

Е.А. Флюрик, ассист.; В.Н. Леонтьев, доц., канд. хим. наук;
М.В. Чеушева, студ. (БГТУ, г. Минск)

СВОЙСТВА ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ШТАММА *T. VIRIDE* Ф-84

Из почв, загрязненных меркаптанами нами был выделен штамм мицелиального гриба *Trichoderma viride* Ф-84 [1], который является эффективным продуцентом внеклеточной тиолоксидазы. Под действием фермента, меркаптаны эффективно окисляются молекулярным кислородом до дисульфидов. Поскольку последние более гидрофобны, чем меркаптаны, они легко десорбируются с гидрофильных поверхностей загрязненных объектов. Данные свойства фермента, меркаптанов и дисульфидов были положены в основу разрабатываемого ферментного препарата. Препарат предназначен для применения в газовой промышленности в качестве средства, удаляющего запах меркаптанов с загрязненных поверхностей (одежды, металлоконструкций, почвы). В процессе создания препарата были разработаны три композиции на основе культуральной жидкости (КЖ) гриба *Trichoderma viride* Ф-84:

- № I – не разбавленная КЖ;
- № II – разбавленная в два раза дистиллированной водой КЖ;
- № III – разбавленная в три раза дистиллированной водой КЖ.

Для сравнения эффективности трех композиций ферментного препарата была разработана методика определения соотношения субстрат/продукт (этилмеркаптан/диэтилдисульфид). В основу методики положено определение удельного содержания этилмеркаптана и диэтилдисульфида в газовой фазе реактора с помощью ГЖХ.

В качестве реактора использовали эксикатор объемом 2,1 дм³, на дно которого помещали 0,1 см³ этилмеркаптана, а на решетку образец х/б ткани массой (2,86 ± 0,05) г. Эксикатор плотно закрывали и выдерживали ткань в атмосфере этилмеркаптана в течение 20 мин, после чего образец ткани быстро переносили в другой такой же эксикатор (реактор) без этилмеркаптана, снабженный системой для отбора газовой смеси. В течение 5 мин выдерживали реактор при температуре 20°C, для выравнивания концентрации компонентов смеси по объему, после чего отбирали первую пробу газовой смеси для регистрации удельного содержания этилмеркаптана и диэтилдисульфида. После этого образец ткани обрабатывали 1 см³ ферментного препарата и через каждые 5 мин проводили отбор проб газовой смеси для анализа.

Анализ проводили на хроматографе HP 4890D (капиллярная колонка HP-INNOWAX L = 30 м × 0,32 мм × 0,50 мкм, температура испарителя 250°C, температура детектора 250°C, температура термостата 45°C, скорость газа-носителя (N₂) 35 см³/с, сброс 1:10).

В ходе эксперимента было установлено, что этилмеркаптан полностью превращается в диэтилдисульфид за 25 мин при обработке образца ткани ферментным препаратом с композициями № I и № II. Для образца ткани обработанного ферментным препаратом с композицией № III за 35 мин с момента начала реакции только 60 % этилмеркаптана превратилось в диэтилдисульфид. Поэтому для дальнейших исследований были отобраны композиции № I и № II.

Для предотвращения кантаминации в ферментный препарат вводили антисептик – бензоат натрия. Структуру белка стабилизировали добавлением глицерина и незначительного количества формальдегида. Для придания ферментному препарату привлекательных потребительских свойств в него вводили парфюмерную отдушку.

Дальнейшая работа была направлена на определение срока хранения ферментного препарата (композиции № I и № II). В качестве величины, характеризующего эффективность препарата при хранении использовали показатель удельной тиолоксидазной активности, который определяли с помощью полярографического метода [2]. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Определение удельной тиолоксидазной активности ферментного препарата при хранении

Срок хранения, месяц	Удельная тиолоксидазная активность, мкмоль/(мин·мг _б)	
	ферментный препарат (композиция № I)	ферментный препарат (композиция № II)
1	1,88 ± 0,07	0,90 ± 0,02
2	1,89 ± 0,03	0,90 ± 0,02
3	1,87 ± 0,03	0,90 ± 0,02
4	1,87 ± 0,03	0,90 ± 0,02
5	1,86 ± 0,01	0,90 ± 0,03
6	1,87 ± 0,02	0,89 ± 0,02
7	1,85 ± 0,02	0,72 ± 0,02
8	1,70 ± 0,06	0,67 ± 0,04

Уменьшение активности ферментного препарата (композиция № I), происходит на 8 месяц хранения. Препарат с композицией № II хранится, без существенного изменения активности, в течение 6 месяцев. Проведя дополнительные исследования, установили, что уменьшение тиолоксидазной активности более чем на 10 % приводит к увеличению расхода ферментного препарата для дезодорации загрязненных меркаптанами поверхностей.

В то же время эффективность окисления этилмеркаптана ферментным препаратом (композиция № II) такая же, как и ферментным препаратом (композиция № I), причем полное окисление этилмеркаптана в диэтилдисульфид происходит за 25 мин. Кроме того, срок годности ферментного препарата (композиция № I) составляет 7 месяцев, а ферментного препарата (композиция № II) – 6 месяцев, что не дает большого преимущества препарату с композицией № I. На основе полученных данных сделали вывод, что для производства ферментного препарата необходимо чтобы удельная тиолоксидазная активность составляла не менее 0,9 мкмоль/(мин·мг_б). Срок годности ферментного препарата – 6 месяцев.

В настоящее время на газораспределительных станциях эпизодически применяют ферментный препарат «ODOR-X» для дезодорации спецодежды и поверхностей инструментов, загрязненных меркаптанами. Результаты сравнения характеристик созданного нами ферментного препарата «АНТИ-ОДОР» и импортного ферментного препарата «ODOR-X» представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнение характеристик импортного препарата «ODOR-X» и препарата «АНТИ-ОДОР»

Наименование показателя	Название препарата	
	«ODOR-X»	«АНТИ-ОДОР»
Внешний вид, цвет, запах	не прозрачная слегка опалесцирующая жидкость молочного цвета, с запахом отдушки	прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость от желтого до светло-коричневого цвета, с запахом отдушки
Плотность, г/см ³	1,06 ± 0,01	1,04 ± 0,01
pH при 20 °С	4,9–5,8	5,2–5,6
Удельная ферментативная активность, мкмоль/(мин·мг _б)		
- целлюлазная	0,30 ± 0,04	260,80 ± 0,30
- эстеразная	23,55 ± 0,54	189,80 ± 0,35
- тиолоксидазная	0,04 ± 0,01	0,90 ± 0,06

Представленные данные свидетельствуют о существенно более высоких активностях разработанного ферментного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1 Скрининг тиолоксиляющих микроорганизмов / В.Н. Леонтьев, Е.А. Флюрик, И.М. Бурак, И.В. Свиридова // Труды БГТУ, Химия и технология органических веществ. – 2004. – Вып. 12. – С. 184–186.

2 Флюрик, Е.А. Ферментативный и химический катализ окисления низкомолекулярных тиолов / Е.А. Флюрик // Молодежь в науке – 2007 : прил. к журн. Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі : в 4 ч. – Минск, 2008. – Ч. 3. – С. 326–331.