

Е. А. ФЛЮРИК

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ И ХИМИЧЕСКИЙ КАТАЛИЗ ОКИСЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ТИОЛОВ

Белорусский государственный технологический университет, Минск

Введение. Низкомолекулярные меркаптаны (тиолы) обладают резким неприятным запахом, настолько сильным, что по нему можно обнаружить присутствие в воздухе малейшее их количество.

Низшие тиолы ($C_1 - C_4$) применяются в качестве одорантов, так как природный газ, не содержащий сероводорода, не имеет ни запаха, ни цвета. Это затрудняет обнаружение газа в случае утечки. Однако в то же время неприятные запахи – это специфический вид загрязнения, борьбе с которым стали уделять серьезное внимание только в последнее время, поэтому уровень развития средств предотвращения и удаления неприятных запахов недостаточно высок.

В настоящее время на газораспределительных станциях (ГРС) в качестве одоранта используется смесь природных меркаптанов (СПМ) или этилмеркаптан. Использование меркаптанов сопряжено с рядом трудностей при работе с ними. Например, этилмеркаптан, применяемый на станциях одоризации природного газа, не только отвратительно пахнет, но и токсичен для человеческого организма, в больших количествах вызывает головную боль, тошноту и потерю координации, а также поражает почки и печень. Кроме того, попадание этилмеркаптана в окружающую среду может привести к серьезной экологической проблеме, так как этилмеркаптан вреден и очень токсичен по отношению к водным организмам (продолжительное вредное воздействие в водной среде), поэтому запрещено сливать меркаптаны в канализацию и объекты окружающей среды.

Меркаптаны хорошо сорбируются различными материалами, вследствие чего на ГРС возникает проблема по очистке металлической тары, инструментов, спецодежды, а также почвы от меркаптанов. Кроме того, в сточных водах после промывки спецоборудования остается большое количество не окисленных меркаптанов.

Анализ современных тенденций развития исследований в области защиты окружающей среды от меркаптанов показывает, что наряду с совершенствованием существующих физических и химических методов большое внимание уделяется биологическим методам. Данные методы основаны на биологической активности микроорганизмов, выделенных из окружающей среды, преимуществом их по сравнению с другими методами является экологическая безопасность, отсутствие вторичных отходов. Биологическое окисление меркаптанов происходит под действием ферментных систем микроорганизмов.

Актуальность исследований состоит в том, что в настоящее время на ГРС имеется большое число емкостей хранения одоранта, дальнейшее использование или утилизация которых невозможны по технологическим причинам, обусловленным их загрязнением меркаптанами, поэтому в Республике Беларусь и других странах СНГ существует серьезная проблема по утилизации отработавших свой срок емкостей. В настоящее время одним из биологических средств, удаляющих запах меркаптанов, является импортный препарат «ODOR-X» (Англия), закупаемый для ГРС эпизодически.

Ферментный препарат может быть эффективно использован для дезодорации меркаптанов, сорбированных на поверхностях различных материалов. Однако в случае необходимости дезодорации больших сильно загрязненных емкостей, используемых для хранения меркаптанов ферментный препарат использовать нельзя из-за денатурации фермента.

В связи с изложенным выше перед нами стояла задача провести скрининг микроорганизмов продуцентов фермента тиолоксидазы, создать ферментный препарат, а также разработать химический (каталитический) метод дезактивации меркаптанов.

Методика эксперимента. Поиск, выделение и отбор штаммов микроорганизмов окислителей меркаптанов. При отборе штаммов микроорганизмов использовали три подхода:

- скрининг штаммов микроорганизмов из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ;
- выделение микроорганизмов из почвы, загрязненной меркаптанами;
- выделение микроорганизмов из водного затвора емкости хранения меркаптанов.

Взятие образцов почвы осуществляли из верхнего почвенного слоя (не более 10 см). В загрязненной почве микроорганизмы находились под селективным давлением загрязнителей – меркаптанов.

Примерно 5 г образца почвы переносили в колбу с 90 см³ стерильной воды. Образец в течение 10 мин интенсивно встряхивали и готовили серию разведений. Высев почвенной суспензии проводили по методу Коха на селективные среды (в качестве источника углерода использовали β -меркаптоэтанол). Чашки инкубировали при 30°C в течение 4 сут. Выделенные из этих почв микробные ассоциации были подвергнуты рассеву до изолированных колоний.

Из водного затвора емкости хранения меркаптанов отбирали пробу воды и проводили высеv по методу Коха на селективные среды с β -меркаптоэтанолом. Инкубирование проводили в течение 4 сут. при 30 °С.

Выделенные культуры использовали в дальнейшем для отбора штаммов микроорганизмов, способных эффективно окислять меркаптаны. Окисление меркаптанов катализирует фермент – тиолоксидаза по следующему уравнению реакции:



Тиолоксидаза (оксидоредуктаза, КФ 1.8.3.) – это группа ферментов, чаще всего представляющих собой гемо- или флавопротеины, а в зависимости от назначения эти ферменты бывают эндо- и экзогенными. Для отбора штаммов микроорганизмов наиболее эффективных окислителей меркаптанов использовали полярографический метод, который основан на определении скорости потребления кислорода при окислении β -меркаптоэтанолом в жидкой среде.

Тиолоксидазную активность штаммов микроорганизмов определяли полярографическим методом на полярографе POLAROGRAPHIC ANALYZER PA2 (Чехословакия) с применением электрода Кларка при потенциале на платиновом электроде + 0,6 В с электродом сравнения Ag/AgCl.

Термостатированную при 20±10°С полярографическую ячейку (объемом 0,67 см³), снабженную механической мешалкой (200 мин⁻¹) и отверстием для ввода проб, предварительно калибровали по дитиониту натрия («Реахим», Россия). Для этого в ячейку, заполненную жидкой питательной средой, использованной для выращивания микроорганизмов, в режиме непрерывной регистрации тока вносили дитионит натрия, в результате чего в ячейке происходило полное химическое восстановление растворенного молекулярного кислорода, и самописец регистрировал кинетическую кривую. Завершение восстановления кислорода отображается линией-100% потребленного кислорода, которая параллельна нулевой линии. Расстояние между нулевой и линией-100% характеризует количество растворенного молекулярного кислорода в анализируемой пробе. Для расчета цены деления шкалы самописца использовали концентрацию растворенного молекулярного кислорода – 2,5×10⁻⁴ М [1].

Для определения тиолоксидазной активности штамма ячейку заполняли культуральной жидкостью (0,67 см³), регистрировали нулевую линию и запускали реакцию добавлением 0,05 см³ 0,1 М раствора β -меркаптоэтанолом («Алдрич», США) в дистиллированной воде. Самописец регистрировал кинетическую кривую ферментативной реакции. Скорость ферментативной реакции определяли как тангенс угла наклона касательной к началу кинетической кривой (рис. 1).

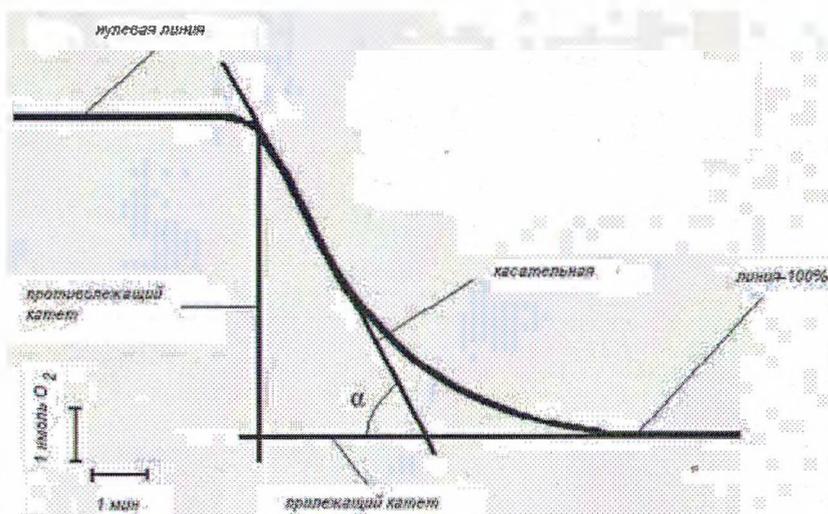


Рис. 1. Схема определения скорости ферментативной реакции

Порядок обработки результатов полярографического исследования тиолоксидазной активности штаммов микроорганизмов.

Расчет цены деления шкалы самописца (N) осуществляли по формуле

$$N = 0,67 \cdot [\text{O}_2] / 1000 \cdot L,$$

где 0,67 – объем ячейки, см³; [O₂] – концентрация растворенного молекулярного кислорода, равная 2,5×10⁻⁴ М; 1000 – коэффициент перевода; L – расстояние между нулевой и линией-100%, мм.

Изменение содержания растворенного молекулярного кислорода в ходе ферментативной реакции (ΔnO_2) находили по формуле

$$\Delta nO_2 = N \cdot l \cdot 10^6,$$

где N – цена деления шкалы самописца, моль/мм; l – величина противолежащего катета, мм; 10^6 – коэффициент перевода.

Тиолоксидазную активность штамма микроорганизмов рассчитывали по следующему уравнению

$$A = \Delta nO_2 / \Delta t \cdot m_6,$$

где ΔnO_2 – изменение содержания растворенного кислорода в ходе ферментативной реакции, мкмоль; Δt – регистрируемое время протекания ферментативной реакции, мин; m_6 – содержание белка в культуральной жидкости, определенное методом Бредфорда [2], в объеме ячейки, мг.

Для определения эффективности окисления меркаптанов и идентификации продуктов их окисления штаммами микроорганизмов использовали *газохроматографический метод*, который был описан нами ранее [3].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Очищенную фракцию белков культуральной жидкости отобранного штамма микроорганизмов анализировали с помощью жидкостного хроматографа «Shimadzu LC-10» (Япония), оснащенного ионообменной колонкой 75×7,5мм BIO-Gel® TSK DEAE-5 PW (Япония). Детектирование проводили при длине волны 280 нм. Колонку уравнивали 0,02 М *трис*-ацетатным буфером pH 9,0. Белки элюировали при линейном градиенте 0,5 М раствора KCl в буфере (0,02 М *трис*-ацетатный буфер pH 9,0) от 0 до 0,5 М с 5 до 35 мин со скоростью 1,0 см³/мин. Во фракциях, соответствующих основным хроматографическим пикам, определяли тиолоксидазную активность полярографическим методом.

Сравнительный анализ белков препарата «ODOR-X» и созданного ферментного препарата на основе отобранного штамма микроорганизмов определен с помощью гель-хроматографии. Хроматографию проводили на колонке 1,2×75 см с гелем TOYOPEARL HW-55 (Япония), скорость элюирования 1 см³/(мин·см²), элюент – 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,0), фракции по 4,0 см³ собирали в коллекторе FRACTION COLLECTOR FCC 61 (Чехословакия), элюент подавали с помощью перистальтического насоса НП-1М (Россия). Объем наносимой пробы 1 см³.

Сравнение ферментативных активностей препарата «ODOR-X» и созданного ферментного препарата. Целлюлазную активность определяли по методике [1], эстеразную активность – [4]. Белок определяли по методу Бредфорда [2].

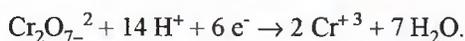
Таблица 1. Результаты скрининга тиолоксиляющих штаммов микроорганизмов

| Обозначение штамма | Источник выделения | Принадлежность: Г – грибной, Б – бактериальный штамм | Эффективность окисления меркаптанов | | | | | |
|--------------------|--------------------|---|-------------------------------------|-----|----|-----|----|-----|
| | | | время культивирования, сут | | | | | |
| | | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | П | Б | + | + | – | ++ | + | – |
| 2к | П | Г | – | – | ++ | +++ | ++ | + |
| 21 | П | Б | – | – | + | + | + | н/д |
| 8 | П | Б | + | ++ | ++ | – | – | + |
| 10 | П | Б | + | + | – | н/д | + | – |
| 11 | П | Б | н/д | + | – | ++ | + | – |
| 13 | П | Б | н/д | н/д | + | ++ | + | ++ |
| 17 | П | Г | н/д | + | ++ | – | – | ++ |
| 18 | З | Б | – | н/д | – | + | + | н/д |
| 25 | З | Б | – | н/д | – | + | + | н/д |

Примечание: П – почва загрязненная меркаптанами; З – водный затвор емкости хранения меркаптанов; «+++» – очень высокая эффективность окисления; «++» – хорошая эффективность окисления; «+» – удовлетворительная эффективность окисления; «–» – окисление меркаптанов отсутствовало; «н/д» – не детектировали.

Для определения эффективности химического (каталитического) окисления меркаптанов использовали показатель химического потребления кислорода (ХПК). Метод основан на определении количества

кислорода, которое необходимо для окисления органических и неорганических веществ, присутствующих в анализируемой пробе. В качестве окислителя применяли бихромат калия, так как считается, что установление ХПК бихроматным методом наиболее точное, экспрессный метод позволил проводить анализ быстро. Шестивалентный хром при этом восстанавливался до трехвалентного:



Количество восстановленного хрома, которое пропорционально количеству кислорода, израсходованного на окисление веществ пробы, находили по разнице между количеством бихромата, взятого на анализ, и тем количеством бихромата, что осталось. Концентрацию бихромата определяли титрованием раствором соли Мора. Расчет показателя ХПК проводили по формуле:

$$\text{ХПК} = (a - b) \cdot 2 \cdot 1000 / g,$$

где a – объем 0,25 н. раствора соли Мора, который пошел на титрование в холостом опыте, см^3 ; b – объем 0,25 н. раствора соли Мора, который пошел на титрование пробы, взятой на анализ, см^3 ; 2 – количество кислорода, эквивалентное 1 см^3 0,25 н. раствора соли Мора или бихромата калия, мг; 1000 – коэффициент перевода; g – объем неразбавленной пробы, взятой на анализ, см^3 [5].

Результаты исследований и их обсуждение. В результате скрининга микроорганизмов было выделено из почвы и водного затвора емкости 22 бактериальных и 4 грибных штамма. Из них только 2 грибных и 8 бактериальных штаммов обладали способностью окислять меркаптаны (табл. 1). Штаммы из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ тиолоксиляющей способностью не обладают.

По результатам количественной оценки культур – накоплению биомассы, удельной скорости роста и эффективности окисления меркаптанов была сформирована коллекция микроорганизмов, способных окислять меркаптаны. Для последующей работы по созданию ферментного препарата был отобран наиболее активно окисляющий меркаптаны штамм микроорганизмов. Результаты полярографического исследования свидетельствуют об очень высокой тиолоксидазой активности грибного штамма № 2к на пятые сутки культивирования в жидкой питательной среде. Данный штамм микроорганизмов был выделен из почвы загрязненной меркаптанами.

Полученные с помощью газожидкостной хроматографии результаты свидетельствуют, что под действием ферментов культуральной жидкости этилмеркаптан за 20 мин полностью превратился в диэтилдисульфид. Расчет показал, что активность тиолоксидазы для этого штамма составила 0,9 $\mu\text{моль}/\text{мин} \cdot \text{мг}$ белка.

Для определения возможности выделения тиолоксидазы была проведена высокоэффективная жидкостная хроматография образца культуральной жидкости штамма № 2к. Результаты обсчета хроматограммы представлены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты ВЭЖХ культуральной жидкости штамма № 2к

| Номер хроматографического пика | Время выхода, мин | Процентное содержание, % | Концентрация КСІ, моль/л | Тиолоксидазная активность |
|--------------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1 | 5,407 | 14,9536 | 0,010 | – |
| 2 | 7,841 | 0,2011 | 0,045 | – |
| 3 | 8,070 | 0,2338 | 0,050 | – |
| 4 | 19,479 | 7,3579 | 0,225 | – |
| 5 | 21,542 | 10,6209 | 0,255 | н/д |
| 6 | 23,132 | 1,4629 | 0,280 | – |
| 7 | 24,250 | 8,4663 | 0,300 | н/д |
| 8 | 26,857 | 15,2910 | 0,340 | н/д |
| 9 | 29,197 | 39,2066 | 0,380 | + |
| 10 | 32,007 | 2,2060 | 0,430 | – |
| | | 100 | | |

Примечание: «–» – тиолоксидазная активность отсутствует; «н/д» – не детектировали; «+» – проявляется тиолоксидазная активность.

Как видно из представленных результатов, тиолоксидазная активность обнаруживалась только в хроматографическом пике № 9, который элюировался на 29 минуте и удельное содержание белков в нем составило 39,2%.

С помощью гель-хроматографии на колонке 1,2×75 см с гелем TOYOPEARL HW-55 (Япония), была разделена культуральная жидкость штамма № 2к (рис. 2, А). Как видно из приведенного профиля элюирования, культуральная жидкость содержит четыре хроматографических пика. При этом первый выходит в объеме исключения и представляет собой полипептид с молекулярной массой более 700 кДа. Второй, третий и четвертый хроматографические пики представлены белками, имеющими молекулярные массы, соответственно 57 кДа, 54 и 25 кДа. В каждой фракции с помощью полярографического метода определили ферментативную активность окисления меркаптанов. Было установлено, что в хроматографическом пике № 3 сосредоточена тиолоксидазная активность и, следовательно, молекулярная масса фермента равна 54 кДа.

С помощью гель-хроматографии было установлено, что в ферментном препарате «ODOR-X» присутствуют белки с аналогичными молекулярными массами (рис.2, Б).

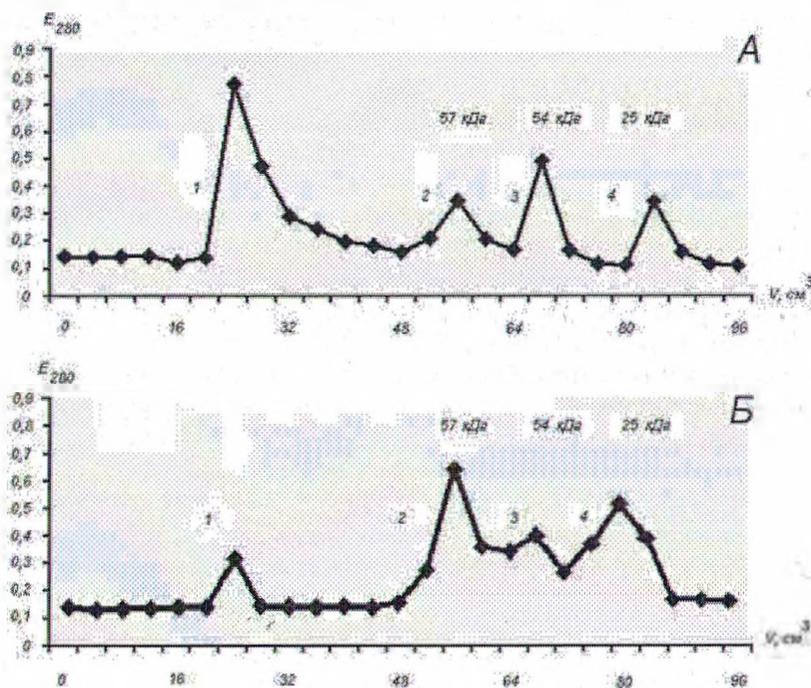


Рис. 2. Гель-хроматограммы культуральной жидкости штамма № 2к (А), ферментного препарата «ODOR-X» (Б)

Разработанный препарат ферментный («АНТИ-ОДОР» ТУ РБ 101478806.001–2004) на основе культуральной жидкости штамма № 2к имеет значительно более высокие удельные ферментативные активности (целлюлазная, эстеразная, тиолоксидазная ($A_{\text{тиол}}$)) по сравнению с импортным препаратом, например $A_{\text{тиол}}$ «ODOR-X» = 0,04 мкмоль/мин·мг белка, а $A_{\text{тиол}}$ «АНТИ-ОДОР» = 0,9 мкмоль/мин·мг белка [6]. Ферментный препарат «АНТИ-ОДОР» отличается от существующих препаратов тем, что не забивает неприятный запах, а блокировав молекулы меркаптанов, окисляет их. Кроме того, препарат полностью биоразлагаем.

Несмотря на большое промышленное значение, окисление меркаптанов изучено недостаточно. В литературе очень мало данных о создании эффективных гетерогенных катализаторов для этого процесса. Принципиально возможные пути окисления меркаптанов представлены на рис. 3 [7].

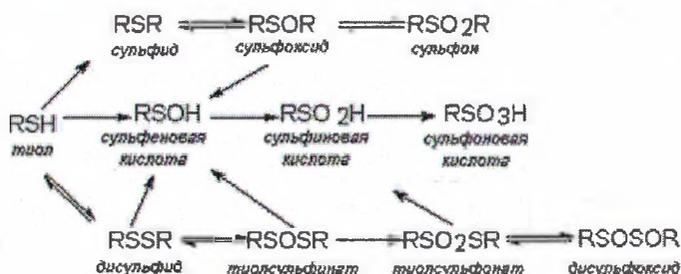


Рис. 3. Схема окисления меркаптанов

В основу разработанного химического метода дезодорации меркаптанов была положена реакция каталитического окисления этилмеркаптана гипохлоритом натрия в щелочной среде [8] в присутствии диэтилдитиокарбамата меди (катализатор):

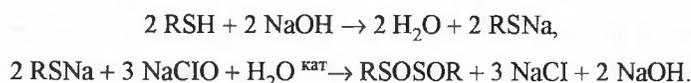


Схема установки для химического окисления меркаптанов была приведена ранее [9]. Результаты определения ХПК представлены в табл. 3. Они свидетельствуют, что происходит эффективное снижение ХПК с 40000 до 5000 мг O₂/л в течение 23 сут.

Таблица 3. Изменение ХПК в процессе окисления меркаптанов

| Сутки | 1 | 4 | 8 | 12 | 14 | 16 | 18 | 21 | 23 |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ХПК, мг O ₂ /л | 40 000 | 22 500 | 15 000 | 10 000 | 7 500 | 5 500 | 5 150 | 5 100 | 5 000 |

Анализ реакционной смеси показал, что окисление меркаптанов завершилось на стадии образования дисульфидов, которые имеют менее выраженный, чем у меркаптанов, неприятный запах и менее токсичны.

Заключение. С целью быстрого выявления тиолоксиляющих микроорганизмов, обладающих способностью окислять меркаптаны, разработан полярографический метод определения тиолоксидазной активности. Приведен способ расчета тиолоксидазной активности, определена молекулярная масса фермента тиолоксидаза. С помощью газохроматографического метода установлены продукты окисления меркаптанов ферментными системами микроорганизмов.

Создан ферментный препарат «АНТИ-ОДОР» ТУ РБ 101478806.001–2004, предназначенный для устранения неприятного запаха меркаптанов с загрязненных поверхностей.

В результате проведенных исследований углублены научно-методические основы каталитического окисления меркаптанов в щелочной среде. Доказана эффективность работы созданной каталитической системы.

Литература

- Северин С. Е. Практикум по биохимии. М., 1989.
 Дарбре А. Практическая химия белка. М., 1989.
 Леонтьев В. Н. // Труды БГТУ. Сер. 4. Химия и технология органических веществ. 2004. Вып. 12. С. 184–186.
 Лявонцьеў В. Н. Хімія біялагічна актыўных рэчываў. Мн., 1995.
 Маркевіч Р. М. Экалагічная біятэхналогія. Мінск, 1999.
 Леонтьев В. Н. // Материалы конф. «Новейшие достижения в области импортозамещения в химической промышленности и производстве строительных материалов». 2003. С. 407–409.
 Бартона Д. Общая органическая химия. М., 1983. Т. 5.
 Багиян Г. А. // Журн. прикл. химии. 2003. Т. 76. Вып. 1. С. 90–96.
 Флюрик Е. А. // Труды БГТУ. Сер. 4. Химия и технология органических веществ. 2006. Вып. 14. С. 159–160.

E. FLYURIK

ENZYMATIC AND CHEMICAL CATALYSIS OF OXIDATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT THIOLS

Summary

This article presents the results of investigation enzymatic and chemical catalysis of oxidation low molecular weight thiols.

Thiols (mercaptans) are a class of organosulfur compounds with sulfhydryl (-SH) groups and a pungent smell.

Low molecular weight mercaptans are used for odorization of natural gas. Enzymatic and chemical methods have been developed for distance of unpleasant odors of mercaptans from the contaminated surfaces.

Oxidation of mercaptans by tioloxidase of microorganisms was a basis of an enzymatic method.

The screening strains of the microorganisms which have been dedicated from different sources of a environment has been investigated by means of a polarographic method. The kinetic of oxidation of mercaptans by endogenous tioloxidase was studied of method GLC.

For chemical oxidation of mercaptans in an alkaline conditions diethyldithiocarbamate of copper has been used as the catalyzer. Results of catalytic oxidation of mercaptans are introduced. Performance of oxidation of mercaptans was fixed on variation of parameter COD. The performance of catalytic system was demonstrated.