомолекулами, выступающими в качестве восстановителей и стабилизирующих агентов, или специфическими условиями реакции. Только в некоторых случаях конкретное вещество или вещества, являющиеся восстановителями Pd²⁺ до Pd(0), были идентифицированы или по крайней мере исследованы достаточно подробно. Для экстракта листьев *Sapium sebiferum* (сальное дерево/сапиум салоносный) в качестве восстановителя Pd²⁺ было предложено фенольное соединение 6-О-галлоилл-D-глюкоза, используя его сформированы сферические НЧ Pd размером 5 нм [191]. Для экстракта листьев *Glycine max* (соя культурная) в качестве основного восстановителя Pd²⁺ установлена и выбрана аминокислота тирозин (получены сферические НЧ Pd размером 15 нм) [192].

Таким образом, применение экстрактов растений позволяет получить и стабилизировать наночастицы, разных форм и размеров. Однако использование клеток и веществ из растений затруднено необходимостью длительного культивирования и последующей переработки растительной биомассы (которая может быть загрязнена ионами металлов из почвы). Кроме того, вещества из экстрактов могут выступать в роли стабилизаторов наночастиц, но не являются их носителями, что может в условиях реакции отразиться на стабильности работы катализатора. Также «экстракт» подразумевает под собой смесь нескольких веществ, которые прореагировать с исходными веществами реакционных смесей, или привести к образованию побочного продукта

в ходе реакции. Поэтому используют дрожжи, грибы, водоросли и бактерии, как участников процесса формирования и стабилизации наночастиц, так и носителей в реакционной смеси.

1.5.2 Дрожжи, грибы и водоросли в биологическом формировании наночастиц

Помимо растений и бактерий такие организмы, как водоросли, дрожжи и грибы, также способны биологически синтезировать НЧ Pd различных размеров и форм (Таблица 1).

Таблица 1. Другие (помимо растений и бактерий) организмы и вещества биологической природы, использованные для синтеза наночастиц Pd [123]

	Организм/вещество	Размер наночастиц, нм	Форма наночастиц	Прекурсор Pd
Водоросли	<i>Botryococcus braunii</i>	2–7	Неправильная	Pd(OAc) ₂
	<i>Chlorella vulgaris</i>	5–20	Сферическая	PdCl ₂
	<i>Dictyota indica</i>	19		Na ₂ [PdCl ₄]
	<i>Padina boryana</i>	5–20		
	<i>Sargassum bovinum</i>	5–10	Октаэдрическая	PdCl ₂
	<i>Sargassum ilicifolium</i>	60–80	Сферическая	
	<i>Spirulina platensis</i>	10–20		
Дрожжи	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32	Гексагональная	Pd(OAc) ₂
Грибы	<i>Agaricus bisporus</i>	13–18	Треугольная	Pd(OAc) ₂
	<i>Agaricus bisporus</i>	1,7	Сферическая	PdCl ₂
Вещества биологической природы	Аскорбиновая кислота	13–33		
	Аскорбиновая кислота и хитозан	30	«Цветочная»	PdCl ₂
	Глюкоманнан	6	Сферическая	
	Глюкозамин	3–9		
	Глюкоза	15		Pd(OAc) ₂
	Глюкоза и крахмал	1–20	Квази-сферическая и октаэдрическая	Na ₂ [PdCl ₄]
	Гуаровая камедь	70–80	Сферическая	PdCl ₂
	Камедь акации	9		
	Мёд	5–40	Неправильная	
	Гиалуроновая кислота	1,5–5	Сферическая	Na ₂ [PdCl ₄]
	Лентинан	2–5		
	Лигнин	16–20		
	Окситоцин	15–20	Многоугольная	PdCl ₂
	Прополис	3	Нерегулярная	
	Дифосфат квартецина	100–300	Сферическая	H ₂ [PdCl ₄]
	Альгинат натрия	2		
Сахароза	4,3	Na ₂ [PdCl ₄]		

	Организм/вещество	Размер наночастиц, нм	Форма наночастиц	Прекурсор Pd
	Дубильная кислота	11,3		PdCl ₂
	Ксантановая камедь	10		

Несколько видов водорослей были успешно использованы для получения биогенных наночастиц Pd: *Botryococcus braunii* размер полученных НЧ 2–7 нм [193]; *Chlorella vulgaris* (хлорелла) – сферические НЧ размером 5–20 нм [194]; *Dictyota indica* (диктиота индика) средний размер 19 нм, форма сферическая [195]; *Padina boryana* (падина борьяна, бурая водоросль) 5–20 нм [196]; *Sargassum bovinum* (саргассум бовиниум) октаэдрической формы размером 5–10 нм [197]. Дрожжи и грибы также могут быть использованы для биосинтеза наночастиц палладия. С помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи) были получены гексагональные НЧ Pd размером 32 нм [198] а из экстракта плодов гриба *Agaricus bisporus* (шампиньон двуспоровый) – треугольные наночастицы Pd размером 13–18 нм [199]. По всей видимости наличие в клетках дрожжей, водорослей, грибов веществ крупных биологических молекул способствует стабилизации размера наночастиц, т. к. большая часть наночастиц представленная в работах из Таблицы 1 обладают более узким диапазоном распределения размеров наночастиц и имеется тенденция к образованию небольших наночастиц или их агрегатов (размером 2–20 нм).

Альтернативой экстрактам растений или микроорганизмам для биологического синтеза НЧ Pd могут быть использованы специфические биологические материалы или вещества (Таблица 1). Применение отдельных веществ с одной стороны позволяет избавиться от «неопределённости», которая возникает при использовании экстрактов или организмов, с другой стороны не всегда вещество способное восстановить металл из соли, способно стабилизировать размер наночастиц. Поэтому на ряду с отдельным веществом могут использовать и биологические субстанции, представляющие собой смесь веществ. Например, применение гуаровой камеди позволяет получить сферические НЧ Pd размером 70–80 нм [200], камедь акации – сферические НЧ размером 9 нм [201], а ксантановая камедь – сферические НЧ размером 10 нм [202]. Кроме того, используя глюкозамин [203] и глюкоманнан [204], получали сферические НЧ Pd размером 3–9 нм и 6 нм, соответственно. Данные вещества одновременно действовали, как восстановитель и стабилизатор при формировании наночастиц Pd, благодаря своим функциональным и структурным свойствам [204].

Использование продуктов кислотно-щелочной обработки сахарозы [205] в качестве восстановителей Pd²⁺ позволило получить сферические наночастицы Pd со средним размером 4,3 нм соответственно. Смесь глюкозы и крахмала использовали, чтобы сформировать квазисферические и октаэдрические наночастицы размером 1–20 нм Система, состоящая из

глюкозы и крахмала может быть эффективной, т. к. глюкоза действует в качестве восстановителя, а крахмал – в качестве стабилизатора [206]. Применение сахаров в биологическом синтезе наночастиц палладия требует наличие стабилизирующего агента для получения узкого распределения размеров и предотвращения их агломерированию. К примеру, проводя формирования наночастиц Pd с глюкозой для стабилизации применяли гидроксид тетрабутиламмония [207].

Помимо полисахаридов, для синтеза наночастиц палладия Pd успешно использовали и другие биологические соединения, такие как витамины и гормоны. Аскорбиновая кислота является хорошо известным восстановителем, и её использование в качестве восстановителя вместе с альгинатом натрия в качестве стабилизатора позволило получить сферические НЧ Pd размером 13–33 нм [208]. Многоугольные наночастиц палладия размером 15–20 нм сформированы с использованием гормона окситоцина, в этом случае аминокислоты, присутствующие в окситоцине, выступали в качестве восстановительного и стабилизирующего агента [209]. Другие биологические материалы были использованы для синтеза наночастиц палладия, включая такие соединения, как гиалуроновая кислота [210], лентинан [211], лигнин [212], альгинат натрия [213] и дубильная кислота [214]. Синтезированные наночастицы Pd имели сферическую форму и размер 1,5–5 нм, 2–5 нм, 16–20 нм, 2 нм и 11,3 нм, соответственно.

Применение отдельных веществ биологической природы требует затрат на получение вещества, его очистку, возможно дополнительные этапы обработки (гидролиз сахаров), и требует наличие стабилизирующего агента в реакционной смеси. В тоже время применение бактерий для биосинтеза наночастиц Pd не требует сложных процедур очисток клеток, их проще выращивать, чем водоросли, и быстрее, чем дрожжи, и сами бактерии содержат в своей структуре вещества, которые могут выступать и в качестве восстановителей Pd²⁺ и в качестве стабилизатора наночастиц Pd.

1.5.3 Формирование наночастиц с использованием бактериальных клеток

Применение для формирования наночастиц и в качестве носителей быстрорастущих бактерий является перспективным направлением исследований. Это обусловлено быстрым ростом биомассы клеток, низкими энергозатратами (до 65 МДж/кг для аэробных бактерий) и возможностью автоматизации культивирования биомассы, структуры клеток генетически детерминированы, каждая клетка является копией другой, что может обеспечить хорошую воспроизводимость поверхности носителя. Клетки микроорганизмов в качестве носителя применяли для наночастиц палладия [38, 167, 215–217] (Таблица 2).

Таблица 2. Получение наночастиц Pd с применением бактерий[123]

Бактерия	Расположение НЧ	Размер НЧ, нм	Форма НЧ	Прекурсор Pd
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Вне/внутриклеточное	3,2	Сферическая	$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$
<i>Bacillus benzeovorans</i>	Внутриклеточное	1–8	Икосаэдрическая	$\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$
<i>Bacillus megaterium</i> Y-4	Вне/внутриклеточное	10–40	Сферическая	
<i>Bacillus sphaericus</i>	Периплазматическое пространство	1–6		
<i>Bacillus wiedmannii</i> MSM		10–36	Овальная	
<i>Calothrix pulvinate</i>	Вне/внутриклеточное	3,5	Сферическая	$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$
<i>Citrobacter braakii</i>	Внеклеточное	–	–	$\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$
<i>Citrobacter</i> sp		17–26	Неправильная	$\text{Pd}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$
<i>Clostridium butyricum</i>		–	–	$\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$
<i>Clostridium pasterianum</i>	Вне/внутриклеточное	11,8	Сферическая	
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Периплазматическое пространство	1–25	Сферическая	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Внутриклеточное	1–2	Икосаэдрическая	
<i>Desulfovibrio fructosivorans</i>	Периплазматическое пространство	–	Сферическая	PdCl_2
<i>Escherichia coli</i> MC4100	Вне/внутриклеточное	–	Сферическая	
<i>Escherichia coli</i> BL21	Внутриклеточное	1–5		
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Вне/внутриклеточное	10–25	Неправильная	$\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Периплазматическое пространство	3–30	Сферическая	
<i>Plectonema boryanum</i> UTEX 485	Внеклеточное	1–20		PdCl_2
<i>Pseudomonas putida</i>	Периплазматическое пространство	3–30	Неправильная	$\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		3–10		
<i>Shewanella loihica</i> PV-4	Вне/внутриклеточное	4–10	Сферическая	
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Внеклеточное	2–12		
<i>Staphylococcus sciuri</i>		1–25		

Следует отметить, что диапазон распределения размера наночастиц палладия сформированных и стабилизированных бактериальными клетками меньше у бактериальных клеток, чем при использовании растительных экстрактов. Применение клеток бактерий обеспечивает разнообразную форму наночастиц палладия, что вероятно связано с тем, какие именно компоненты и в каком месте клетки стабилизируют размер наночастиц. Нельзя не отметить, что наночастицы находящиеся после синтеза внутри клеток или в периплазматическом пространстве чаще всего имеют меньший размер. В качестве прекурсора используют преимущественно водорастворимую соль палладия, в виде тетрахлолопалладата натрия (Таблица 3).

Таблица 3. Формирование наночастиц Pd с применением бактерий

Название	Расположение и размер НЧ	Особенности процесса синтеза	Т получения, °С	Предшественник металла
<i>Cupriavidus necator</i> <i>Pseudomonas putida</i> [166]	Внеклеточные 10–500 нм	Использование формиата натрия в качестве донора электронов	30	Na ₂ [PdCl ₄]
<i>Staphylococcus sciuri</i> <i>Cupriavidus necator</i> [218]	Внеклеточные ≤25 нм	Инкубация клеток с солью металла в течение ночи при 30 °С	30	Na ₂ [PdCl ₄]
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> [219]	Внеклеточные 3,3–13,1 нм	Использование H ₂ в качестве донора электронов; подкисленная среда для улучшенной биосорбции заряженных комплекс-ионов палладия.	30	Na ₂ [PdCl ₄] в 0,01 М HNO ₃
<i>Escherichia coli</i> <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <i>Arthrobacter oxydans</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Serratia</i> sp. <i>Shewanella oneidensis</i> [216]	Внеклеточные около 50 нм	Использование H ₂ в качестве донора электронов	25–37	Na ₂ [PdCl ₄]
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> [215]	Внеклеточные 4–12 нм	Предварительное создание бескислородных условий; донор электронов H ₂	30	Na ₂ [PdCl ₄]
<i>Shewanella oneidensis MR-1</i> [220]	Внеклеточные 7,7–54,3 нм	Использование формиата, как донора электронов	30	Na ₂ [PdCl ₄]

Предыдущие исследования [216, 219] показали успешное формирование наночастиц палладия на различных бактериальных штаммах, включая грамотрицательные *Desulfovibrio desulfuricans* NCIMB 8307 [215, 216] и *Escherichia coli* MC4100 [221], *Serratia* sp. NCIMB 40259, *Shewanella oneidensis* MR1 NCIMB 146063 [38] и *Cupriavidis metallidurans* NCIMB 14178 [216], а также грамположительные *Arthrobacter oxydans* NCIMB 10504 и *Micrococcus luteus* NCIMB 9278. Метод, описанный в работе [216], предполагал применение тетрахлооропалладата натрия, как источника металла и водорода в качестве донора электронов. Смесь клеток и Pd подвергалась периодическому встряхиванию при 30 °С в течение 30 минут для усиления биосорбции Pd(II). После этого H₂ (1,2 атм.) пропускали через суспензию в течение 10 минут для восстановления, связанного с клетками Pd(II) до Pd(0), что позволило подготовить катализатор всего за 50 минут

без необходимости проведения стадии сушки. Все методы формирования наночастиц палладия подразумевают контакт клеток с предшественником палладия (солью) и биологическое восстановление Pd из соединения с участием донора электронов.

Можно выделить два подхода формирования и нанесения наночастиц металлов на клетки бактерий. Первый предполагает выращивание клеток в питательной среде, содержащей раствор соли металла [222] и доноры электронов, такие как глюкоза, муравьиная, уксусная, молочная кислоты, аскорбиновая кислота и их соли [223–225]. Предполагается, что ферменты в клетках потребляют эти субстраты, восстанавливая ионы металлов до наночастиц.

Второй подход предполагает использование предварительно выращенной биомассы клеток микроорганизмов [219, 226], которую используют с источником металла и донором электронов [218, 219, 227]. Оба подхода позволяют получать металлические частицы либо внутри клеток [228], либо на их поверхности [229] (Рисунок 5).

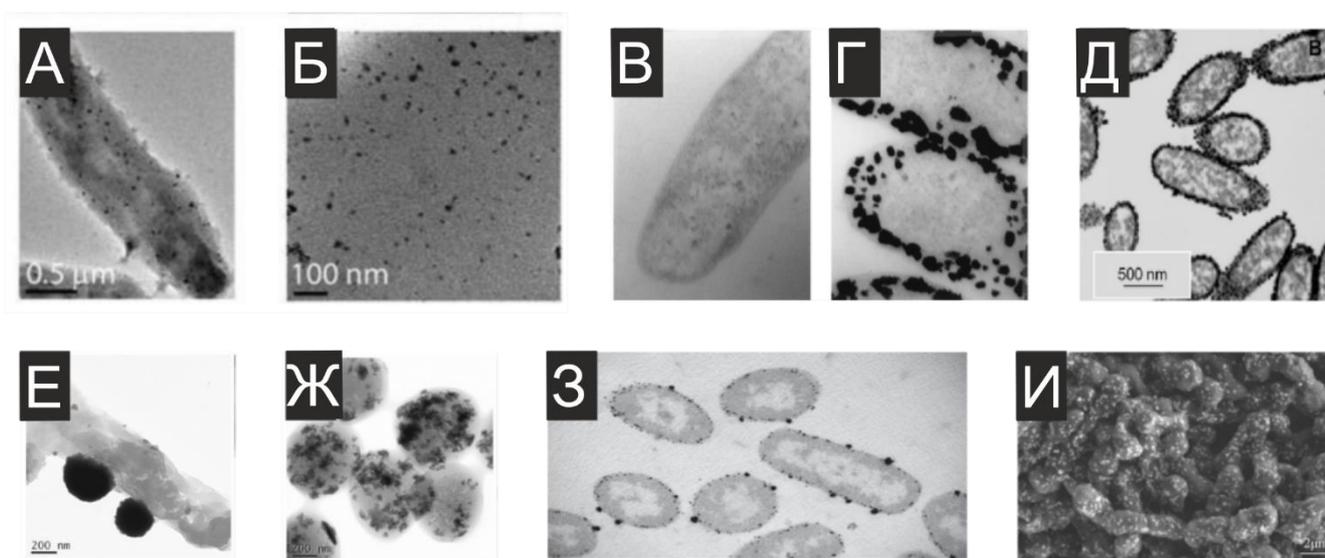


Рисунок 5. Изображения, полученные просвечивающей электронной микроскопией (ПЭМ), сформированных наночастиц палладия на клетках бактерий: А, Б – *Cupriavidus necator* [166]; В, Г – *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 [230]; Д – *Desulfovibrio desulfuricans* [215]; Е, Ж – *Cupriavidus necator* и *Staphylococcus sciuri*, соответственно [218]; З – *Shewanella oneidensis* MR-1 117; И – изображения, полученные сканирующей электронной микроскопией (СЭМ) клеток *Citrobacter freundii* [231]

Т. е. процесс образования наночастиц палладия бактериальными клетками связывают с активностью ферментативных систем бактерий. В настоящее время выдвигают предполагаемый механизм (Рисунок 6) формирования наночастиц Pd на поверхности бактерий и внутри клеток при участии ферментов.

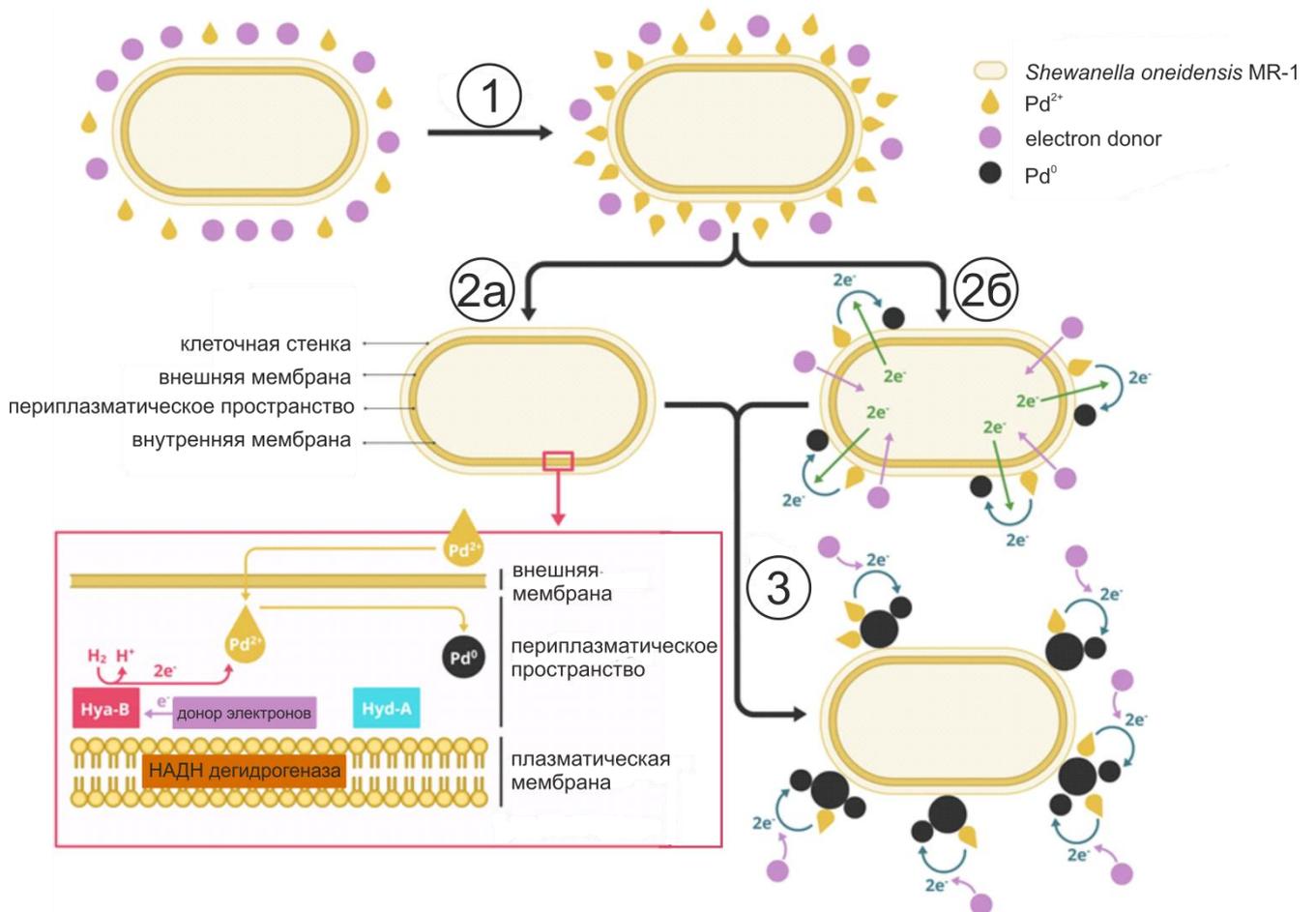


Рисунок 6. Предполагаемый механизм формирования НЧ Pd внутри и вне бактерий *Shewanella oneidensis*: (1) адсорбция Pd^{2+} на клеточной стенке, (2a) превращение Pd^{2+} в $\text{Pd}(0)$ внутри клетки, (2б) на клеточной стенке, и (3) автокаталитическое превращение Pd^{2+} в $\text{Pd}(0)$ вне клетки. Рисунок составлен по мотивам работ [232–234]

Предполагаемый механизм формирования наночастиц палладия клеткой бактерии включает в себя процессы: а) миграция катиона Pd^{2+} (в случае тетрахлооропалладата аниона $[\text{PdCl}_4]^{2-}$) или молекулы предшественника Pd к клетке, посредством диффузии или электростатического взаимодействия между заряженным ионом палладия и заряженными функциональными группами компонентов клеточной мембраны; б) восстановление палладия в исходном соединении или катиона палладия (Pd^{2+}) до $\text{Pd}(0)$; в) стабилизация атома/кластера/наночастицы палладия путём взаимодействия с функциональными группами клеток. Оба процесса могут осуществляться: на внешней мембране клетки [234]; в периплазматическом пространстве клетки и внутри цитоплазматического пространства клетки. На текущий момент затруднительно однозначно сказать, в какой форме Pd проникает в периплазматическое и цитоплазматическое пространство клетки, т. к. внутрь может проникать и восстановленная наночастица Pd, и катион Pd^{2+} . Причём необходимый для проникновения в клетку размер НЧ будет зависеть от её формы и других свойств [235–237]. В процессе

восстановления участвуют ферментные системы клетки, передавая электроны от доноров электрона на ионы металла. В результате происходит образование Pd(0) и формирование наночастиц в межмембранном пространстве клетки или на её поверхности [38].

Ранее [232, 238] высказано предположение, что гидрогеназы (периплазматическая NiFe-гидрогеназа, Fe-гидрогеназа и цитоплазматическая НАД-гидрогеназа) клеток *Desulfovibrio fructosivorans* участвуют в процессе восстановления Pd(II) до Pd(0). В работе использовали мутантные штаммы *Desulfovibrio fructosivorans*: 1) отсутствовала NiFe-гидрогеназа; 2) отсутствовала Fe-гидрогеназа; 3) отсутствовали NiFe-гидрогеназа и Fe-гидрогеназа. В качестве контроля использовали «дикий» (природный) штамм, без генетической модификации. При формировании наночастиц с участием «дикого» штамма агрегаты палладия были обнаружены в периплазматическом пространстве. Если гидрогеназы в периплазме отсутствуют, наблюдали формирование палладия около цитоплазматической мембраны. Авторы делают вывод, что ферменты выступают «сайтами» для инициализации зародышей наночастиц, и, что биологическое восстановление помогает инициировать формирование наночастиц в периплазматическом пространстве клетки.

Показано, [216] что размер и конечное расположение НЧ Pd, продуцируемых бактериями, зависят от штамма, и связано со строением мембраны клетки. При применении грамположительных бактерий, клеточная стенка которых содержит более толстый слой пептидогликана, наночастицы Pd локализованы исключительно на поверхности клеток. В грамотрицательных бактериях напротив обнаружено формирование наночастиц Pd, внутри клеток в периплазматическом и цитоплазматическом пространствах (Рисунок 7). Причём меньший размер наночастиц обычно характерен для расположенных в межмембранном пространстве [239].

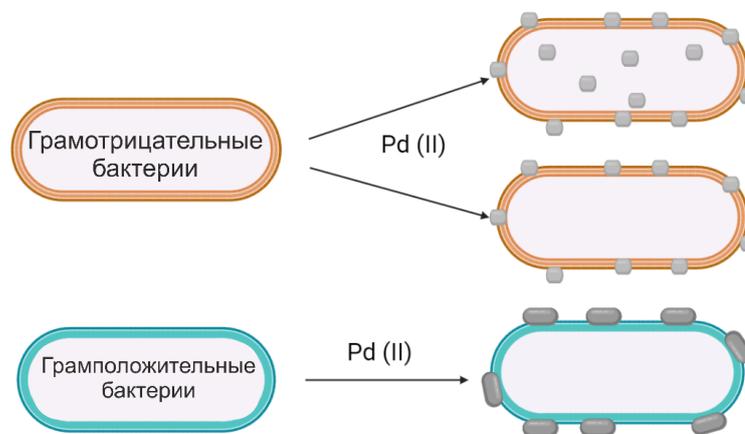


Рисунок 7. Локализация наночастиц при формировании микроорганизмами различных типов

По всей видимости, восстановленный Pd(0) в форме наночастиц – на текущий момент нет информации о присутствии субнаноразмерных кластеров палладия и отдельных атомов Pd в бактерии после формирования – стабилизируется компонентами клеток (белками, нуклеиновыми кислотами), что препятствует дальнейшему росту наночастицы в размере [172].

В тоже время существуют работы, не подтверждающие роли ферментов в формировании наночастиц Pd при использовании клеток микроорганизмов [240]. Одновременно нельзя пренебрегать тем, что возможно происходит параллельный процесс химического восстановления палладия (взаимодействие донора электронов с солью Pd без участия фермента или компонентов клетки) и автокаталитическое восстановление Pd. Учитывая, что разные виды бактерий различаются по способности к сорбции и восстановлению палладия [216], и по всей видимости в процессе формирования наночастиц могут играть роль плазмиды [241], транспортные белки [242] клетки, можно предположить, что существуют несколько механизмов биоформирования и стабилизации НЧ Pd.

Внедрение наночастиц палладия во внутриклеточное пространство или их осаждение на поверхности бактерий позволяет получать нанесённый катализатор без больших энергозатрат, не прибегая к сложным синтетическим методам [38, 230, 243, 244].

Таким образом, показано, что клетки бактерии могут быть использованы для формирования наночастиц Pd и их стабилизации. Быстрый рост бактерий, однородность, обусловленная генетическим аппаратом, возможность автоматизации выращивания биомассы обеспечивают перспективу их использования, как «самовоспроизводимого» носителя для наночастиц Pd.

1.5.4 Применение в катализе наночастиц палладия, полученных с использованием бактериальных клеток

Способность бактериальных клеток к формированию наночастиц, как правило, используют для очистки сточных вод [221, 245]. Применение биосинтезированных наночастиц в катализе встречается гораздо реже [166, 215, 216, 218–220, 246]. Наночастицы палладия на бактериях или полученные НЧ Pd с участием бактерий (био-Pd) использовали, как катализатор (Таблица 4) реакции Сузуки-Мияуры [166, 216, 218, 247, 248], реакции Мизороки-Хека [166, 215, 216, 219], гидрирования [218, 249], восстановления Pt(IV) [231] и для деградации водных загрязнителей [216, 226, 250–253] (Рисунок 8).



Рисунок 8. Применение биосинтезированных наночастиц Pd: А – гидрирование [249]; Б – деградация водных загрязнителей [251]; В – реакции кросс-сочетания [166]

Таблица 4. Применение сформированных с использованием бактерий или на бактериальном носителе наночастиц Pd

Бактерия	Грам-положительная (+) или грам-отрицательная (-)	Реакция	Размер НЧ, нм	Выход продукта, %
<i>Shewanella oneidensis</i> [249]	-	Восстановление 4-нитрофенола до 4-аминофенола	5–25	Выход не указан, конверсия 4-нитрофенола > 95 %
<i>Cupriavidus necator</i> и <i>Pseudomonas putida</i> [166]	-	Сузуки-Мияуры	10–500	≥ 79
		Мизороки-Хека		≥ 53
<i>Staphylococcus sciuri</i> [218]	+	Сузуки-Мияуры	≤ 25	100
		Восстановление 4-хлоробензола		100
<i>Cupriavidus necator</i>	-	Гидрогенизация (E)-3-(4-метоксифенил)-N-метилакриламида		100
				100
				100

Бактерия	Грам-положительная (+) или грам-отрицательная (-)	Реакция	Размер НЧ, нм	Выход продукта, %
<i>Escherichia coli</i> [216]	–	Мизороки-Хек	до 50	67,9–99
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	–			99
<i>Arthrobacter oxydans</i>	+			67,1–99
<i>Micrococcus luteus</i>	+			77,2–99
<i>Serratia sp.</i>	–			95,1–99
<i>Shewanella oneidensis</i>	–			78,4–99
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> [215]	–	Мизороки-Хек (йодобензол + стирол) за 5 ч.	4–12	74,6–84,9
		Мизороки-Хек (йодобензол+этилакрилат) за 4 ч.		93,5–95,5
		Мизороки-Хек (йодобензол+этилакрилат в диметилформамиде за 2 ч.)		96,42
		Мизороки-Хек (йодобензол+этилакрилат в диметилсульфоксиде за 2 ч.)		47,79
<i>Shewanella oneidensis MR-I</i> [254]	–	Восстановление 4-нитрофенола до 4-аминофенола	10–16	91,6–99,5

В работе [166] (Рисунок 5А и 5В) получали наночастицы палладия на двух штаммах *Cupriavidus necator* ATCC 43291 и *Pseudomonas putida* ATCC 12633 (ATCC – American Type Culture Collection, Американская коллекция типовых культур). Методика формирования наночастиц включала в себя выдерживание в течение нескольких часов клеток микроорганизмов в буфере, приготовленном из 3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоты (MOPS) с формиатом натрия и тетрахлооропалладата натрия. После приготовления получили катализатор, представляющий собой частицы палладия на клетках бактерий. Лучшее распределение по размерам для частиц Pd было получено при использовании штамма *C. necator* (около 50 % частиц размером меньше 10 нм, 7 % размером 11–30 нм, 23 % размером 31–100 нм). Оба катализатора тестировали в реакциях Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры с различными субстратами, как активными арильодидами, так и менее активными бромпроизводными. С йодидаренами были

получены высокие выходы (>79 %) и в реакции Сузуки-Мияуры (Схема 1А и 1Б) и в реакции Мизороки-Хека (Схема 1В и 1Г). Однако, с менее активным 4-бромбензонитрилом не было получено продукта в выбранных условиях в реакции Сузуки-Мияуры (0 %) (Схема 1Д), в отличие от реакции Мизороки-Хека (97 %).

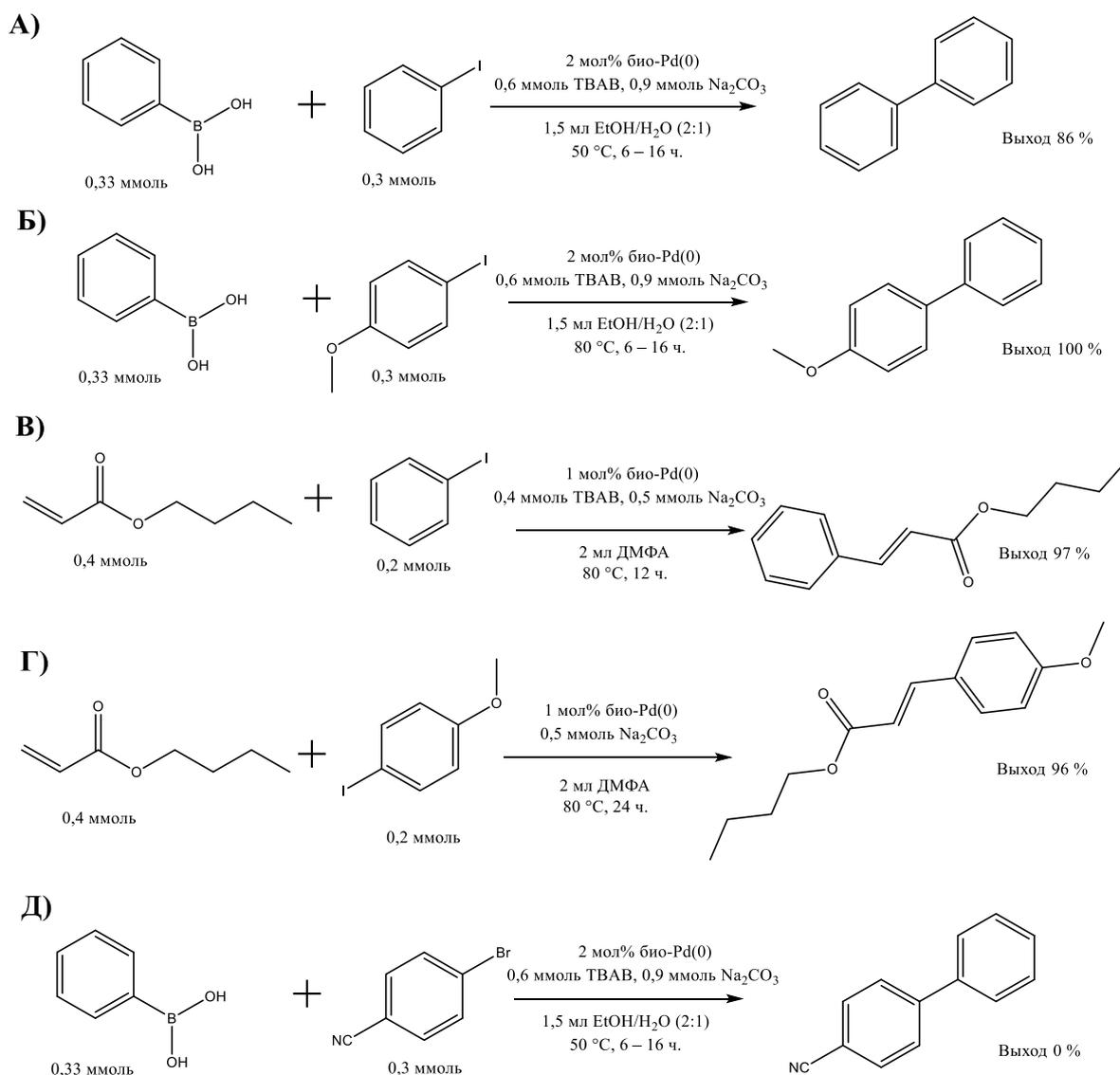


Схема 1. Условия некоторых реакций из работы [166]

Также в работе продемонстрирована принципиальная возможность нанесения Pd с отработанного катализатора на бактериальные клетки, что можно использовать для повторного использования палладия. Использованный в реакции гидрирования катализатор Pd/C обрабатывали «царской водкой», чтобы перевести металл в растворимую форму Pd(II), после чего проводили нейтрализацию и охлаждение раствора, который использовали, как исходный для формирования наночастиц на клетках *S. necator*. Приготовленный таким образом

катализатор обеспечил 90 % выход продукта *n*-бутил(*E*)-3-(4-метоксифенил)акрилата в реакции Мизороки-Хека.

Опубликованы исследования [215, 216] по формированию наночастиц Pd с помощью клеток микроорганизмов рода *Desulfovibrio*, облигатно анаэробных сульфатредуцирующих бактерий. Выращивание биомассы клеток и приготовление катализатора проводили в анаэробных условиях с использованием тетрахлолопалладата натрия в качестве источника палладия. Катализатор, полученный с использованием *Desulfovibrio desulfuricans*, тестировали [215] в реакциях Мизороки-Хека взаимодействия йодбензола с этилакрилатом или стиролом в сравнении с стабилизированными коллоидными наночастицами палладия. Авторы отмечают высокую конверсию исходного вещества при применении катализатора Pd/био 25 масс% и сопоставимую начальную (нормированную к массе Pd) скорость образования продукта. Максимальная нормированная скорость и выход продукта при сочетании йодбензола и стирола была получена в условиях, представленных на Схеме 2

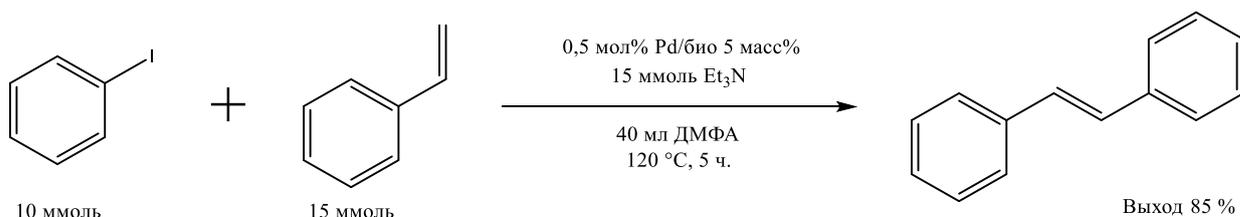


Схема 2. Условия реакции Мизороки-Хека из работы [215]

Проварьировав различные растворители в реакции с этилакрилатом, авторы получили невысокие (меньше 10 %) конверсии и скорости образования продукта при использовании неполярных растворителей, по их мнению, это согласуется с тем, что применение неполярных растворителей приводит к меньшему вымыванию (leaching) палладия с носителя [255]. Т. о. выбор растворителя влияет на образование продукта при применении биологического носителя. Дополнительно продемонстрировано, что катализатор на биологическом носителе способен дольше поддерживать свою каталитическую активность, т. к. меньшее (по сравнению с носителем – активированным углём) количество палладия перешло с носителя в реакционную смесь и после 6-ти циклов реакции Мизороки-Хека размер наночастиц в катализаторе Pd на *Desulfovibrio desulfuricans* увеличился в 5 раз (до примерно 20 нм), в то время как после одного цикла реакции Мизороки-Хека размер наночастиц на активированном угле может увеличиться от 2,4 нм до 23 нм [255]. Такую способность биологического носителя стабилизировать размер наночастиц исследователи связывают с взаимодействием металла с функциональными группами периплазматических дегидрогеназ.

В гидрировании пент-2-ина и соевого масла [256] посредством катализаторов Pd/*E. coli*, Pd/*D. desulfuricans* и Pd/Al₂O₃ (катализатор сравнения) обнаружено, что происходит более селективное образование *цис*-пент-2-ена при использовании катализаторов на биологическом носителе по сравнению с катализатором на оксиде алюминия. При гидрогенизации соевого масла Pd/*E. coli* продемонстрировал меньшую скорость конверсии линолевой (*цис*-C18:2) кислоты, чем Pd/Al₂O₃, но с более низкой *цис*-/*транс*-изомеризации и полной гидрогенизацией до ненасыщенной двойной связи на активных участках.

Наночастицы палладия использовали, как катализатор реакции гидрирования бутин-1,4-диола [219] (Схема 3). Использовали анаэробно выращенную биомассу клеток *Desulfovibrio desulfuricans* NCIMB 8307 (NCIMB – National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria, Национальная коллекция промышленных, пищевых и морских бактерий).

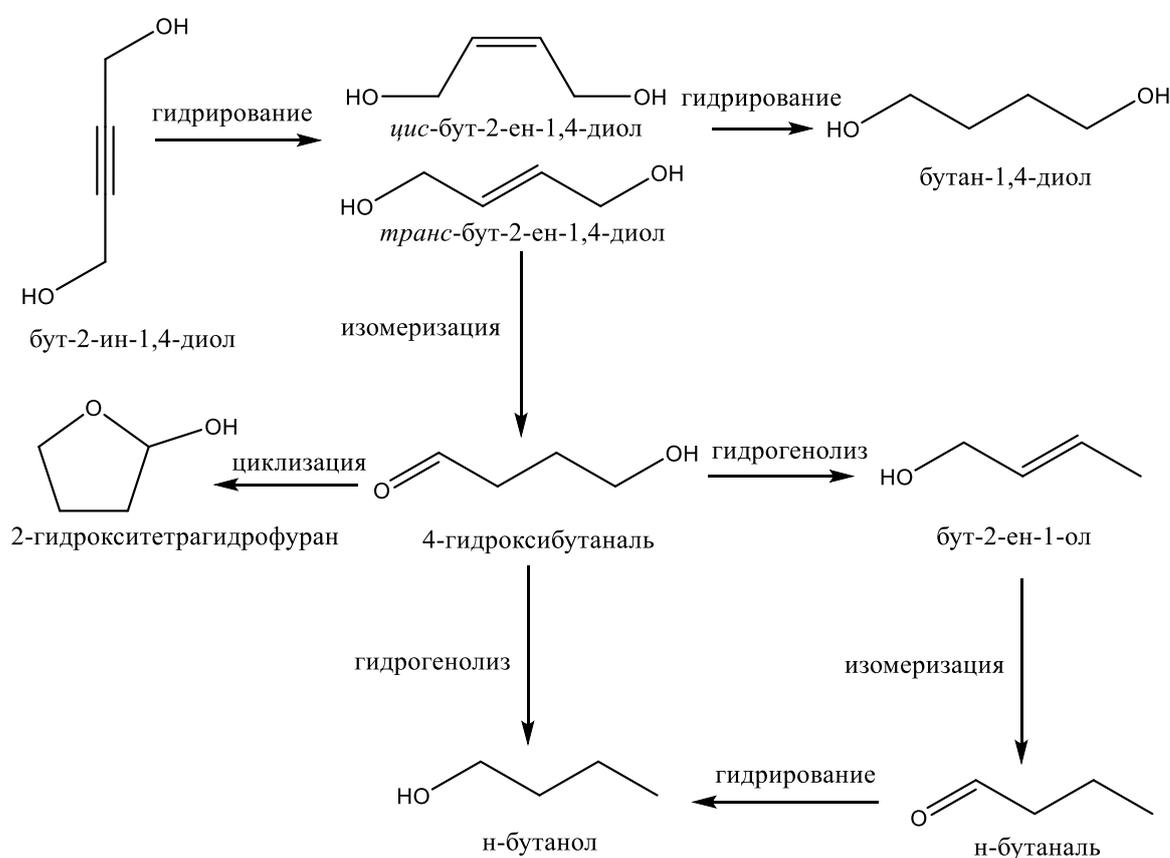


Схема 3. Пути образования веществ при гидрировании бут-2-ин-1,4-диола [219]

Коммерческий катализатор Pd/Al₂O₃ продемонстрировал более высокую скорость гидрирования, т. к. за первый час был израсходован весь исходный субстрат. В то время, как через 4 ч. катализа Pd/*D. desulfuricans* осталось около 23 % от исходной загрузки бут-2-ин-1,4-диола. Но отмечено более селективное образование ненасыщенного бут-2-ен-1,4-диола при использовании катализатора Pd/*D. desulfuricans*, по сравнению с коммерческим катализатором

Pd/Al₂O₃. Авторы связывают рост селективности с взаимодействием палладия с элементами функциональных групп компонентов клетки, серой и фосфором, и возможной формой наночастиц Pd сформированных на биологическом носителе. В этой же работе был получен катализатор, представляющий собой Pd/*D. desulfuricans*, который термически обрабатывали выдерживанием в течение 1 часа при 960 °С и вакууме ($8 \cdot 10^{-5}$ мбар), получая таким образом катализатор, представляющий собой Pd на сферах из отожжённых клеток. Термически обработанный катализатор продемонстрировал ещё большую селективность образования алкена в ходе гидрирования. Однако, такой термически обработанный катализатор был неактивен в реакции Мизороки-Хека взаимодействия йодбензола и этилакрилата (выход продукта 0–5 %) в отличие от применённого Pd/C и Pd/*D. desulfuricans* (около 90 %).

Таким образом ранее были получены катализаторы, представляющие собой наночастицы Pd на бактериальных клетках. Проведены тесты, где показана принципиальная возможность применения таких катализаторов в реакциях C-C сочетания, гидрирования, деградации загрязнителей. Показано, что бактерии способны стабилизировать размер наночастиц. Однако, чаще всего используют клетки анаэробных бактерий, выращивание и использование которых требует бескислородных условий, что усложняет производство. Также работ, посвящённых изучению каталитической активности и селективности образования продукта при использовании НЧ Pd на бактериальных клетках немного, т.к. часто реакции осуществляли в течение определённого времени, не анализируя кинетику образования продукта. Остаются неизвестными причины более селективного образования того или иного продукта в ходе реакции. Неизвестен точный механизм формирования наночастиц бактериальными клетками, что не позволяет проводить генетическую модификацию клеток с целью управления свойствами катализатора. В принципе, на текущий момент не установлена взаимосвязь между структурами бактерии, её метаболизмом и свойствами катализатора, представляющего собой наночастицы Pd на клетках.

1.6 Наночастицы палладия на бактериях и соответствие принципам «зелёной» химии

Преимуществом формирования наночастиц палладия с помощью бактерий является соответствие принципам «зелёной химии» [257]. Так как в процессе приготовления катализатора образуется минимальное количество отходов, представляющих собой водные растворы с незначительным остаточным содержанием палладия [159], которые в дальнейшем можно использовать для повторного получения наночастиц при использовании микроорганизмов, тем самым минимизировать или исключить потерю ценного металла. В синтезе применяют безопасные соединения, растворитель при формировании – вода. Исключается образование побочных продуктов. В отличие от химических и физических методов, биологическое формирование не требует жёстких условий и менее вредно для окружающей среды. Исходные

компоненты воспроизводимы, клетки бактерий выращивают, а в качестве питательной среды для их роста можно использовать отходы пищевых производств. Культивирование клеток и приготовление катализатора требует температур меньших [38], чем при карбонизации или активации углеродных носителей, или при восстановлении Pd^{2+} после пропитки носителя в атмосфере водорода. При этом готовый катализатор обладает свойствами не уступающими коммерчески доступным катализаторам [123], и при утилизации не будет генерировать токсичных отходов. В сумме биологическое формирование наночастиц палладия и применение бактерий в качестве носителя соответствует 9 из 12 принципам зелёной химии.

1.7 Заключение

Разработка эффективных катализаторов необходима для развития промышленных процессов при одновременном сокращении отходов и энергопотребления. Альтернативой уже существующим носителям из углеродных материалов или оксидов элементов являются клетки бактерий. Это самовоспроизводимый носитель, который не требует больших температур и длительного времени для производства. Каждая дочерняя клетка бактерии является копией материнской клетки, что обеспечивает хорошую воспроизводимость свойств поверхности носителя. Процесс приготовления катализатора на бактериальных клетках относительно простая процедура, при этом размер наночастиц остаётся в достаточно узком диапазоне. Показано, что Pd/бактерии способны катализировать реакции с количественными выходами. Всё это обеспечивает перспективы применения бактериальных клеток для формирования наночастиц палладия и их стабилизации в качестве носителей.

Глава 2 Материалы и методы

2.1 Реагенты и исходные вещества

Приобретенные реагенты перед использованием проверяли методом ЯМР и при необходимости очищали стандартными методами [258]. Спектры ядерно-магнитного резонанса регистрировали на спектрометре Bruker AVANCE DRX 500 (Германия) при частоте 500,13 МГц (^1H) и спектрометре Bruker Fourier 300 HD при частоте 300,1 МГц (^1H) с остаточным пиком растворителя в качестве внутреннего стандарта. Спектры обрабатывали с помощью программы MestReNova. Хромато-масс-спектрометрию проводили на: квадрупольном приборе Маэстро- α (Интерлаб, Россия) с источником электронной ионизации (EI-MS) с вводом пробы через газовый хроматограф Кристаллюкс-4000М (Мета-Хром, Россия), энергия ионизации 70 эВ.

В работе использовали следующие вещества: пептон (Molekula Ltd., Великобритания), дрожжевой экстракт (Bio Springer, Франция), агар-агар (BIO-RAD, Франция), NaCl ($\geq 99\%$, Хеликон, Россия), йодбензол (Sigma-Aldrich, США), фенилбороновая кислота (Alfa aesar, США), стирол (Sigma-Aldrich, США), K_2CO_3 (ABC R GmbH & Co. KG, Германия), диметилформамид (Sigma-Aldrich, США), бутилакрилат (Acros Organics BM, Бельгия), бромбензол (Acros Organics BM, Бельгия), 4-метил-фенилбороновая кислота (Acros Organics BM, Бельгия), 1-йод-4-нитробензол (Acros Organics BM, Бельгия), 1-йод-4-метоксибензол (Acros Organics BM, Бельгия), 4-йодо-метилбензоат (Acros Organics BM, Бельгия), 1-бром-4-нитробензол (Acros Organics BM, Бельгия), диметилформамид (ООО Компонент, Россия) этанол (Медхимпром, Россия), ацетонитрил (ООО Компонент-реактив, Россия), ацетонитрил HPLC (Acros Organics BM, Бельгия), глюкоза (ООО Компонент-Реактив, Россия), дифенилацетилен (Sigma-Aldrich, США), метиленовый синий (Sigma-Aldrich, США), 1,4-динитробензол (Acros Organics BM, Бельгия), диэтиловый эфир (Медхимпром, Россия), этилацетат (НПП Гамма, Россия), Pd/C 5 масс.% (Acros organics, Бельгия), Pd/C 1 масс.% (Sigma-Aldrich, США), ацетат палладия (Fluorochem, Великобритания), дейтерированный хлороформ (Carl Roth GmbH & Co. KG, Германия), дейтерированная вода (Solvex, Россия), дейтерированный диметилформамид (Carl Roth GmbH & Co. KG, Германия), дейтерированный ацетон (Carl Roth GmbH & Co. KG, Германия), динитробензол (Acros Organics BM, Бельгия), N-метил-2-пирролидон (АО «База № 1 Химреактивов», Россия), натриевая соль 2,2,3,3- d_4 -3-(триметилсилил)-пропионовая кислота (Sigma-Aldrich, США), тетраметилсилан (Sigma-Aldrich, США), триэтиламин (Sigma-Aldrich, США), фторид натрия (РусХим, Россия), поливиниловый спирт марки 16/1 (ООО Полимер, Россия), метилтриэтоксисилан (Sigma-Aldrich, США) тетраэтоксисилан (Sigma-Aldrich, США).

2.2 Модельные реакции Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры

Модельными реакциями выбраны: реакция Мизороки-Хека – арилирование стирола йодбензолом в диметилформамиде (ДМФА), в качестве основания использовали карбонат калия; реакция Сузуки-Мияуры – взаимодействие йодбензола и фенилбороновой кислот в 80 об.% водном растворе этанола. В качестве катализатора использовали коммерческий катализатор палладий на активированном угле (Pd/C 5 масс.%).

2.2.1 Модельная реакция Мизороки-Хека

Навески веществ последовательно помещали в пробирки с завинчивающимися крышками и магнитными якорями Pd/C 5 масс% – 0,005 ммоль (1 мол%); карбонат калия – 0,6 ммоль (1,2 экв.). Добавляли 5 см³ диметилформамида, йодбензол – 0,5 ммоль (1 экв.) и стирол – 0,6 ммоль (1,2 экв.). Реакционную смесь оставляли при температуре 140 °С, перемешивании 1200 об/мин на 5 ч.. По истечении времени проводили выделение продукта, для чего к реакционной смеси Мизороки-Хека добавляли избыток диэтилового эфира и фильтровали через диатомит (Cellit 545) под давлением. После фильтрации раствор перегоняли на роторном испарителе до выделения сухого осадка, который повторно растворяли в диэтиловом эфире, фильтровали через диатомит (Cellit 545) под давлением в предварительно взвешенную колбу-приёмник и повторно перегоняли на роторном испарителе. Продукт взвешивали вместе с колбой для определения его массы и расчета выхода реакции. Для подтверждения структуры выделенного вещества и отсутствия посторонних веществ использовали метод ЯМР спектроскопии. Образец продукта растворяли в 0,6 см³ дейтерированного хлороформа (CDCl₃) или дейтерированного ацетона (ацетон-*d*6) и регистрировали спектры ¹H ЯМР.

2.2.2 Модельная реакция Сузуки-Мияуры

Навески веществ последовательно помещали в пробирки с завинчивающимися крышками и магнитными якорями: Pd/C 5 масс% – 0,005 ммоль (1 мол%); фенилбороновая кислота – 0,6 ммоль (1,2 экв.); карбонат калия – 0,6 ммоль (1,2 экв.). Добавляли 5 см³ водного раствора этанола 80 об.% и йодбензол – 0,5 ммоль (1 экв.). Реакционную смесь оставляли на 3 ч. при температуре 80 °С и 1200 об/мин. По истечению времени реакционную смесь Сузуки-Мияуры растворяли в диэтиловом эфире и фильтровали через диатомит (Cellit 545) под давлением. После фильтрации раствор перегоняли на роторном испарителе до полного высыхания. Проводили экстракцию хлороформом, для чего высушенный осадок растворяли в воде и хлороформе, переносили в делительную воронку, перемешивали и оставляли на 20 минут после разделения слоев. Органическую часть собирали в предварительно взвешенную колбу, а в делительную воронку добавляли новую порцию экстрагента (хлороформа). Раствор перемешивали и оставляли

на 20 минут после разделения слоев. Органическую часть собирали. Процесс повторяли три раза. Полученную органическую часть перегоняли на роторном испарителе.

Продукт взвешивали вместе с колбой для определения его массы и расчета выхода реакции. Для подтверждения структуры выделенного вещества и отсутствия посторонних веществ использовали метод ЯМР спектроскопии. Образец продукта растворяли в 0,6 см³ дейтерированного хлороформа (CDCl₃) или дейтерированного ацетона (ацетон-*d*₆) и регистрировали спектры ¹H ЯМР.

2.3 Культивирование бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302. Определение массы клеток после сушки при комнатной температуре

Культивирование бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 осуществляли на питательной среде Lysogeny broth (LB) следующего состава: пептон – 10 г/л; NaCl – 10 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л. Культуру бактерий выращивали в колбах Эрленмейера объемом 750 см³ (объем питательной среды 200 см³) при 28 °С и перемешивании на шейкере-инкубаторе Bios BSI-2 (Китай) 180 об/мин. Через 36 часов культивирования клетки собирали центрифугированием (8000 об/мин, 10 мин., центрифуга MWP-351R Польша) в предварительно взвешенные микропробирки типа «Эппендорф». Сливали надосадочную жидкость. Биомассу клеток хранили при температуре +4 °С.

Биомассу клеток в микропробирке типа Эппендорф взвешивали на аналитических весах (OhausPX 124, 0,1 мг, Китай). Микропробирку с клетками оставляли открытой при комнатной температуре, периодически (1 раз в 24 часа) взвешивая на аналитических весах для определения потери массы клеток после испарения воды и сушки в условиях лаборатории.

2.4 Общая процедура приготовления катализатора Pd/*P. yeii*. Варьирование условий приготовления Pd/*P. yeii*

2.4.1 Общая процедура приготовления катализатора Pd/*P. yeii*

Процедура приготовления катализатора включает в себя использование предварительно выращенной биомассы бактерий, соль палладия и продувка смеси соли и клеток водородом (Рисунок 9).



Рисунок 9. Процедура приготовления катализатора Pd/*P. yeii*: А – смесь ацетата палладия и суспензии клеток; Б – перемешивание смеси; В – перед продувкой водородом; Г – смесь после продувки H₂; Д, Е – высушенный катализатор

Биомассу клеток смешивали с ацетатом палладия в пробирке ($V=14\text{ см}^3$) с дистиллированной водой в соотношении $m(\text{Pd}):m(\text{клеток})$ равном 5:95 (Рисунок 9А) для получения, с учётом последующей потери массы клетками при сушке, катализатора 5 масс% Pd/*P. yeii* и соотношении 0,2:99,8 для получения катализатора 1 масс%: Pd/*P. yeii*. Аргон (чистота 6.0, объемная доля 99,9999%) пропускали через смесь в течение 1 минуты, пробирку закрывали резиновой пробкой и перемешивали в течение 10 минут (180 об/мин; 28 °С, Рисунок 9Б). После (Рисунок 9В), используя генератор водорода (ГВ-12, НПФ «Мета-Хром», Россия), подавали через смесь водород (0,53 мл/мин) в течение заданного времени (Рисунок 9Г). Биомассу клеток с наночастицами палладия собирали центрифугированием (12000 об/мин, 10 мин., ВКС-ТН16Д, Китай) в микропробирки типа «Эппендорф» (Рисунок 9Д). Надосадочную жидкость сливали, осадок катализатора Pd/*P. yeii* оставляли на сушку при комнатной температуре на 48 часов, либо обезвоживали ацетоном/этиловым спиртом/с помощью роторного испарителя (Рисунок 9Е).

2.4.2 Варьирование условий приготовления Pd/*P. yeii*

В ходе работы варьировали следующие условия: предшественник палладия (а); время подачи водорода при барботировании смеси бактерий и соли Pd (б); температура при приготовлении катализатора Pd/*P. yeii* (в); клетки *P. yeii* нативные или термически инактивированные (г). Дополнительно готовили катализаторы с содержанием металла 1, 4,4 и 20 масс% (д). Варьировали условия сушки (е)

Процесс приготовления катализатора полностью повторял пункт 2.4.1 за исключением:

а) использовали нитрат палладия или ацетат палладия. Соотношение $m(\text{Pd}):m(\text{клеток})=5:95$ и 1:99 для получения катализаторов 5 и 1 масс% Pd/*P. yeii* соответственно (в пересчете на сухую массу клеток);

б) подавая через смесь клеток и соли палладия водород (0,53 мл/мин) в течение 0,5; 1; 2; 3; 5 или 10 минут;

в) используя водяную баню с температурой 5, 15, 25, 35, 45, 55 или 65 °С готовили катализатор Pd/*P. yeai* при разных температурах. Достижение температуры выше 25 °С осуществлялось посредством нагревательной плитки с перемешиванием, температуру контролировали посредством термодары. Температуры ниже 25 °С достигали охлаждением водяной бани льдом, контроль температуры осуществляли ртутным термометром. Приготовление катализатора при 25 °С осуществляли без дополнительного нагревания или охлаждения при комнатной температуре;

г) клетки перед приготовлением катализатора подвергали следующим процедурам: суспензию клеток в дистиллированной воде выдерживали при температуре 64 °С в течении 45 минут (пастеризация); суспензию клеток в дистиллированной воде помещали в автоклав на 45 минут, 1,1 атм., 121 °С (автоклавирувание). Пастеризованные, автоклавируванные и нативные (не обработанные предварительно, живые клетки) использовали в приготовлении катализатора по методике, описанной выше в пункте 2.4.1;

д) использовали ацетат палладия и соотношения m (Pd):m (клеток) 1:99, 5:95 и 20:80 для приготовления катализатора с средним содержанием 1, 5 и 20 масс.%;

е) тестировали следующие методы сушки/дегидратации приготовленного по пункту 2.4.1 катализатора: сушка при комнатной температуре 48 ч.; промывка ацетоном (3×10 мл); промывка этанолом (3×10 мл); сушка на роторном испарителе. Дополнительно готовили и сразу же использовали в реакции катализатор без этапа дегидратации.

2.4.3 Холостой опыт

Для холостого опыта проводили приготовление катализатора в отсутствие бактерий *P. yeai*. В колбу (25 см³) взвешивали навеску ацетата палладия 8,5 мг, добавляли 2,5 мл дистиллированной воды. Продувают аргоном 30 с. Перемешивают в течение 10 мин. 180 об/мин. Продувают смесь воды и ацетата палладия водородом в течение 2 мин. (0,53 мин). На роторном испарителе высушивают, и оставляют на 48 часов. После чего в колбу добавляют компоненты смеси реакции Мизороки-Хека (1-йодо-4-нитробензол 3,76 ммоль; 18,8 см³ *N*-метилпирролидона; 4,512 ммоль стирола и 4,512 ммоль триэтиламина), вместо катализатора используя полученный выше восстановленный ацетат палладия (загрузка 1 мол%), и осуществляют реакцию при 140 °С в течение 5 ч.. После отбирают 0,01 см³ реакционной смеси и анализируют методом ХМС (пункт 2.13).

Для получения изображений ПЭМ приготовленного в отсутствие клеток катализатора готовили образец следующим образом: взвешивали 17 мг ацетата палладия в пробирку, добавляли 10 см³ дистиллированной воды, продували аргоном 30 с., перемешивали в течение 10 мин. 180 об/мин. После подавали в течение 2 мин. водород, распределяли смесь по

эппендорфам и центрифугировали (10000 об/мин, 10 мин., ВКС-ТН16D, Китай). Надосадочную жидкость сливали, осадок сушили в течение 48 ч. при комнатной температуре. Образцы приготовленного в отсутствие клеток катализатора наносили на сетки для получения изображений ПЭМ, для чего добавили ацетон, переводили осадок в смесь, наносили на сетки для ПЭМ и подсушивали на воздухе, после чего получали ПЭМ изображения (пункт 2.6.3).

2.5 Приготовление срезов

Срезы свежеприготовленного катализатора Pd/P. *yeei*, Pd/P. *yeei*@ORMOSIL и бактериальных клеток готовили по следующей методике. Образец катализатора или клеток фиксировали в 2 % растворе глутарового альдегида в 0,05 М какодилатном буфере (pH 7,2) в течение 1 ч при +4 °С. После образец трижды промывали 0,05 М какодилатным буфером (pH 7,2). Обезвоженный образец в агаровых блоках покрывали эпоксидной смолой Epon 812 и резали с помощью ультрамикротомы Reichert-Jung UltraCut E (Германия). Срезы помещали на медные решетки для просвечивающей электронной микроскопии. Образцы катализатора Pd/P. *yeei* из реакционных смесей после реакции, осаждали из суспензии в изопропанол на поверхность медных ТЭМ-решеток с углеродным покрытием.

2.6 Исследования методами микроскопии

2.6.1 Сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ (РСМА)

Перед проведением сканирующей электронной микроскопии и рентгеноспектрального микроанализа образец (влажные клетки *P. yeei* или катализатор Pd/P. *yeei* или катализатор Pd/P. *yeei*@ORMOSIL) наносили на двусторонний углеродный скотч, прикрепленный к стандартному алюминиевому столику диаметром 2,54 см. Образцы высушивали в вакууме (10^{-4} мбар, 5 минут) и покрывали пленкой углерода толщиной 15 нм (Cressington 208, Великобритания). СЭМ исследования проводили на сканирующем электронном микроскопе с полевой эмиссией (Hitachi Regulus 8230 (SU8230), Япония). Изображения получали в режиме обратно отражённых электронов (композиционный контраст) при ускоряющем напряжении 10 кВ. РСМА осуществляли на сканирующем электронном микроскопе с полевой эмиссией Hitachi SU8000 (Япония), оснащённом энергодисперсионным рентгеновским спектрометром Oxford Instrument X-Max 80 (Великобритания). Спектры РСМА получали при ускоряющем напряжении 20 кВ.

2.6.2 Сканирующая электронная микроскопия в просвечивающем режиме (светлое поле) (СПЭМ) катализатора Pd/P. *yeei* и его срезов

Изображения сканирующей электронной микроскопии в режиме прошедших электронов получали с использованием сканирующего электронного микроскопа с полевой эмиссией Hitachi Regulus 8230 (SU8230, Япония). Наблюдение и съёмку осуществляли в режиме прошедших электронов (светлое поле) при ускоряющем напряжении 30 кВ. Для статистического анализа изображений использовали программу Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, США).

2.6.3 Просвечивающая электронная микроскопия срезов катализатора Pd/P. *yeei* и обработка полученных изображений

Срезы изучали на просвечивающем электронном микроскопе Hitachi HT7700 (Hitachi, Япония). Изображения получали в режиме ярко-полевой просвечивающей электронной микроскопии при ускоряющем напряжении 100 кВ. Распределение наночастиц по размерам определяли с помощью программы ImageJ PRO и облачного сервиса DLgram для анализа микроскопических изображений [259].

Обнаружение наночастиц проводили с помощью библиотеки OpenCV [259] в два этапа: получение карты примерного расположения наночастиц и последующий поиск контуров наночастиц с фильтрацией по размеру. Для первого этапа были применены следующие операции:

1) адаптивное пороговое выделение с использованием гауссова адаптивного метода для расчета порогового значения. Размер блока был равен 41, а константа C равнялась 7 для изображений с увеличением 100 тыс. и более и 12 для изображений с увеличением 20 тыс. или 50 тыс. Этот метод бинаризации был выбран из-за лучших результатов для изображений с переменной освещенностью и высокой контрастностью.

2) Морфологические преобразования: расширение с ядром (5, 5) и эрозия с ядром (3, 3) для уменьшения шума в бинаризованном изображении.

3) Медианный фильтр размытия с ядром (5, 5) для дополнительного сглаживания изображения.

Бинаризация изображений с разным увеличением была реализована разными способами. Если изображение имело увеличение 100 тыс. раз и более, то метод применяли ко всему изображению. В противном случае, при увеличении 20 или 50 тыс. раз, процедуру проводили для каждого из восьми участков изображения, предварительно увеличенного в 3 раза с помощью бикубической интерполяции.

Вторым шагом была реализация поиска контуров. Для каждого контура находили выпуклый корпус, и если площадь контура составляла менее 70 % от его площади, то соответствующий контур заменялся выпуклым корпусом.

Затем для каждого контура находилась минимальный объемлющий круг, диаметр в нанометрах и координаты центра. Эта информация использовалась для фильтрации контуров по линейному размеру. Результатом этого этапа являются два массива: массив контуров и массив наночастиц, содержащий данные о расположении и размере наночастиц.

Было проведено обнаружение наночастиц на клетках и в окружающем растворе. Для этого была проведена сегментация клеток с помощью алгоритма Cellpose3 [260] (модель "cyto3"). Затем полученные маски сегментации использовались для определения наночастиц на клетках и свободных наночастиц: центр наночастицы проверялся на принадлежность к области с клетками.

2.6.4 Флуоресцентная микроскопия (ФМ) образцов

Состояние клеток (живые и мертвые) определяли, используя набор для оценки жизнеспособности бактерий LIVE/DEAD™ BacLight™ (Molecular Probes). Краситель (1 мкл) из набора добавляли к 0,5 мл образца. Образцы исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии на приборе AXIO Imager A1 (Zeiss, Германия) с набором фильтров 56HE (Zeiss) при длинах волн 470 нм (возбуждение) и 512 нм+630 нм (эмиссия). Съёмку образца осуществляли с помощью камеры AxioCam 506 (Zeiss).

2.7 Определение содержания Pd в катализаторе методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой

Навеску образца растворяли в определённом объёме концентрированной азотной кислоты и осуществляли количественное определение содержания элементов в растворе на оптико-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой ОЭС-ИСП Varian 710-ES (Agilent, США) при следующих условиях: мощность плазмы 1,20 кВт, поток плазмы 15,0 л/мин, аксиальный поток 1,5 л/мин.

2.8 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия палладия в катализаторе Pd/P. *yeei*

Твёрдые образцы катализатора Pd/P. *yeei* 4,4 масс.% анализировали методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии. Исследования РФЭС провели на спектрометре OMICRON ESCA+ (Швеция) с алюминиевым анодом, оснащённом источником монохроматического рентгеновского излучения Al K α XM1000 (с энергией излучения 1486,6 эВ и мощностью 252 Вт). Регистрация спектров осуществлялась полусферическим детектором-анализатором Argus (Швеция). Для снятия локального заряда на анализируемой поверхности использовался нейтрализатор заряда CN-10 (Швеция) с силой тока 4 мкА и энергией пучка 1 эВ. Энергия пропускания анализатора составляла 20 эВ. Спектрометр был откалиброван по линии

Au4f 7/2 при 84,1 эВ. Давление в камере анализатора не превышало 10^{-9} мбар. Все спектры накапливались не менее трех раз. Колебания положения пиков не превышали $\pm 0,1$ эВ.

2.9 Активность дегидрогеназы нативных, пастеризованных и автоклавированных клеток

Неспецифическую дегидрогеназную активность определяли, смешивая 1 % раствор метиленового синего, раствор глюкозы (5 мл; 1 ммоль/л) и нативные или термически инактивированные клетки бактерий (пункт 2.3.2 д) в дистиллированной воде. Кювету заполняли маслом, чтобы предотвратить восстановление цвета за счет окисления кислородом воздуха. Исчезновение окраски в ходе реакции определяли с помощью спектрофотометра (СФ 2000, Россия) в кинетическом режиме при рабочей длине волны (525 нм).

2.10 Высев бактерий *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 на твёрдую питательную среду

Проверку возможности роста и размножения нативных, пастеризованных и автоклавированных бактерий *P. yeei* проводили высевам на твёрдую питательную среду LB следующего состава: пептон – 10 г/л; NaCl – 10 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л; агар-агар – 22 г/л. Расплавленную твёрдую питательную среду (Т около 80 °С) разливали по чашкам Петри, после застывания проводили посев нативных, пастеризованных и автоклавированных бактерий. Перед посевом готовили серию разведений, для чего готовили 10 пробирок, каждая с 4,5 см³ стерильного физиологического раствора (раствор хлорида натрия 0,9 масс%), отбирали 0,5 см³ начальной суспензии клеток и добавляли к 4,5 см³ в пробирке, встряхивали пробирку и отбирали из неё 0,5 см³ в следующую пробирку с 4,5 см³ стерильного физиологического раствора. Т. о. приготовили серию разведений. Из каждого разведения отбирали и вносили в чашку Петри по 0,05 см³ суспензии. Растирали шпателем Дригальского для равномерного распределения суспензии на твёрдой питательной среде до высыхания. Помещали чашки Петри в термостат на 48 часов при температуре 28 °С. После чего доставали чашки Петри и проводили подсчёт колоний и рассчитывали количество колониеобразующих единиц в 1 мл суспензии (КОЕ/мл).

2.11 Влияние бактерий *P. yeei* на проведение модельной реакции Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры

2.11.1 Приготовление и калибровка стандарта для холостого опыта

В ¹H ЯМР спектроскопии при анализе проб из холостых опытов применили метод стандарта. Предварительно готовили герметичный капилляр со стандартным раствором внутри.

В качестве стандартного раствора для реакции Мизороки-Хека использовали 5,2 мг 1,4-динитробензола, растворенного в 0,19 см³ дейтерированного хлороформа (CDCl₃). Для калибровки капилляра его поместили в ампулу для ЯМР, содержащую 3,1 мг натриевой соли

2,2,3,3-*d*₄-3-(триметилсилил)-пропионовой кислоты, растворенной в 0,6 см³ дейтерированной воды (D₂O), получили спектр ¹H ЯМР.

В качестве стандартного раствора для реакции Сузуки-Мияуры использовали 0,0025 см³ тетраметилсилана в 0,1 см³ дейтерированного хлороформа (CDCl₃). Для калибровки капилляра его поместили в ампулу для ЯМР, содержащую 5,0 мг 1,4-динитробензола, растворенного в 0,6 см³ дейтерированного хлороформа (CDCl₃), и получили спектр ¹H ЯМР.

2.11.2 Оценка взаимодействия бактерий с исходными веществами. Влияние клеток на спектроскопию ядерно-магнитного резонанса

Все твёрдые компоненты реакции, кроме катализатора, помещали в пробирки с магнитными якорями и завинчивающимися крышками (загрузки веществ указаны в пункте 2.2), растворителем в реакции Мизороки-Хека в данном опыте был дейтерированный диметилформамид. Перемешивали, и отбирали пробы в ампулы для получения спектров ¹H ЯМР: из реакционной смеси Мизороки-Хека отбирали 0,55 см³; из реакционной смеси Сузуки-Мияуры – 0,2 см³ реакционной смеси и добавляли 0,35 см³ дейтерированного ацетона (ацетон-*d*₆). Были получены спектры ¹H ЯМР.

После этого в реакционные смеси добавили высушенную биомассу клеток *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 (30 мг – в реакционную смесь реакции Мизороки-Хека; 10 мг – реакции Сузуки-Мияуры). Перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре (1200 об/мин). Повторно отбирали пробы для получения спектров ¹H ЯМР, как описано выше. Ампулы центрифугировали для осаждения клеток в течение 6 минут при 1900 об/мин (ELMI CM-6MT, Латвия), вносили стандарт в ампулы с образцами и снимали ¹H ЯМР спектры.

Затем пробирки с реагентами и бактериями перемешивали (1200 об/мин) при температуре реакции (реакция Мизороки-Хека – 140 °С; реакция Сузуки-Мияуры – 80 °С) в течение времени реакции (реакция Мизороки-Хека – 5 часов; реакция Сузуки-Мияуры – 3 часа). По истечении времени ещё раз отбирали пробы для получения спектров ¹H ЯМР, центрифугировали ампулы с пробами, вносили стандарт в ампулы и снимали ¹H ЯМР спектры.

2.11.3 Проверка взаимодействия бактерий с продуктами реакции

Продукты реакций Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры – *транс*-стильбен и дифенил – были выделены методом хроматографии ранее в Институте органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва.

Образец продукта реакции Мизороки-Хека – *транс*-стильбена (146 мг, 0,81 ммоль) – смешивали с биомассой клеток *P. yeei* (20 мг) в пробирке и добавляли 2,5 см³ диметилформамида. Образец продукта реакции Сузуки-Мияуры, дифенила (154 мг, 1 ммоль), смешивали с биомассой

клеток *P. yeai* (20 мг) в пробирке и добавляли 2,5 см³ водного раствора этанола (80 об.%). После этого смеси клеток и продуктов перемешивали (1200 об/мин) при температуре реакции (реакция Мизороки-Хека – 140 °С; реакция Сузуки-Мияуры – 80 °С) в течение времени реакции (реакция Мизороки-Хека – 5 часов; реакция Сузуки-Мияуры – 3 часа).

Выделение продуктов реакции проводили по методике, описанной в пункте 2.2. Отбирали навески образцов выделенных продуктов (9,9 мг и 11,3 мг реакции Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры, соответственно), к каждой добавляли 0,6 см³ дейтерированного хлороформа (CDCl₃) растворяли и переносили в ампулу для ЯМР спектроскопии и получали спектры ¹H ЯМР.

2.11.4 Тест на устойчивость выбранных модельных реакций, катализируемых Pd/C

Загрузки реакционных смесей указаны в пункте 2.2. В каждую реакционную смесь дополнительно добавляли биомассу клеток *P. yeai* 30 мг. Смеси перемешивали (1200 об/мин) при температуре реакции (реакция Мизороки-Хека – 140 °С; реакция Сузуки-Мияуры – 80 °С) в течение времени реакции (реакция Мизороки-Хека – 5 часов; реакция Сузуки-Мияуры – 3 часа). По истечении времени продукт реакции выделяли по методике, описанной в пункте 2.12. Навески проб выделенного продукта (2,1 мг – реакция Мизороки-Хека и 11,0 мг – реакция Сузуки-Мияуры) растворяли в 0,6 см³ CDCl₃, центрифугировали 6 минут при 1900 об/мин, вносили ампулы с стандартом и получали спектры ¹H ЯМР.

2.12 Построение градуировочных зависимостей для количественного анализа реакционных смесей методом хромато-масс-спектрометрией. Анализ проб реакционных смесей

Продукты реакции Мизороки-Хека: 4-нитро-*транс*-стильбен и *транс*-стильбен для построения градуировочных зависимостей были синтезированы ранее и выделены колоночной хроматографией в ФГБОУ ВО Тульский государственный университет.

Для количественного анализа методом хромато-масс-спектрометрии готовили серию стандартных растворов (Таблица 5) определяемого продукта (4-нитро-*транс*-стильбен или *транс*-стильбен), исходного арилгалогенида (1-йодо-4-нитробензол или йодбензол) с постоянным содержанием внутреннего стандарта – дифенилацетилена – в ацетонитриле.

Таблица 5. Концентрации веществ в растворах для построения градуировочной зависимости

№	$C_{\text{Ag-Hal}}$, ммоль/см ³	$C_{\text{продукт}}$, ммоль/см ³	$C_{\text{вн. ст.}}$, ммоль/см ³
1	0,00020	0	0,00010
2	0,00016	0,00004	
3	0,00012	0,00008	
4	0,00010	0,00010	
5	0,00008	0,00012	
6	0,00006	0,00014	
7	0	0,00020	

Перед анализом пробы реакционных смесей дополнительно разбавляли в 1000 раз раствором внутреннего стандарта (дифенилацетилен 0,0001 ммоль/мл) в ацетонитриле и пропускали через шприц-фильтр (0,43 мкм; d=25 мм).

Приготовленные пробы анализировали на квадрупольном приборе Маэстро-α (Интерлаб, Россия) с вводом пробы через газовый хроматограф Кристаллюкс-4000М (Мета-Хром, Россия), с колонкой ZB-5ms L=30 м, d_{вн}=0,25 мм, толщина фазы 0,25 мкм (Phenomex, США). Начальная температура 50 °С (давление 0,353 атм), скорость нагрева 10 °С/мин до 80 °С, после нагрева со скоростью 20 °С/мин до конечной температуры 310 °С (давление 1,576 атм). Энергия ионизации 70 мВ.

2.13 Проверка катализатора Pd/P. *yeei*, приготовленного при варьировании условий, в реакции Мизороки-Хека

Катализаторы Pd/P. *yeei*, приготовленные в различных условиях тестировали в реакции взаимодействия 1-бром-4-нитробензола и стирола, в диметилформамиде в присутствии основания – карбоната калия.

Катализатор (Pd/P. *yeei* приготовленный при разных условиях или Pd/C 5 масс.%), в количестве 0,005 ммоль (1 мол.%) вносили в пробирку с завинчивающейся крышкой и магнитным якорем, последовательно добавляли 1-бром-4-нитробензол 0,5 ммоль 1 экв.; K₂CO₃ 0,5 ммоль 1 экв.. К твердым реагентам добавили растворитель (2,5 см³ диметилформамида) и стирол (0,5 ммоль; 1 экв.). Реакционные смеси оставляли при 140 °С и перемешивании 1200 об/мин на 5 часов. По истечении времени из реакционной смеси отбирали пробы для анализа методом ХМС (0,01 см³). Пробу для ХМС перед анализом разбавляли в 1000 раз и анализировали методом ХМС (пункт 2.12).

2.14 Pd/P. *yeei* в реакциях Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры с разными субстратами

2.14.1 Реакция Мизороки-Хека с различными субстратами

Реакции Мизороки-Хека осуществляли с разными субстратами. Использовали следующие арилгалогениды: 1-йодобензол, 1-бромобензол, 1-йодо-4-нитробензол, 1-йодо-4-метоксибензол, 4-йодо-метилбензоат. Алкены: стирол, бутилакрилат. Твердые (при н.у.) вещества последовательно помещали в пробирки с магнитными якорями и завинчивающимися крышками катализатор – 0,005 ммоль, 1 мол.%; арилгалогенид – 0,5 ммоль, 1 экв.; карбонат калия – 0,6 ммоль, 1,2 экв.. Добавляли 2,5 см³ диметилформамида и жидкие (при н.у.) реагенты арилгалогенид – 0,5 ммоль, 1 экв.; алкен – 0,6 ммоль, 1,2 экв.. После приготовления реакционной смеси её оставляли на 5 ч. при перемешивании 1200 об/мин и температуре 140 °С. По истечении времени проводили выделение продукта реакции по методике, описанной в пункте 2.2. Продукт взвешивали вместе с колбой для определения его массы и расчета выхода реакции. Для подтверждения структуры выделенного вещества и отсутствия посторонних веществ использовали метод ЯМР спектроскопии. Образец продукта растворяли в 0,6 см³ дейтерированного хлороформа (CDCl₃) или дейтерированного ацетона (ацетон-*d*6) и регистрировали спектры ¹H ЯМР.

2.14.2 Реакция Сузуки-Мияуры с различными субстратами

Реакции Сузуки-Мияуры осуществляли с разными субстратами. Использовали следующие арилгалогениды: 1-йодобензол, 1-бромобензол, 1-йодо-4-нитробензол, 1-йодо-4-метоксибензол, 4-йодо-метилбензоат. Бороновые кислоты: фенилбороновая кислота, 4-метилфенилбороновая кислота. Твердые (при н.у.) вещества последовательно помещали в пробирки с магнитными якорями и завинчивающимися крышками: катализатор – 0,005 ммоль, 1 мол.%; арилгалогенид – 0,5 ммоль, 1 экв.; арилбороновая кислота – 0,6 ммоль, 1,2 экв.; карбонат калия – 0,6 ммоль, 1,2 экв.. Добавляли 2,5 см³ водного раствора этанола 80 об.% и жидкие (при н.у.) реагент: арилгалогенид – 0,5 ммоль, 1 экв.. После приготовления пробирку с реакционной смесью оставляли при температуре 80 °С, перемешивании 1200 об/мин на 3 ч..

По истечении времени проводили выделение продукта по методике, описанной в пункте 2.2. Продукт взвешивали вместе с колбой для определения его массы и расчета выхода реакции. Для подтверждения структуры выделенного вещества и отсутствия посторонних веществ использовали метод ЯМР спектроскопии. Образец продукта растворяли в 0,6 см³ дейтерированного хлороформа (CDCl₃) или дейтерированного ацетона (ацетон-*d*6) и регистрировали спектры ¹H ЯМР.

2.15 Проверка на возможность многократного использования катализатора Pd/P. *yeei* и Pd/P. *yeei*@ORMOSIL и Pd/C

Для проверки возможности многократного применения катализаторов Pd/P. *yeei* и Pd/P. *yeei*@ORMOSIL использовали метод перезапуска реакций (Fresh start, FS) и метод с отделением катализатора (Catalyst separation, CS).

2.15.1 Метод перезапуска реакции Pd/P. *yeei*

Для теста на многократное использование катализатора использовали следующие загрузки веществ и условия.

В колбу объёмом 50 см³ с магнитным якорем последовательно помещали реагенты. Для реакции Мизороки-Хека: катализатор 4,4 масс% Pd/P. *yeei* – 0,005 ммоль (1 мол.%); карбонат калия – 0,5 ммоль (1 экв.); для реакции Сузуки-Мияуры: катализатор 4,4 масс% Pd/P. *yeei* – 0,005 ммоль (1 мол.%); 4-метил-фенилбороновая кислота – 0,5 ммоль (1 экв.); карбонат калия – 0,5 ммоль (1 экв.). Добавляли растворитель (реакция Мизороки-Хека – 2,5 см³ ДМФА; реакция Сузуки-Мияуры – 2,5 см³ водного раствора этанола 80 об.%) и жидкие реагенты (реакция Мизороки-Хека: йодбензол – 0,5 ммоль (1 экв.); стирол – 0,5 ммоль (1 экв.); реакция Сузуки-Мияуры: йодбензол – 0,5 ммоль (1 экв.)).

Колбу соединяли с обратным-холодильником. Свободный конец обратного-холодильника закрывали хлоркальциевой трубкой. Перемешивали (1200 об/мин) реакционные смеси при температуре реакции (реакция Мизороки-Хека – 140 °С; реакция Сузуки-Мияуры – 80 °С) в течение времени реакции (реакция Мизороки-Хека – 5 часов; реакция Сузуки-Мияуры – 3 часа). После реакции отбирали 0,01 см³ смеси на анализ методом ХМС и предварительно разбавляли (пункт 2.12). Далее в реакционную смесь добавляли новую порцию арилгалогенида, алкена, основания и растворителя (Рисунок 10) и начинали новый цикл.

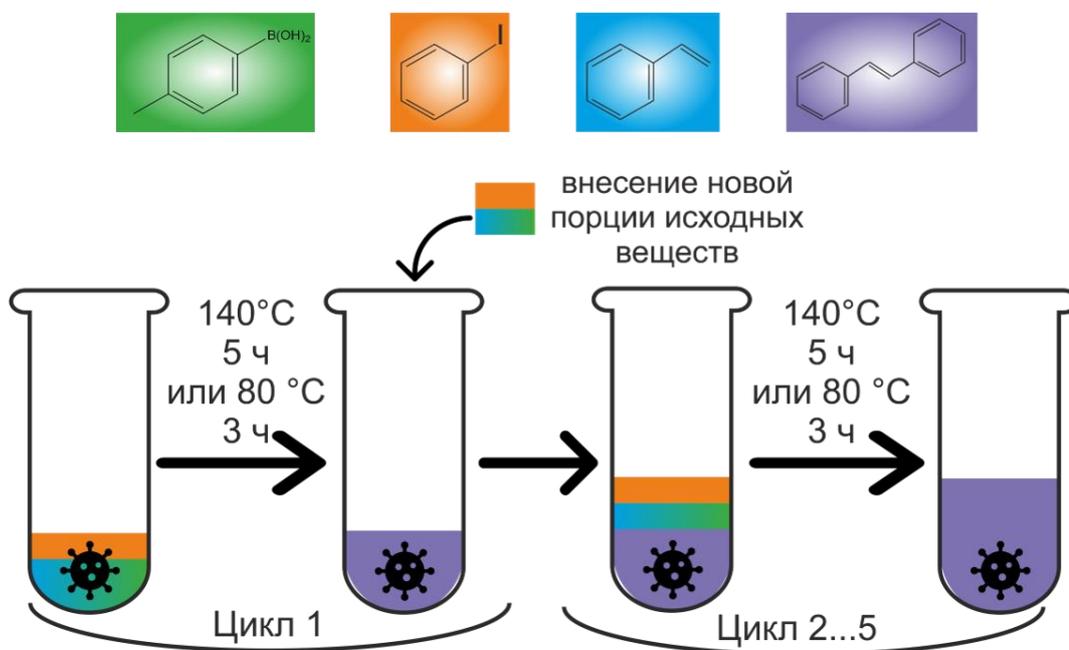


Рисунок 10. Схема эксперимента по методу перезапуска реакции (FS)

Цикл «реакция-анализ методом ХМС-повтор реакции» повторяли не менее 5 раз.

2.15.2 Метод с отделением катализатора Pd/*P. yeai*

Реакционные смеси готовили как описано в пункте 2.16.1 в пробирках с завинчивающимися крышками. После приготовления перемешивали (1200 об/мин) при температуре реакции (реакция Мизороки-Хека – 140 °С; реакция Сузуки-Мияуры – 80 °С) в течение времени реакции (реакция Мизороки-Хека – 5 часов; реакция Сузуки-Мияуры – 3 часа). После реакции отбирали 0,01 см³ смеси на анализ методом ХМС и предварительно разбавляли (пункт 2.12). Далее применяли два варианта (А и Б) отделения катализатора для отдельных реакционных смесей, приготовленных идентично:

Вариант А. Катализатор отделяли от реакционной смеси путем фильтрации, промывали его различными растворителями (последовательно 3×10 см³: бензол, толуол, этанолом, ацетон и вода). Катализатор высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу (100 °С), взвешивали и использовали в следующей реакции с новой порцией реагентов (соотношение катализатор:реагенты было постоянным на каждом повторе реакции). Реакцию повторяли и по завершению снова анализировали выход продукта методом ХМС и отделяли катализатор. Было выполнено не менее 5-и последовательных циклов с одним катализатором.

Вариант Б. Пробирки центрифугировали (8000 об/мин, 10 мин) после реакции (Рисунок 11) для осаждения катализатора. Удаляли надосадочную жидкость. Катализатор в пробирке промывали различными растворителями (последовательно 3×10 см³: бензолом,

толуолом, этанолом, ацетоном и водой). Пробирку с катализатором высушили до постоянной массы в сушильном шкафу (100 °С), взвешивали для определения массы катализатора.

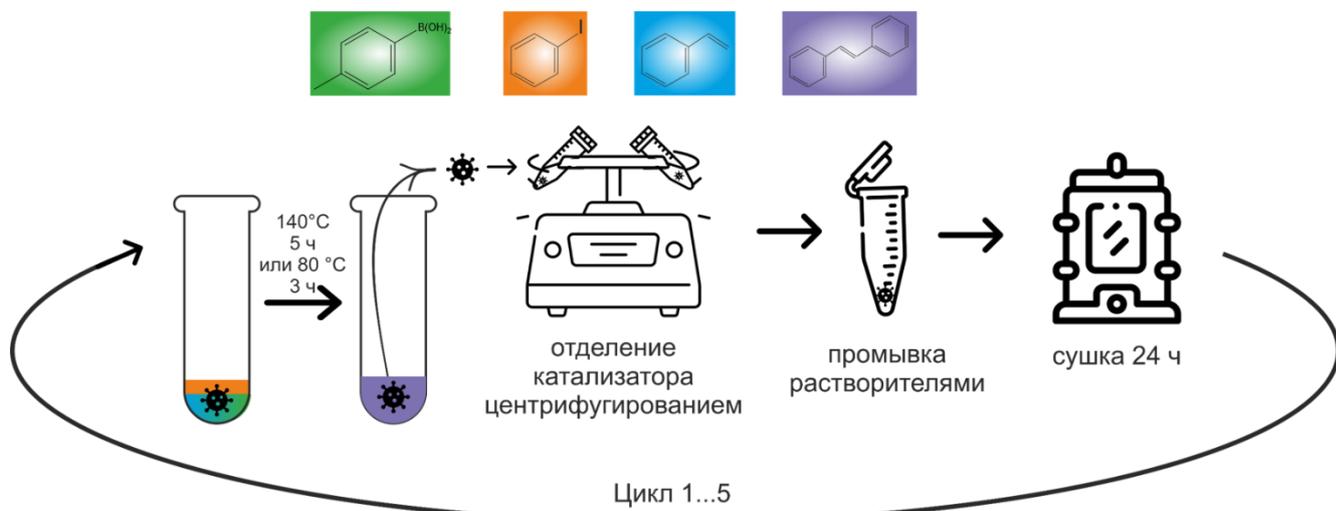


Рисунок 11. Схема эксперимента по методу с отделением катализатора (Вариант Б, CS)

Добавляли новую порцию реагентов (соотношение катализатор:реагенты было постоянным на каждом повторе реакции). Реакцию повторяли и по завершению снова анализировали выход продукта методом ХМС и отделяли катализатор. Было выполнено не менее 5-и последовательных циклов с одним катализатором.

2.15.3 Метод перезапуска реакции с катализаторами Pd/P. *yeei*, Pd/P. *yeei*@ORMOSIL и Pd/C

Для сравнительного тестирования многократного применения катализаторов Pd/C, Pd/P. *yeei* и Pd/P. *yeei*@ORMOSIL использовали реакцию Мизороки-Хека с триэтиламин в качестве основания. Т. к. карбонат калия может блокировать поры в катализаторе Pd/P. *yeei*@ORMOSIL, что окажет негативное воздействие на свойства катализатора.

В колбу объемом 50 см³ и магнитным якорем последовательно вносили катализатор – 0,005 ммоль (1 мол.%). Добавляли 2,5 см³ ДМФА, йодбензол – 0,5 ммоль (1 экв.); стирол – 0,5 ммоль (1 экв.); триэтиламин – 0,5 ммоль (1 экв.)). Оставляли при перемешивании 1200 об/мин и температуре 140 °С на 5 ч.. Колбу соединяли с обратным-холодильником. Свободный конец обратного-холодильника закрывали хлоркальциевой трубкой. Перемешивали (1200 об/мин) реакционные смеси при 140 °С в течение 5 часов. После реакции отбирали 0,01 см³ смеси на анализ методом ХМС, предварительно разбавляли пробу и анализировали методом ХМС (пункт 2.12). Далее в реакционную смесь добавляли новую порцию арилгалогенида, алкена, основания и растворителя (Рисунок 10) и начинали новый цикл.

2.16 Рентгенофазовый анализ Pd/P. *yeei* перед и после теста на многократное использование

Рентгеновская дифракция микропорошков проводилась на четырехкружном дифрактометре Rigaku Synergy S (Rigaku, Япония), оснащенном площадным детектором HyPix6000HE (каппа-геометрия, беззатворный метод ϕ -сканирования), с использованием монохроматического излучения Cu K α (среднее K α_1 и K α_2 50 кВ, 1 мА). Образцы фиксировались на петле с помощью вакуумной смазки (Dow corning, США). Данные собирались при температуре 22 °С, времени экспозиции 500 с. и расстоянии до детектора 120 мм в диапазоне 2θ от 0 до 80°. Модельные линии РФА спектра Pd были смоделированы на основе опубликованных данных [261].

2.17 Вымывание палладия с носителя

Использовали два варианта загрузок веществ. Т. к. карбонат калия может блокировать поры в катализаторе Pd/P. *yeei*@ORMOSIL, что окажет негативное воздействие на свойства катализатора, то провели смену основания (Вариант 2).

Вариант 1. Твердые вещества помещали в пробирку с завинчивающейся крышкой: Pd/P. *yeei* 4,4 масс.% – 0,0015 ммоль (1 мол.%), 1-йодо-4-нитробензол – 0,15 ммоль (1 экв.), карбонат калия – 0,15 ммоль (1 экв.). Добавили 2 см³ диметилформамида и 0,15 ммоль (1 экв.) стирола.

Вариант 2. Твердые вещества помещали в пробирку с завинчивающейся крышкой: 1-йодо-4-нитробензол – 0,15 ммоль (1 экв.), Pd/P. *yeei* 1 масс.% – 0,0015 ммоль (1 мол.%) или Pd/P. *yeei*@ORMOSIL 0,61 масс.% – 0,0015 ммоль (1 мол.%). Добавили 2 см³ *N*-метилпирролидона, 0,15 ммоль (1 экв.) стирола и 0,15 ммоль (1 экв.) триэтиламина.

Пробирку с реакционной смесью выдерживали при температуре 140 °С 10 минут. Через 10 минут образец реакционной смеси отбирали на анализ методом ХМС, а катализатор извлекали из пробирки (Рисунок 12).

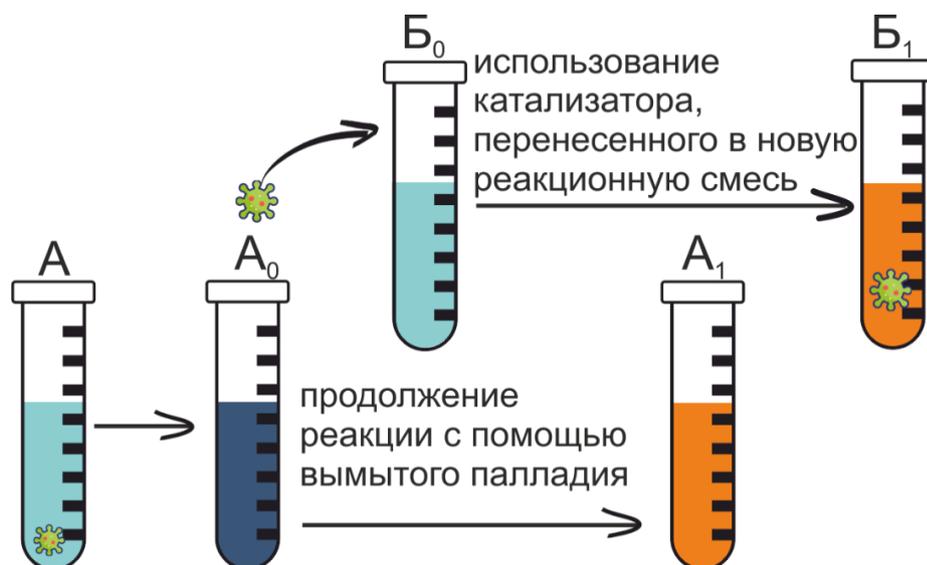


Рисунок 12. Схема эксперимента по тесту перехода палладия с носителя

После извлечения катализатор промыли диметилформамидом ($3 \times 0,5 \text{ см}^3$) и вносили в другую пробирку с реакционной смесью, состав которой аналогичен исходной за исключением отсутствия катализатора. Реакционную смесь с перенесенным катализатором и пробирку откуда катализатор был изъят оставляли при $140 \text{ }^\circ\text{C}$ на 5 часов. После этого из обеих пробирок были отобраны пробы (по $0,01 \text{ см}^3$) на анализ методом ХМС для оценки выхода продукта реакции (пункт 2.12).

2.17.1 «Горячее фильтрование»

Реакционные смеси готовили по пункту 2.2. Реакционную смесь перемешивали (1200 об/мин) при температуре реакции (реакция Мизороки-Хека – $140 \text{ }^\circ\text{C}$; реакция Сузуки-Мияуры – $80 \text{ }^\circ\text{C}$). После 1 ч. от начала реакции осуществления реакции на горячем фильтре проводили отделение катализатора от реакционной смеси. Отфильтрованную реакционную смесь оставляли при перемешивании при температуре реакции ещё на 4 часа. После чего отбирали $0,01 \text{ см}^3$ на анализ методом ХМС (пункт 2.12).

2.18 Исследование кинетики образования продукта реакции Мизороки-Хека

Для кинетических экспериментов проводили реакцию взаимодействия 1-йодо-4-нитро-йодбензола со стиролом. Идентифицированным побочным продуктом был динитробифенил.

Катализатор (Pd/C 1 масс% или Pd/P. *yeei* 1 масс% или Pd/P. *yeei*@ORMOSIL 0,61 масс%) помещали в пробирки с магнитными якорями и заворачивающимися крышками: загрузка катализатора – $0,005 \text{ ммоль}$ (1 мол.%) или $0,0005 \text{ ммоль}$ (0,1 мол%). Вносили 1-йодо-4-нитробензол – $0,5 \text{ ммоль}$ (1 экв). Добавляли растворитель $2,5 \text{ см}^3$ *N*-метилпирролидона, стирол – $0,6 \text{ ммоль}$ (1,2 экв.), триэтиламин – $0,6 \text{ ммоль}$ (1,2 экв.).

Реакционную смесь перемешивали (1200 об/мин) при температуре реакции. Кинетические исследования проводили при 100, 120, 140 и 160 °С. Через определённые интервалы времени отбирали пробы (0,01 см³) на анализ методом ХМС (пункт 2.12). Реакцию и отбор проб проводили до исчерпания исходных веществ или до прекращения образования продукта реакции, что определяли из хроматограмм, полученных методом ХМС.

2.18.1 Обработка катализатора Pd/*P. yeii* нагревом в *N*-метилпирролидоне

Приготовленный катализатор Pd/*P. yeii* 1 масс% в количестве 0,005 ммоль (1 мол%) помещали в пробирку с завинчивающейся крышкой, добавляли 2,5 см³ *N*-метилпирролидона и оставляли на 1,5 ч. при температуре 160 °С и перемешивании 1200 об/мин. (Рисунок 13).

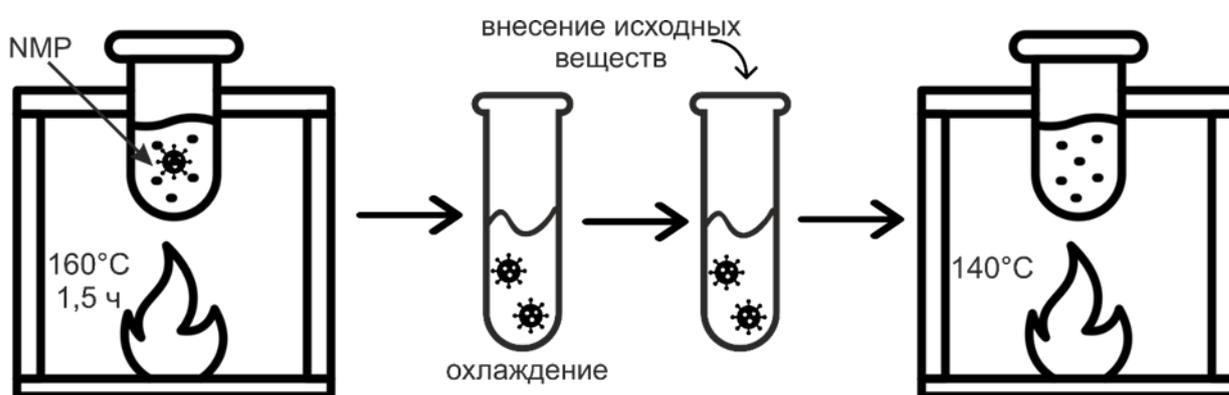


Рисунок 13. Схема эксперимента с предварительной обработкой катализатора Pd/*P. yeii* нагревом в *N*-метилпирролидоне

По истечении времени пробирку с катализатором охлаждали до комнатной температуры и добавляли исходные вещества реакции Мизороки-Хека (пункт 2.18) за исключением катализатора, после чего проводили кинетическое исследование при температуре 140 °С и перемешивании 1200 об/мин, отбирая через определённые интервалы времени пробы (0,01 см³) на анализ методом ХМС (пункт 2.12). Реакцию и отбор проб проводили до исчерпания исходных веществ или до прекращения образования продукта реакции, что определяли из хроматограмм, полученных методом ХМС.

2.19 Внедрение в кремнийорганический материал

2.19.1 Внедрение в кремнийорганический материал бактерий *P. yeii*

Суспензию бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 (0,05 см³, 150 мг/мл) в фосфатном буфере (рН 6,8) смешивали с структуроуправляющим агентом – 0,02 см³ раствором поливинилового спирта (ПВС) 5 масс%. Перемешивали встряхиванием на центрифуге-встряхивателе (ELMI CM-70M-09, Литва) 5 минут. Добавляли 0,05 см³ метилтриэтоксисилана

(МТЭС) и $0,05 \text{ см}^3$ тетраэтоксисилана и повторно встряхивали 5 минут. Вносили катализатор – $0,005 \text{ см}^3$ раствора фторида натрия (20 ммоль/дм^3), встряхивали в течение 15 минут. Оставляли на 24 ч. для сушки при атмосферном давлении и комнатной температуре.

2.19.2 Внедрение в кремнийорганический материал катализатора Pd/*P. yeii*

Приготовленный и высушенный катализатор Pd/*P. yeii* смешивали с фосфатным буферным раствором (рН 6,8) для приготовления исходной суспензии ($T = 150 \text{ мг/мл}$), добавляли раствор ПВС (5 масс%) 40 % от объёма полученной суспензии. Встряхивали 5 минут (ELMI CM-70M-09, Литва). Добавляли МТЭС и ТЭОС в количестве 1 к 1 относительно объёма исходной суспензии, встряхивали 5 минут. Вносили раствор NaF (20 ммоль/дм^3) 10 % от объёма исходной суспензии. Встряхивали 15 минут. Смесь выливали в чашку Петри для сушки и оставляли на 48 часов при комнатной температуре и атмосферном давлении.

2.20 Исследование кремнийорганического материала методом низкотемпературной адсорбции азота

Образцы кремнийорганического материала с внедрёнными клетками бактерий *P. yeii* последовательно промывали в дистиллированной воде и этиловом спирте в течение 15 минут при 150 об/мин. Промывочную жидкость удаляли декантацией. Образцы высушивали в термокамере в течение 120 мин. при $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Стандартизированную пробу массой $0,1\text{--}0,3 \text{ г}$ помещали в предварительно взвешенную кварцевую кювету, которую вносили в прибор Beckman Coulter M SA-PREP™ (Beckman Coulter, США) для подготовки проб, где высушивали с помощью азота (99,999%, ГОСТ 9293-74) в течение 60 мин. при температуре до $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Подготовленный образец помещали в порт для удаления газа газового анализатора Beckman Coulter M SA 3100™ (Beckman Coulter, США). Весь газ удалили в течение 60 мин. при фоновом давлении $0,001 \text{ мм рт. ст.}$ при температуре $60 \text{ }^\circ\text{C}$. После этого образец в кювете охлаждали и взвешивали для определения его точной массы ($\pm 0,0005 \text{ г}$). Затем образец помещали в аналитический порт прибора SA3100™ для измерения свойств поверхности (удельная площадь поверхности, структура пор) на основе адсорбции азота при постоянной температуре. Структура пор (микро-, мезо- или макропористая) изучалась при относительном давлении в диапазоне от 0 до 0,995.

Глава 3 Результаты и их обсуждение

3.1 Влияние бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 на модельные реакции Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры (холостые опыты)

Ранее штамм аэробной бактерии *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 (*P. yeii*) был выделен из активного ила, охарактеризован и депонирован в базу данных Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пущино [262]. Так как этот штамм выживал и размножался в условиях бытовых сточных вод, насыщенных ионами различных металлов, мы предположили, что бактерии *P. yeii* способны биотрансформировать исходные соли Pd в наночастицы металла с последующим их накоплением на поверхности клетки или во внутриклеточном пространстве. Это аэробные клетки, для выращивания которых не требуется создание анаэробных условий способны к быстрому размножению, не требуют применения питательных сред сложного состава. Также клетки *P. yeii* при делятся в 4-ёх направлениях, имея морфологию «сарцина», т. е. образуют ассоциации из 8 клеток, растущих в тесном контакте друг с другом, что предположительно должно спровоцировать формирование наночастиц Pd малого размера между отдельными клетками в сарцине.

Разрабатываемый в работе катализатор будет представлять собой нанесенные наночастицы палладия на клетки бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302. Перед его приготовлением необходимо подтвердить, что этот микроорганизм не окажет в данных условиях негативного воздействия на ход химической реакции. Поэтому, осуществив контрольный эксперимент без катализатора, проверили взаимодействие клеток с исходными веществами модельных реакций Мизороки-Хека (взаимодействие йодбензола и стирола) (Схема 4) и Сузуки-Мияуры (взаимодействие йодбензола и фенолбороновой кислоты) (Схема 5).

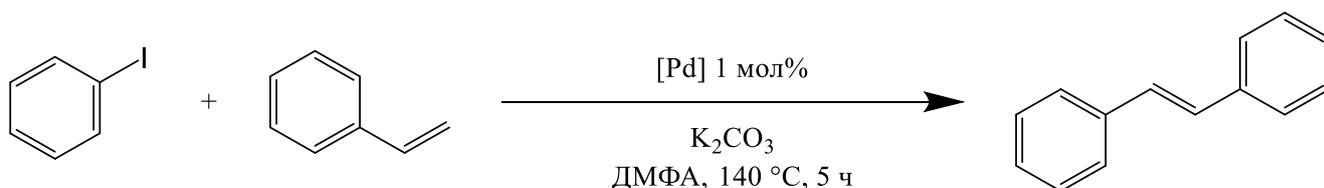


Схема 4. Модельная реакция Мизороки-Хека

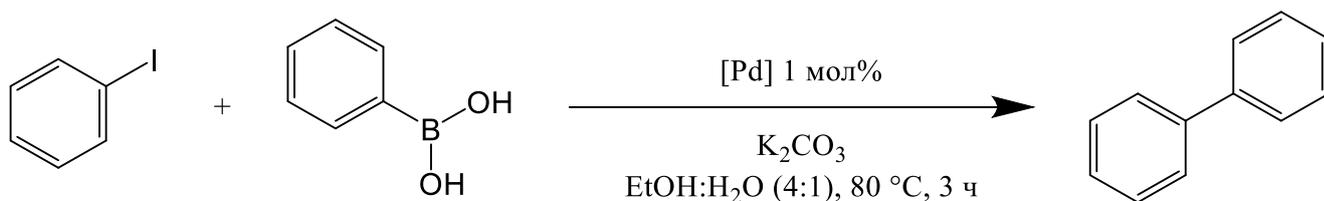


Схема 5. Модельная реакция Сузуки-Мияуры

Исходные вещества смешивали с клетками и перемешивали в течение 1 ч. при комнатной температуре (пункт 2.11.2). Затем реакционные смеси анализировали с использованием ^1H ЯМР спектроскопии с использованием стандарта (пункт 2.11.1). Дополнительно, смеси перемешивают с нагреванием в течение 3 и 5 ч. для реакций Сузуки-Мияуры и Мизороки-Хека, соответственно. Последующая ^1H ЯМР-спектроскопия подтверждает отсутствие реакций между клетками бактерий и исходными реагентами, которые могли бы привести к уменьшению концентрации исходных веществ и образованию нежелательных побочных продуктов. Таким образом показано, что бактериальные клетки *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 не реагируют в заданных условиях с исходными веществами модельных реакций.

Выполнили отдельный эксперимент для исключения возможности взаимодействия клеток с продуктами модельных реакций. Выделенные заранее продукты модельных реакций – *транс*-стильбен и дифенил – смешивали с клетками *P. yeei* и перемешивали при нагревании в течение всего времени протекания соответствующей реакции. После истечения времени продукт выделяют из реакционной смеси и получают ^1H ЯМР спектр для подтверждения структуры и отсутствия примесей. Несмотря на потери массы продуктов в ходе эксперимента (осталось 81 % и 89 % от исходных количеств *транс*-стильбена и дифенила, соответственно), вещества не претерпели существенных превращений в ходе эксперимента. Единственным исключением стало появление небольших пиков в алифатической области на ^1H ЯМР спектре, что может свидетельствовать о частичном разрушении и растворении компонентов клеток при нагревании. Учитывая разнообразие органических веществ, входящих в структуру клеточных компонентов, однозначно идентифицировать эти вещества только с использованием ^1H ЯМР спектроскопии затруднительно. Однако не замечено взаимодействия этих примесей с внесёнными продуктами реакций, кроме того, часть клеточных остатков остаётся на фильтре при фильтровании после завершения реакции.

Клетки *P. yeei* не реагируют в выбранных условиях с исходными веществами и продуктами модельных реакций Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры. Далее проверили влияние бактерий *P. yeei* на выход продуктов модельных реакций при использовании катализатора наночастиц палладия на активированном угле (Pd/C) (пункт 2.11.4) (Схема 4 и 5). Структуру выделенных по истечению времени продуктов реакций подтверждали при помощи ^1H ЯМР спектроскопии. Эксперимент показал, что в выбранных условиях реакция Сузуки-Мияуры нечувствительна к присутствию микроорганизмов в реакционной смеси и протекает с почти количественным выходом (Таблица 6).

Таблица 6. Проверка чувствительности модельных реакций с катализатором Pd/C к присутствию бактерий *P. yeii* в реакционной смеси

Реакция	m (5 масс% Pd/C), мг	m (<i>P. yeii</i>), мг	Выход продукта, %
Сузуки-Мияуры	21,3	–	93
	21,8	29,9	96
Мизороки-Хека	21,3	–	99
	21,3	30	33

Выход *транс*-стильбена не превышает 33 % для модельной реакции Мизороки-Хека в присутствии бактериальных клеток (Таблица 6). При холостых опытах использовали клетки *P. yeii* без предварительной сушки, как и в дальнейших процедурах приготовления катализатора Pd/*P. yeii*. При этом тест разных процедур сушки катализатора (пункт 2.4.2) показал, что применение катализатора Pd/*P. yeii* без удаления воды обеспечивает выход продукта реакции Мизороки-Хека (Схема 6) 59 %, что меньше, чем при любом из протестированных методов сушки. Так как реакцию Мизороки-Хека можно осуществить в водной среде [263], то, по всей видимости именно совместное присутствие воды и компонентов или веществ клетки влияет на выход продукта, что будет исследовано в следующих работах. Дополнительно можно предположить, что клетки сорбируясь на поверхность активированного угля не позволяют металлу переходить в реакционную смесь и при этом блокируют доступ субстрата к активным центрам и/или бактерии сорбируют на себя наночастицы палладия или часть реагирующих веществ, и поэтому выход продукта снижен. Впрочем, как будет показано ниже, катализатор Pd/*P. yeii* способен обеспечивать образование продукта реакции Мизороки-Хека, и проявляет признаки катализатора «коктейлевого типа» [264].

Таким образом продемонстрировано, что клетки *P. yeii*, в использованных количествах и выбранных условиях, не вступают в химическое взаимодействие с исходными веществами и продуктами реакций по отдельности. Однако присутствует эффект снижения выхода продукта реакции Мизороки-Хека, катализируемой Pd/C в присутствии клеток. В рамках текущей работы истинная причина этого эффекта не была выявлена, возможная причина связана с наличием воды и биоорганических веществ в клетке одновременно и/или взаимодействием клетки с наночастицами палладия. Так как клетки не взаимодействуют с продуктом реакции и исходными соединениями, в дальнейшем использовали их в качестве биологического носителя наночастиц палладия для приготовления катализатора реакций тонкого органического синтеза.

3.2 Синтез и характеристика катализатора Pd/*P. yeii*

На следующем этапе работы определяют массу бактерий *P. yeii* после сушки при комнатной температуре и атмосферном давлении. По результатам эксперимента потеря массы в процессе сушки составляет около 80 масс%. Дальнейшее приготовление катализатора проводили с учётом этой потери массы клеток.

Приготовление катализатора включает в себя: получение смеси источника палладия (соль палладия) и живых клеток бактерий в среде (дистиллированная вода/буферный раствор/физиологический раствор); контакт смеси с донором электронов, необходимым для успешного биологического восстановления Pd из предшественника. По литературным данным [215] клетки бактерий непосредственно принимают участие в формировании и стабилизации размера наночастиц Pd при приготовлении катализатора. Соответственно, факторы, воздействующие на состояние ферментных систем и других компонентов бактерий, могут повлиять на процесс приготовления катализатора и, соответственно, конечный результат. Также количество донора электронов влияет на размер частиц, поскольку продолжительное время контакта с ним может привести к формированию крупноразмерных частиц [234, 265]. Поэтому на данном этапе работы при приготовлении катализатора варьировали следующие параметры: предшественник палладия (ацетат или нитрат палладия); время подачи водорода; температура; нативные или термически обработанные бактерии *P. yeii*.

В качестве исходного соединения для приготовления Pd/*P. yeii* использовали ацетат палладия (II) или нитрат палладия (II). Примечательно, что ацетат палладия ранее не использовали для формирования наночастиц Pd на бактериальных клетках. Предположили, что наличие ацетатной группы может способствовать вовлечению соли палладия в метаболизм клеток *P. yeii* поскольку многие бактерии способны использовать ацетат в качестве метаболического субстрата, что простимулирует биологический процесс формирования наночастиц. Нитрат палладия одно из основных соединений из которого получают другие соединения палладия.

Для изучения влияния условий приготовления на формирование наночастиц палладия проводили барботирование водородом (скорость потока 0,53 мл/мин) в течение 0,5, 1, 2, 5 и 10 минут. Полученные образцы исследовали методом сканирующей электронной микроскопии в режиме композиционного контраста для качественной оценки наличия и распределения металла на поверхности бактерий.

Клетки бактерий *P. yeii* имеют форму неправильного шара и растут группами по 8 клеток, что характерно для морфологии «сарцина». На изображениях электронной микроскопии клетки имеют серый цвет, яркость которого зависит от расположения клеток относительно пучка

электронов. Частицы палладия, как более тяжёлые по атомному номеру, в режиме композиционного контраста наблюдают, как «белые точки» или их скопления.

Результаты СЭМ показали, что продолжительность подачи водорода влияет на формирование частиц Pd и их распределение на поверхности клеток (Рисунок 14).

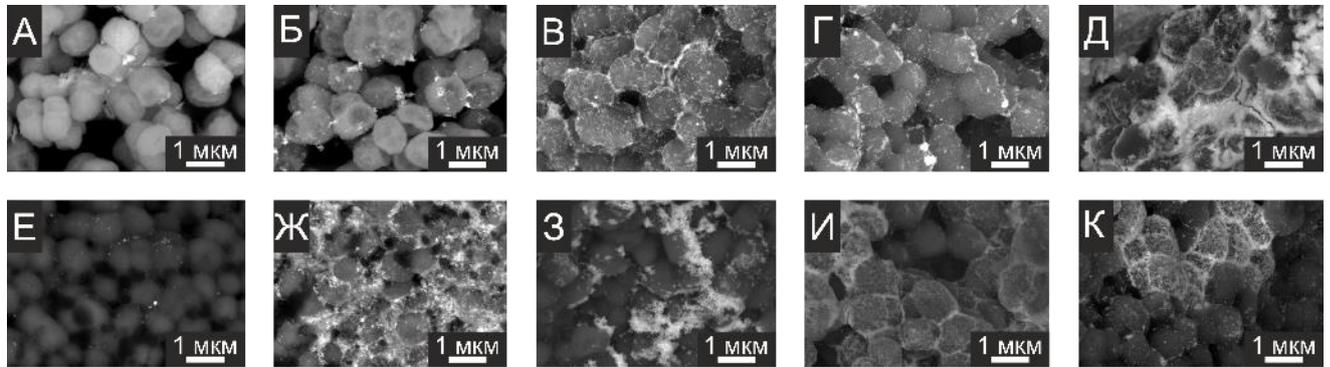


Рисунок 14. Изображения, полученные СЭМ, катализатора Pd/*P. yeii*, полученного с разными солями и при разном времени барботирования H₂: А, Б, В, Г, Д – Pd(OAc)₂ 0,5, 1, 2, 5 и 10 минут соответственно; Е, Ж, З, И, К – Pd(NO₃)₂ 0,5, 1, 2, 5 и 10 минут соответственно

Подачи водорода в течение 0,5 и 1 минуты недостаточно для формирования наночастиц Pd из ацетата палладия (Рисунок 14А и 14Б), поскольку на клетках видно лишь незначительное присутствие металлического палладия в виде отдельных частиц и небольших агрегатов. Через 2 минуты наблюдают равномерное покрытие клеток частицами металла (Рисунок 14В). Увеличение времени барботирования до 5 минут (Рисунок 14Г) приводит к значительной агломерации частиц металла. После 10 минут подачи H₂ (Рисунок 14Д) дополнительно образуются монолитные структуры из клеток, что означает деформацию и разрушение носителя.

При применении нитрата палладия времени подачи водорода в 0,5 минут также недостаточно для покрытия клеток палладием (Рисунок 14Е). Увеличение времени барботирования до 1 и более минут (Рисунок 14Ж–К) демонстрирует покрытие клеток металлом, но выделить какую-то зависимость из полученных изображений затруднительно.

Pd/*P. yeii*, приготовленный из ацетата палладия при барботировании водородом 2 минуты дополнительно изучали методом сканирующей электронной микроскопии и рентгеноспектрального микроанализа для характеристики полученного биогибридного материала на микро- и наноуровнях (Рисунок 15).

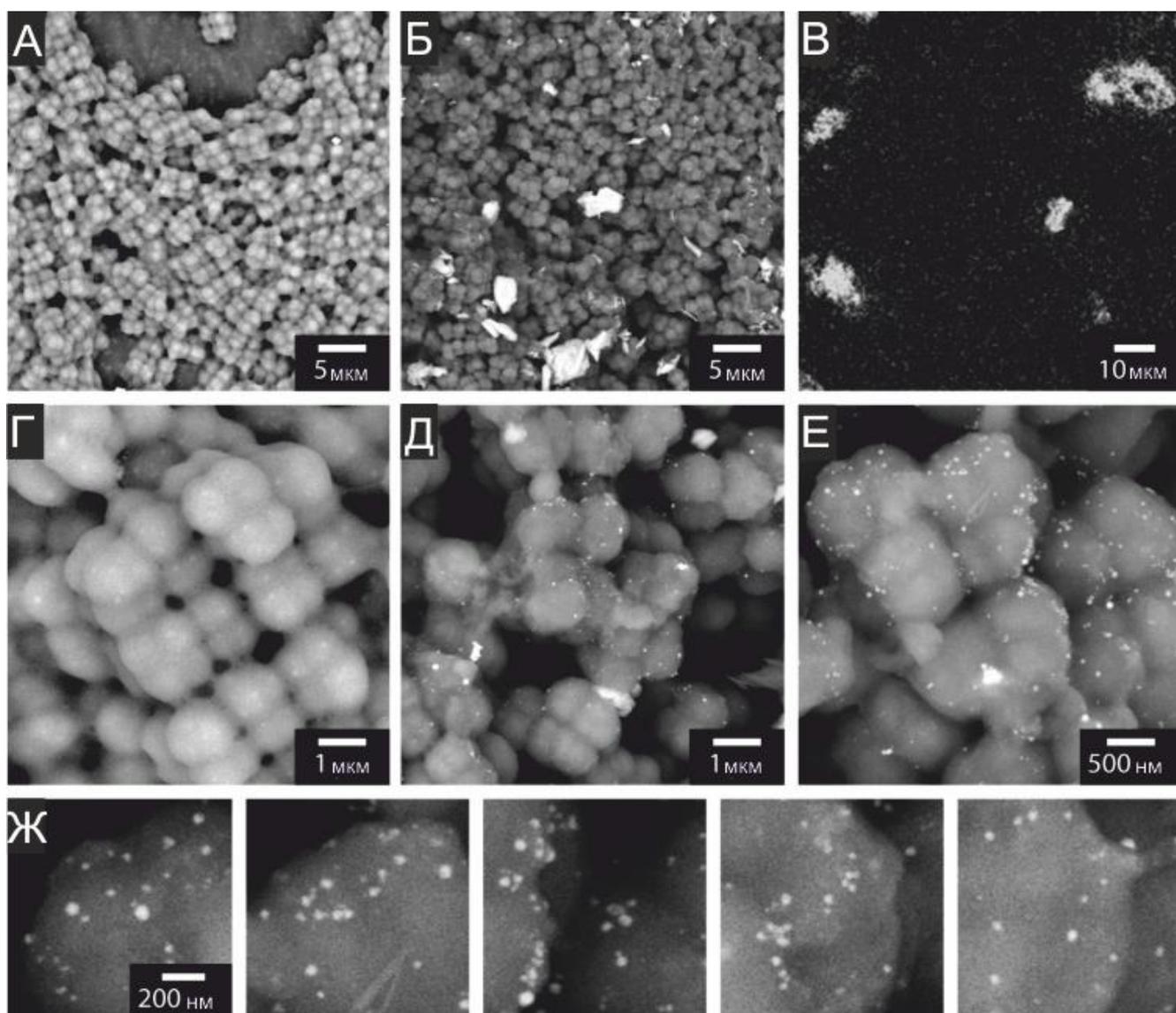


Рисунок 15. Изображения, полученные СЭМ в режиме детекции отражённых электронов (BSE) бактерий *P. yeii*: А – до приготовления катализатора; Б – после приготовления катализатора Pd/*P. yeii*; В – участок катализатора Pd/*P. yeii*, который анализировали методом рентгеноспектрального микроанализа; Г – поверхности бактерий перед нанесения палладия; Д – после нанесения палладия при сильном увеличении; Ж – индивидуальная клетка бактерии *P. yeii*.

Бактерии *P. yeii* до приготовления катализатора и после сушки в вакууме на SEM изображениях в режиме детекции BSE представляют собой шары неправильной формы диаметром около 1 мкм, плотно прилегающие друг к другу (Рисунок 15А). Равномерный цвет и отсутствие изменений контраста свидетельствуют об однородности образца при выбранном увеличении. После приготовления катализатора заметны изменения во внешнем виде образца. На СЭМ-изображении (Рисунок 15Б) показано появление крупных кристаллических частиц размером около 1–5 мкм. Наличие яркого контраста между этой фазой и окружающими

бактериями позволяет предположить присутствие палладия в микроскопических включениях. Наличие Pd в катализаторе было независимо подтверждено методом рентгеноспектрального микроанализа. На элементной карте, построенной по интенсивности рентгеновской эмиссионной линии палладия $L_{\alpha 1}$, видно распределение палладия (Рисунок 16).

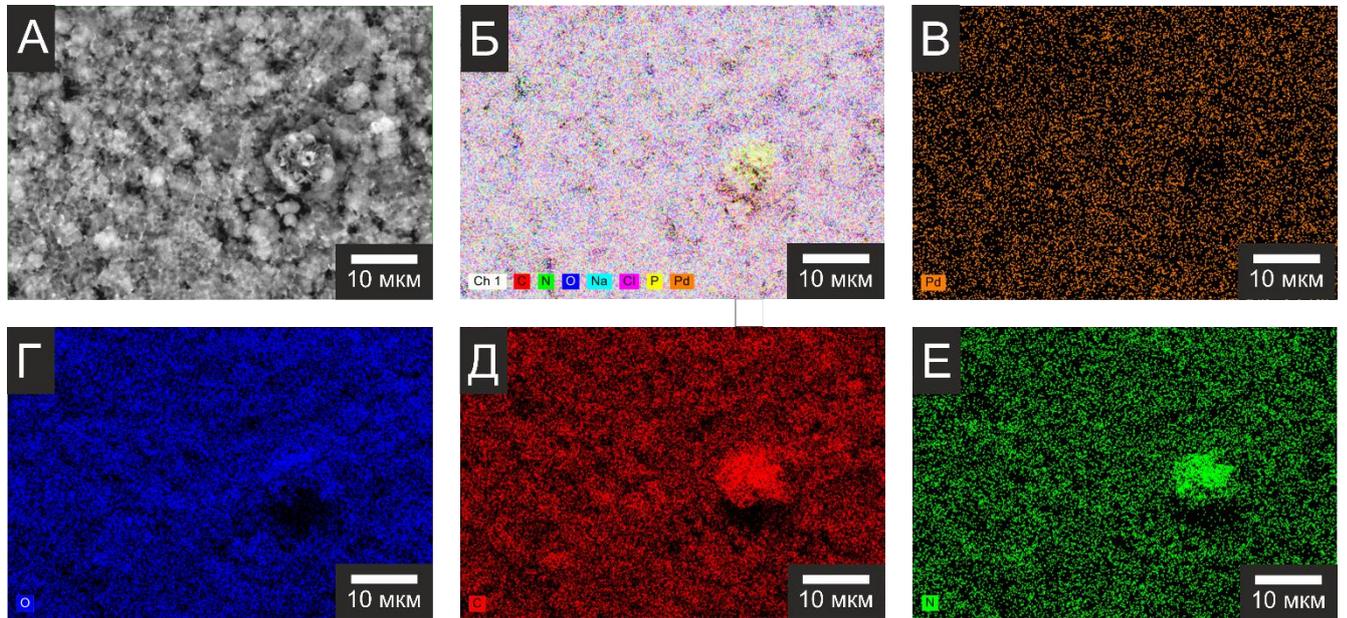


Рисунок 16. Изображение, полученное СЭМ (А), и карты распределение элементов (Б), палладия (В), кислорода (Г), углерода (Д) и азота (Е) в катализаторе Pd/P. *yeii*

Элементное картирование (Рисунок 16) наглядно показывает, что биогенные элементы (N, C и O) равномерно распределены по поверхности образца. Неоднородности на картах этих элементов обусловлены исключительно сложным рельефом образца. Малоразмерные наночастицы палладия обнаружены с помощью РСМА-картирования, распределены равномерно.

В спектре, полученном РСМА, образца Pd/P. *yeii* присутствует ряд сигналов, соответствующих типичным неметаллическим (C, N, O, P) и металлическим (Na) биогенным элементам (Рисунок 17).

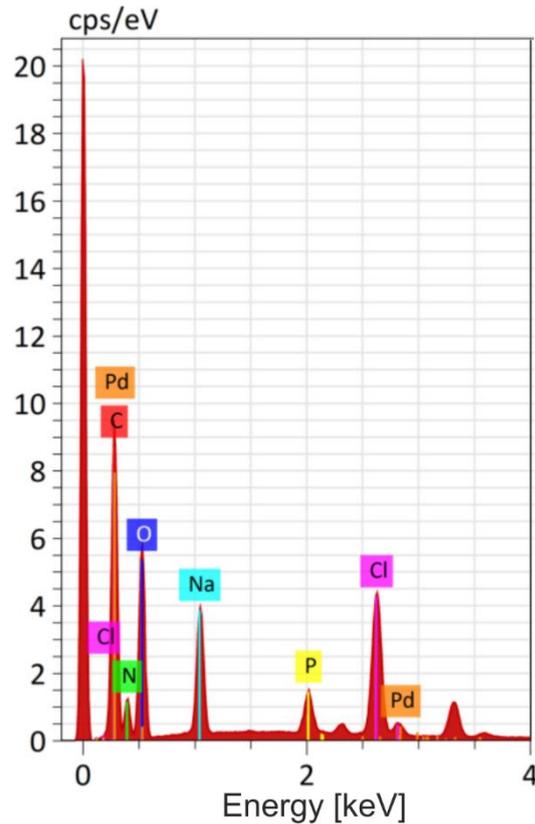


Рисунок 17. Спектр, полученный методом РСМА, образца Pd/*P. yeii*

Наличие в спектре интенсивных линий, соответствующих L-серии палладия, дополнительно указывает на его встраивание в клетки бактерий *P. yeii* или на их поверхности.

В случае изображений СЭМ бактерий *P. yeii* до приготовления катализатора, полученных при большем увеличении, видно только наличие незначительной внутренней структурной неоднородности внутри частиц образца (Рисунок 15Г). Однако, для Pd/*P. yeii* наблюдают иную картину. Благодаря сильному положительному композиционному контрасту между биологическим носителем и металлической фазой видно наноразмерную оболочку из палладия, покрывающую бактериальные клетки (Рисунок 15Д и 15Е). Анализ морфологии оболочки показывает, что она состоит из почти сферических частиц и агломератов размером от 10 до 50 нм (Рисунок 15Ж).

Таким образом, электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ подтверждают наличие палладия в приготовленном катализаторе в двух различных формах: наноразмерных частиц Pd(0) и их мелких агрегатов (менее 100 нм), а также микроразмерных кристаллических включений, вероятно, содержащих Pd(II). Возможным объяснением наблюдаемого эффекта может быть, как склонность образующихся металлических частиц к агломерированию, так и ограниченная растворимость исходной соли металла в условиях приготовления катализатора.

Дополнительно изучили срезы биогибридного материала Pd/*P. yeii*, приготовленного из ацетата палладия (время подачи водорода 2 минуты) с использованием СПЭМ, что позволило увеличить контрастность клеток на фоне сетки для образцов и проанализировать размер наночастиц в следующих «местоположениях»: снаружи клеток/на поверхности клеточной мембраны; между отдельными клетками в сарцинах; внутри клеток (Рисунок 18).

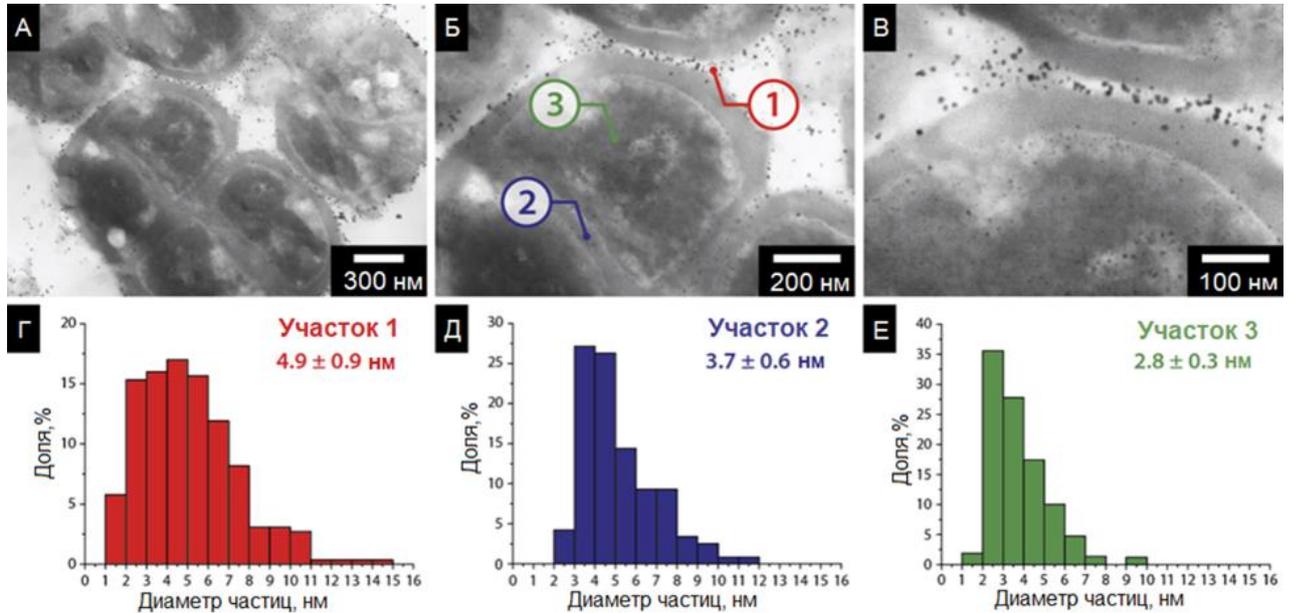


Рисунок 18. Изображения, полученные СПЭМ, среза биогибридного материала Pd/*P. yeii* и распределение размера наночастиц палладия: А, Г – на поверхности клетки; Б, Д – между отдельными клетками в сарцинах; В, Е – внутри клетки.

Распределение наночастиц по размерам различается в зависимости от расположения наночастиц металла на поверхности или внутри бактерии. Узкое распределение и малый средний размер наночастиц ($2,8 \pm 0,3$ нм) характерны для наночастиц Pd, расположенных внутри клетки. Исходя из данных по размерам частиц (Рисунок 18 Г, Д, Е) сделан вывод, что компоненты бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 расположенные внутри клетки, играют ключевую роль в стабилизации размера частиц, что важно для поиска путей контролируемого биологического синтеза наночастиц палладия требуемого размера. Однозначно идентифицировать места связывания палладия с клетками бактерий – сложная научная задача, требующая применения передовых методов и оборудования, а также тщательной постановки эксперимента. Это обусловлено тем, что клетки бактерий могут разрушаться или претерпевать другие изменения под воздействием излучений, используемых при анализе катализатора. Дополнительной сложностью является то, что динамический процесс формирования наночастиц палладия бактериями требует продуманных подходов к «остановке» или «замедлению» процесса, чтобы отследить различные этапы формирования и не внести изменений в процесс формирования. То

есть основная сложность при исследовании – необходимость сохранения целостности и структуры клеток, чтобы не допустить искажения результатов исследования и/или затруднить интерпретацию полученных данных.

Так как метод РСМА при анализе образцов со сложной и неоднородной поверхностью вероятно даст неточные данные, то для оценки количества Pd в приготовленном катализаторе использовали метод ИСП-МС. Проанализировав катализатор Pd/*P. yeai*, приготовленный с теоретическим содержанием Pd 5 масс%, установили, что среднее по трём измерениям содержание Pd в катализаторе составляет 4,4 масс%. Т. о. в среднем потери палладия составили 12 % при нанесении, что вероятно обусловлено осаждением металла на стенки пробирки при приготовлении и/или неполной сорбцией мелких частиц Pd клетками *P. yeai*. В последующих экспериментах при расчёте загрузки катализатора в реакциях исходили из того, что содержание Pd в катализаторе составляет 4,4 масс%.

Для определения форм палладия на поверхности катализатора Pd/*P. yeai* использовали рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию (Рисунок 19).

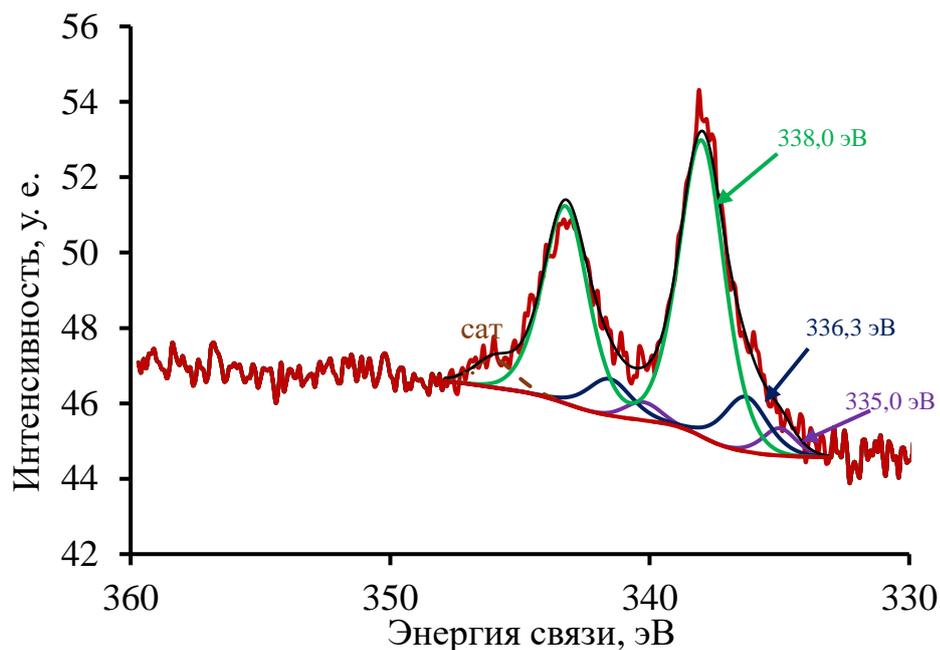


Рисунок 19. РФЭС поверхности катализатора Pd/*P. yeai*

Деконволюция спектра РФЭС показала, что на поверхности наночастиц палладий присутствует в трех различных формах с относительным содержанием, соответствующим 6 ат.%, 14 ат.% и 80 ат.% (по возрастанию энергий связи). Первая форма представляет собой Pd(0), полученный при приготовлении катализатора и являющийся продуктом прямого восстановления ацетата палладия водородом. Вторая форма – это, вероятно, PdO, представляющий собой тонкую

пленку на поверхности наночастиц Pd. Обе формы ожидаемы в катализаторе Pd/*P. yeii* после синтеза. Пик с энергией связи 338,0 эВ находится в области, характерной для солей палладия, но не соответствует исходному ацетату палладия, т. к. такой пик ожидаем в области 339,0 эВ. Появление такой спектральной линии можно объяснить либо образованием ацетатных комплексов с донорными лигандами, в качестве которых выступают компоненты бактериальных клеток [172], либо образованием субнаноразмерных кластеров палладия, спектральные свойства которых отличаются от свойств объемного или даже наноразмерного металла из-за размерных эффектов [266]. Также необходимо отметить, что глубина анализа методом РФЭС не превышает нескольких нанометров, то есть изучению подвергается только приповерхностная фаза палладия, поэтому следует осторожно интерпретировать полученные результаты РФЭС.

Активность ферментных систем клеток зависит от температуры окружающей среды, что может повлиять на процесс формирования наночастиц палладия бактерией. Поэтому, при приготовлении катализаторов Pd/*P. yeii* варьировали не только время подачи донора электронов, но и температуру смеси, в которой осуществляли приготовление катализатора. С катализаторами Pd/*P. yeii*, приготовленными с использованием нитрата и ацетата палладия при разном времени подачи H₂ и при разной температуре, осуществили реакцию Мизороки-Хека (Схема 6) и определили выход продукта (Рисунок 20 и Рисунок 21).

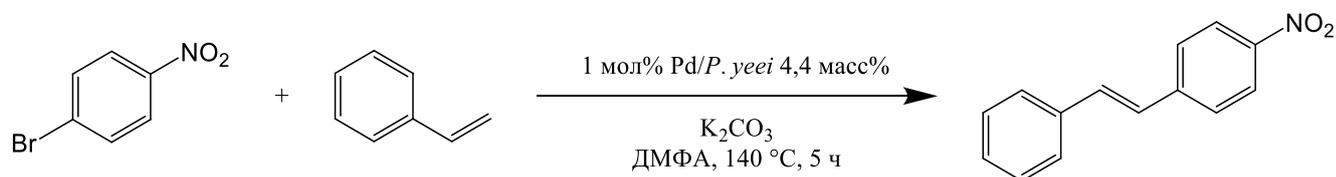


Схема 6. Реакция Мизороки-Хека для проверки каталитической активности Pd/*P. yeii*, полученного при варьировании условий приготовления

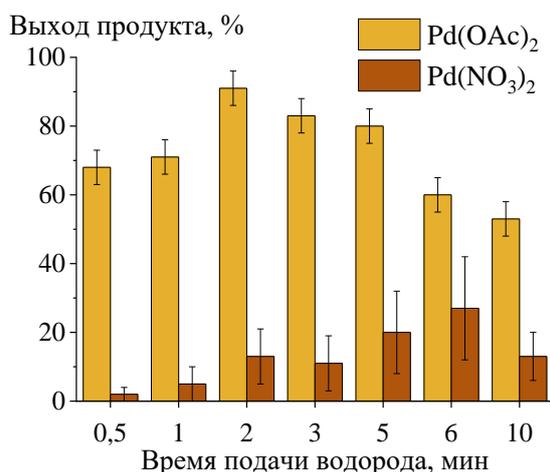


Рисунок 20. Выход продукта реакции Мизороки-Хека с катализаторами Pd/P. *yeei*, приготовленными при разном времени подачи H₂

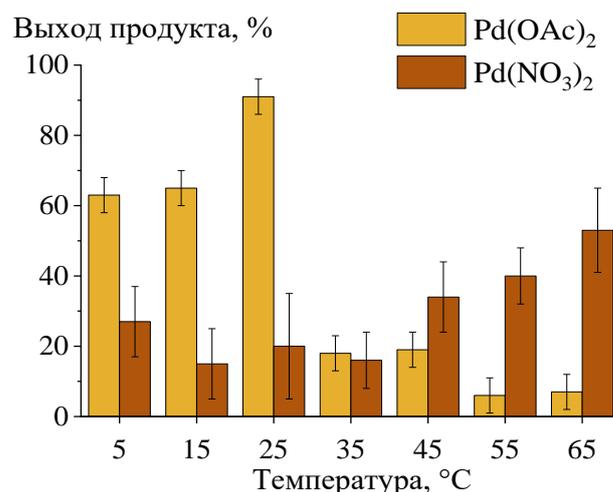


Рисунок 21. Выход продукта реакции Мизороки-Хека с катализаторами Pd/P. *yeei*, приготовленными при разной температуре

Наибольший выход продукта в реакции Мизороки-Хека (Схема 6) получен с катализатором Pd/P. *yeei*, приготовленным при использовании Pd(OAc)₂ и продолжительности барботирования H₂ 2 минуты. Анализируя выходы продукта реакции и изображения катализатора, полученные электронной микроскопией (Рисунок 14), сделан вывод, что времени подачи водорода менее 2 минут недостаточно для формирования наночастиц и приготовления катализатора с максимальной активностью. Снижение выхода продукта реакции с увеличением продолжительности подачи водорода вероятно связано с прогрессирующей агломерацией наночастиц Pd, что снижает активность катализатора Pd/P. *yeei*. Выход 4-нитро-*транс*-стильбена в реакции с катализатором Pd/P. *yeei*, приготовленным из Pd(NO₃)₂, ниже и не имеет однозначной зависимости от времени барботирования водородом (Рисунок 20) по сравнению с использованием катализатора приготовленного из ацетата палладия. Оптимальная температура для приготовления катализатора Pd/P. *yeei* из ацетата палладия 25 °C, так как при данной температуре выход продукта максимален (Рисунок 21). Оптимум температуры для формирования Pd/P. *yeei* из Pd(NO₃)₂ точно не определён, но происходит увеличение выхода продукта с ростом температуры выше 40 °C, когда происходит денатурация белков клетки и нарушение гомеостаза. Это может негативно повлиять на биологическую активность клеток, и, следовательно, их способность к формированию и стабилизации наночастиц определённого размера. Низкий выход продукта реакции Мизороки-Хека с применением катализатора Pd/P. *yeei*, приготовленного из Pd(NO₃)₂, вероятно, связан с негативным воздействием нитрата на клетки микроорганизмов, что было проверено при помощи флуоресцентной микроскопии (ФМ).

Смеси бактерий с солями палладия с разной продолжительностью подачи водорода анализировали с помощью ФМ, чтобы определить состояние клеток в зависимости от используемой соли Pd и продолжительности подачи водорода (Рисунок 22).

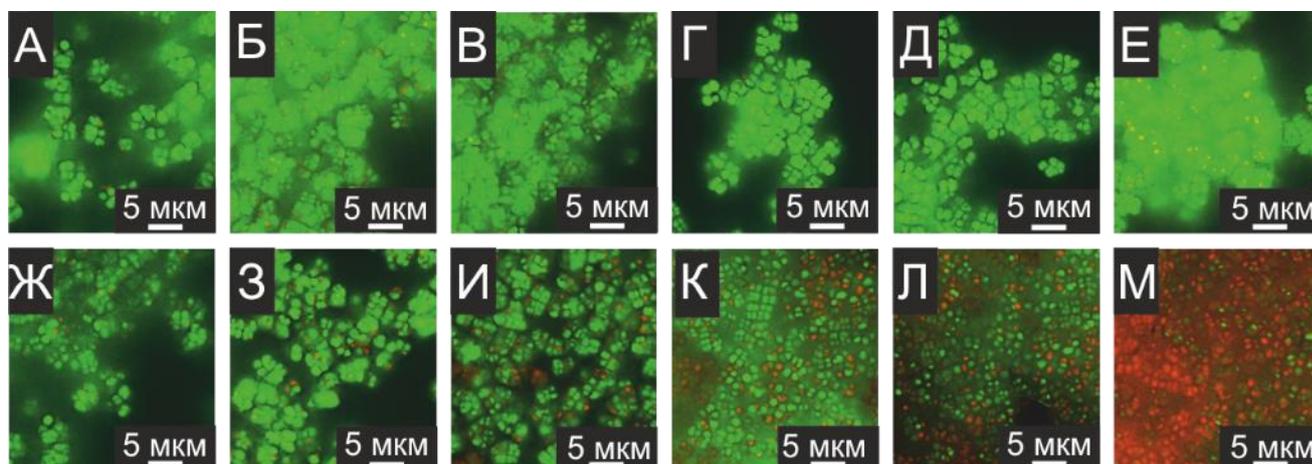


Рисунок 22. Изображения, полученные методом флуоресцентной микроскопии, бактерий *P. yeii*: А, Ж – без соли Pd и подачи H_2 ; Б – с $Pd(OAc)_2$ до подачи H_2 ; В, Г, Д, Е – с $Pd(OAc)_2$ и барботированием H_2 в течение 1, 2, 5 и 10 мин., соответственно; З – с $Pd(NO_3)_2$ до подачи H_2 ; И, К, Л, М – с $Pd(NO_3)_2$ и барботированием H_2 в течение 1, 2, 5 и 10 мин., соответственно

Зелёный цвет люминесценции бактерий обусловлен образованием комплекса при взаимодействии красителя SYTO9 и нуклеиновых кислот клетки. Йодид пропидия обладает большей константой связывания с нуклеиновыми кислотами по сравнению с SYTO9, что приводит к замещению SYTO9 и образованию комплекса нуклеиновых кислот с йодидом пропидия, для которого характерна люминесценция красного цвета. Замещение SYTO9 возможно только при нарушении целостности клеточной мембраны, т. к. через неповреждённую мембрану йодид пропидия проникнуть внутрь клетки бактерии не может, соответственно, красная люминесценция свидетельствует о нарушении целостности мембраны. Повреждение и нарушение проницаемости клеточной мембраны приводит к гибели клетки. Поэтому рост числа клеток с красной люминесценцией равнозначен увеличению количества клеток с повреждением клеточной мембраны и, следовательно, нежизнеспособных клеток. С увеличением времени подачи H_2 в смесь клеток *P. yeii* и нитрата палладия наблюдают рост количества клеток с красной люминесценцией (Рисунок 22И–М), и, следовательно, прогрессирующую гибель клеток от нарушения целостности клеточной мембраны. Причём это может быть токсичное воздействие, как нитрат-ионов [267, 268], так самого металла. Возможно повышенная, по сравнению с ацетатом палладия, растворимость нитрата палладия приводит к быстрому восстановлению металла и формированию наночастиц, что не позволяет клеткам справиться с их токсичным

воздействием [269] и выжить. В этих условиях происходит гибель бактерий *P. yeii*. Подобного негативного воздействия не наблюдали при использовании ацетата палладия (Рисунок 22Б–Е). Т. о. подтверждено, что применение нитрата палладия приводит к гибели клеток, и сделан вывод, что для приготовления катализатора целесообразно использовать ацетат палладия.

По результатам ФМ предположили, что для приготовления катализатора важно использовать нативные клетки *P. yeii*. Для проверки этого предположения клетки *P. yeii* перед приготовлением катализатора Pd/*P. yeii* предварительно обрабатывали пастеризацией (64 °С в течение 45 минут) и автоклавированием (1,1 атм., 121 °С в течение 45 минут). После чего готовили и анализировали образцы, используя флуоресцентную микроскопию (Рисунок 23).

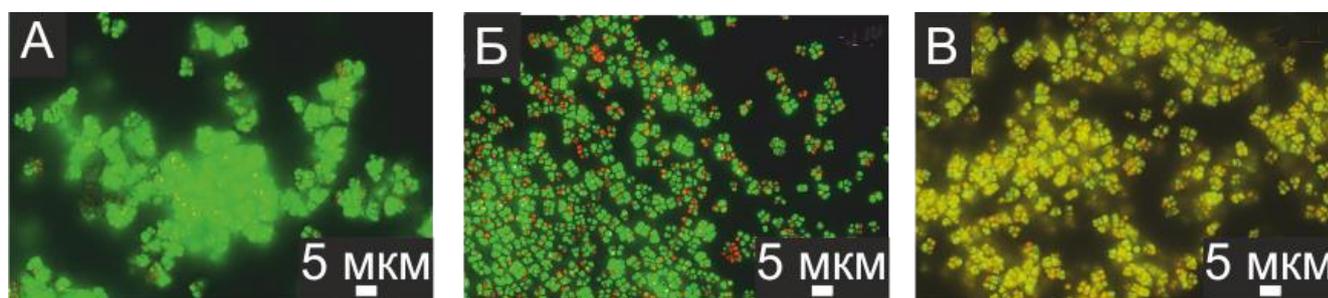


Рисунок 23. Полученные методом флуоресцентной микроскопии изображения катализатора Pd/*P. yeii*, приготовленного из бактерий:

А – нативных; Б – пастеризованных; В – автоклавированных

Нативные клетки в катализаторе Pd/*P. yeii* люминесцируют зелёным цветом, красная люминесценция практически не встречается, следовательно, клеточная мембрана не повреждена. Жёлтая флуоресценция автоклавированных клеток обусловлена неполным замещением красителя SYTO9 на йодид пропидия в мёртвых клетках, это известное явление, которое может возникнуть при использовании данных красителей. В данном случае жёлтый цвет люминесценции означает гибель клеток бактерий. Малая доля пастеризованных бактерий с красной люминесценцией демонстрирует сохранение структуры цитоплазматической мембраны, в тоже время, 45 минут при температуре 64 °С достаточно для денатурации ферментов и гибели неспорообразующих мезофильных бактерий, поэтому предположено, что пастеризованные клетки сохранили структуру клеточной мембраны, но из-за денатурации белка они утратили ферментативную активность и способность к росту и размножению. Подтвердить утрату ферментативной активности можно определив активность фермента, а способность к росту и размножению проверить высевом на твёрдые питательные среды.

Так как в литературе по получению наночастиц металлов с помощью ферментных систем бактерий чаще всего отводят главную роль ферментам дегидрогеназам и гидрогеназам [230, 232,

240, 270], то проверили относительную дегидрогеназную активность нативных, пастеризованных и автоклавированных бактерий *P. yeai* (Рисунок 24). Дегидрогеназную активность оценивали по сравнению с активностью нативных клеток, принятой за 100 %, что соответствовало полному обесцвечиванию метиленового голубого за 35 минут (пункт 2.9). Параллельно проводили посев в жидкую питательную среду, используя нативные, пастеризованные и автоклавированные клетки *P. yeai* в качестве посевного материала. Количество живых клеток в единице объёма питательной среды после культивирования оценивали методом высева на твёрдые питательные среды (Рисунок 24).

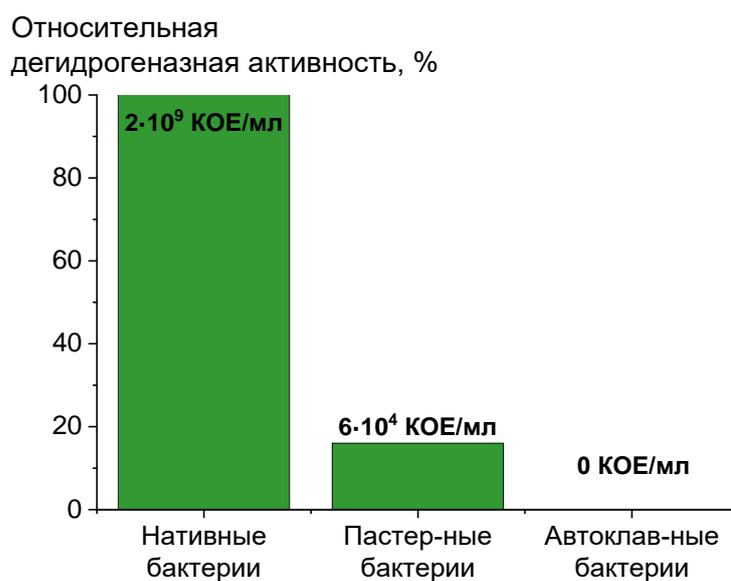


Рисунок 24. Относительная дегидрогеназная активность и рост нативных и термически обработанных клеток *P. yeai*

Отсутствие дегидрогеназной активности и роста клеточной биомассы свидетельствует о гибели бактерий *P. yeai* после автоклавирования. Присутствует небольшой рост биомассы и остаточная дегидрогеназная активность у бактерий после пастеризации, следовательно, часть клеток не полностью утратили ферментативную активность и смогли выжить. Но следует отметить, что рост был незначителен (конечное содержание клеток в объёме составило только 0,003 % от аналогичного показателя для выращенной из нативных клеток культуры), а относительная активность дегидрогеназы составила всего 16 %. Следовательно, пастеризация привела к снижению ферментативной активности клеток и их гибели.

Нативные, пастеризованные и автоклавированные бактерии *P. yeai* использовали для приготовления катализаторов Pd/*P. yeai*, с которыми осуществили реакцию Мизороки-Хека (Схема 6).

Выход продукта реакции Мизороки-Хека при применении приготовленного из нативных клеток катализатора Pd/*P. yeii* составляет 96 %, катализаторы Pd/*P. yeii* с носителем из термически инактивированных клеток обеспечивает выход продукта реакции 8 % для пастеризованных и 3 % для автоклавированных клеток. Приготовление катализатора с применением термически обработанных бактерий *P. yeii* повлияло на его свойства, что привело к резкому падению выхода продукта реакции. Как известно, размер наночастиц палладия влияет на характеристики катализатора, поэтому предположили, что приготовленные катализаторы различаются между собой размером наночастиц.

Срезы катализаторов Pd/*P. yeii*, приготовленных из нативных, пастеризованных и автоклавированных клеток изучили методом просвечивающей электронной микроскопии (Рисунок 25), для получения данных о размерах частиц Pd. Обработка изображений, полученных методом ПЭМ, с помощью нейросетей [259] позволила оценить размер наночастиц палладия и построить их распределение по размерам (Рисунок 25Г, 25З, 25М).

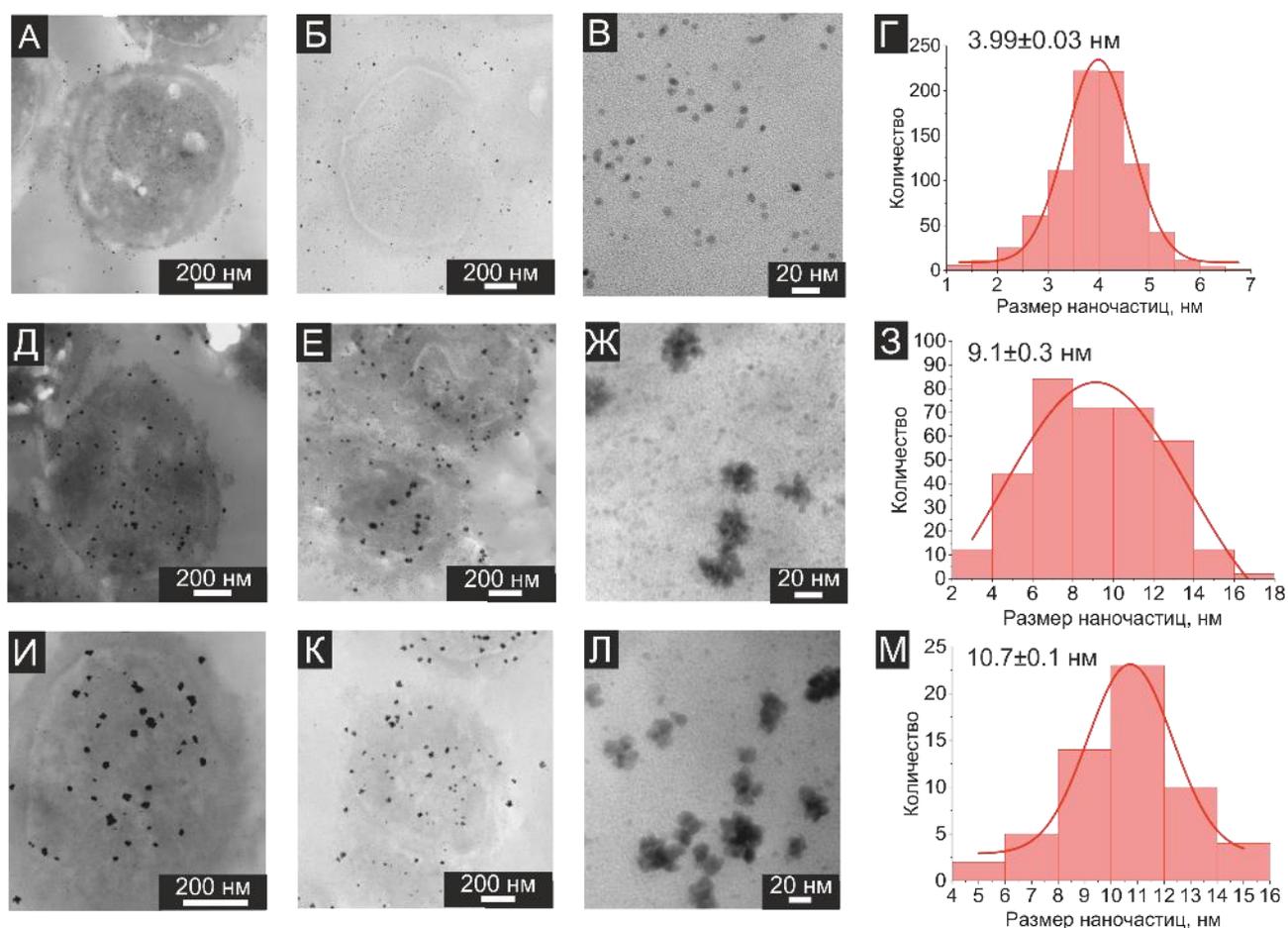


Рисунок 25. Изображения, полученные ПЭМ, и распределения наночастиц Pd по размерам в катализаторах Pd/*P. yeii*, приготовленных из клеток бактерий: А–Г – нативных; Д–З – пастеризованных; И–М – автоклавированных

На изображениях, полученных методом ПЭМ, клетки бактерий *P. yeii* представляют собой объекты серого цвета (при малой толщине среза светло-серого) с формой неправильного круга, диаметром около 0,5–1 мкм. Наночастицы палладия имеют вид серых или чёрных включений, обладающих сферической формой. Заметно существенное увеличение размера наночастиц между катализаторами Pd/*P. yeii*, приготовленными из нативных клеток и термически обработанных. В случае пастеризованных и автоклавированных клеток наблюдали наличие агломератов наночастиц Pd диаметром около 20 нм (Рисунок 25Ж и 25Л), при применении нативных клеток бактерий такого агломерирования не было замечено. При оценке распределения наночастиц по размерам агломераты разделяли на отдельные наночастицы, и определяли размер каждой. Построенное распределение наночастиц Pd по размерам (Рисунок 25Г, 25З, 25М) показывает, что применение нативных клеток обеспечивает узкий диапазон распределения размера наночастиц палладия и средний диаметр наночастиц $3,99 \pm 0,03$ нм, что в 2,3 и 2,7 раз меньше, чем при использовании пастеризованных ($9,1 \pm 0,3$ нм) и автоклавированных ($10,7 \pm 0,1$ нм) клеток, соответственно.

Дополнительно провели холостой опыт (пункт 2.4.3), который заключался в приготовлении катализатора в отсутствие бактерий *P. yeii*, чтобы продемонстрировать роль клеток при продувке ацетата палладия водородом. ПЭМ изображения полученного в отсутствие клеток катализатора представлены на Рисунке 26.

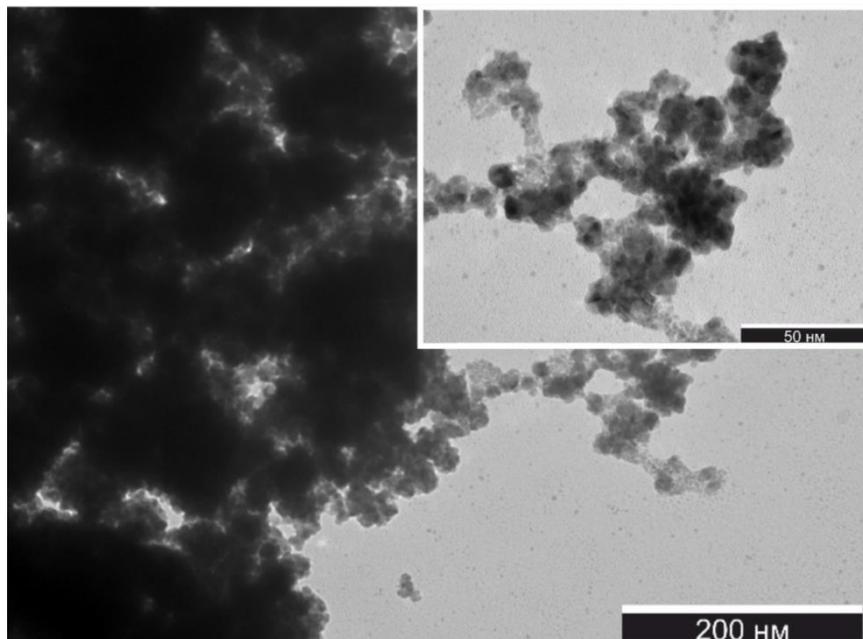


Рисунок 26. Микрофотография ПЭМ катализатора, приготовленного в отсутствие клеток бактерий *P. yeii*

Просвечивающая электронная микроскопия показала, что в отсутствие клеток микроорганизмов происходит сильная агломерация восстановленных наночастиц палладия, что видно в виде большой тёмной массы металла. Однако, при большем увеличении по краям от общей совокупности агломератов можно увидеть присутствие светло-серых наночастиц палладия меньшего размера (около 5 нм в диаметре). Проведённая с таким катализатором реакция взаимодействия 1-йодо-4-нитробензола со стиролом (Схема 9А) продемонстрировала, что за 5 ч. проведения реакции выход продукта реакции составляет 46 %, и образуется около 52 % динитробифенила (побочного продукта). Т. о. дополнительно показано, что клетки бактерий *P. yeii* способны стабилизировать размер наночастиц.

Исходя из данных по размерам частиц (Рисунок 25Г, 25З, 25М) сделан вывод, что компоненты бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 играют ключевую роль в стабилизации размера наночастиц, что важно для: а) приготовления катализатора Pd/*P. yeii* для реакций органического синтеза; б) поиска путей контролируемого биологического синтеза наночастиц палладия требуемого размера; в) определения точного механизма процессов формирования и стабилизации наночастиц металла клетками бактерий *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302.

От количества металла на носителе может зависеть активность катализатора, т. к. при большем содержании металла выше вероятность, что произойдёт агломерирование и увеличится размер наночастиц. Также большее содержание Pd в катализаторе увеличивает вероятность загрязнения продукта металлом. Однако, при большем содержании металла наоборот наблюдается рост активности катализатора, что можно объяснить тем, что больше металла равномерно распределено по поверхности носителя, т. е. высокой дисперсией каталитически активного палладия. Приготовлены катализаторы Pd/*P. yeii* с разным содержанием металла: 1, 4,4 и 20 масс%, чтобы проверить, влияет ли содержание Pd на свойства катализатора, их использовали в реакции Мизороки-Хека (Схема 4). Выход продукта реакции Мизороки-Хека (Рисунок 27) снижается с уменьшением содержания металла в катализаторе.

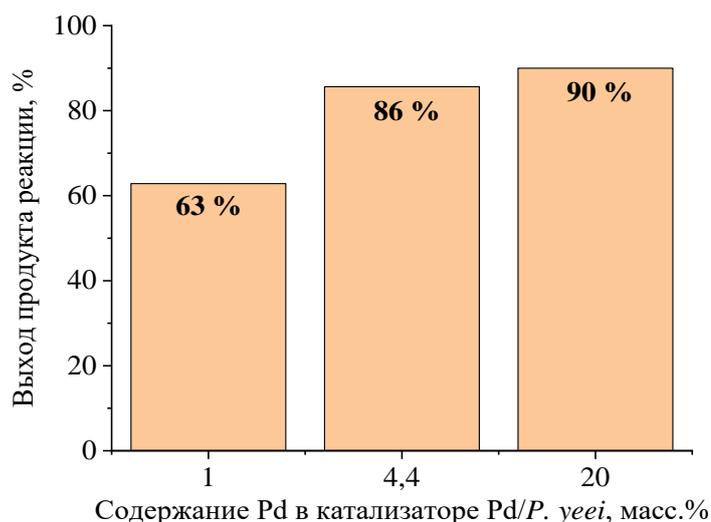


Рисунок 27. Выходы продукта реакции Мизороки-Хека при использовании катализаторов Pd/P. yei с разным содержанием палладия

Однако, значительное снижение выхода продукта реакции наблюдают для катализатора Pd/P. yei с содержанием Pd 1 масс%. В дальнейшей работе использовали катализатор Pd/P. yei с концентрацией металла 4,4 масс%, а в кинетических экспериментах – 1 масс%.

Еще одним важным этапом приготовления катализатора является его сушка после формирования. В ходе работы были протестированы следующие способы обезвоживания катализатора: 48 ч. при комнатной температуре, обработка этанолом, обработка ацетоном, сушка на роторном испарителе. В качестве контроля эффективности выбранного метода сушки проводили с катализатором реакцию Мизороки-Хека (Схема 6) и определяли выход продукта (Таблица 7). Дополнительно, для подтверждения, что сушка необходима после приготовления катализатора провели контрольный опыт, где катализатор не обезвоживали, а сразу использовали в реакции.

Таблица 7. Выходы продукта реакции Мизороки-Хека с катализатором Pd/P. yei (после барботирования водородом в течение 2 мин.)

Метод сушки	Без сушки	48 ч. на воздухе	Обработка этанолом	Сушка на роторном испарителе	Обработка ацетоном
Выход продукта, %	59	96	96	95	92

Показано, что использование катализатора без предварительной сушки снижает выход продукта реакции, что согласуется с наблюдаемым ранее негативным влиянием влажных клеток бактерий, присутствующих в реакционной смеси, на протекание реакции Мизороки-Хека при

использовании Pd/C в качестве катализатора. Выходы продукта реакций с катализаторами, полученными при других методах сушки сопоставимы, что позволяет значительно сократить время приготовления катализатора (обработка этанолом или ацетоном) до 7 мин. Однако, растворители могут повлиять на состояние клеточной мембраны и органелл, поэтому в дальнейшей работе использовали сушку в течение 48 ч. при комнатной температуре и атмосферном давлении.

Таким образом показано, что применение живых бактерий *P. yeai* на этапе приготовления катализатора необходимо для формирования наночастиц палладия со средним размером 4 нм и узким распределением размеров наночастиц. Оптимальными условиями для приготовления катализатора Pd/*P. yeai* выбраны: 25 °С, 2 минуты подачи водорода. В дальнейшей работе при этих условиях, используя ацетат палладия и живые клетки бактерий *P. yeai* готовили катализатор Pd/*P. yeai*, после приготовления катализатор сушили в течение 48 ч. на воздухе. Метод приготовления из возобновляемых ресурсов при комнатной температуре биогибридного катализатора Pd/*P. yeai* позволяет минимизировать отходы, снижая общую токсичность метода. Получаемый таким образом катализатор Pd/*P. yeai* представляет собой аэробные бактерии, часть которых равномерно покрыта наночастицами Pd со средним размером $3,99 \pm 0,03$ нм. Наночастицы Pd находятся внутри и на поверхности клеток. Среднее содержание Pd в катализаторе Pd/*P. yeai* составило $4,4 \pm 0,5$ масс%.

3.3 Катализатор Pd/*P. yeai* в реакциях Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры с различными субстратами

После проведения холостых экспериментов с клетками бактерий *P. yeai* и веществами (пункт 3.1) испытали Pd/*P. yeai* в качестве катализатора реакций Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры с разными исходными веществами. В качестве условий выбрали для реакции Мизороки-Хека 140 °С и 5 часов, для реакции Сузуки-Мияуры 80 °С и 3 часа (Схема 7). В качестве субстратов использовали, как более активные соединения – 1-йодо-4-нитробензол, йодбензол, так и менее активные – бромбензол, 4-йоданизол. Растворитель (ДМФА – реакция Мизороки-Хека; 80 об% этанола в воде – реакция Сузуки-Мияуры), основание (K_2CO_3) и загрузку катализатора (1 мол%) не варьировали, различие заключалось в исходном арилгалогениде, алкене или бороновой кислоте. В качестве катализатора для сравнения использовали наночастицы палладия на активированном угле Pd/C 5 масс%.

После завершения реакции структуру выделенного продукта подтверждали методом ЯМР-спектроскопии. Выходы продуктов приведены для выделенных и очищенных соединений (Схема 7 и 8).

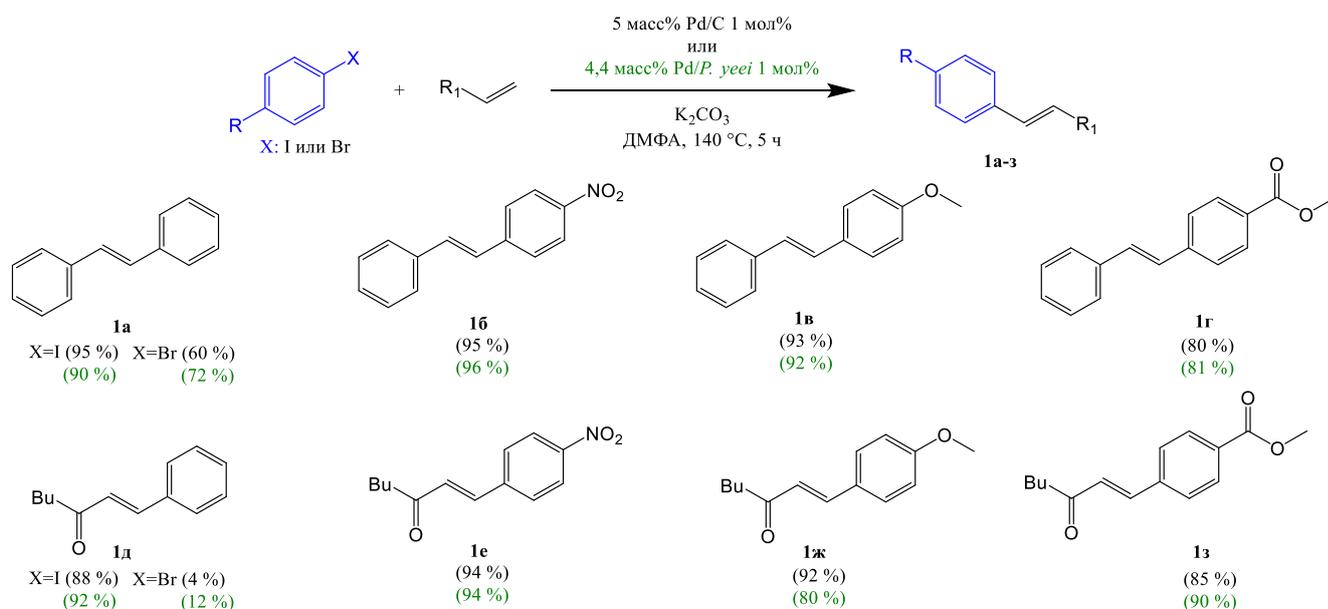


Схема 7. Реакция Мизороки-Хека и полученные продукты с выходами

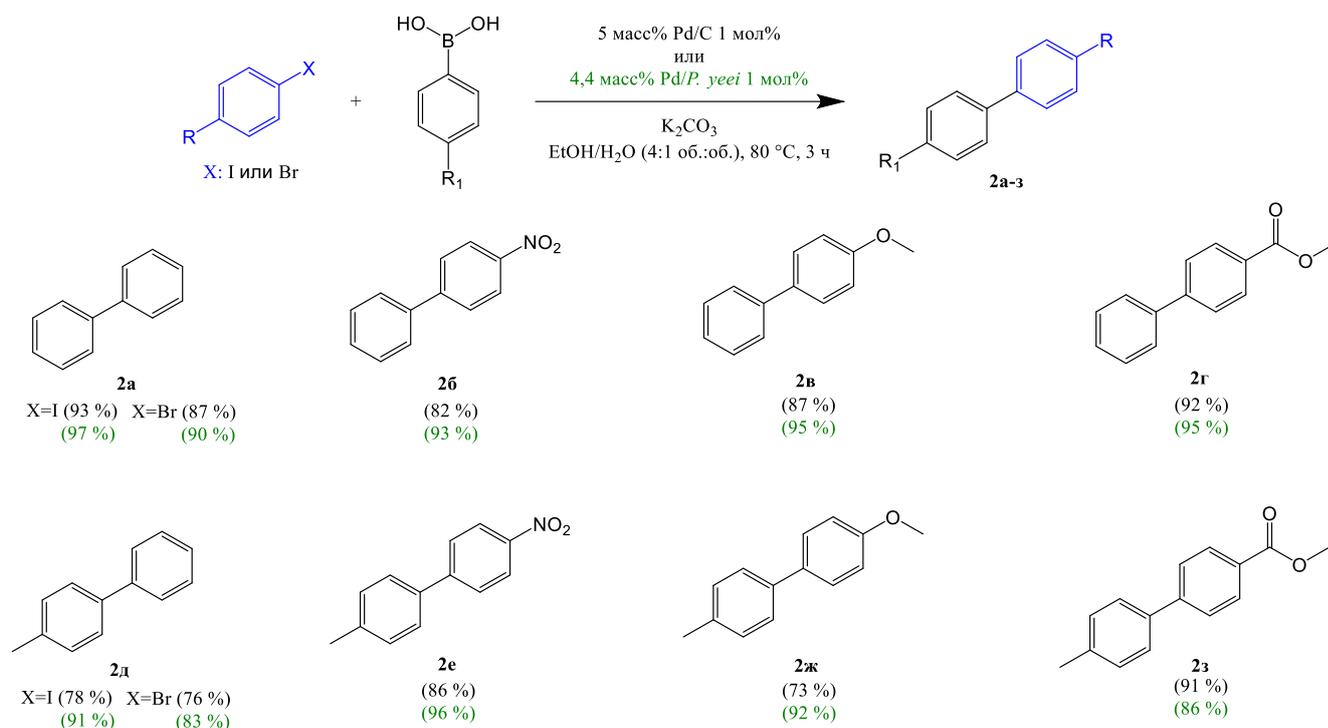


Схема 8. Реакция Сузуки-Мияуры и полученные продукты с выходами

Выходы продуктов реакций Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры в выбранных условиях при использовании катализатора Pd/*P. yeii* и катализатора Pd/C сопоставимы. Невысокий выход продукта при взаимодействии бромбензола с бутилакрилатом (Схема 7 **2д**) вероятно связан с неоптимальными условиями проведения химической реакции. Pd/*P. yeii* можно использовать в качестве катализатора реакции Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры с разными субстратами.

В работе [215] выход продукта сочетания йодбензола и стирола– стильбена – равен 85 %, по значению этот результат сопоставим с выходом в 95 % (Схема 7 **1a**). Но заметны различия в условиях осуществления реакций (Схема 2 и Схема 7), так в работе [215] начальная концентрация арилгалогенида больше (0,25 ммоль/мл против 0,2 ммоль/мл), взят больший относительно йодбензола избыток алкена и основания, синтез осуществляли при меньшей температуре (120 °С) и загрузке катализатора (0,5 мол%). Если сравнить условия реакций взаимодействия йодбензола, 4-йоданизола с фенилбороновой кислотой и бутилакрилатом [166] (Схема 1, Схема 7 и Схема 8), то разница в загрузках катализатора, дополнительное применение бромида тетрабутиламмония, меньшая температура, но большее время реакции не позволяет провести достоверное сравнение катализатора Pd/*P. yeai* с литературными данными.

Следует отметить, если культура чистая и культивирование проводится в постоянных условиях клетки бактерий хорошо воспроизводимы по элементному составу и свойствам поверхности. Но условия выращивания бактерий, наличие определённых генов и их экспрессия, влияют на элементный состав клетки и наличие компонентов, таких как ферменты, плазмиды и т.д. Эта зависимость от условий выращивания и различие в используемых в литературе методах приготовления наночастиц палладия на клетках бактерий дополнительно затрудняет сравнение между собой катализаторов полученных с использованием различных клеток.

Для определения активности катализатора и селективности образования продукта реакции необходимо провести кинетические исследования накопления продукта реакции.

3.4 Кинетика реакции Мизороки-Хека с катализатором Pd/*P. yeai*

Кинетические исследования, как правило, проводят в условиях, при которых реакция протекает медленно. Поэтому реакцию осуществляли в растворителе *N*-метилпирролидоне (NMP) с основанием триэтиламином (Et₃N) и с, одновременно, сниженной загрузкой катализатора Pd/*P. yeai* (0,1 мол%) и уменьшенной массовой долей палладия (1 масс%) (Схема 9А). В ходе кинетических экспериментов посредством ¹H ЯМР спектроскопии в качестве побочного продукта идентифицировали 4,4'-динитробифенил (Схема 9Б).

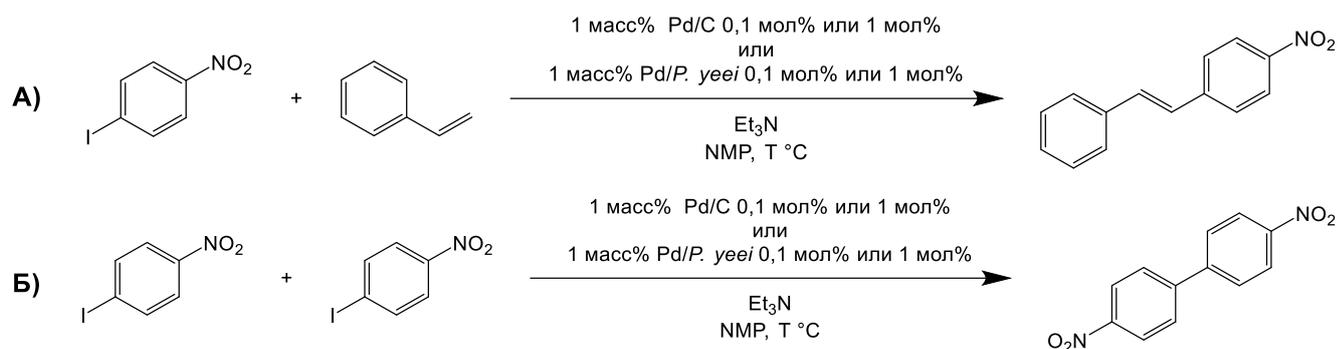


Схема 9. Образование целевого (А) и побочного (Б) продукта реакции Мизороки-Хека

Реакцию Мизороки-Хека (Схема 9А) осуществляли при температуре 100, 120, 140, 160 °С и определяли выход продукта реакции в течение времени методом ХМС по предварительно построенной с использованием внутреннего стандарта градуировочной зависимости (Рисунок 28).

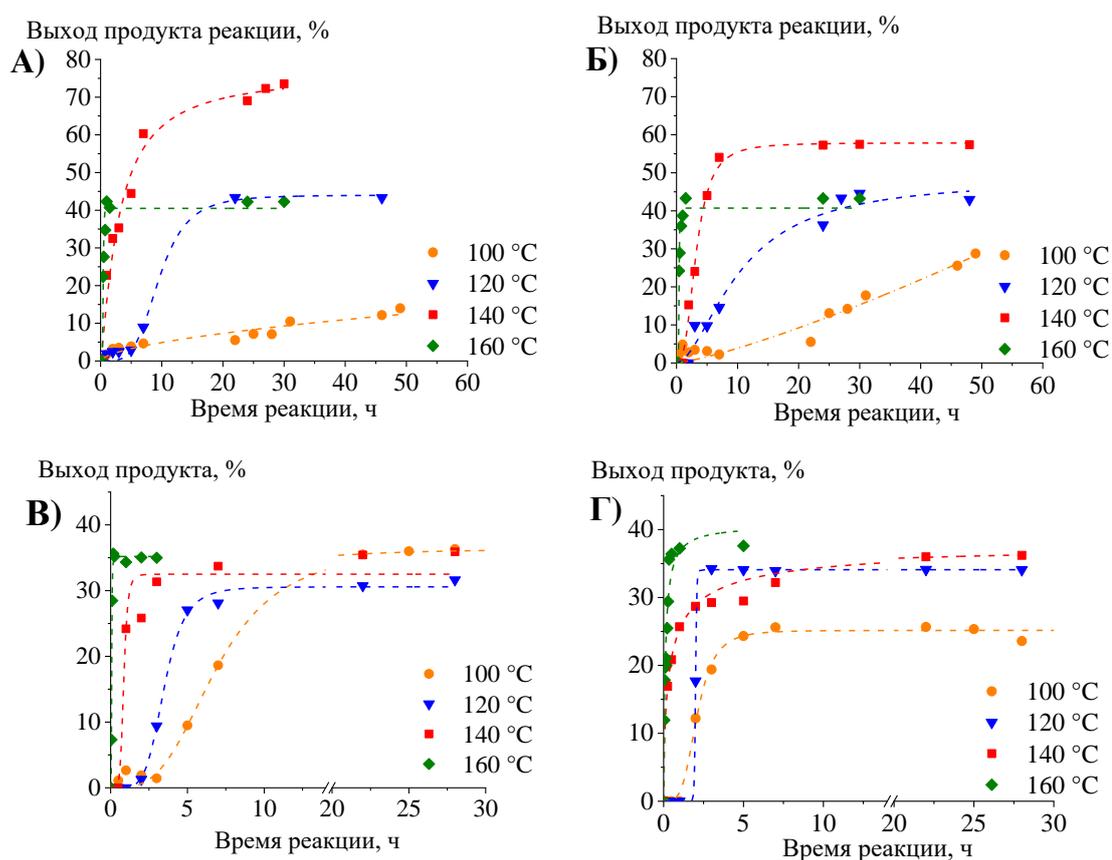


Рисунок 28. Выход 4-нитро-стильбена в зависимости от времени для катализаторов: А – 1 масс% Pd/C 0,1 мол%; Б – 1 масс% Pd/P. yeii 0,1 мол%; В – 1 масс% Pd/C 1 мол%; Г – 1 масс% Pd/P. yeii 1 мол%

Кинетические кривые демонстрируют незначительную разницу в образовании 4-нитростильбена при использовании катализаторов Pd/C и Pd/P. *yeei* и конечный выход продукта сопоставим. Исключением является разница в выходах продукта при температуре 100 °С, загрузке катализаторов 1 мол% (Рисунок 28В и 28Г). Отличие в выходах вероятно обусловлено тем, что часть наночастиц палладия находится внутри клеток, и при такой температуре доступность субстрата к ним ниже, чем при использовании Pd/C. С целью количественной оценки разницы в образовании продукта реакции определили среднюю начальную скорость образования продукта реакции, как тангенс угла наклона линейной аппроксимирующей прямой начального участка кинетической зависимости (Таблица 8).

Таблица 8. Начальная скорость образования продукта реакции Мизороки-Хека (Схема 9А)

Т, °С	Средняя начальная скорость образования продукта, мкмоль/(ч·мл)			
	Загрузка катализатора 0,1 мол%		Загрузка катализатора 1 мол%	
	Pd/C	Pd/P. <i>yeei</i>	Pd/C	Pd/P. <i>yeei</i>
100	3	3	6	16
120	7	6	25	35
140	26	22	62	46
160	146	150	318	306

Средняя начальная скорость образования продукта реакции сопоставимы при использовании катализатора Pd/C и Pd/P. *yeei*. Общая тенденция к увеличению средней начальной скорости образования продукта с большей загрузкой катализатора обусловлена с потенциальным увеличением числа активных центров в реакции.

Определяли селективность образования 4-нитростильбена и удельную производительность катализаторов (Рисунок 29) Pd/P. *yeei* и Pd/C.

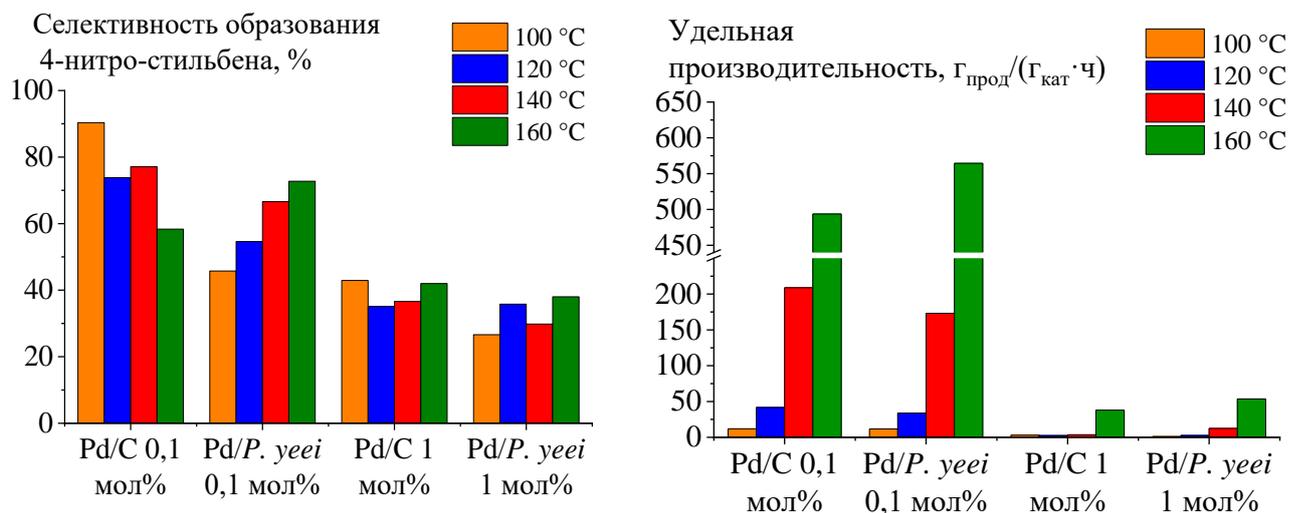


Рисунок 29. Селективность образования целевого продукта и удельная производительность катализаторов Pd/P. yeii и Pd/C, определённая по данным эксперимента

Снижение селективности образования продукта реакции с увеличением загрузки катализатора можно объяснить увеличением вероятности образования агломератов в ходе реакции и/или ростом вероятности протекания побочных процессов. Примечательным является особенно выраженный при загрузке катализатора 0,1 мол% рост селективности образования продукта реакции при использовании катализатора Pd/P. yeii с ростом температуры. Возможно повышение температуры приводит к: а) увеличению проницаемости клеточной мембраны; б) высокая температура приводит к разрушению бактерий. Оба сценария приводят к увеличению доступности субстрата к активным центрам, находящимся на палладии, который локализован внутри клеток бактерий и, по всей видимости, эти активные центры способны к более селективному образованию продукта. Удельные производительности катализаторов Pd/P. yeii и Pd/C сопоставимы.

Катализатор Pd/P. yeii 1 масс% выдерживали в NMP при 160 °C в течение 1,5 ч., чтобы подтвердить, что это повлияет на селективность образования продукта. После обработки катализатора, смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли необходимые реагенты (пункт 2.19.1) и проводили реакцию (Схема 9А) при температуре 140 °C (Рисунок 30).

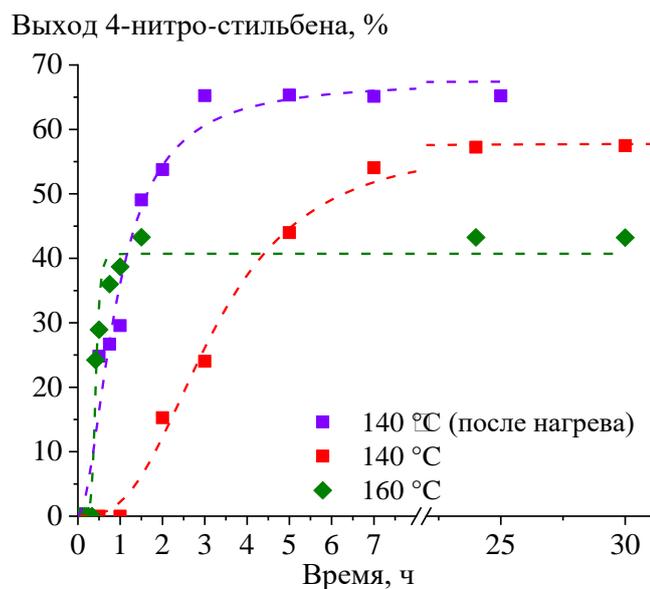


Рисунок 30. Выход продукта реакции в зависимости от времени для катализатора Pd/P. yei

Зафиксировано увеличение скорости образования продукта реакции в случае применения катализатора Pd/P. yei, который предварительно выдерживали при нагревании в NMP, по сравнению с применением катализатора без предварительного нагрева (при температуре реакции 140 °C) (Рисунок 30). Интересно также, что выход продукта реакции явно выше при использовании предварительно обработанного катализатора, что связано с возросшей селективностью образования продукта реакции и удельной производительностью после выдерживания катализатора в NMP при 160 °C на протяжении 1,5 ч. (Рисунок 31)

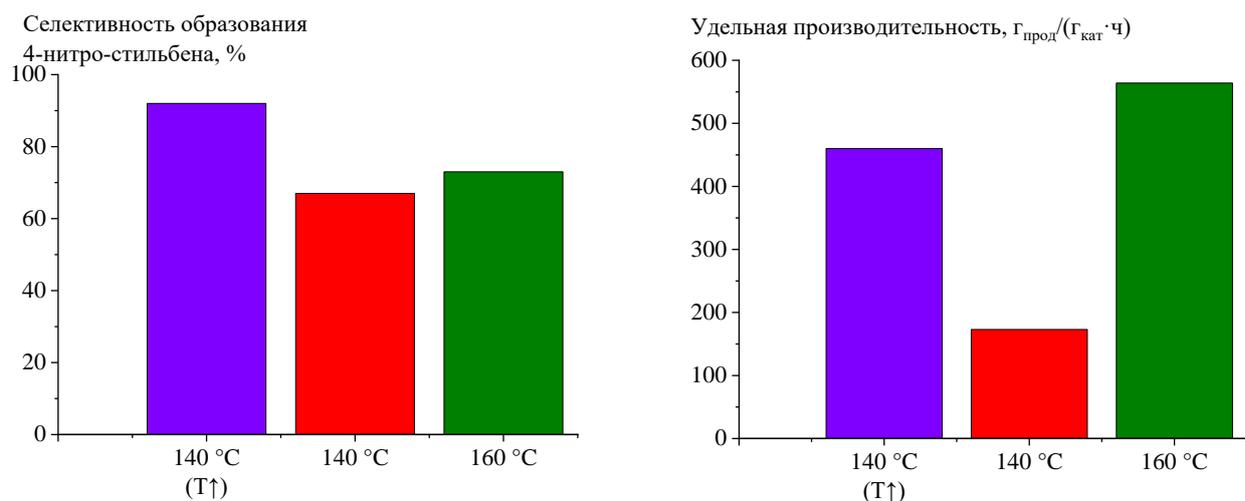


Рисунок 31. Селективность образования продукта реакции и удельная производительность катализатора Pd/P. yei: 140 °C (T↑) – после предварительной обработки в NMP, реакцию проводили при 140 °C; 140 и 160 °C – без обработки при соответствующих температурах

Зная, что NMP является одним из веществ, способным разрушить клеточную мембрану и приняв во внимание рост селективности в реакции и удельной производительности катализатора Pd/P. *yeei* после предварительной обработки, сделан вывод, что по всей видимости в условиях высоких температур и воздействия растворителя происходит разрушение клеток с высвобождением палладия находящегося внутри бактерий, который, по всей видимости, более активен и селективен в образовании 4-нитро-*транс*-стильбена.

По числу оборотов катализатора и частоте оборотов оценивают производительность и активность катализатора, соответственно. На данном этапе затруднительно определить роль отдельных каталитических центров в катализаторе Pd/P. *yeei*, находящихся, как снаружи клетки, так и внутри них. Поэтому рассчитаны число оборотов (TON, turnover number) и частота оборотов (TOF, turnover frequency) катализаторов (Таблица 9), приняв допущение, что все активные центры у Pd обладают одинаковой активностью и весь металл участвует в образовании продукта реакции. Дополнительно определяли эффективную энергию активации образования продукта реакции, используя метод начальных скоростей ($\ln r_0 = \text{const} - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$).

Таблица 9. TON, TOF и эффективная энергия активации образования 4-нитро-стильбена

Т, °С	Загрузка катализатора 0,1 мол%				Загрузка катализатора 1 мол%			
	TON		TOF, ч ⁻¹		TON		TOF, ч ⁻¹	
	Pd/C	Pd/P. <i>yeei</i>	Pd/C	Pd/P. <i>yeei</i>	Pd/C	Pd/P. <i>yeei</i>	Pd/C	Pd/P. <i>yeei</i>
100	135	231	5	5	36	26	1	0,6
120	468	401	21	15	32	34	1	1
140	666	560	95	80	35	29	2	6
160	466	378	311	252	34	38	5	25
Эффективная энергия активации, кДж/моль (метод начальных скоростей)								
Pd/C 0,1 мол%		Pd/P. <i>yeei</i> 0,1 мол%		Pd/C 1 мол%		Pd/P. <i>yeei</i> 1 мол%		
98,8		90,2		55,3		60,9		

Значения TON и TOF численно больше у катализатора Pd/C, чем у катализатора Pd/P. *yeei*. Однако, высокая конверсия и расход исходного арилгалогенида приводит к более высокой производительности Pd/P. *yeei* в реакции. Под эффективной энергией активации в данном случае подразумевают некоторую необходимую для получения продукта суммарную энергию, она складывается из затрат на преодоление энергетических барьеров и энергий возможных сорбций/десорбций. Также метод начальных скоростей может уступать в точности экспериментальному методу определения через зависимость логарифма константы скорости

реакции от обратной температуры $\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$, но не требует знания кинетического уравнения реакции, которое сложно определить из-за сложного механизма реакции Мизороки-Хека. Эффективные энергии активации образования 4-нитро-стильбена у катализаторов Pd/C и Pd/P. *yeei* значимо не различаются. Однако сравнивая эффективную энергию активации в рамках одного катализатора при разных нагрузках, видна существенная разница в значениях, что косвенно свидетельствует об изменении вклада различных форм палладия в катализ.

Таким образом, кинетические исследования демонстрируют сопоставимость катализаторов Pd/P. *yeei* и Pd/C. Интересным является рост активности катализатора и селективности в реакции при термической обработке, вероятно, происходит разрушение бактерий, что увеличивает доступность субстрата к активным центрам внутри клеток. Не исключено, что часть Pd может иметь форму комплексов с компонентами клеток или субнаноразмерных кластеров, что обеспечивает увеличение эффективности реакции, это может стать предметом будущих исследований, на что косвенно указывают данные РФЭС. Переход палладия в реакционную смесь с поверхности носителя – известная проблема для нанесённых палладиевых катализаторов [271], учитывая возможное разрушение клеток, следовало проверить катализатор Pd/P. *yeei* на возможность многократного использования и потерю металла в ходе реакции.

3.5 Стабильность работы при повторном использовании катализатора Pd/P. *yeei*

В эксперименте использовали два подхода, описанные в литературе [272] – метод «перезапуска реакции» и метод с отделением катализатора (пункт 2.16). Метод «перезапуска реакции» прост в исполнении, т. к. предполагает внесение на каждом последующем цикле новой порции реагентов (без катализатора) к исходной реакционной смеси, однако, происходит нарушение пропорции катализатор:реагенты, т. к. количество исходных веществ, продуктов реакции и растворителя с каждым последующим циклом увеличивается, а количество катализатора остаётся без изменений. Метод с отделением катализатора предполагает извлечение катализатора из реакционной смеси, промывка от компонентов смеси, сушка, взвешивание и повторное использование, что, с одной стороны усложняет эксперимент, с другой стороны позволяет соблюдать пропорцию катализатор:вещества на каждом этапе и «отслеживать», возможные изменения в катализаторе в процессе многократного использования.

Pd/P. *yeei* использовали многократно в реакциях кросс-сочетания (Схема 10), чтобы проверить активность катализатора после нескольких последовательных циклов.

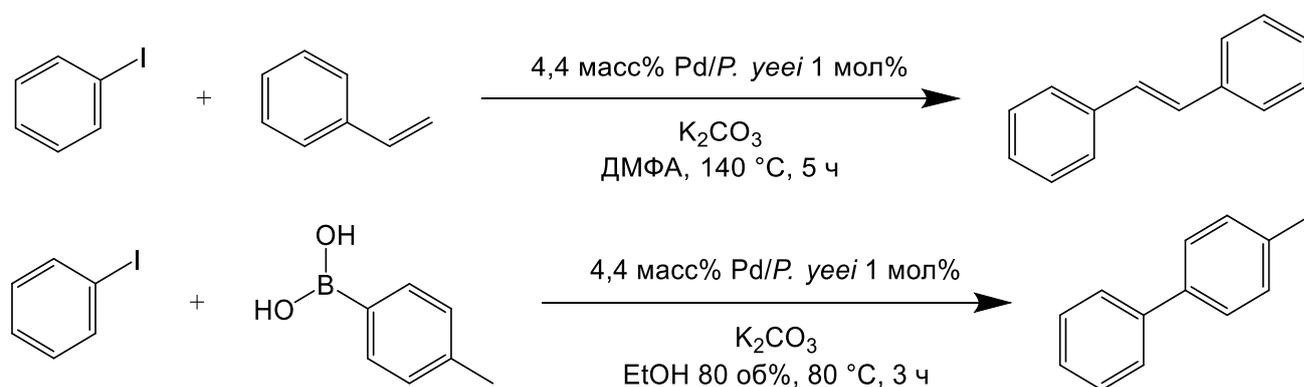


Схема 10. Реакции Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры для теста катализатора на многократное использование

Методы FS и CS использовали и для реакции Мизороки-Хека, и для реакции Сузуки-Мияуры, и определяли выходы продукта реакции (Рисунок 32).

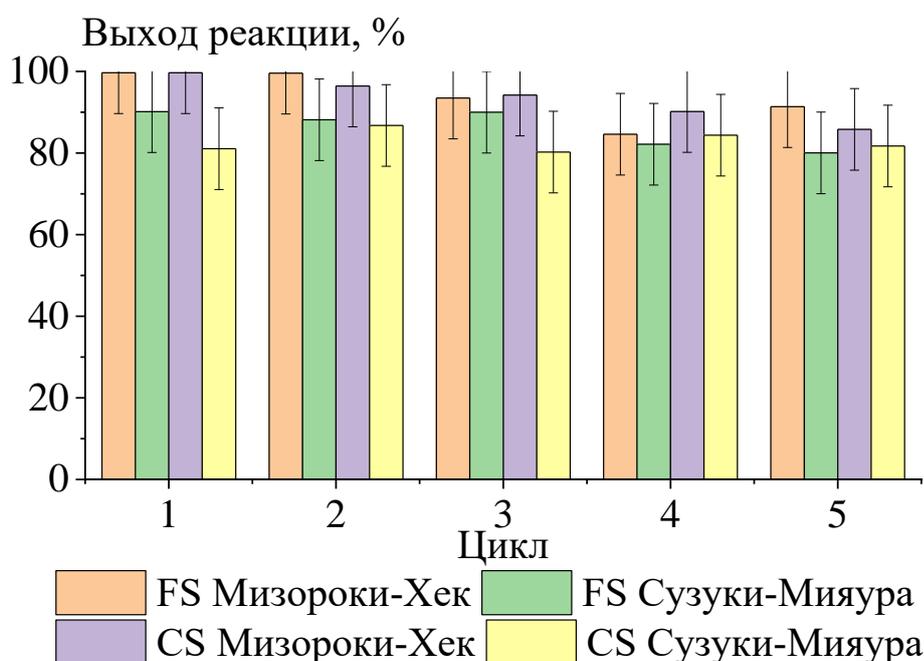


Рисунок 32. Выходы реакций Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры при многократном использовании Pd/P. *yeei*

Оба метода (FS и CS) показали сохранение высокого уровня выходов продукта реакции при использовании Pd/P. *yeei* после 5 последовательных реакций (Рисунок 32), что свидетельствует о сохранении активности катализатора. Присутствует тенденция к снижению выхода продукта с каждым последующим циклом, что логично с учётом возможных протекающих процессов – агломерирования наночастиц палладия, необратимой адсорбцией реагентов или продуктов и т. д. – характерных при применении катализатора, представляющего

собой наночастицы на носителе. Снижение выхода продукта реакции более выражено в случае реакции Мизороки-Хека: более высокая температура проведения реакции (140 °С против 80 °С при проведении реакции Сузуки-Мияуры), вероятно, сильнее воздействует на бактериальный носитель. ПЭМ изображения катализаторов после 5 циклов реакции были получены для оценки размеров наночастиц и состояния клеток (Рисунок 33).

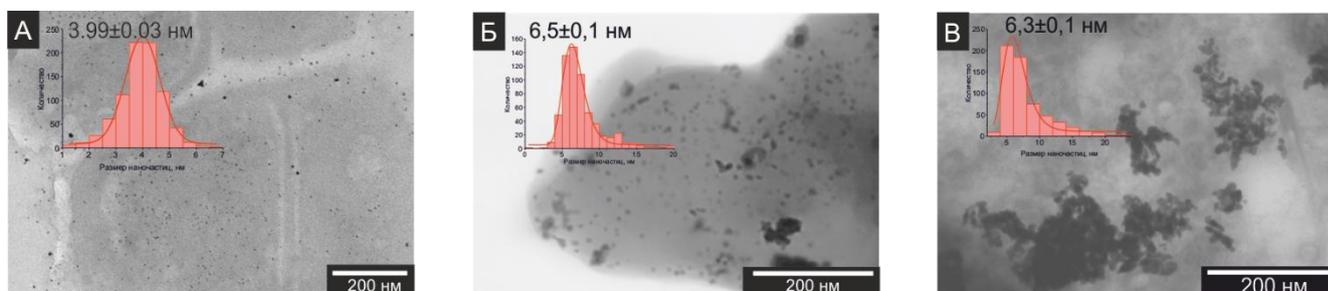


Рисунок 33. Изображения, полученные ПЭМ катализатора Pd/*P. yeii* (вставка – данные о распределении наночастиц по размерам):

А – до проведения реакции; Б – после 5 циклов реакции Мизороки-Хека; В – после 5 циклов реакции Сузуки-Мияуры;

Данные показывают, что после пяти циклов реакций средний размер агломерированных наночастиц увеличивается с 4 до 6 нм, что может быть одной из причин падения активности катализатора Pd/*P. yeii* при последовательном использовании. Этот результат лучше известного в литературе [215], где за пять циклов реакции Мизороки-Хека размер наночастиц увеличился с 5 до 20 нм. Несмотря на высокую для клеток температуру реакции (140 °С и 80 °С) и применение органических растворителей (ДМФА и 80 об% раствор этанола), биологический носитель визуально сохраняет свою целостность.

Для оценки изменения фазы палладия при многократном использовании катализатора Pd/*P. yeii* до реакций и после пяти последовательных циклов реакции Мизороки-Хека (Схема 10) использовали метод микро-рентгенофазового анализа (Рисунок 34)

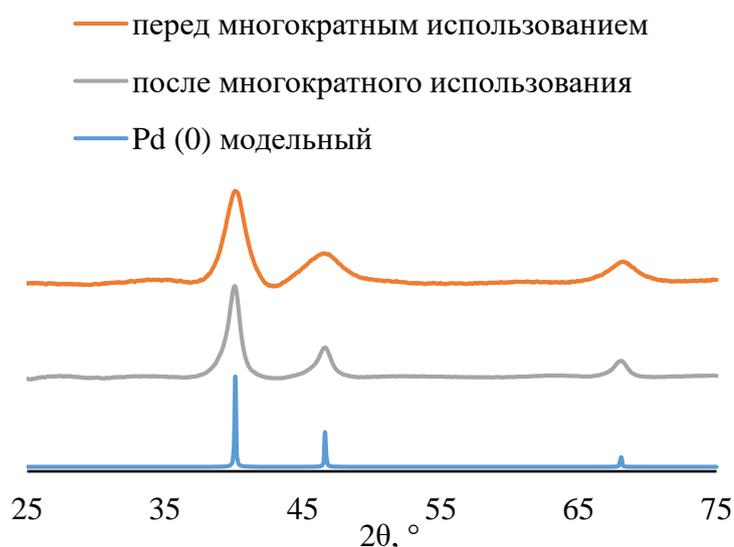


Рисунок 34. Дифрактограммы РФА катализатора Pd/P. ueei до и после многократного использования, модельный спектр построен по данным [261]

На дифрактограмме катализатора Pd/P. ueei пики с значением угла 2θ равном 40,1, 46,6 и 68,1° относятся к Pd(0). Сужение пиков на дифрактограмме после 5 циклов реакции Мизороки-Хека свидетельствует о увеличении размера частиц палладия. Отсутствие на дифрактограмме пиков характерных для оксида палладия обнаруженного с помощью метода РФЭС, предположительно обусловлено тем, что оксид в катализаторе присутствует в виде тонкой плёнки на поверхности металлической фазы. Форма Pd, которой соответствует пик при энергии связи 338,0 эВ (Рисунок 19), обнаруженная с помощью РФЭС вероятно или недостаточно сконцентрирована и/или имеет слишком малый размер для обнаружения с помощью микро РФА и требуют прибора с большей чувствительностью.

Используя уравнение Шеррера можно определить размер области когерентного рассеяния, однако, первоначальная задача при использовании микро РФА стояла в оценке качественного состава металла в катализаторе. Испускаемое прибором монохроматическое излучение является средним $\text{Cu } K_{\alpha}$ между $\text{Cu } K_{\alpha 1}$ и $\text{Cu } K_{\alpha 2}$, поэтому рассчитанный по уравнению Шеррера размер области когерентного рассеяния может иметь завышенное или заниженное значение. Приняв, что форма наночастиц шарообразная, по уравнению Шеррера определено, что средний размер области когерентного рассеяния до реакций равен $4,7 \pm 0,1$ нм, после 5-ти циклов реакции $7,8 \pm 0,1$ нм. Этот результат, в целом, соотносится с размером наночастиц, который был определён из ПЭМ изображений.

Эксперименты по многократному использованию катализатора также проводились при коротком времени реакции, чтобы проверить эффективность катализатора при более низкой

конверсии. При арилировании стирола 1-иодо-4-нитробензолом при 140 °С конверсия составила около 40 % в течение пяти последовательных циклов.

Помимо агломерирования, причиной падения активности катализатора может быть вымывание металла с поверхности носителя в ходе реакций, что известная проблема нанесённых катализаторов [271]. Поэтому, чтобы проверить катализатор Pd/P. *yeei* на переход металла с поверхности биологического носителя провели эксперимент (пункт 2.18) (Схема 11).

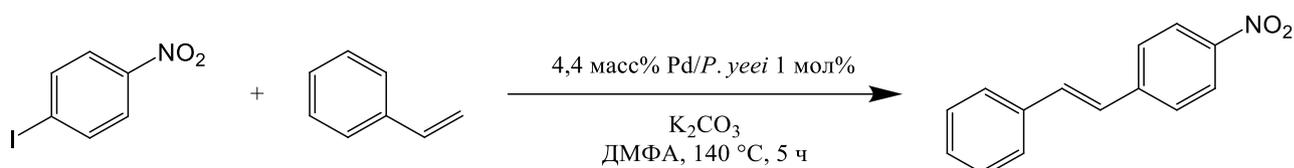


Схема 11. Условия реакции Мизороки-Хека для теста на переход металла в реакционную смесь

Суть эксперимента заключалось в том, что после кратковременного (10 минут) нагрева реакционной смеси с катализатором Pd/P. *yeei*, катализатор вынимали, промывали растворителем и вносили в свежую реакционную смесь. Реакционную смесь, в которую внесли катализатор, и смесь, из которой катализатор изъняли, оставляли при 140 °С и перемешивании на 5 часов. Отбирали пробы и определяли выход продукта реакции посредством ХМС перед изъятием катализатора (Рисунок 35 точка A₀) и через 5 часов (Рисунок 35 точки A₁ и B₁).

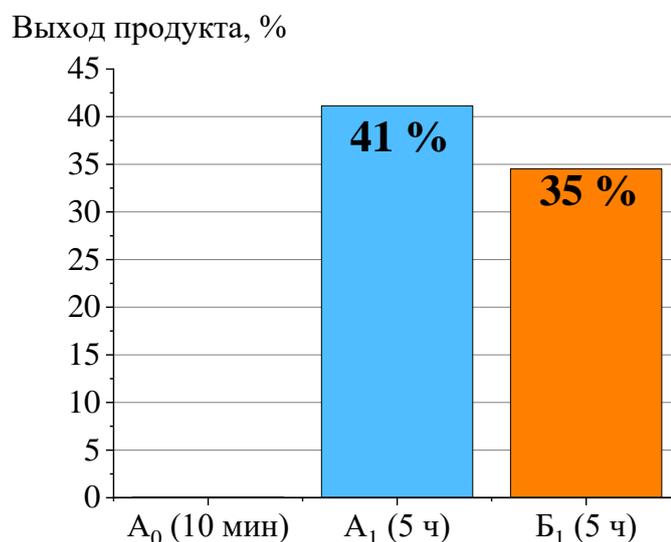


Рисунок 35. Выходы реакции Мизороки-Хека в тесте на переход металла с носителя в реакционную смесь: A₁ – исходная реакционная смесь; B₁ – реакционная смесь в которую перенесли катализатор

Так как выход продукта реакции зафиксирован в обеих реакционных смесях после истечения 5 часов, то был сделан вывод, что часть палладия перешла в реакционную смесь с поверхности биологического носителя за первые 10 минут нагрева, а другая часть металла осталась на носителе.

Дополнительно вымывание палладия было проверено с помощью горячего фильтрования. Для чего реакционную смесь реакции Мизороки-Хека (Схема 4) через 3 часа после начала реакции отфильтровывали на нагретом фильтре Шота, и оставляли при температуре реакции ещё на 2 часа. Определяли выход продукта реакции до фильтрования и после фильтрования. Выход продукта реакции до фильтрования составил 60 %, после фильтрования 82 %. Результаты горячего фильтрования подтверждают переход металла в реакционную смесь при осуществлении реакции.

Анализируя образцы катализатора Pd/*P. yeii* до реакции и после 5 циклов реакции Мизороки-Хека методом ИСП-МС, определено, что после многократного применения с биологического носителя потеряно около 23 % от исходного содержания Pd. Т. е. после реакций содержание Pd составило около 3,4 масс%.

Таким образом показано, что катализатор Pd/*P. yeii* способен сохраняет активность в реакции Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры в течение пяти последовательных циклов, при этом снижение выхода продукта реакции составило 12 %, что связано с агломерированием и увеличение размера наночастиц (средний размер наночастиц увеличился до 6 нм) и потерей металла с носителя. Это негативно влияет на срок службы катализатора, его активность и возможность рециклинга палладия. Для того, чтобы снизить переход палладия было предложено провести внедрение клеток *P. yeii* с наночастицами Pd в кремнийорганический материал. Показано, что катализатор Pd/*P. yeii* проявляет характеристичные признаки «коктейлевого» типа катализа с частичным вымыванием палладия.

3.6 Включение Pd/*P. yeii* в кремнийорганическую матрицу для предотвращения вымывания наночастиц Pd

Ранее было показано, что бактерии *P. yeii* можно иммобилизовать в кремнийорганический материал (органомодифицированный силикат – ORMOSIL), полученный золь-гель методом. Золь-гель метод позволяет получать чистый материал без требований к дальнейшей очистке. Синтез кремнийорганического материала проводили с использованием метилтриэтоксисилана, тетраэтоксисилана (ТЭОС), структуроуправляющего агента – поливинилового спирта – при катализе фторидом натрия (Схема 12).

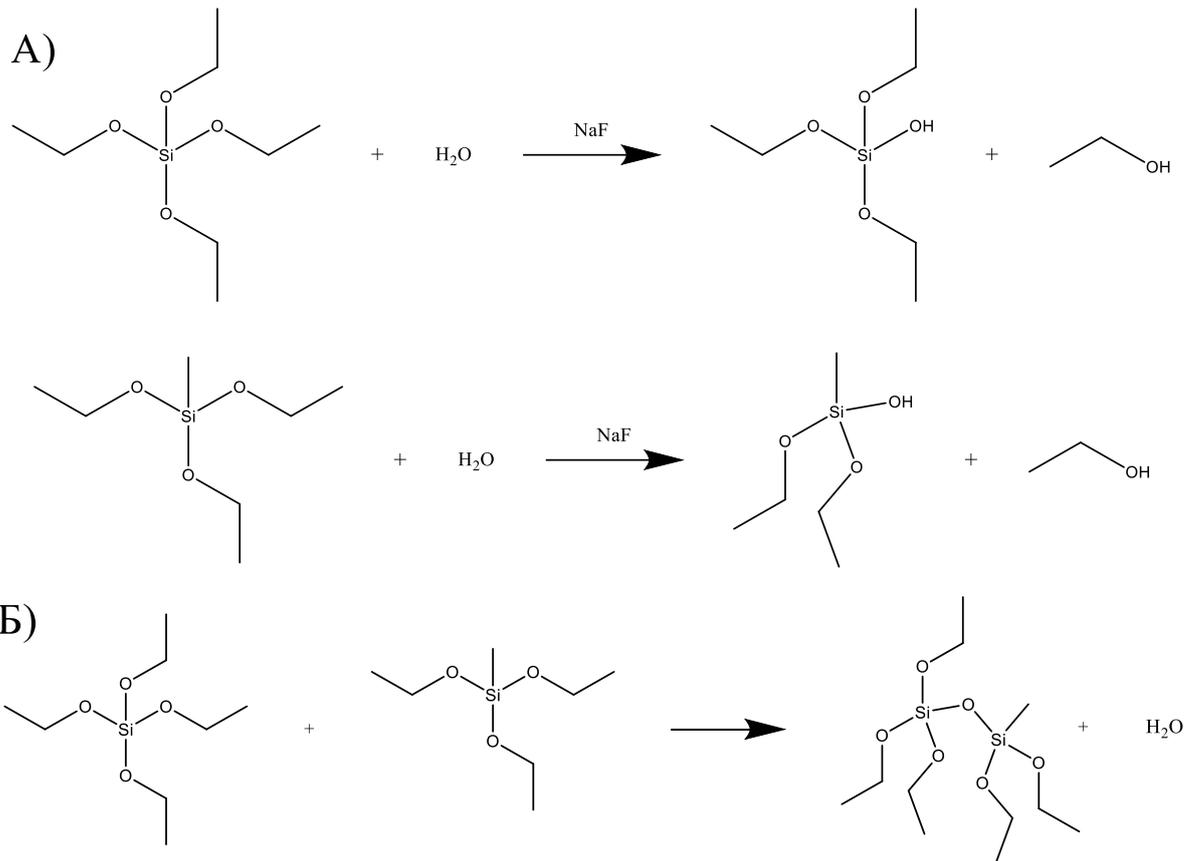


Схема 12. Стадии формирования кремнийорганического материала: А – гидролиз; Б – поликонденсация.

При начальном соотношении клеток и веществ предшественников по массе 3/1/43/44 *P. yeai*/ПВС/МТЭС/ТЭОС получали кремнийорганический материал с удельной площадью поверхности 359 м²/г (определено по модели Ленгмюра) и 312 м²/г (определено по модели Брунауэра-Эммета-Теллера, БЭТ), что обеспечивается значительной долей мезо- и макропор (Рисунок 36).

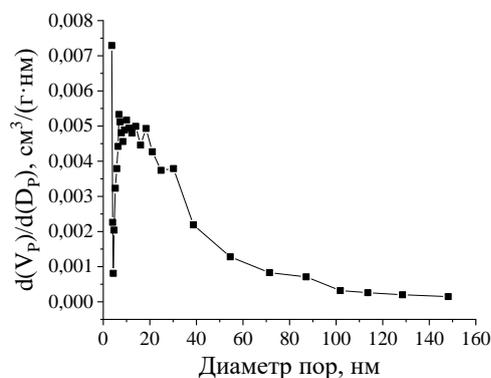


Рисунок 36. Распределение пор по размерам в кремнийорганическом материале с клетками *P. yeai*, определено по модели Барретта-Джойнера-Халенды (БДХ)

Для проверки гипотезы о том, что внедрение катализатора Pd/P. *yeei* в кремнийорганический материал снизит потери палладия при многократном использовании, приготовили катализатор Pd/P. *yeei*@ORMOSIL (Рисунок 37). Предполагается, что «оболочка» вокруг клеток, обладающая более сильными адсорбционными свойствами по сравнению с углеродом, предотвратит вымывание палладия, а наличие пор в материале (Рисунок 36) обеспечит эффективный транспорт субстрата к активным центрам катализатора.

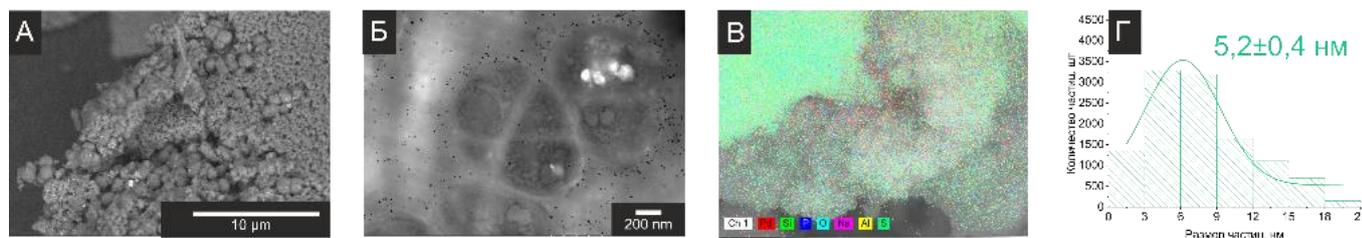


Рисунок 37. Данные по катализатору Pd/P. *yeei*@ORMOSIL: А – изображение, полученное СЭМ; Б – ПЭМ изображение среза катализатора Pd/P. *yeei*@ORMOSIL; В – карта распределения элементов; Г – распределение наночастиц Pd по размерам

При наблюдении методом СЭМ, катализатор представляет собой массу клеток *P. yeei* покрытых кремнийорганическим материалом (Рисунок 37). Клетки видны «на изломе материала» или в макропорах (Рисунок 37А). В отличие от катализатора Pd/P. *yeei* образец Pd/P. *yeei*@ORMOSIL не демонстрирует столь яркого свечения частиц палладия при сканирующей электронной микроскопии. Однако ПЭМ среза катализатора, внедрённого в кремнийорганический материал, подтверждает наличие наночастиц палладия как внутри клеток, так и в окружающем их кремнийорганическом материале (Рисунок 37Б). Вероятно, часть наночастиц палладия, слабо связанных с поверхностью клеток или вовсе не связанных с ними, сорбировалась на кремнийорганический материал в процессе приготовления катализатора.

Средний размер наночастиц палладия после внедрения в кремнийорганический материал составил $5,2 \pm 0,4$ нм (Рисунок 37Г), что незначительно больше размера до внедрения. Карта распределения элементов (Рисунок 37В) демонстрирует равномерное распределение палладия в материале, по крайней мере на глубине проникновения электронного пучка. Количественный анализ показал, что содержание палладия в Pd/P. *yeei*@ORMOSIL $0,61 \pm 0,07$ масс% после внедрения в кремнийорганический материал катализатора Pd/P. *yeei* с содержанием Pd 4,4 масс%. Таким образом, катализатор представляет собой наночастицы палладия, расположенные как внутри, так и снаружи бактерий *P. yeei*, при этом металл и клетки заключены

в кремнийорганический материал. Содержание палладия в конечном катализаторе составляет 0,61 масс%.

Повторили эксперимент (пункт 2.17) на проверку перехода палладия с носителя в реакцию смесь, осуществив реакцию Мизороки-Хека, с катализатором Pd/P. *yeei*@ORMOSIL и Pd/P. *yeei* (Рисунок 38). При повторе эксперимента вместо карбоната калия в качестве основания использовали триэтиламин, т. к. карбонат калия практически нерастворим в органическом растворителе и может блокировать поры в кремнийорганическом материале, препятствуя диффузии субстрата к палладию (пункт 2.17 Вариант 2).

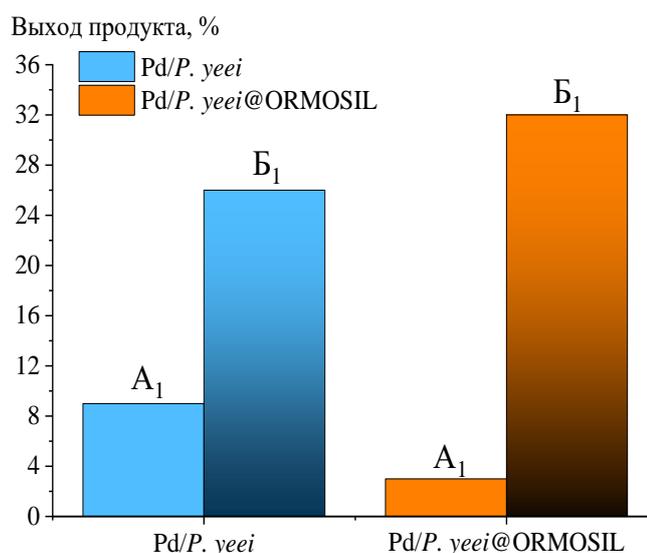


Рисунок 38. Выходы продукта реакции Мизороки-Хека в эксперименте на переход палладия в реакцию смесь: A₁ – исходные реакционные смеси; B₁ – реакционные смеси в которые перенесли катализатор

Уменьшение в 3,8 раза соотношения количества продукта в реакционных смесях А к Б для Pd/P. *yeei*@ORMOSIL по сравнению с катализатором без внедрения косвенно указывает на то, что меньше каталитически активного металла перешло в реакцию смесь. Определяли стабильность выходов продукта реакции Мизороки-Хека (Схема 13) при многократном использовании катализатора Pd/P. *yeei*@ORMOSIL в сравнении с Pd/C и Pd/P. *yeei* с использованием метода FS (Рисунок 39).

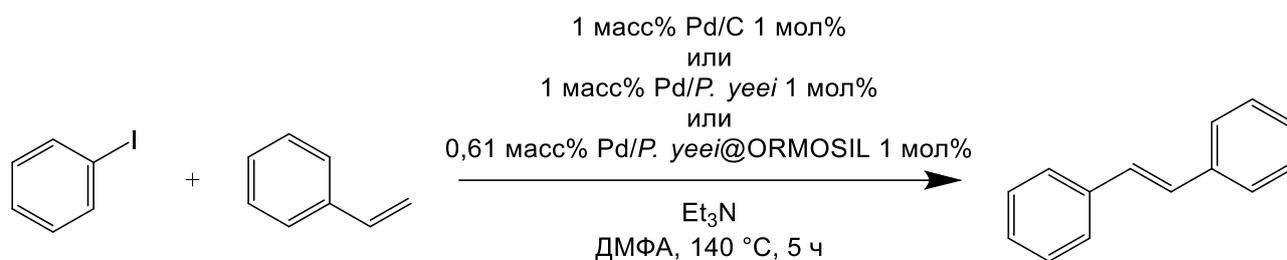


Схема 13. Условия реакции Мизороки-Хека для многократного применения катализаторов

Необходимо отметить, что применение в реакции Мизороки-Хека (Схема 13) другого основания, связано с тем, что карбонат калия нерастворим в органических растворителях, поэтому он может «закрыть» поры в кремнийорганическом материале, что приведёт к резкому падению транспорта веществ к активным центрам и резкому снижению скорости работы катализатора.

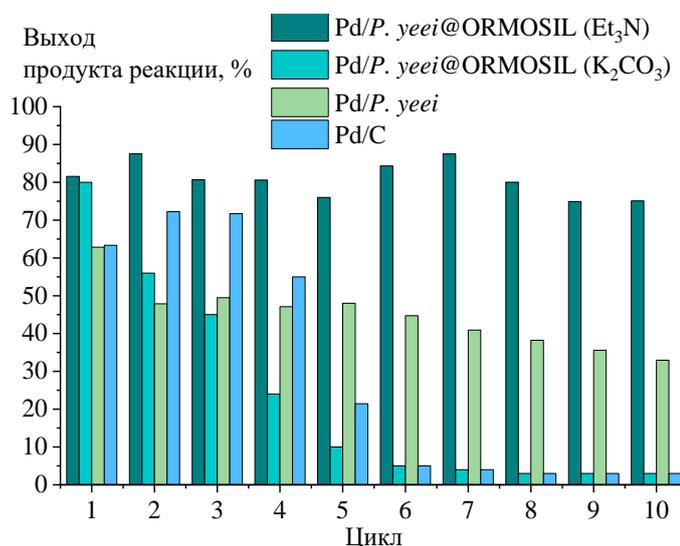


Рисунок 39. Выход продукта реакции Мизороки-Хека при многократном использовании катализаторов

Внедрение в кремнийорганический материал катализатора Pd/P. *yeei* позволяет сохранять выход продукта на высоком уровне в течение минимум 10 последовательных циклов, в отличие от катализаторов Pd/C и Pd/P. *yeei*, при применении которых наблюдается резкое снижение выхода продукта. Такая стабильность выходов продукта вероятно обусловлена меньшей потерей палладия в ходе реакции, что обеспечено оболочкой из кремнийорганического материала. Для подтверждения меньшей потери катализатора после 10 последовательных циклов реакции Мизороки-Хека анализировали содержание Pd в катализаторе Pd/P. *yeei*@ORMOSIL. Метод ИСП-МС показал, что содержание Pd в катализаторе Pd/P. *yeei*@ORMOSIL снизилось с 0,6 % до 0,51 %, т. о. потеря металла за 10 циклов использования катализатора почти в половину меньше,

чем за 5 циклов использования Pd/*P. yeii* (13 % и 23 % от начального содержания Pd, соответственно). Действительно кремнийорганический материал препятствует переходу Pd в реакционную смесь. Т. к. активные центры катализатора находятся внутри материала, на что указывает отсутствие свечения палладия на СЭМ изображении (Рисунок 37А) и наличие Pd на карте элементов (Рисунок 37В), то провели кинетический эксперимент с целью проверки активности катализатора, для чего анализировали выход продукта реакции (Схема 9А) в течении времени при 140 °С (Рисунок 40).

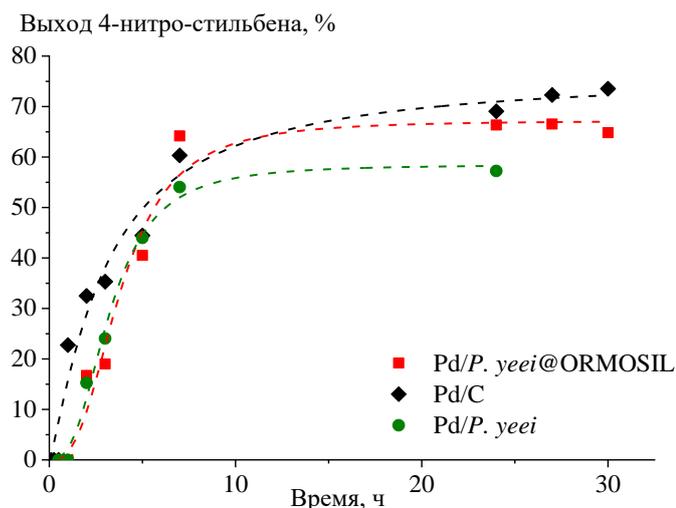


Рисунок 40. Выход продукта реакции в зависимости от времени для катализаторов Pd/C (1 масс%), Pd/*P. yeii* (1 масс%) и Pd/*P. yeii*@ORMOSIL (0,61 масс%), загрузка катализатора 0,1 мол%, температура 140 °С

Средняя начальная скорость образования продукта, определённая как тангенс угла наклона аппроксимирующей прямой начального участка зависимости образования 4-нитростильбена с течением времени, при использовании Pd/*P. yeii*@ORMOSIL в качестве катализатора ($20 \text{ мкмоль} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) значительно не отличается, чем при использовании Pd/C и Pd/*P. yeii* ($26 \text{ мкмоль} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ и $22 \text{ мкмоль} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ соответственно). Проанализирована селективность образования 4-нитростильбена и удельная производительность катализатора Pd/*P. yeii*@ORMOSIL (Рисунок 41).

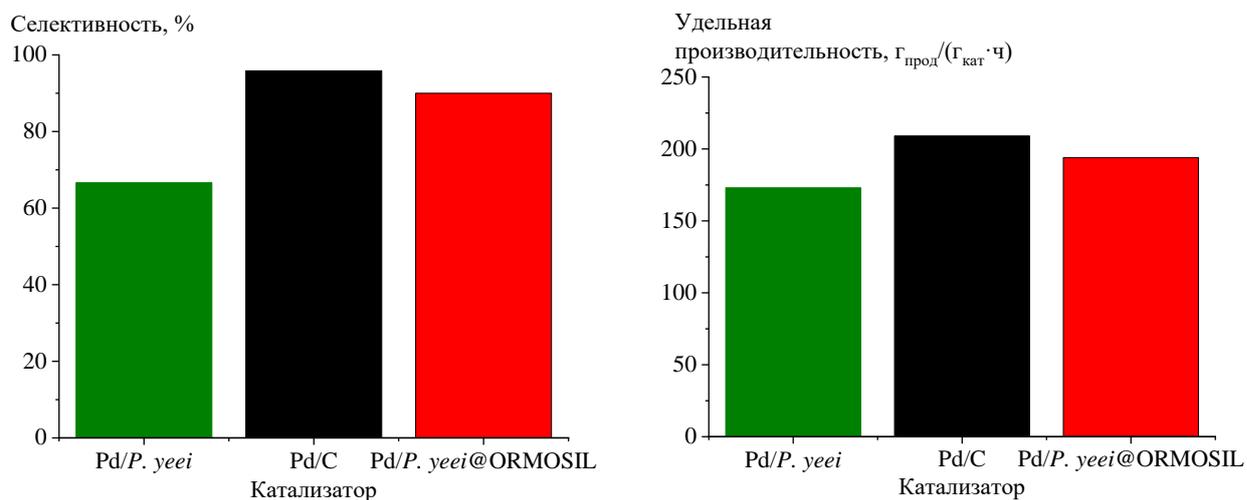


Рисунок 41. Селективность образования 4-нитро-стильбена и удельная производительность катализаторов Pd/C, Pd/P. yeii и Pd/P. yeii@ORMOSIL

Показано, что применение катализатора Pd/P. yeii@ORMOSIL в кремнийорганический материал не снижает селективность образования целевого продукта и удельную производительность катализатора. Таким образом путём внедрения Pd/P. yeii в кремнийорганический материал получают катализатор Pd/P. yeii@ORMOSIL, что позволяет снизить потерю палладия в ходе реакции. Это демонстрируется снижением содержания Pd в Pd/P. yeii@ORMOSIL на 13 % за 10 циклов реакции Мизороки-Хека, в то время как для Pd/P. yeii за 5 циклов реакции на 23 %. Внедрение в кремнийорганический материал не вызывает изменения скорости и селективности образования продукта реакции.

Основные результаты и выводы

1. Разработана методика удобного и быстрого получения биогибридного катализатора, представляющего собой наночастицы Pd на аэробных бактериях *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302.
2. Впервые показано, что, используя аэробные бактерии *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 и ацетат палладия, можно приготовить катализатор реакций C–C сочетания с узким распределением наночастиц Pd по размерам. Катализатор включает в себя наночастицы Pd размером 1–7 нм, расположенные внутри и на поверхности бактерий.
3. Установлено, что бактерии *Paracoccus yeii* ВКМ В-3302 после термического воздействия неспособны эффективно стабилизировать размер наночастиц, в отличие от живых бактерий. Средний размер наночастиц при приготовлении катализатора из автоклавированных клеток в 2,7 раз больше, чем при использовании неповреждённых бактерий.
4. Показано, что катализатор Pd/*P. yeii* по активности сопоставим с катализатором Pd/C, и обеспечивает высокие выходы продукта (до 95 %) в реакциях Мизороки-Хека и Сузуки-Мияуры.
5. Продемонстрировано, что внедрение Pd/*P. yeii* в кремнийорганический материал приводит к повышению стабильности работы катализатора до 10 циклов, уменьшению количества палладия, вымывающегося с бактериального носителя в ≈ 2 раза.
6. Разработанный метод синтеза биогибридного катализатора Pd/*P. yeii* обеспечивает минимизацию образования отходов, сохранение высокой каталитической активности при использовании безопасных реагентов и возобновляемых ресурсов, снижает нагрузку на окружающую среду. Данный метод соответствует 9 из 12 принципов зелёной химии.

Благодарность

Автор выражает сердечную благодарность научному руководителю, к.х.н. доценту О. А. Каманиной за научное руководство, поддержку и помощь в работе над диссертацией. Автор выражает глубокую признательность академику В. П. Ананикову за всестороннюю помощь в исследованиях и в работе над публикациями. Автор искренне благодарит: А. Н. Звонарёва за помощь с получением изображений методом флуоресцентной микроскопии; А. Н. Фахрутдинова за помощь с анализом выделенных продуктов реакций и реакционных смесей методом ЯМР спектроскопии; д.х.н. А. С. Кашина, к.т.н. Н. М. Иванову за помощь с получением изображений катализатора и его срезов методом электронной микроскопии; к.х.н. К. С. Ерохина за помощь с анализом катализаторов методом микро-РФА; к.х.н. А. С. Галушко за помощь в планировании и интерпретации результатов кинетических экспериментов. Автор признателен к.х.н. Ю. В. Бурькиной, к.х.н. Б. Я. Карлинскому, к.х.н. В. Н. Соромотину и всем соавторам

публикаций за сотрудничество и помощь в выполнении экспериментов и подготовке публикаций, а также всех коллег, причастных к этой работе.

Список литературы

1. Bacterial protein for food and feed generated via renewable energy and direct air capture of CO₂: Can it reduce land and water use? / J. Sillman, L. Nygren, H. Kahiluoto [et al.] // *Global Food Security*. – 2019. – Vol. 22. – P. 25–32.
2. Chikri, Y. A. Decarbonization options for the Dutch carbon black industry / Y. A. Chikri, W. Wetyels. – Hague, 2020. – 44 p.
3. Alhashimi, H. A. Life cycle environmental and economic performance of biochar compared with activated carbon: A meta-analysis / H. A. Alhashimi, C. B. Aktas // *Resources, Conservation and Recycling*. – 2017. – Vol. 118. – P. 13–26.
4. Sun, Z. Ultrafast, low-cost, and mass production of high-quality graphene / Z. Sun, Y. H. Hu // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2020. – Vol. 59. – № 24. – P. 9232–9234.
5. Environmental impact of the production of graphene oxide and reduced graphene oxide / L. Serrano-Luján, S. Víctor-Román, C. Toledo [et al.] // *SN Applied Sciences*. – 2019. – Vol. 1. – № 2. – P. 179.
6. Kushnir, D. Energy requirements of carbon nanoparticle production / D. Kushnir, B. A. Sandén // *Journal of Industrial Ecology*. – 2008. – Vol. 12. – № 3. – P. 360–375.
7. Appl, M. Ammonia / M. Appl // *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. – Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. – P. 2–155.
8. King, M. Sulfuric Acid Manufacture / M. King, M. Moats, W. G. I. Davenport. – 2nd ed. – Oxford : Elsevier, 2013. – 618 p.
9. Martin, R. Palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions employing dialkylbiaryl phosphine ligands / R. Martin, S. L. Buchwald // *Accounts of Chemical Research*. – 2008. – Vol. 41. – № 11. – P. 1461–1473.
10. Huo, S. Negishi coupling in the synthesis of advanced electronic, optical, electrochemical, and magnetic materials / S. Huo, R. Mroz, J. Carroll // *Organic Chemistry Frontiers*. – 2015. – Vol. 2. – № 4. – P. 416–445.
11. Luscombe, C. K. Synergistic catalysis for the synthesis of semiconducting polymers / C. K. Luscombe, S. Phan, I. Sanskriti // *Polymer Journal*. – 2023. – Vol. 55. – № 4. – P. 343–352.
12. Transition metal-catalyzed cross-coupling methodologies for the engineering of small molecules with applications in organic electronics and photovoltaics / L. Zani, A. Dessì, D. Franchi [et al.] // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2019. – Vol. 392. – P. 177–236.
13. A mild aqueous Sonogashira reaction as a fluorescent labeling strategy for 5-bromide-2'-deoxyuridine / S. Wang, Y. Gao, S. Shen [et al.] // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23. – № 1. – P. 154.
14. Near-infrared emissive BODIPY polymeric and copolymeric dyes / V. R. Donuru, S. Zhu, S. Green, H. Liu // *Polymer*. – 2010. – Vol. 51. – № 23. – P. 5359–5368.

15. Baleeva, N. S. The Sonogashira reaction as a new method for the modification of borated analogues of the green fluorescence protein chromophore / N. S. Baleeva, M. S. Baranov // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2017. – Vol. 43. – № 5. – P. 612–615.
16. Buchwald-Hartwig amination of aryl halides with heterocyclic amines in the synthesis of highly fluorescent benzodifuran-based star-shaped organic semiconductors / M. J. Bosiak, A. A. Zielińska, P. Trzaska [et al.] // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2021. – Vol. 86. – № 24. – P. 17594–17605.
17. Buchwald-Hartwig reaction: An overview / M. M. Heravi, Z. Kheilkordi, V. Zadsirjan [et al.] // *Journal of Organometallic Chemistry*. – 2018. – Vol. 861. – P. 17–104.
18. Applications of palladium-catalyzed C–N cross-coupling reactions in pharmaceutical compounds / R. Emadi, A. Bahrami Nekoo, F. Molaverdi [et al.] // *RSC Advances*. – 2023. – Vol. 13. – № 27. – P. 18715–18733.
19. Ruiz-Castillo, P. Applications of palladium-catalyzed C–N cross-coupling reactions / P. Ruiz-Castillo, S. L. Buchwald // *Chemical Reviews*. – 2016. – Vol. 116. – № 19. – P. 12564–12649.
20. Liu, Q.-Y. *In situ* active site for Fe-catalyzed Fischer-Tropsch synthesis: Recent progress and future challenges / Q.-Y. Liu, C. Shang, Z.-P. Liu // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. – 2022. – Vol. 13. – № 15. – P. 3342–3352.
21. Liu, Q.-Y. *In situ* active site for CO activation in Fe-catalyzed Fischer-Tropsch synthesis from machine learning / Q.-Y. Liu, C. Shang, Z.-P. Liu // *Journal of the American Chemical Society*. – 2021. – Vol. 143. – № 29. – P. 11109–11120.
22. Fischer-Tropsch synthesis: A review of the effect of CO conversion on methane selectivity / J. Yang, W. Ma, D. Chen [et al.] // *Applied Catalysis A: General*. – 2014. – Vol. 470. – P. 250–260.
23. Cobalt-based nanoreactors in combined Fischer-Tropsch synthesis and hydroprocessing: effects on methane and CO₂ selectivity / A. Straß-Eifert, T. L. Sheppard, H. Becker [et al.] // *ChemCatChem*. – 2021. – Vol. 13. – № 24. – P. 5216–5227.
24. Highly dispersed Co-based Fischer-Tropsch synthesis catalysts from metal-organic frameworks / B. Qiu, C. Yang, W. Guo [et al.] // *Journal of Materials Chemistry A*. – 2017. – Vol. 5. – № 17. – P. 8081–8086.
25. Catalytic cracking of crude oil: Mini review of catalyst formulations for enhanced selectivity to light olefins / A. Tanimu, G. Tanimu, H. Alasiri, A. Aitani // *Energy & Fuels*. – 2022. – Vol. 36. – № 10. – P. 5152–5166.
26. Weitkamp, J. Catalytic hydrocracking-mechanisms and versatility of the process / J. Weitkamp // *ChemCatChem*. – 2012. – Vol. 4. – № 3. – P. 292–306.

27. Misra, P. Isomerization catalysts and technologies for biorefining: Opportunities for producing sustainable aviation fuels / P. Misra, A. Alvarez-Majmutov, J. Chen // *Fuel*. – 2023. – Vol. 351. – P. 128994.
28. Recent advances in catalytic chain transfer polymerization of isobutylene: a review / T. Rajasekhar, G. Singh, G. S. Kapur, S. S. V. Ramakumar // *RSC Advances*. – 2020. – Vol. 10. – № 31. – P. 18180-18191.
29. Single-site heterogeneous catalysts for olefin polymerization enabled by cation exchange in a metal-organic framework / R. J. Comito, K. J. Fritzsche, B. J. Sundell [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2016. – Vol. 138. – № 32. – P. 10232–10237.
30. Li, D. Catalytic reforming of oxygenates: state of the art and future prospects / D. Li, X. Li, J. Gong // *Chemical Reviews*. – 2016. – Vol. 116. – № 19. – P. 11529–11653.
31. The effect of supports on hydrogenation and water-tolerance of copper-based catalysts / Z. Chen, X. Zhao, S. Wei [et al.] // *New Journal of Chemistry*. – 2021. – Vol. 45. – № 22. – P. 9967–9974.
32. Rational design of supported metal catalysts for selective hydrogenation of sulfur-containing compounds / H. Chen, Z. Ling, Y. Wang [et al.] // *ChemCatChem*. – 2025. – Vol. 17. – № 3.
33. Selective hydrogenation over supported metal catalysts: from nanoparticles to single atoms / L. Zhang, M. Zhou, A. Wang, T. Zhang // *Chemical Reviews*. – 2020. – Vol. 120. – № 2. – P. 683–733.
34. Ciuparu, D. Oxygen exchange between palladium and oxide supports in combustion catalysts / D. Ciuparu, F. Bozon-Verduraz, L. Pfefferle // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2002. – Vol. 106. – № 13. – P. 3434–3442.
35. Stability of supported metal and supported metal oxide combustion catalysts / J. G. McCarty, M. Gusman, D. M. Lowe [et al.] // *Catalysis Today*. – 1999. – Vol. 47. – № 1-4. – P. 5–17.
36. Chandrakala, V. Review on metal nanoparticles as nanocarriers: current challenges and perspectives in drug delivery systems / V. Chandrakala, V. Aruna, G. Angajala // *Emergent Materials*. – 2022. – Vol. 5. – № 6. – P. 1593–1615.
37. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications / P. G. Jamkhande, N. W. Ghule, A. H. Bamer, M. G. Kalaskar // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2019. – Vol. 53. – P. 101174.
38. Biotechnological synthesis of Pd-based nanoparticle catalysts / C. Egan-Morriss, R. L. Kimber, N. A. Powell, J. R. Lloyd // *Nanoscale Advances*. – 2022. – Vol. 4. – № 3. – P. 654–679.
39. Friend, C. M. Heterogeneous catalysis: A central science for a sustainable Future / C. M. Friend, B. Xu // *Accounts of Chemical Research*. – 2017. – Vol. 50. – № 3. – P. 517–521.

40. Arai, M. Metal catalysts recycling and heterogeneous/homogeneous catalysis / M. Arai, F. Zhao // *Catalysts*. – 2015. – Vol. 5. – № 2. – P. 868–870.
41. Generation, regeneration, and recovery of Cu catalytic system by changing the polarity of electrodes / K. S. Rodygin, D. E. Samoylenko, M. M. Seitkalieva [et al.] // *Green Chemistry*. – 2022. – Vol. 24. – № 3. – P. 1132–1140.
42. Mirza-Aghayan, M. Synthesis and characterization of palladium nanoparticles immobilized on graphene oxide functionalized with triethylenetetramine or 2,6-diaminopyridine and application for the Suzuki cross-coupling reaction / M. Mirza-Aghayan, M. Mohammadi, R. Boukherroub // *Journal of Organometallic Chemistry*. – 2022. – Vol. 957. – P. 122160.
43. Unveiling the effect of gas treatment on the electronic structure of carbon nanotube-supported Pd catalysts for electroreduction of H₂O₂ and Heck reaction / J. Y. Kim, Y. Jo, J. D. Kim [et al.] // *Chemosphere*. – 2022. – Vol. 307. – P. 135838.
44. Catalytic reduction of nitroarenes and Suzuki-Miyaura reactions using Pd complex stabilized on the functionalized polymeric support / M. Ariannezhad, N. Pourmorteza, A. Yousefi, M. Esperi // *Chemical Physics Letters*. – 2022. – Vol. 793. – P. 139431.
45. Role of the support in gold-containing nanoparticles as heterogeneous catalysts / M. Sankar, Q. He, R. V Engel [et al.] // *Chemical Reviews*. – 2020. – Vol. 120. – № 8. – P. 3890–3938.
46. Carbon-supported noble-metal nanoparticles for catalytic applications – A review / A. Karczmarzka, M. Adamek, S. El Houbbadi [et al.] // *Crystals*. – 2022. – Vol. 12. – № 5. – P. 584.
47. Platinum group metals: A review of resources, production and usage with a focus on Catalysts / A. E. Hughes, N. Haque, S. A. Northey, S. Giddey // *Resources*. – 2021. – Vol. 10. – № 9. – P. 93.
48. Recent progress in Pd-based nanocatalysts for selective hydrogenation / X. Zhao, Y. Chang, W.-J. Chen [et al.] // *ACS Omega*. – 2022. – Vol. 7. – № 1. – P. 17–31.
49. Li, M.-B. Efficient heterogeneous palladium catalysts in oxidative cascade reactions / M.-B. Li, J.-E. Bäckvall // *Accounts of Chemical Research*. – 2021. – Vol. 54. – № 9. – P. 2275–2286.
50. Ahmad, H. Supported nanocatalysts: recent developments in microwave synthesis for application in heterogeneous catalysis / H. Ahmad, M. K. Hossain // *Materials Advances*. – 2022. – Vol. 3. – № 2. – P. 859–887.
51. Mastalir, Á. Palladium nanoparticles supported on porous silica materials as heterogeneous catalysts of C–C Coupling and cross-coupling reactions / Á. Mastalir, Á. Molnár // *ChemCatChem*. – 2023. – Vol. 15. – № 19.
52. Metal-support interactions for heterogeneous catalysis: mechanisms, characterization techniques and applications / J. Chen, Y. Zhang, Z. Zhang [et al.] // *Journal of Materials Chemistry A*. – 2023. – Vol. 11. – № 16. – P. 8540–8572.

53. Torborg, C. Recent applications of palladium-catalyzed coupling reactions in the pharmaceutical, agrochemical and fine chemical industries / C. Torborg, M. Beller // *Advanced Synthesis & Catalysis*. – 2009. – Vol. 351. – № 18. – P. 3027–3043.
54. Enhancing activity, selectivity and stability of palladium catalysts in formic acid decomposition: Effect of support functionalization / I. Barlocco, S. Bellomi, J. J. Delgado [et al.] // *Catalysis Today*. – 2021. – Vol. 382. – P. 61–70.
55. Tuning the selectivity of palladium catalysts for hydroformylation and semihydrogenation of alkynes: experimental and mechanistic studies / J. Liu, Z. Wei, J. Yang [et al.] // *ACS Catalysis*. – 2020. – Vol. 10. – № 20. – P. 12167–12181.
56. The application of palladium catalysts in catalyzing the hydrogenolysis of *N*-benzyl compounds / S. Lou, J. Jin, Q. Wang [et al.] // *Applied Catalysis A: General*. – 2024. – Vol. 682. – P. 119802.
57. Holman, K. R. Palladium-catalyzed cascade cyclizations involving C–C and C–X bond formation: strategic applications in natural product synthesis / K. R. Holman, A. M. Stanko, S. E. Reisman // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – Vol. 50. – № 14. – P. 7891–7908.
58. A high-durability palladium catalyst for the oxygen reduction reaction in an alkaline environment / H. E. Bae, J. E. Park, T. B. N. Huynh [et al.] // *Journal of Materials Chemistry A*. – 2024. – Vol. 12. – № 45. – P. 31467–31479.
59. Aerobic heterogeneous palladium-catalyzed oxidative allenic C–H arylation: benzoquinone as a direct redox mediator between O₂ and Pd / W.-J. Kong, M. Reil, L. Feng [et al.] // *CCS Chemistry*. – 2021. – Vol. 3. – № 6. – P. 1127–1137.
60. Palladium-catalyzed cross-coupling reactions: A powerful tool for the synthesis of agrochemicals / P. Devendar, R.-Y. Qu, W.-M. Kang [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 66. – № 34. – P. 8914–8934.
61. Gan, Y. X. Activated carbon from biomass sustainable sources / Y. X. Gan // *C*. – 2021. – Vol. 7. – № 2. – P. 39.
62. Spatial imaging of carbon reactivity centers in Pd/C catalytic systems / E. O. Pentsak, A. S. Kashin, M. V. Polynski [et al.] // *Chemical Science*. – 2015. – Vol. 6. – № 6. – P. 3302–3313.
63. Mironenko, R. M. Approaches to the synthesis of Pd/C catalysts with controllable activity and selectivity in hydrogenation reactions / R. M. Mironenko, O. B. Belskaya, V. A. Likhobobov // *Catalysis Today*. – 2020. – Vol. 357. – P. 152–165.
64. Recent developments in palladium (nano)catalysts supported on polymers for selective and sustainable oxidation processes / M. Nasrollahzadeh, M. Sajjadi, M. Shokouhimehr, R. S. Varma // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2019. – Vol. 397. – P. 54–75.

65. Palladium-catalyzed cross-coupling: A historical contextual perspective to the 2010 nobel prize / C. C. C. Johansson Seechurn, M. O. Kitching, T. J. Colacot, V. Snieckus // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2012. – Vol. 51. – № 21. – P. 5062–5085.
66. Progresses in chitin, chitosan, starch, cellulose, pectin, alginate, gelatin and gum based (nano)catalysts for the Heck coupling reactions: A review / M. Dohendou, K. Pakzad, Z. Nezafat [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 192. – P. 771–819.
67. Almaradhi, M. A. Fe₃O₄-carbon spheres core-shell supported palladium nanoparticles: A robust and recyclable catalyst for suzuki coupling reaction / M. A. Almaradhi, H. M. A. Hassan, M. S. Alhumaimess // *Chinese Journal of Chemical Engineering*. – 2022. – Vol. 51. – P. 75–85.
68. Preparation of a novel heterogeneous palladium nanocatalyst based on carboxyl modified magnetic nanoparticles and its applications in Suzuki-Miyaura coupling reactions / F. Ren, S. Li, W. Zheng [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2022. – Vol. 642. – P. 128611.
69. Polshettiwar, V. Silica-supported palladium: Sustainable catalysts for cross-coupling reactions / V. Polshettiwar, C. Len, A. Fihri // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2009. – Vol. 253. – № 21–22. – P. 2599–2626.
70. Selective capture of Pd(II) from aqueous media by ion-imprinted dendritic mesoporous silica nanoparticles and re-utilization of the spent adsorbent for Suzuki reaction in water / Y. Gao, R. Zhou, L. Yao [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2022. – Vol. 436. – P. 129249.
71. Catalytic performances in methane combustion over Pd nanoparticles supported on pure silica zeolites with different structures / Y. Xie, X. Meng, S. Gao [et al.] // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2022. – Vol. 346. – P. 112298.
72. Tovar, J. De. Heterogenization of Pd(II) complexes as catalysts for the Suzuki-Miyaura reaction / J. De Tovar, F. Rataboul, L. Djakovitch // *Applied Catalysis A: General*. – 2021. – Vol. 627. – P. 118381.
73. Correlation of adsorbed and embedded palladium species in chitosan composite nanofibers with their catalytic activities for Suzuki reactions / B. Su, Q. Zhang, L. Shao [et al.] // *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. – 2022. – Vol. 168. – № March. – P. 110818.
74. Silk-fibroin-supported palladium catalyst for Suzuki-Miyaura and Ullmann coupling reactions of aryl chlorides / G. Rizzo, G. Albano, T. Sibillano [et al.] // *European Journal of Organic Chemistry*. – 2022. – Vol. 2022. – № 16. – P. 9.
75. Waste biomass-derived carbon-supported palladium-based catalyst for cross-coupling reactions and energy storage applications / M. Kempasiddaiah, K. A. Sree Raj, V. Kandathil [et al.] // *Applied Surface Science*. – 2021. – Vol. 570. – P. 151156.

76. Selective hydrogenation of vanillin to vanillyl alcohol over Pd, Pt, and Au catalysts supported on an advanced nitrogen-containing carbon material produced from food waste / X. Guo, G. Gao, J. Remón [et al.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2022. – Vol. 440. – P. 135885.
77. Synthesis of Pd-Al/biomorphic carbon catalysts using cellulose as carbon precursor / F. Cazaña, A. Galetti, C. Meyer [et al.] // *Catalysis Today*. – 2018. – Vol. 301. – P. 226–238.
78. Lau, J. Thermodynamic assessment of CO₂ to carbon nanofiber transformation for carbon sequestration in a combined cycle gas or a coal power plant / J. Lau, G. Dey, S. Licht // *Energy Conversion and Management*. – 2016. – Vol. 122. – P. 400–410.
79. Gerber, I. C. A theory/experience description of support effects in carbon-supported catalysts / I. C. Gerber, P. Serp // *Chemical Reviews*. – 2020. – Vol. 120. – № 2. – P. 1250–1349.
80. Defect engineering on carbon-based catalysts for electrocatalytic CO₂ reduction / D. Xue, H. Xia, W. Yan [et al.] // *Nano-Micro Letters*. – 2021. – Vol. 13. – № 1. – P. 5.
81. Mironenko, R. M. The phenomenon of “dead” metal in heterogeneous catalysis: opportunities for increasing the efficiency of carbon-supported metal catalysts / R. M. Mironenko, D. B. Eremin, V. P. Ananikov // *Chemical Science*. – 2023. – Vol. 14. – № 48. – P. 14062–14073.
82. Engineering carbon-based nanomaterials for the delivery of platinum compounds: An innovative cancer disarming frontier / S. Y. R. Rahchamandi, E. Mirhadi, F. Gheybi [et al.] // *Environmental Research*. – 2024. – Vol. 262. – P. 119933.
83. Albers, P. Poisoning and deactivation of palladium catalysts / P. Albers, J. Pietsch, S. F. Parker // *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. – 2001. – Vol. 173. – № 1–2. – P. 275–286.
84. Lam, E. Carbon materials as catalyst supports and catalysts in the transformation of biomass to fuels and chemicals / E. Lam, J. H. T. Luong // *ACS Catalysis*. – 2014. – Vol. 4. – № 10. – P. 3393–3410.
85. Butt, J. B. Activation, deactivation, and poisoning of catalysts / J. B. Butt. – San Diego : Academic Press, 1988. – 495 p.
86. Jia, Y. Defects in carbon-based materials for electrocatalysis: synthesis, recognition, and advances / Y. Jia, X. Yao // *Accounts of Chemical Research*. – 2023. – Vol. 56. – № 8. – P. 948–958.
87. Chemical synthesis and characterization of Pd/SiO₂: The effect of chemical reagent / A. Bugaev, V. Polyakov, A. Tereshchenko [et al.] // *Metals*. – 2018. – Vol. 8. – № 2. – P. 135.
88. Pd doped SiO₂ nanoparticles: an efficient recyclable catalyst for Suzuki, Heck and Sonogashira reactions / D. A. Kotadia, U. H. Patel, S. Gandhi, S. S. Soni // *RSC Adv*. – 2014. – Vol. 4. – № 62. – P. 32826–32833.
89. Highly dispersed PdNPs/ α -Al₂O₃ catalyst for the selective hydrogenation of acetylene prepared with monodispersed Pd nanoparticles / H. Zhang, Y. Wang, Y. Wang [et al.] // *Catalysts*. – 2017. – Vol. 7. – № 5. – P. 128.

90. Inorganic materials as supports for palladium nanoparticles: Application in the semi-hydrogenation of phenylacetylene / S. Domínguez-Domínguez, Á. Berenguer-Murcia, Á. Linares-Solano, D. Cazorla-Amorós // *Journal of Catalysis*. – 2008. – Vol. 257. – № 1. – P. 87–95.
91. Pd nanoparticles supported on CeO₂ nanospheres as efficient catalysts for dehydrogenation from additive-free formic acid at low temperature / Y. Gao, E. Hu, G. Yin, Z. Huang // *Fuel*. – 2021. – Vol. 302. – P. 121142.
92. Nemeryuk, A. M. Synthesis of TiO₂ and SiO₂ oxide systems, containing nanoparticles of palladium and platinum / A. M. Nemeryuk, M. M. Lykina // *Oriental Journal of Chemistry*. – 2017. – Vol. 33. – № 2. – P. 593–597.
93. Dynamic structural evolution of MgO-supported palladium catalysts: from metal to metal oxide nanoparticles to surface then subsurface atomically dispersed cations / Y. Chen, R. Rana, Y. Zhang [et al.] // *Chemical Science*. – 2024. – Vol. 15. – № 17. – P. 6454–6464.
94. Catalytic performances in methane combustion over Pd nanoparticles supported on pure silica zeolites with different structures / Y. Xie, X. Meng, S. Gao [et al.] // *Microporous and Mesoporous Materials*. – 2022. – Vol. 346. – P. 112298.
95. Zeolite-encaged palladium catalysts for heterogeneous Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions / M. Gao, J. Wang, W. Shang [et al.] // *Catalysis Today*. – 2023. – Vol. 410. – P. 237–246.
96. *In situ* decorated palladium nanoparticles on chitosan beads as a catalyst for coupling reactions / K. Oudghiri, L. Bahsis, S. Eddarir [et al.] // *Coatings*. – 2023. – Vol. 13. – № 8. – P. 1367.
97. Investigation of palladium catalysts in mesoporous silica support for CO oxidation and CO₂ adsorption / R. M. Al Soubaihi, K. M. Saoud, A. Awadallah-F [et al.] // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9. – № 7. – P. e18354.
98. A hybrid polyketone–SiO₂ support for palladium catalysts and their applications in cinnamaldehyde hydrogenation and in 1-phenylethanol oxidation / C. Antonetti, L. Toniolo, G. Cavinato [et al.] // *Applied Catalysis A: General*. – 2015. – Vol. 496. – P. 40–50.
99. Liang, Y. Recent advanced development of metal-loaded mesoporous organosilicas as catalytic nanoreactors / Y. Liang // *Nanoscale Advances*. – 2021. – Vol. 3. – № 24. – P. 6827–6868.
100. Lamber, R. Metal-support interaction in the Pd/SiO₂ system: Influence of the support pretreatment / R. Lamber, N. Jaeger, G. Schulz-Ekloff // *Journal of Catalysis*. – 1990. – Vol. 123. – № 2. – P. 285–297.
101. Highly dispersed Pd nanoparticles supported on γ -Al₂O₃ modified by minimal 3-aminopropyltriethoxysilane as effective catalysts for 2-ethyl-anthraquinone hydrogenation / W. Li, F. Wang, X. Zhang [et al.] // *Applied Catalysis A: General*. – 2021. – Vol. 619. – P. 118124.

102. Synthesis and thermal stability of palladium nanoparticles supported on γ -Al₂O₃ / Y. Y. Kalishyn, V. V. Ordynskiy, M. V. Ishchenko [et al.] // *Current Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 5. – № 1. – P. 79–90.
103. Characterization and reactivity of alumina-supported Pd catalysts for the room-temperature hydrodechlorination of chlorobenzene / N. S. Babu, N. Lingaiah, R. Gopinath [et al.] // *J. Phys. Chem. C*. – 2007. – Vol. 111. – P. 6447–6453.
104. Synthesis of highly dispersed palladium alumina supported particles: Influence of the particle surface density on physico-chemical properties / M. Benkhald, S. Morin, C. Pichon [et al.] // *Applied Catalysis A: General*. – 2006. – Vol. 312. – P. 1–11.
105. Investigation of Pd nanoparticles supported on zeolites for hydrogen production from formic acid dehydrogenation / M. Navlani-García, M. Martis, D. Lozano-Castelló [et al.] // *Catalysis Science & Technology*. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 364–371.
106. Modular Pd/zeolite composites demonstrating the key role of support hydrophobic/hydrophilic character in methane catalytic combustion / P. Losch, W. Huang, O. Vozniuk [et al.] // *ACS Catalysis*. – 2019. – Vol. 9. – № 6. – P. 4742–4753.
107. Metal-support interaction in Pd/CeO₂ model catalysts for CO oxidation: From pulsed laser-ablated nanoparticles to highly active state of the catalyst / E. M. Slavinskaya, T. Y. Kardash, O. A. Stonkus [et al.] // *Catalysis Science and Technology*. – 2016. – Vol. 6. – № 17. – P. 6650–6666.
108. Pd nanoparticles supported on CeO₂ as efficient catalyst for hydrogen generation from formaldehyde solution at room temperature / T. Feng, R. Tang, N. Shang [et al.] // *Applied Organometallic Chemistry*. – 2017. – Vol. 31. – № 12. – P. e3889.
109. Ringleb, F. Preparation of Pd–MgO model catalysts by deposition of Pd from aqueous precursor solutions onto Ag(001)-supported MgO(001) thin films / F. Ringleb, M. Sterrer, H.-J. Freund // *Applied Catalysis A: General*. – 2014. – Vol. 474. – P. 186–193.
110. Synthesis of highly dispersed palladium nanoparticles supported on silica for catalytic combustion of methane / P. Cao, B. Yan, Y. Chu [et al.] // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2021. – Vol. 60. – № 20. – P. 7545–7557.
111. Synthesis of Pd/SiO₂ catalysts in various HCl concentrations for selective NBR hydrogenation: Effects of H⁺ and Cl[–] concentrations and electrostatic interactions / T. Cheng, J. Chen, A. Cai [et al.] // *ACS Omega*. – 2018. – Vol. 3. – № 6. – P. 6651–6659.
112. Improved stability of Pd/Al₂O₃ prepared from palladium nanoparticles protected with carbosilane dendrons in the dimethyl ether steam reforming reaction / E. Ramos, L. Davin, I. Angurell [et al.] // *ChemCatChem*. – 2015. – Vol. 7. – № 14. – P. 2179–2187.

113. Investigation of palladium interaction with cerium oxide and its state in catalysts for low-temperature CO oxidation / A. I. Boronin, E. M. Slavinskaya, I. G. Danilova [et al.] // *Catalysis Today*. – 2009. – Vol. 144. – № 3–4. – P. 201–211.
114. Pd nanoparticles with highly defined structure on MgO as model catalysts: An FTIR study of the interaction with CO, O₂ and H₂ under ambient conditions / H. Borchert, B. Jurgens, V. Zielasek [et al.] // *Journal of Catalysis*. – 2007. – Vol. 247. – № 2. – P. 145–154.
115. Modification of Pd–CeO₂ catalyst by different treatments: Effect on the structure and CO oxidation activity / B. Wang, D. Weng, X. Wu, R. Ran // *Applied Surface Science*. – 2011. – Vol. 257. – № 9. – P. 3878–3883.
116. High-temperature behavior of Pd/MgO catalysts prepared via various sol-gel approaches / G. B. Veselov, D. M. Shvtsov, E. V. Ilyina [et al.] // *Gels*. – 2024. – Vol. 10. – № 11. – P. 698.
117. Creation of Pd/Al₂O₃ Catalyst by a spray process for fixed bed reactors and its effective removal of aqueous bromate / Y. Gao, W. Sun, W. Yang, Q. Li // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 41797.
118. “Imprinting” catalytically active Pd nanoparticles onto ionic-liquid-modified Al₂O₃ supports / L. Luza, A. Gual, D. Eberhardt [et al.] // *ChemCatChem*. – 2013. – Vol. 5. – № 8. – P. 2471–2478.
119. Baig, N. Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges / N. Baig, I. Kammakam, W. Falath // *Materials Advances*. – 2021. – Vol. 2. – № 6. – P. 1821–1871.
120. Qazi, F. Advances in biogenic synthesis of palladium nanoparticles / F. Qazi, Z. Hussain, M. N. Tahir // *RSC Advances*. – 2016. – Vol. 6. – № 65. – P. 60277–60286.
121. Vishnukumar, P. Plant-mediated biogenic synthesis of palladium nanoparticles: recent trends and emerging opportunities / P. Vishnukumar, S. Vivekanandhan, S. Muthuramkumar // *ChemBioEng Reviews*. – 2017. – Vol. 4. – № 1. – P. 18–36.
122. Prabakaran, S. Biosynthesis of nanoparticles and their roles in numerous areas / S. Prabakaran, M. Rajan // *Biosynthesized Nanomaterials*. – 2021. – P. 1–47.
123. Synthesis methods and applications of palladium nanoparticles: A review / N. Joudeh, A. Saragliadis, G. Koster [et al.] // *Frontiers in Nanotechnology*. – 2022. – Vol. 4. – P. 1–24.
124. Methods of preparation of nanoparticles / Mr Sharad Kamble, Miss. Kaveri Bhosale, Mr. Mahesh Mohite, Mrs Swapnali Navale // *International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology*. – 2022. – Vol. 2. – № 1. – P. 640–646.
125. Pd nanoparticle formation in ionic liquid thin films monitored by in situ vibrational spectroscopy / S. Mehl, A. Toghian, T. Bauer [et al.] // *Langmuir*. – 2015. – Vol. 31. – № 44. – P. 12126–12139.

126. Dinca, V. Functional nanostructured interfaces for environmental and biomedical applications / V. Dinca, M. Sucea. – Elsevier, 2019. – 397 p.
127. Pal, M. Preparation of Pd/TiO₂ nanocomposite by magnetron sputtering / M. Pal, T. Sasaki, N. Koshizaki // *Scripta Materialia*. – 2001. – Vol. 44. – № 8–9. – P. 1817–1820.
128. Musil, J. Magnetron discharges for thin films plasma processing / J. Musil, J. Vlcek, P. Baroch // *Materials Surface Processing by Directed Energy Techniques*. – Elsevier, 2006. – P. 67–110.
129. Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids / B. N. Chichkov, C. Momma, S. Nolte [et al.] // *Applied Physics A Materials Science & Processing*. – 1996. – Vol. 63. – № 2. – P. 109–115.
130. Production of palladium nanoparticles by pulsed laser ablation in water and their characterization / G. Cristoforetti, E. Pitzalis, R. Spiniello [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2011. – Vol. 115. – № 12. – P. 5073–5083.
131. Kuriganova, A. B. Theoretical and technological fundamentals of pulse electrolysis for the production of electro- and catalytically active materials based on Pt, Pd, Sn and graphene nanostructures / A. B. Kuriganova, I. Y. Brink, N. V. Smirnova // *Nano Materials Science*. – 2024.
132. Kuriganova, A. Electrochemistry of Pt and Pd under pulse electrolysis conditions / A. Kuriganova, I. Leontyev, N. Smirnova // *Journal of The Electrochemical Society*. – 2024. – Vol. 171. – № 12. – P. 126505.
133. ‘Green’ synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation / J. Singh, T. Dutta, K.-H. Kim [et al.] // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2018. – Vol. 16. – № 1. – P. 84.
134. Palladium nanoparticles: plant aided biosynthesis, characterization, applications / S. B. Manjare, P. D. Pendhari, S. M. Badade, S. R. Thopate // *Chemistry Africa*. – 2021. – Vol. 4. – № 4. – P. 715–730.
135. A review of preparation methods for supported metal catalysts / B. A. T. Mehrabadi, S. Eskandari, U. Khan [et al.] // *Advanced in Catalysis* / ed. C. Song. – Elsevier, 2017. – P. 1–35.
136. Carbon and non-carbon support materials for platinum-based catalysts in fuel cells / S. Samad, K. S. Loh, W. Y. Wong [et al.] // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2018. – Vol. 43. – № 16. – P. 7823–7854.
137. Synthesis and support interaction effects on the palladium nanoparticle catalyst characteristics / B. Van Vaerenbergh, J. Lauwaert, P. Vermeir [et al.] // *Advances in Catalysis* / ed. C. Song. – Elsevier, 2019. – P. 1–120.
138. Towards high-performance heterogeneous palladium nanoparticle catalysts for sustainable liquid-phase reactions / B. Van Vaerenbergh, J. Lauwaert, P. Vermeir [et al.] // *Reaction Chemistry & Engineering*. – 2020. – Vol. 5. – № 9. – P. 1556–1618.

139. Zhu, J. Carbon nanomaterials in catalysis: proton affinity, chemical and electronic properties, and their catalytic consequences / J. Zhu, A. Holmen, D. Chen // *ChemCatChem*. – 2013. – Vol. 5. – № 2. – P. 378–401.
140. Rapid “mix-and-stir” preparation of well-defined palladium on carbon catalysts for efficient practical use / S. A. Yakukhnov, E. O. Pentsak, K. I. Galkin [et al.] // *ChemCatChem*. – 2018. – Vol. 10. – № 8. – P. 1869–1873.
141. Palladium nanoparticles and nanowires deposited electrochemically: AFM and electrochemical characterization / V. C. Diculescu, A.-M. Chiorcea-Paquim, O. Corduneanu, A. M. Oliveira-Brett // *Journal of Solid State Electrochemistry*. – 2007. – Vol. 11. – № 7. – P. 887–898.
142. Shendage, S. S. Electrochemical deposition of highly dispersed palladium nanoparticles on nafion-graphene film in presence of ferrous ions for ethanol electrooxidation / S. S. Shendage, U. B. Patil, J. M. Nagarkar // *Fuel Cells*. – 2013. – Vol. 13. – № 3. – P. 364–370.
143. Electrochemical synthesis, voltammetric behavior and electrocatalytic activity of Pd nanoparticles / W. Pan, X. Zhang, H. Ma, J. Zhang // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2008. – Vol. 112. – № 7. – P. 2456–2461.
144. Gedanken, A. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials / A. Gedanken // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2004. – Vol. 11. – № 2. – P. 47–55.
145. Xu, H. Sonochemical synthesis of nanomaterials / H. Xu, B. W. Zeiger, K. S. Suslick // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – Vol. 42. – № 7. – P. 2555–2567.
146. Nemamcha, A. Synthesis of palladium nanoparticles by sonochemical reduction of palladium(II) nitrate in aqueous solution / A. Nemamcha, J.-L. Rehspringer, D. Khatmi // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2006. – Vol. 110. – № 1. – P. 383–387.
147. Controllable synthesis of palladium nanoparticles via a simple sonoelectrochemical method / X.-F. Qiu, J.-Z. Xu, J.-M. Zhu [et al.] // *Journal of Materials Research*. – 2003. – Vol. 18. – № 6. – P. 1399–1404.
148. Sonochemical preparation of size-controlled palladium nanoparticles on alumina surface / K. Okitsu, S. Nagaoka, S. Tanabe [et al.] // *Chemistry Letters*. – 1999. – Vol. 28. – № 3. – P. 271–272.
149. Sonochemical preparation and catalytic behavior of highly dispersed palladium nanoparticles on alumina / K. Okitsu, A. Yue, S. Tanabe, H. Matsumoto // *Chemistry of Materials*. – 2000. – Vol. 12. – № 10. – P. 3006–3011.
150. Byrappa, K. Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology – towards biomedical applications / K. Byrappa, S. Ohara, T. Adschiri // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – Vol. 60. – № 3. – P. 299–327.

151. Kameo, A. Preparation of noble metal nanoparticles in supercritical carbon dioxide / A. Kameo, T. Yoshimura, K. Esumi // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2003. – Vol. 215. – № 1–3. – P. 181–189.
152. Cansell, F. Design of functional nanostructured materials using supercritical fluids / F. Cansell, C. Aymonier // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2009. – Vol. 47. – № 3. – P. 508–516.
153. Tang, L. Supercritical CO₂ mediated synthesis and catalytic activity of graphene/Pd nanocomposites / L. Tang, V. H. Nguyen, J.-J. Shim // *Materials Research Bulletin*. – 2015. – Vol. 71. – P. 53–60.
154. Preparation via supercritical fluid route of Pd-impregnated nafion membranes which exhibit reduced methanol crossover for DMFC / R. Jiang, Y. Zhang, S. Swier [et al.] // *Electrochemical and Solid-State Letters*. – 2005. – Vol. 8. – № 11. – P. A611.
155. Preparation of functional hybrid palladium nanoparticles using supercritical fluids: a novel approach to detach the growth and functionalization steps / S. Moisan, J.-D. Marty, F. Cansell, C. Aymonier // *Chemical Communications*. – 2008. – № 12. – P. 1428.
156. Sol-gel synthesis of Pd@PdO core-shell nanoparticles and effect of precursor chemistry on their structural and optical properties / T. Kumari, R. Gopal, A. Goyal, J. Joshi // *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. – 2019. – Vol. 29. – № 2. – P. 316–325.
157. Size-controlled synthesis of highly stable and active Pd@SiO₂ core-shell nanocatalysts for hydrogenation of nitrobenzene / Y. Hu, K. Tao, C. Wu [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2013. – Vol. 117. – № 17. – P. 8974–8982.
158. One-step preparation of Pd-SiO₂ composite microspheres by the sol-gel process in a microchannel / J. Li, H. Yao, Y. Wang, G. Luo // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2014. – Vol. 53. – № 26. – P. 10660–10666.
159. Palladium nanoparticles fabricated by green chemistry: promising chemotherapeutic, antioxidant and antimicrobial agents / S. Fahmy, E. Preis, U. Bakowsky, H. M. Azzazy // *Materials*. – 2020. – Vol. 13. – № 17. – P. 3661.
160. Amidoxime modified PAN supported palladium complex: A greener and efficient heterogeneous catalyst for Heck reaction / P. R. Sruthi, V. Sarika, A. Suku [et al.] // *Inorganica Chimica Acta*. – 2020. – Vol. 502. – P. 119305.
161. Synthesis of mesoporous carbon materials from renewable plant polyphenols for environmental and energy applications / Y. Y. Feng, Y. Q. Chen, Z. Wang, J. Wei // *Xinxing Tan Cailiao/New Carbon Materials*. – 2022. – Vol. 37. – № 1. – P. 196–222.
162. *In situ* sol-gel modification strategies to develop a monolith continuous microreactor for enzymatic green reactions / D. Pirozzi, M. Abagnale, L. Minieri [et al.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2016. – Vol. 306. – P. 1010–1016.

163. Pokorski, J. K. The art of engineering viral nanoparticles / J. K. Pokorski, N. F. Steinmetz // *Molecular Pharmaceutics*. – 2011. – Vol. 8. – № 1. – P. 29–43.
164. Biochemical synthesis of palladium nanoparticles: The influence of chemical fixatives used in electron microscopy on nanoparticle formation and catalytic performance / L. Tan, T. Ray Jones, J. Poitras [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2020. – Vol. 398. – P. 122945.
165. Catalytic asymmetric hydrogenation reaction by *in situ* formed ultra-fine metal nanoparticles in live thermophilic hydrogen-producing bacteria / W. Bing, F. Wang, Y. Sun [et al.] // *Nanoscale*. – 2021. – Vol. 13. – № 17. – P. 8024–8029.
166. Bio-supported palladium nanoparticles as a catalyst for Suzuki-Miyaura and Mizoroki-Heck reactions / L. S. Søbjerg, D. Gauthier, A. T. Lindhardt [et al.] // *Green Chemistry*. – 2009. – Vol. 11. – № 12. – P. 2041.
167. Nanoparticles of Pd supported on bacterial biomass for hydroprocessing crude bio-oil / B. Kunwar, S. D. Deilami, L. E. Macaskie [et al.] // *Fuel*. – 2017. – Vol. 209. – P. 449–456.
168. Green synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticles using wild medicinal mushroom *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India / Y. K. Mohanta, S. K. Singdevsachan, U. K. Parida [et al.] // *IET Nanobiotechnology*. – 2016. – Vol. 10. – № 4. – P. 184–189.
169. Supported palladium nanoparticles synthesized by living plants as a catalyst for Suzuki-Miyaura reactions / H. L. Parker, E. L. Rylott, A. J. Hunt [et al.] // *PLOS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 1. – P. 1–6.
170. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. / P. Singh, Y.-J. Kim, D. Zhang, D.-C. Yang // *Trends in biotechnology*. – 2016. – Vol. 34. – № 7. – P. 588–599.
171. Temperature-induced formation of Pd nanoparticles in heterogeneous nanobiohybrids: application in C–H activation catalysis / N. Losada-Garcia, A. S. Santos, M. M. B. Marques, J. M. Palomo // *Nanoscale Adv.* – 2023. – Vol. 5. – № 2. – P. 513–521.
172. Mart, M. The effect of the DNA support on Pd/DNA catalyzed organic transformations / M. Mart // *Catalysis Science & Technology*. – 2024. – Vol. 14. – № 13. – P. 3580–3588.
173. DNA-functionalized gold nanoparticles: Modification, characterization, and biomedical applications / X. Ma, X. Li, G. Luo, J. Jiao // *Frontiers in Chemistry*. – 2022. – Vol. 10.
174. Green synthesis of metallic nanoparticles: Applications and limitations / P. Dikshit, J. Kumar, A. Das [et al.] // *Catalysts*. – 2021. – Vol. 11. – № 8. – P. 902.
175. Biogenic palladium nanostructures for Suzuki-Miyaura and Sonogashira cross-coupling reaction under mild reaction conditions / S. K. Das, A. Dewan, P. Deka [et al.] // *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. – 2022. – Vol. 5. – P. 100301.

176. Pd nanoparticles-loaded honeycomb-structured bio-nanocellulose as a heterogeneous catalyst for heteroaryl cross-coupling reaction / A. Dewan, M. Sarmah, P. Bharali [et al.] // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 954–966.

177. Green synthesis of Pd/Fe₃O₄ nanoparticles using *Chamomile* extract as highly active and recyclable catalyst for Suzuki coupling reaction / H. Veisi, A. Zohrabi, S. A. Kamangar [et al.] // *Journal of Organometallic Chemistry*. – 2021. – Vol. 951. – P. 122005.

178. Shen, D. S. Rapid green synthesis of palladium nanoparticles using the dried leaf of *Anacardium occidentale* / D. S. Shen, D. Philip, J. Mathew // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2012. – Vol. 91. – P. 35–38.

179. The biosynthesis of palladium nanoparticles by antioxidants in *Gardenia jasminoides* Ellis : long lifetime nanocatalysts for p-nitrotoluene hydrogenation / L. Jia, Q. Zhang, Q. Li, H. Song // *Nanotechnology*. – 2009. – Vol. 20. – № 38. – P. 385601.

180. *Gloriosa superba* mediated synthesis of platinum and palladium nanoparticles for induction of apoptosis in breast cancer / S. S. Rokade, K. A. Joshi, K. Mahajan [et al.] // *Bioinorganic Chemistry and Applications*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–9.

181. Green synthesis of silver nanoparticles using *Parthenium hysterophorus*: Optimization, characterization and *in vitro* therapeutic evaluation / A. Ahsan, M. A. Farooq, A. Ahsan Bajwa, A. Parveen // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 15. – P. 3324.

182. Green synthesis of palladium nanoparticles: Applications in aryl halide cyanation and Miyaura cross-coupling reaction under ligand free conditions / V. Kandathil, R. B. Dateer, B. S. Sasidhar [et al.] // *Catalysis Letters*. – 2018. – Vol. 148. – № 6. – P. 1562–1578.

183. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of aqueous extract of *Annona squamosa* L. peel as biomaterial for the reduction of palladium salts into nanoparticles / S. M. Roopan, A. Bharathi, R. Kumar [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2012. – Vol. 92. – P. 209–212.

184. Watermelon rind-mediated green synthesis of noble palladium nanoparticles: catalytic application / R. Lakshmiathy, B. Palakshi Reddy, N. C. Sarada [et al.] // *Applied Nanoscience*. – 2015. – Vol. 5. – № 2. – P. 223–228.

185. Biofabrication of polyphenols coated nano palladium and its *in vitro* cytotoxicity against human leukemia cell lines (K562) / Y. Li, H. Wang, R. Zhang [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2017. – Vol. 175. – P. 173–177.

186. Synthesis and antimicrobial activity of palladium nanoparticles from *Prunus × yedoensis* leaf extract / V. Manikandan, P. Velmurugan, J.-H. Park [et al.] // *Materials Letters*. – 2016. – Vol. 185. – P. 335–338.

187. Vaghela, H. Palladium nanoparticles mediated through *bauhinia variegata*: Potent *in vitro* anticancer activity against MCF-7 cell lines and antimicrobial assay / H. Vaghela, R. Shah, A. Pathan // *Current Nanomaterials*. – 2019. – Vol. 3. – № 3. – P. 168–177.
188. Green synthesis of silver and palladium nanoparticles using *Lithodora hispidula* (Sm.) Griseb. (*Boraginaceae*) and application to the electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide / E. Turunc, R. Binzet, I. Gumus [et al.] // *Materials Chemistry and Physics*. – 2017. – Vol. 202. – P. 310–319.
189. Ultrasound agitated phytofabrication of palladium nanoparticles using Andean blackberry leaf and its photocatalytic activity / B. Kumar, K. Smita, L. Cumbal, A. Debut // *Journal of Saudi Chemical Society*. – 2015. – Vol. 19. – № 5. – P. 574–580.
190. Biobased green method to synthesise palladium and iron nanoparticles using *Terminalia chebula* aqueous extract / K. Mohan Kumar, B. K. Mandal, K. Siva Kumar [et al.] // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2013. – Vol. 102. – P. 128–133.
191. *Sapium sebiferum* leaf extract mediated synthesis of palladium nanoparticles and *in vitro* investigation of their bacterial and photocatalytic activities / K. Tahir, S. Nazir, B. Li [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2016. – Vol. 164. – P. 164–173.
192. Soybean (glycine max) leaf extract based green synthesis of palladium nanoparticles / R. Kumar Petla, S. Vivekanandhan, M. Misra [et al.] // *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. – 2012. – Vol. 03. – № 01. – P. 14–19.
193. Arya, A. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of biogenically synthesized palladium and platinum nanoparticles using *Botryococcus braunii* / A. Arya, K. Gupta, T. S. Chundawat // *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – Vol. 17. – № 3. – P. 299–306.
194. Arsiya, F. Green synthesis of palladium nanoparticles using *Chlorella vulgaris* / F. Arsiya, M. H. Sayadi, S. Sobhani // *Materials Letters*. – 2017. – Vol. 186. – P. 113–115.
195. Green biosynthesis of palladium oxide nanoparticles using *Dictyota indica* seaweed and its application for adsorption / A. Yazdani Shargh, M. Hossein Sayadi, A. Heidari [et al.] // *J. Water Environ. Nanotechnol.* – 2018. – Vol. 3. – № 4. – P. 337–347.
196. *Padina boryana* mediated green synthesis of crystalline palladium nanoparticles as potential nanodrug against multidrug resistant bacteria and cancer cells / H. Sonbol, F. Ameen, S. AlYahya [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 5444.
197. Momeni, S. A simple green synthesis of palladium nanoparticles with *Sargassum* alga and their electrocatalytic activities towards hydrogen peroxide / S. Momeni, I. Nabipour // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 176. – № 7. – P. 1937–1949.

198. Sriramulu, M. Biosynthesis of palladium nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae* extract and its photocatalytic degradation behaviour / M. Sriramulu, S. Sumathi // *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. – 2018. – Vol. 9. – № 2. – P. 025018.
199. Mohana, S. Multi-functional biological effects of palladium nanoparticles synthesized using *Agaricus bisporus* / S. Mohana, S. Sumathi // *Journal of Cluster Science*. – 2020. – Vol. 31. – № 2. – P. 391–400.
200. Efficient synthesis of palladium nanoparticles using guar gum as stabilizer and their applications as catalyst in reduction reactions and degradation of azo dyes / F. Anjum, S. Gul, M. I. Khan, M. A. Khan // *Green Processing and Synthesis*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 63–76.
201. Gum acacia as a facile reducing, stabilizing, and templating agent for palladium nanoparticles / D. K. Devi, S. V. Pratap, R. Haritha [et al.] // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2011. – Vol. 121. – № 3. – P. 1765–1773.
202. Green synthesis, characterization and catalytic activity of palladium nanoparticles by xanthan gum / A. Santoshi kumari, M. Venkatesham, D. Ayodhya, G. Veerabhadram // *Applied Nanoscience*. – 2015. – Vol. 5. – № 3. – P. 315–320.
203. Palladium nanoparticles synthesis, characterization using glucosamine as the reductant and stabilizing agent to explore their antibacterial & catalytic applications / S. Ullah, A. Ahmad, A. Khan [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. – 2018. – Vol. 125. – P. 150–157.
204. Green synthesis of Konjac glucomannan templated palladium nanoparticles for catalytic reduction of azo compounds and hexavalent chromium / J. Chen, D. Wei, L. Liu [et al.] // *Materials Chemistry and Physics*. – 2021. – Vol. 267. – P. 124651.
205. Palladium nanoparticles synthesized by reducing species generated during a successive acidic/alkaline treatment of sucrose / L. Amornkitbamrung, P. Pienpinijtham, C. Thammacharoen, S. Ekgasit // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2014. – Vol. 122. – P. 186–192.
206. Green synthesis of time-stable palladium nanoparticles using microfluidic devices / E. Gioria, C. Signorini, F. Wisniewski, L. Gutierrez // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2020. – Vol. 8. – № 5. – P. 104096.
207. Glucose as a clean and renewable reductant in the Pd-nanoparticle-catalyzed reductive homocoupling of bromo- and chloroarenes in water / A. Monopoli, V. Calò, F. Ciminale [et al.] // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2010. – Vol. 75. – № 11. – P. 3908–3911.
208. Rapid and facile microwave-assisted synthesis of palladium nanoparticles and evaluation of their antioxidant properties and cytotoxic effects against fibroblast-like (HSkMC) and human lung carcinoma (A549) cell lines / A. Ameri, M. Shakibaie, H.-R. Rahimi [et al.] // *Biological Trace Element Research*. – 2020. – Vol. 197. – № 1. – P. 132–140.

209. A simple, efficient and green approach for the synthesis of palladium nanoparticles using oxytocin: Application for ligand free Suzuki reaction and total synthesis of aspongopyrazine A / A. D. Bendre, V. P. Patil, S. S. Terdale [et al.] // *Journal of Organometallic Chemistry*. – 2020. – Vol. 909. – P. 121093.
210. Hyaluronic acid-guided synthesis of Pd nanocatalysts for transfer hydrogenation of 4-nitrophenol / D. Yin, J. Zhang, W. Li, Y. Fu // *Catalysis Letters*. – 2021. – Vol. 151. – № 7. – P. 1902–1910.
211. Green synthesis of palladium nanoparticles using lentinan for catalytic activity and biological applications / Z. Han, L. Dong, J. Zhang [et al.] // *RSC Advances*. – 2019. – Vol. 9. – № 65. – P. 38265–38270.
212. One-pot synthesis of lignin-stabilised platinum and palladium nanoparticles and their catalytic behaviour in oxidation and reduction reactions / F. Coccia, L. Tonucci, D. Bosco [et al.] // *Green Chemistry*. – 2012. – Vol. 14. – № 4. – P. 1073.
213. Bio-synthesized palladium nanoparticles using alginate for catalytic degradation of azo-dyes / Y. Xiong, L. Huang, S. Mahmud [et al.] // *Chinese Journal of Chemical Engineering*. – 2020. – Vol. 28. – № 5. – P. 1334–1343.
214. Meena Kumari, M. Synthesis of monodispersed palladium nanoparticles using tannic acid and its optical non-linearity / M. Meena Kumari, S. A. Aromal, D. Philip // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2013. – Vol. 103. – P. 130–133.
215. Nanoparticles of palladium supported on bacterial biomass: New re-usable heterogeneous catalyst with comparable activity to homogeneous colloidal Pd in the Heck reaction / J. A. Bennett, I. P. Mikheenko, K. Deplanche [et al.] // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2013. – Vols. 140–141. – P. 700–707.
216. Catalytic activity of biomass-supported Pd nanoparticles: Influence of the biological component in catalytic efficacy and potential application in “green” synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals / K. Deplanche, J. A. Bennett, I. P. Mikheenko [et al.] // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2014. – Vol. 147. – P. 651–665.
217. Probing the viability of palladium-challenged bacterial cells using flow cytometry / J. B. Omajali, I. P. Mikheenko, T. W. Overton [et al.] // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 94. – № 1. – P. 295–301.
218. Size control and catalytic activity of bio-supported palladium nanoparticles / L. S. Søbjerg, A. T. Lindhardt, T. Skrydstrup [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – Vol. 85. – № 2. – P. 373–378.

219. Selective hydrogenation catalyst made via heat-processing of biogenic Pd nanoparticles and novel 'green' catalyst for Heck coupling using waste sulfidogenic bacteria / I. P. Mikheenko, J. A. Bennett, J. B. Omajali [et al.] // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2022. – Vol. 306. – P. 121059.
220. Palladized cells as suspension catalyst and electrochemical catalyst for reductively degrading aromatics contaminants: Roles of Pd size and distribution / Y.-N. Hou, B. Zhang, H. Yun [et al.] // *Water Research*. – 2017. – Vol. 125. – P. 288–297.
221. Biorefining of platinum group metals from model waste solutions into catalytically active bimetallic nanoparticles / A. J. Murray, J. Zhu, J. Wood, L. E. Macaskie // *Microbial Biotechnology*. – 2018. – Vol. 11. – № 2. – P. 359–368.
222. Okibe, N. Palladium bionanoparticles production from acidic Pd(II) solutions and spent catalyst leachate using acidophilic Fe(III)-reducing bacteria / N. Okibe, D. Nakayama, T. Matsumoto // *Extremophiles*. – 2017. – Vol. 21. – № 6. – P. 1091–1100.
223. Electron transfer involved in bio-Pd(0) synthesis by *Citrobacter freundii* at different growth phases / J. Wang, S. Bi, Y. Chen, Y. Hu // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2020. – Vol. 190. – P. 110124.
224. Comparison of bacterial cells and amine-functionalized abiotic surfaces as support for Pd nanoparticle synthesis / S. De Corte, S. Bechstein, A. R. Lokanathan [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – Vol. 102. – P. 898–904.
225. The effect of biotic and abiotic environmental factors on Pd(II) adsorption and reduction by *Bacillus wiedmannii* MSM / Y. Chen, Y. Chen, J. Wu, J. Zhang // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – Vol. 162. – P. 546–553.
226. Triclosan detoxification through dechlorination and oxidation via microbial Pd-NPs under aerobic conditions / Y. Chen, Y. Chen, J. Jia, B. Yan // *Chemosphere*. – 2022. – Vol. 286. – № P3. – P. 131836.
227. Scalable preparation of Pd/bacteria-rGO(CNT, Ketjen) composites for efficient oxygen reduction catalyst / S. Zhang, Q. Li, H. Zhou [et al.] // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2021. – Vol. 46. – № 7. – P. 5664–5676.
228. Bai, Y. Designed transition metal catalysts for intracellular organic synthesis / Y. Bai, J. Chen, S. C. Zimmerman // *Chemical Society Reviews*. – 2018. – Vol. 47. – № 5. – P. 1811–1821.
229. Narayanan, K. B. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes / K. B. Narayanan, N. Sakthivel // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2010. – Vol. 156. – № 1–2. – P. 1–13.
230. Lloyd, J. R. Enzymatic recovery of elemental palladium by using sulfate-reducing bacteria / J. R. Lloyd, P. Yong, L. E. Macaskie // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1998. – Vol. 64. – № 11. – P. 4607–4609.

231. Prompting the FDH/Hases-based electron transfers during Pt(IV) reduction mediated by bio-Pd(0) / J. Wang, W. Lin, Y. Chen [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2021. – Vol. 417. – P. 126090.
232. Involvement of hydrogenases in the formation of highly catalytic Pd(0) nanoparticles by bioreduction of Pd(II) using *Escherichia coli* mutant strains / K. Deplanche, I. Caldelari, I. P. Mikheenko [et al.] // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 156. – № 9. – P. 2630–2640.
233. Reductive formation of palladium nanoparticles by *Shewanella oneidensis*: role of outer membrane cytochromes and hydrogenases / C. K. Ng, T. K. Cai Tan, H. Song, B. Cao // *RSC Advances*. – 2013. – Vol. 3. – № 44. – P. 22498.
234. Insights into palladium nanoparticles produced by *Shewanella oneidensis* MR-1: Roles of NADH dehydrogenases and hydrogenases / Z.-N. Yang, Y.-N. Hou, B. Zhang [et al.] // *Environmental Research*. – 2020. – Vol. 191. – P. 110196.
235. Farokhzad, O. C. Impact of nanotechnology on drug delivery / O. C. Farokhzad, R. Langer // *ACS Nano*. – 2009. – Vol. 3. – № 1. – P. 16–20.
236. The effect of particle design on cellular internalization pathways / S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – № 33. – P. 11613–11618.
237. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface / A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol [et al.] // *Nature Materials*. – 2009. – Vol. 8. – № 7. – P. 543–557.
238. Bioaccumulation of palladium by *Desulfovibrio fructosivorans* wild-type and hydrogenase-deficient strains / I. P. Mikheenko, M. Rousset, S. Dementin, L. E. Macaskie // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 74. – № 19. – P. 6144–6146.
239. Probing the outer mitochondrial membrane in cardiac mitochondria with nanoparticles / V. Salnikov, Y. O. Lukyáenko, C. A. Frederick [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2007. – Vol. 92. – № 3. – P. 1058–1071.
240. Formation of palladium(0) nanoparticles at microbial surfaces / M. Bunge, L. S. Søbjerg, A. Rotaru [et al.] // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2010. – Vol. 107. – № 2. – P. 206–215.
241. Precipitation of silver-thiosulfate complex and immobilization of silver by *Cupriavidus metallidurans* CH34 / M.-L. Ledrich, S. Stemmler, P. Laval-Gilly [et al.] // *BioMetals*. – 2005. – Vol. 18. – № 6. – P. 643–650.
242. von Rozycki, T. Genomic analyses of transport proteins in *Ralstonia metallidurans* / T. von Rozycki, D. H. Nies, M. H. Saier // *Comparative and Functional Genomics*. – 2005. – Vol. 6. – № 1–2. – P. 17–56.
243. Windt, W. De. Bioreductive deposition of palladium (0) nanoparticles on *Shewanella oneidensis* with catalytic activity towards reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls / W. De

Windt, P. Aelterman, W. Verstraete // *Environmental Microbiology*. – 2005. – Vol. 7. – № 3. – P. 314–325.

244. Microbial synthesis of highly dispersed nano-Pd electrocatalyst for oxygen reduction reaction / Q. Li, S. Zhang, W. Xuan [et al.] // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2021. – Vol. 46. – № 53. – P. 26886–26896.

245. A novel biorefinery: Biorecovery of precious metals from spent automotive catalyst leachates into new catalysts effective in metal reduction and in the hydrogenation of 2-pentyne / A. J. Murray, J. Zhu, J. Wood, L. E. Macaskie // *Minerals Engineering*. – 2017. – Vol. 113. – P. 102–108.

246. Construction of stable bio-Pd catalysts for environmental pollutant remediation / H. Chen, Z. Zhou, W. Chen [et al.] // *RSC Advances*. – 2021. – Vol. 11. – № 57. – P. 36174–36180.

247. Biotechnological synthesis of Pd/Ag and Pd/Au nanoparticles for enhanced Suzuki-Miyaura cross-coupling activity / R. L. Kimber, F. Parmeggiani, T. S. Neill [et al.] // *Microbial Biotechnology*. – 2021. – Vol. 14. – № 6. – P. 2435–2447.

248. Adsorption of bacteria and polycations on model surfaces of cellulose, hemicellulose and wood extractives studied by QCM-D / T. Leino, M. Raulio, M. Salkinoja-Salonen [et al.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2011. – Vol. 86. – № 1. – P. 131–139.

249. Biogenic synthesis of Pd-based nanoparticles with enhanced catalytic activity / L. Xiong, X. Zhang, Y.-X. Huang [et al.] // *ACS Applied Nano Materials*. – 2018. – Vol. 1. – № 4. – P. 1467–1475.

250. Zhang, Y. Reduction and removal of Cr(VI) in water using biosynthesized palladium nanoparticles loaded *Shewanella oneidensis* MR-1 / Y. Zhang, Q. Zhao, B. Chen // *Science of The Total Environment*. – 2022. – Vol. 805. – P. 150336.

251. Reduction pathway and mechanism of chloronitrobenzenes synergistically catalyzed by bioPd and *Shewanella oneidensis* MR-1 assisted by calculation / W.-Q. Kong, J.-Y. Lin, X. He [et al.] // *Chemosphere*. – 2017. – Vol. 187. – P. 62–69.

252. *Shewanella oneidensis* assisted biosynthesis of Pd/reductive-graphene-oxide nanocomposites for oxygen reduction reaction / W. Wang, J. Mi, Q. Shen, Y. Yong // *ChemistrySelect*. – 2020. – Vol. 5. – № 11. – P. 3179–3186.

253. Bacterial biosorbents, an efficient heavy metals green clean-up strategy: Prospects, challenges and opportunities / V. H. T. Pham, J. Kim, S. Chang, W. Chung // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10. – № 3. – P. 610.

254. Li, C. Biosynthesis of Cu nanoparticles supported on carbon nanotubes and its catalytic performance under different test conditions / C. Li, R. Huang, X. Shi // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2020. – Vol. 95. – № 5. – P. 1511–1518.

255. Highly active palladium/activated carbon catalysts for Heck reactions: Correlation of activity, catalyst properties, and Pd leaching / K. Köhler, R. G. Heidenreich, J. G. E. Krauter, J. Pietsch // *Chemistry - A European Journal*. – 2002. – Vol. 8. – № 3. – P. 622–631.
256. Selective hydrogenation using palladium bioinorganic catalyst / J. Zhu, J. Wood, K. Deplanche [et al.] // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2016. – Vol. 199. – P. 108–122.
257. Anastas, P. T. *Green chemistry: Theory and practice* / P. T. Anastas, J. C. Warner. – New York : Oxford University Press, 1998. – 30 p.
258. Armarego, W. L. F. *Purification of laboratory chemicals. Purif. Lab. Chem.* / W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai. – 2009. – 1–743 p.
259. Bradski, G. *The OpenCV Library* / G. Bradski // *Dr Dobb's Journal of Software Tools*. – 2000. – P. 120–125.
260. Stringer, C. *Cellpose3: one-click image restoration for improved cellular segmentation* / C. Stringer, M. Pachitariu. – 2024.
261. Ellner, M. Zusammenhang zwischen strukturellen und thermo-dynamischen eigenschaften bei phasen der kupfer-familie in T10-B4-systemen / M. Ellner // *Journal of the Less Common Metals*. – 1981. – Vol. 78. – № 2. – P. 21–32.
262. Mediator BOD biosensor based on cells of microorganisms isolated from activated sludge / A. S. Kharkova, V. A. Arlyapov, A. D. Turovskaya [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2019. – Vol. 55. – P. 189–197.
263. Beletskaya, I. P. The Heck reaction as a sharpening stone of palladium catalysis / I. P. Beletskaya, A. V. Cheprakov // *Chemical Reviews*. – 2000. – Vol. 100. – № 8. – P. 3009–3066.
264. Transition metal 'cocktail'-type catalysis / D. O. Prima, N. S. Kulikovskaya, A. S. Galushko [et al.] // *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. – 2021. – Vol. 31. – P. 100502.
265. Bioreduction and biocrystallization of palladium by *Desulfovibrio desulfuricans* NCIMB 8307 / P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr [et al.] // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2002. – Vol. 80. – № 4. – P. 369–379.
266. Size-dependent XPS spectra of small supported Au-clusters / S. Peters, S. Peredkov, M. Neeb [et al.] // *Surface Science*. – 2013. – Vol. 608. – P. 129–134.
267. Change in metabolic status of glutathione by palladium nitrate in blood components / M. Mukhtiar, M. F. Khan, S. U. Jan [et al.] // *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – Vol. 26. – № 1. – P. 131–135.
268. Agency for toxic substances and disease registry. Draft toxicological profile for nitrate and nitrite / Agency for toxic substances and disease registry. – 2017. – 278 c.

269. Leso, V. Palladium nanoparticles: toxicological effects and potential implications for occupational risk assessment / V. Leso, I. Iavicoli // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – № 2. – P. 503.

270. Insights into the biosynthesis of palladium nanoparticles for oxygen reduction reaction by genetically engineered bacteria of *Shewanella oneidensis* MR -1 / S. Li, J. Huang, L. Tong [et al.] // *Microbial Biotechnology*. – 2024. – Vol. 17. – № 4.

271. Biffis, A. Palladium metal catalysts in Heck C–C coupling reactions / A. Biffis, M. Zecca, M. Basato // *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. – 2001. – Vol. 173. – № 1–2. – P. 249–274.

272. Comparing Separation vs. Fresh start to assess reusability of Pd/C catalyst in liquid-phase hydrogenation / R. M. Mironenko, E. R. Saybulina, M. V. Trenikhin [et al.] // *ChemCatChem*. – 2021. – Vol. 13. – № 16. – P. 3656–3661.

Список используемых сокращений и условных определений

BSE	back-scattered electrons, обратно-отражённые электроны
CS	catalyst separation, отделение катализатора
FS	fresh start, новый старт
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone, <i>N</i> -метилпирролидон
ORMOSIL	organically modified silica, органически модифицированный силикат
<i>P. yeii</i>	<i>Paracoccus yeii</i>
ТВАВ	tetrabutylammonium bromide, бромид тетрабутиламмония
ТОF	turnover frequency, частота оборотов
TON	turnover number, число оборотов
БДХ	Барретт-Джойнера-Халенды (модель)
БЭТ	Брунауэра-Эммета-Теллера (модель)
ВКМ	Всероссийская коллекция микроорганизмов
ДМФА	диметилформаид
ИСП-МС	масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой
МТЭС	метилтриэтоксисилан
НЧ	наночастицы
ПАВ	поверхностно активное вещество
ПВП	поливинилпирролидон
ПВС	поливиниловый спирт
ПИТ	переменный импульсный ток
ПЭМ	просвечивающая электронная микроскопия
РСМА	рентгеноструктурный микроанализ
РФА	рентгенофазовый анализ
РФЭС	рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
СПЭМ	сканирующая электронная микроскопия в режиме прошедших электронов
СЭА	сильная электростатическая адсорбция (метод)
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ТЭОС	тетраэтоксисилан
УНВ	углеродные нановолокна
УНТ	углеродные нанотрубки
ХМС	хромато-масс-спектрометрия
ЯМР	ядерно-магнитный резонанс