UNIVERSUM: ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ

Научный журнал
Издается ежемесячно с ноября 2013 года
Является печатной версией сетевого журнала
Universum: химия и биология

Выпуск: 11(65)

Ноябрь 2019

Часть 1

Москва
2019

УДК 54+57
ББК 24+28
U55

Главный редактор:

Козьминых Владислав Олегович, д-р хим. наук;

Члены редакционной коллегии:

Аронбаев Сергей Дмитриевич, д-р хим. наук;

Безрядин Сергей Геннадьевич, канд. хим. наук;

Борисов Иван Михайлович, д-р хим. наук;

Винокурова Наталья Владимировна – канд. биол. наук;

Гусев Николай Федорович, д-р биол. наук;

Ердаков Лев Николаевич, д-р биол. наук;

Козьминых Елена Николаевна, канд. хим. наук, д-р фарм. наук;

Кунавина Елена Александровна, канд. хим. наук;

Ларионов Максим Викторович, д-р биол. наук;

Левенец Татьяна Васильевна, канд. хим. наук;

Муковоз Пётр Петрович, канд. хим. наук;

Саттаров Венер Нуруллович, д-р биол. наук;

Сулеймен Ерлан Мэлсулы, канд. хим. наук, PhD;

Ткачева Татьяна Александровна, канд. хим. наук;

Харченко Виктория Евгеньевна, канд. биол. наук;

U55 Universum: химия и биология: научный журнал. – № 11(65). Часть 1. М.,
Изд. «МЦНО», 2019. – 84 с. – Электрон. версия печ. публ. –
<http://7universum.com/ru/nature/archive/category/11-65>

ISSN (печ.версии): 2500-1280

ISSN (эл.версии): 2311-5459

DOI: 10.32743/UniChem.2019.65.11-1

Учредитель и издатель: ООО «МЦНО»

ББК 24+28

© ООО «МЦНО», 2019 г.

Содержание	
Биологические науки	6
Общая биология	6
Микробиология	6
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА RHODOCOCCUS RUBER - 8/4/1 – ПРОДУЦЕНТ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ Камбаралиева Маргуба Иброхимжановна Алимова Барно Хасановна Пулатова Озодахон Мансуровна Давранов Кахрамон Давранович Махсумханов Ахмаджан Аъзамханович	6
СКРИНИНГ ШТАММОВ ASPERGILLUS NIGER ПО БИОСИНТЕЗУ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ Пулатова Озодахон Мансуровна Холмурадова Нишона Караматовна Алимова Барно Хасановна Махсумханов Ахмаджан Аъзамханович Ташбаев Шерзодбек Абдурасулович Мамиев Мухиддин Саломович Давранов Кахрамон Давранович	12
СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ-БИОСИНТЕТИКОВ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ДЛЯ ОБРАБОТКИ КАОЛИНОВ С ЦЕЛЬЮ УЛУЧШЕНИЯ ИХ КАЧЕСТВА Исматов Азамат Муйдинжонович Зайнитдинова Людмила Ибрахимовна Куканова Светлана Ивановна	18
ВЛИЯНИЕ ПЕСТИЦИДОВ НА МИКРОБИОЦЕНОЗЫ И ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРОЗЕМОВ Зайнитдинова Людмила Ибрахимовна Косимов Диербек Илхом угли Ташпулатов Жавлон Жамондинович Куканова Светлана Ивановна	22
Физико-химическая биология	27
Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)	27
БИОТРАНСФОРМАЦИЯ АКРИЛОНИТРИЛА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ В СТРУКТУРЕ ГЕЛЯ АГАРОЗЫ БАКТЕРИИ RHODOCOCCUS RUBER – 8/4/1 Алимова Барно Хасановна Камбаралиева Маргуба Иброхимжановна Пулатова Озодахон Мансуровна Шарифов Мансурбек Рахимберганович Кадирова Дильдора Эргашбаевна Давранов Кахрамон Давранович Махсумханов Ахмаджан Аъзамханович	27
Биофизика	32
ВАЗОРЕЛАКСАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ АЛКАЛОИДА 1-(4'-ХЛОРФЕНИЛ)- 6,7- ДИМЕТОКСИ-1,2,3,4-ТЕТРАГИДРОИЗОХИНОЛИН НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК АОРТЫ КРЫСЫ Зарипов Абдисалим Абдикаримович Есимбетов Адилбай Тлепович Усманов Пулат Бекмуратович Журакулов Шерзод Ниятқобилович	32
Физиология	36
Клеточная биология, цитология, гистология	36
КЛЕТКА – ОСНОВА ЖИЗНИ НА ЗЕМЛЕ Гусейнова Назакет Таги кызы Мамедова Рена Фирудин кызы	36

Физиология	42
АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КВЕРЦЕТИНА И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА	42
Тухтаева Феруза Шоназаровна	
Зулайхо Аминжановна Маматова	
Гайибов Улугбек Гаппаржанович	
ИЗУЧЕНИЕ ЭНДОТЕЛИЙ - ЗАВИСИМОЕ ВАЗОРЕЛАКСАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ	47
ФЛАВОНОИДА ХРИЗИНА	
Есимбетов Адилбай Тлепович	
Зарипов Абдисалим Абдикаримович	
Усманов Пулат Бекмуратович	
Химические науки	52
Аналитическая химия	52
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ РТУТИ(II)	52
Турабов Нурмухаммат Турабович	
Тоджиев Жамолиддин Насириддинович	
ОПТИМИЗАЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРА АМИНА В ОЧИСТКЕ КИСЛОГО ГАЗА	56
Завкиев Муродали Завки угли	
Панжиев Олимжон Холлиевич	
Усманова Мухлиса Баходиркизи	
Мамашаев Ихтиёр Абдикодир угли	
Биоорганическая химия	59
ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТИМУЛЯТОРА РОСТА ДЛЯ ТЕХНИЧЕСКИХ КУЛЬТУР	59
Холбоев Юсубжон Хакимович	
Абдурахманов Улугбек Курганбаевич	
Юсупов Мухаммадшукур Мамадалиевич	
Махсумов Абдухамид Гофурович	
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ ИЗ СОИ	62
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ ДЛЯ ИФА	
Эшбоев Фарход Бакир угли	
Юсупова Элвира Гайнатовна	
Пякина Галина Аликсандровна	
Межлумян Лариса Гайковна	
Зиявитдинов Жамолитдин Фазлитдинович	
Ишимов Учкун Жомуродович	
Азимова Шахноз Садыковна	
Высокомолекулярные соединения	66
СОРБЦИЯ ИОНОВ МЕДИ (II) И НИКЕЛЯ (II) НА АЗОТ- И СЕРОСОДЕРЖАЩЕМ	66
ПОЛИАМФОЛИТЕ	
Хушвактов Суюн Юсуп угли	
Жураев Мурод Махмаражаб угли	
Сагдиев Наиль Жадитович	
Бекчанов Давронбек Жумазарович	
Мухамедиев Мухтаржан Ганиевич	
ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗИРОВАННОГО АЗОТ И ФОСФОРСОДЕРЖАЩЕГО	71
ТИОКОЛОВОГО ОЛИГОМЕРА	
Нормуродов Бахтиёр Абдуллаевич	
Тураев Хайит Худайназарович	
Набиев Дилмурод Абдуалиевич	
Суюнов Жаббор Рўзиевич	
Хайиталиева Хурсандой Абдулла кизи	
СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ	74
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО МОДИФИЦИРОВАННОГО КРАХМАЛА И ПОЛИМЕРОВ	
Жумаев Жаббор Хамрокулович	
Шарипова Насиба Уктамовна	

Коллоидная химия	77
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ТЕПЛОТА И ИЗОТЕРМА АДсорбЦИИ ОКСИДА УГЛЕРОДА В ЦЕОЛИТАХ ТИПА NH ₄ ZSM-5 Кулдашева Шахноза Абдулазизовна Абдулхаев Толибжон Долимжонович Рахматкариева Фируза Гайратовна	77
РЕЗУЛЬТАТЫ ИК-СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА СВЯЗУЮЩЕГО ДЛЯ АСФАЛЬТОВЫХ ДОРОГ ИЗ ЖИДКОГО НЕФТЕШЛАМА Юсупов Фарход Махкамovich Шукуруллаев Ботир Аманбоевич	80

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ**ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ****МИКРОБИОЛОГИЯ****ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА RHODOCOCCUS RUBER -
8/4/1 – ПРОДУЦЕНТ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ****Камбаралиева Маргуба Иброхимжановна**

мл. науч. сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: k_marguba@mail.ru

Алимова Барно Хасановна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник Института микробиологии Академии наук
Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: balimova@list.ru

Пулатова Озодахон Мансуровна

канд. биол. наук, ст. науч.сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: opulatova@inbox.ru

Давранов Кахрамон Давранович

д-р биол. наук, проф. Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: k_davranov@mail.ru

Махсумханов Ахмаджан Аъзамханович

канд. биол. наук, старший научный сотрудник Института микробиологии Академии наук
Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: amakhsum@mail.ru

**OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS OF THE RHODOCOCCUS RUBER -
8/4/1 STRAIN – PRODUCER OF NITRILHYDRATASE****Marguba Kambaralieva**

Junior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent

Barno Alimova

candidate of biological sciences, senior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent

Ozodakhon Pulatova

candidate of biological sciences, senior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent

Kakhramon Davranov*Doctor of Science, Prof. Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent***Akhmadzhan Makhsumkhanov***candidate of biological sciences, senior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent*

АННОТАЦИЯ

В статье приведены данные по подборе оптимальных условий культивирования штамма *Rhodococcus ruber* – 8/4/1 для повышения активности нитрилгидратазы как в условиях качалки, так и в условиях ферментера. Оптимальная температура для роста и развития штамма является 28-30 °С с исходным значением pH питательной среды – 7.5, скорость вращения качалки или мешалки ферментёра – 120-150 об./мин и количество вносимого инокулята – 1-4%. Следует отметить, что культивирование штамма *R. ruber* – 8/4/1 на ферментере, приводит к повышению удельной активности нитрилгидратазы в 3-4 раза по сравнению с вариантом, когда использовали качалки.

ABSTRACT

This paper describes experimental data on the selection of optimal cultivation conditions for the *Rhodococcus ruber* – 8/4/1 strain to increase nitrile hydratase activity for both shaker incubator and fermenter conditions. The optimum temperature for the strain's growth and development is 28-30 °C with the initial pH of the liquid medium being 7.5, rotation speed of the shaker or the propeller of the fermenter is 120-150 rpm and the amount of inoculum – 1-4%. It should be noted that cultivation of the *R. ruber* – 8/4/1 strain in the fermenter leads for increasing of the specific activity of nitrile hydratase by 3-4 times compared to the used shaker incubator.

Ключевые слова: *Rhodococcus ruber* – 8/4/1, активность нитрилгидратазы, биомасса, культивирование, температура, pH среды, ферментер, качалка.

Keywords: nitrile hydratase activity, biomass, cultivation, temperature, pH of medium, fermenter, shaker.

Для успешной реализации процесса ферментации с микроорганизмами-продуцентами биологически и физиологически активных соединений необходимо подобрать оптимальные условия культивирования. И это является ключевым звеном для их практического применения в соответствующих областях промышленности или производства. Большинство микроорганизмов требовательны к условиям культивирования на искусственных питательных средах, таких как лабораторные термостаты, шейкер-инкубаторы (качалки) или ферментеры от 1 литра до нескольких тысяч кубических метров. Во время роста и развития на этом оборудовании микроорганизмы находятся под влиянием абиотических (температура, кислотность, аэрация) и биотических (количество биомассы) факторов окружающей среды. Эти факторы напрямую определяют качество получаемого продукта и влияют на биокаталитическую активность выбранного штамма [1-5].

Целью данной работы являлось подбор оптимальных условий культивирования штамма *R. ruber*– 8/4/1 для получения биокаталитически активной биомассы, содержащей фермент нитрилгидратазы.

В работе был использован штамм бактерии *R. ruber*– 8/4/1 – продуцент нитрилгидратазы, депонированный под номером СКБ-318 коллекции микроорганизмов Института микробиологии АН РУз [6].

Для выращивания штамма *R. ruber*– 8/4/1 была использована питательная среда «ПС» следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 0,5; KH_2PO_4 – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,0; Пептон – 2,0; Глюкоза – 10,0;

Мочевина – 12,0; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,03; Полиэтиленгликоль – 5,0.

Штамм *R. ruber*– 8/4/1 выращивали глубинным способом на круговой электромагнитной качалке и ферментере объёмом 5 литров «Biotron» (Корея) в течение от 3-х до 5 суток в зависимости от цели эксперимента. За единицу удельной нитрилгидратазной активности принимали количество белка, содержащейся в 1 мг сухого веса клеток, катализирующей образование 1 мкмоль акриламида в минуту (мкМ амид/мг сух.вес.×мин). Концентрацию акриламида анализировали методом ВЭЖХ на приборе LKB HPLC-system, используя колонку Силосорб SPH C₁₈ (150×4мм, 8 мкм) или DISCOVERY-C₁₈ (75×4мм, 5 мкм), УФ-детектор фильтром 206 нм, потоком подвижной фазы 1.0-1.5 мл/мин следующего состава: 10 мМ фосфатный буфер– 97%, CH_3CN – 3%, pH=2.5 (доводили с ортофосфорной кислотой). В качестве контроля использовали серийные разведения чистых препаратов акрилонитрила и акриламида. Количественное содержание акриламида в образце определяли по калибровочной кривой акриламида на ВЭЖХ.

Биотрансформацию акрилонитрила в акриламид проводили в конических колбах Эрленмейера с притертой крышкой объёмом 100 мл содержащих 10 мл или 20 мл суспензии клеток штамма. К клеточной суспензии дробно добавляли 0,5-0,6% акрилонитрил. Реакцию проводили при 20-25 °С. Из реакционной среды при определенном отрезке времени отбирали по 1 мл пробы и определяли количество образовавшегося акриламида.

Для определения зависимости нитрилгидратазной активности от температуры культивирования штамм *R. ruber-8/4/1* выращивали в течение 120 часов на круговой электромагнитной качалке 120-150 об/мин при температуре от 20 °С до 40 °С (Рисунок 1). В результате проведенных исследований было установлено, что штамм *R. ruber-8/4/1* медленно растет при температуре 40 °С, активность нитрилгидратазы не превысила 50 Ед/мг. Из рисунка 1 видно, что более выраженные показатели по активности фермента наблюдалось, когда штамм выращивали при температуре от 25 °С до 35 °С с показателями нитрилгидратазной активности 410 Ед/мг и 340 Ед/мг, соответственно. Необходимо отметить, что культивирование штамма при температуре 30 °С приводит активному росту штамма с высокой нитрилгидратазной активностью (425 Ед/мг). Литера-

турными данными показано, что скорость образования кислоты при биотрансформации акрилонитрила клетками *R. erythropolis* Pla и P3 снижается при температуре выше 45°С. Очевидно, это связано со снижением нитрилгидратазной, но не амидазной активности [7]. Это согласуется с известными данными относительно температурного профиля активности Fe-зависимых нитрилгидратаз: для ферментов *P. chlororaphis* B23 и *R. erythropolis* R312 температурный оптимум которых составляет 20 °С и 35 °С, соответственно [8, 9].

Полученные данные показали, что для оптимального накопления биомассы с высокой нитрилгидратазной активностью штамм *R. ruber-8/4/1* достаточно культивировать в течение 96-120 часов при температуре от 25 °С до 30 °С.

Рисунок 1. Влияние температуры культивирования на активность нитрилгидратазы штамма *Rhodococcus ruber* - 8/4/1

Профиль зависимости активности нитрилаз и нитрилгидратаз от кислотности среды хорошо изученных продуцентов достаточно сходен. Оптимум pH для них находится в пределах 6.0-8.0 [3]. Для установления оптимума pH питательной среды, штамм *R. ruber* - 8/4/1 выращивали на питательной среде с pH значениями от 6.0 до 9.0 (Рисунок 2). Данный штамм хорошо растет в широком диапазоне pH значений, но высокая нитрилгидратазная активность проявляется в диапазоне pH 7,0-7,5. Из рисунка 2 видно, что культивирование штамма при указанном диапазоне pH значений в течение 96-120 часов демонстрирует синтез нитрилгидратазы с высокой активностью 385 Ед/мг и 430 Ед/мг соответственно. Необходимо отметить, что при значении pH ниже 7,0 или выше 7,5 штамм растет очень медленно проявляя низкую ферментативную активность.

Следует отметить, что наиболее благоприятным условием для роста и развития штамма для образования высокоактивного фермента является pH питательной среды 7,5.

Оптимальной для ведения процесса культивирования родококков является интенсивность перемешивания при 150 об/мин. Увеличение интенсивности перемешивания среды приводит к нарушению процесса массообмена в ней в связи с образованием пены и конгломератов биомассы культивируемых родококков [10]. В связи с этим, нами было изучено влияние перемешивания и аэрации питательной среды на рост, развитие и активность нитрилгидратазы штамма *R. ruber* - 8/4/1. Из таблицы 1 видно, что перемешивание питательной среды со скоростью 120-150 об./мин благоприятно влияет на рост штамма. В этих условиях штамм образует 3,5 мг/мл и 3,6 мг/мл сухой биомассы в системе объемами 0,5 л и 1,0 л соответственно. Также обнаружено, что активность нитрилгидратазы коррелируется с образованием биомассы при скорости вращения до 150 об./мин. При увеличении интенсивности перемешивания до 200 об./мин наблюдается снижение значений по количеству биомассы и активности фермента.

Рисунок 2. Влияние pH питательной среды на активность нитрилгидратазы штамма *Rhodococcus ruber* - 8/4/1

Обращает внимание то, что увеличение общего объема питательной среды до 1 литра положительно влияет на показатели по биомассе и активности фермента, показав максимум по биомассе 3,6 мг/мл

и по активности 430 Ед/мг соответственно. Аналогичные данные были получены при культивировании штамма *Rhodococcus rhodochrous* М33 [11].

Таблица 1.

Влияние аэрации на рост и активность нитрилгидратазы штамма *Rhodococcus ruber* – 8/4/1

Аэрация, об./мин	Объем культуральной жидкости, 0.5 л		Объем культуральной жидкости, 1.0 л	
	Биомасса, мг/мл	Активность, Ед/мг	Биомасса, мг/мл	Активность, Ед/мг
80	1,5±0,03	350±12,5	1,8±0,05	380±11,2
100	3,1±0,07	390±14,0	3,2±0,08	380±10,5
120	3,2±0,08	400±15,5	3,3±0,1	410±12,0
150	3,5±0,09	420±13,5	3,6±0,11	430±14,0
200	3,1±0,08	380±12,3	3,0±0,12	365±13,5

В зависимости от поставленной задачи в этой работе, для апробации или имитации укрупненных испытаний в производственных условиях необходимо было культивировать штамм *R. ruber* - 8/4/1 в большом объеме. Для оптимизации условий культивирования штамм выращивали в ферментере периодическим методом в течение 7 суток при постоянном перемешивании с подачей стерильного воздуха и термостатированием при 28-30 °С. Скорость аэрации составила 0.5-1.0 объем/объем/мин. Эксперименты ставили в 2-х

вариантах с содержанием питательной среды ПС в объеме 1 и 2 литра. Инокулятом служила 48 часовая культура штамма, предварительно выращенная в колбах Эрленмейера на качалке при температуре 28-30 °С, при перемешивании 120 об/мин. Инокулят вносили в объеме 1% (об/об). Из таблицы 2 видно, что активность нитрилгидратазы штамма *R. ruber* - 8/4/1 достигает максимума на 5-6 сутки культивирования в обоих вариантах с активностью нитрилгидратазы 1950 Ед/мг и 1450 Ед/мг соответственно.

Таблица 2.

Динамика роста и активности нитрилгидратазы штамма *Rhodococcus ruber* – 8/4/1 при культивировании на ферментере

Время, сутки	Объем – 1 л		Объем – 2 л	
	Биомасса, мг/мл	Активность, Ед/мг	Биомасса, мг/мл	Активность, Ед/мг
1	1,0±0,03	150±12	0,8±0,03	80±6
2	1,5±0,07	300±14	1,6±0,07	200±10
3	2,2±0,08	800±20	2,2±0,08	600±25
4	4,8±0,09	1500±85	4,6±0,09	1300±85
5	5,5±0,08	1950±90	6,5±0,08	1450±90
6	5,1±0,07	1800±70	5,5±0,08	1350±70
7	5,0±0,07	1750±70	5,0±0,08	1300±70

При культивировании в ферментере наибольшее накопление биомассы наблюдалось на 5 сутки ферментации, с содержанием биомассы 5,5 мг/мл и 6,5 мг/мл (соответственно). Следует отметить, что при культивировании в ферментере, в динамике роста и развития штамма *R. ruber* - 8/4/1 наблюдается четкая корреляция между образованием биомассы и активностью фермента.

Для исследования влияния количества вносимого инокулята, в ферментационную среду вносили разные концентрации 48 часовой культуры штамма *R. ruber* – 8/4/1. Инокулянты вносили в количестве от 1% до 5%. В таблице 3 показано, что количество биомассы достигало максимальной точки при вне-

сении инокулята в количестве 4% по объему в обоих вариантах. Но, активность нитрилгидратазы была достаточно высока при внесении инокулята в количестве 1-2%. Необходимо отметить, что внесенные все дозы инокулята положительно влияли на образование и активность фермента. Из таблицы 3 видно, что в 1 варианте эксперимента с использованием 1 л питательной среды «ПС» активность нитрилгидратазы была больше на 35% (2000 Ед/мг), чем активность фермента полученная во втором варианте эксперимента (1500 Ед/мг). Эти данные наводят на мысль о том, что для каждого продуцента необходим индивидуальный подход для выбора оптимальных условий культивирования.

Таблица 3.

Влияние количества инокулята на рост и активность нитрилгидратазы, штамма *Rhodococcus ruber* – 8/4/1 при культивировании в ферментере

Объем инокулята, %	Объем - 1 л		Объем - 2 л	
	Биомасса, мг/мл	Активность, Ед/мг	Биомасса, мг/мл	Активность, Ед/мг
1,0	3,5±0,06	1850±50	4,0±0,06	1400±60
2,0	4,2±0,08	1900±70	3,8±0,07	1300±45
3,0	5,2±0,11	1900±85	5,2±0,08	1400±70
4,0	6,3±0,12	2000±80	6,6±0,09	1500±80
5,0	5,5±0,08	1900±60	6,5±0,08	1450±60

В ходе экспериментальных работ, на образование биомассы штамма было изучено влияние скорости перемешивания ферментера и барботирование стерильным воздухом. Повышение скорости мешалки более чем 200 об/мин и барботирование воздухом более чем на 2 объем/объем/мин приводит к вспениванию ферментационной жидкости, потери биомассы и снижению эффективности культивирования. Добавление полиэтиленгликоля с мол.массой 2000 Да в качестве пеногасителя в количестве 0,5% положительно влияло на процесс ферментации штамма *R. ruber* – 8/4/1.

Анализ проведенных исследований показал, что ферментативно-активная биомасса по нитрилгидратазе достигает максимальной точки на 4-5 сутки при

культивировании на лабораторных качалках и на 5-6 сутки на ферментере.

Таким образом, в результате проведенных исследований подобрано оптимальное условие культивирования штамма *R. ruber* – 8/4/1 для повышения активности нитрилгидратазы. Установлено, что оптимальная температура для роста и развития штамма является 28-30 °С с исходным значением pH питательной среды – 7,5, скорость вращения качалки или мешалки ферментера – 120-150 об/мин и количество вносимого инокулята – 1-4%. Следует отметить, что культивирование штамма на ферментере приводит к повышению активности нитрилгидратазы в 3-4 раза по сравнению с вариантом, где использовали качалки.

Список литературы:

1. Самсонова А.С. Оптимизация условий глубинного культивирования микроорганизмов-деструкторов жировых веществ. Вестник НАН Беларуси, – 2014, – №4, – С. 63–66.
2. Мухутдинова А.Н. Влияние условий культивирования *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 647 на биодеструкцию дротаверина гидрохлорида - фармацевтического экотоксиканта. Вестник Пермского университета. – 2014, – С. 39–42.
3. Патент RU 2223316. 2004. Штамм бактерий *Rhodococcus ruber* – продуцент нитрилгидратазы. / Демаков В.А., Максимов А.Ю., Аликин В.Н., Кузнецова М.В., Овечкина Г.В., Будников В.И., Федченко В.Н., Федченко Н.Н., Кузьмицкий Г.Э., Черешнев В.А.
4. Патент RU 2304165. 2007. Способ получения акриловых мономеров и штамм бактерий *Rhodococcus rhodochrous* для его осуществления. / Полякова И. Н., Яненко А.С., Ларинова Г.А., Леонова Т.Е., Дебабов В.Г., Герасимова Т.В.
5. Kim B-Y., Kim J-C., Lee H-N., Hyun H-N., "Fed-batch Fermentation for Production of Nitrile Hydratase by *Rhodococcus rhodochrous* M33", Biotechnol. Bioprocess Eng., – 2001, – 6:11–17.
6. Патент РУЗ №ИАР 05723. 2018. Штамм бактерий *Rhodococcus ruber* - 8/4/1 – продуцент нитрилгидратазы. / Махсумханов А.А., Алимова Б.Х., Пулатова О.М., Камбаралиева М.И., Ташбаев Ш.А.
7. Козлов С.В. Биологическая характеристика бактериальных штаммов-активных продуцентов нитрилгидролизующих ферментов: дис. ... канд. биол. наук. – Пермь, 2007. – 139 с.

8. Osprian I., Jarret C., Strauss U. Large-scale preparation of a nitrile-hydrolysing biocatalyst: *Rhodococcus* R312 (CBS 717.73). *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*. – 1999. – V.6, – N.6, – P. 555–560.
9. Nishiyama T., Horinouchi S., Kobayashi M. Cloning and characterization of genes responsible for metabolism of nitrile compounds from *Pseudomonas chlororaphis* B23. *J. Bacteriol.* – 1991. – V.173, – P. 2465–2472.
10. Кузнецова М.В. Физиолого-биохимическая характеристика штаммов рода *Rhodococcus* – продуцентов нитрилгидратазы: дис. ...канд. биол. наук. – Пермь, 2004. – 123 с.
11. Патент РФ 2340667. 2008. Способ культивирования штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33, продуцирующего нитрилгидратазу. / Лоренц Й., Воронин С.П., Козулин С.В., Сингирцев И.Н., Дебабов В.Г., Яненко А.С.

СКРИНИНГ ШТАММОВ *ASPERGILLUS NIGER* ПО БИОСИНТЕЗУ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ**Пулатова Озодахон Мансуровна**

канд. биол. наук, старший научный сотрудник Института микробиологии Академии наук
Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: opulatova@inbox.ru

Холмурадова Нишона Караматовна

мл.науч. сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: nishona89@mail.ru

Алимова Барно Хасановна

канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: balimova@list.ru

Махсумханов Ахмаджан Аъзамханович

канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: amakhsum@mail.ru

Ташибаев Шерзодбек Абдурашулович

мл.науч. сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: sherzod484@mail.ru

Мамиев Мухиддин Саломович

канд. биол. наук, старший научный сотрудник Института микробиологии Академии наук
Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: tamiev65@mail.ru

Давранов Кахрамон Давранович

док. биол наук, проф. Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: k_davranov@mail.ru

SCREENING OF *ASPERGILLUS NIGER*'S STRAINS BY CITRIC ACID BIOSYNTHESIS***Ozodakhon Pulatova***

*candidate of biological sciences, senior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent*

Nishona Kholmuradova

*junior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent*

Barno Alimova

*candidate of biological sciences, senior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent*

Akhmadzhan Makhsumkhanov*candidate of biological sciences, senior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences, Uzbekistan, Tashkent***Sherzodbek Tashbaev***junior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences, Uzbekistan, Tashkent***Mukhiddin Mamiev***candidate of biological sciences, senior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences, Uzbekistan, Tashkent***Davranov Kakhramon***Doctor of Science, Prof. Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences, Uzbekistan, Tashkent*

АННОТАЦИЯ

Изучение кислотообразующей способности (первичный скрининг) коллекционных штаммов относящихся к виду *Aspergillus niger* показало, что среди изученных 56 штаммов мицелиальных грибов на твердой питательной среде у 30 штаммов вокруг колонии не было обнаружено зоны растворения мела. Установлено, что наиболее высокой способностью образовать зоны растворения мела вокруг колонии обладали три штамма №6, №26, №29 при этом зона растворения мела составила 5,5, 5,1 и 5,8 мм (соответственно). В результате первичного скрининга было отобрано 15 штаммов мицелиальных грибов. Показано, что отобранные штаммы при культивировании на жидкой питательной среде способны синтезировать лимонную кислоту (ЛК) в количестве от 1,41 до 2,98 г/л. Максимальное значение образование ЛК отмечено у трех штаммов №6, №26 и №29, где содержание ЛК составило 2,83, 2,63 и 2,98 г/л (соответственно).

ABSTRACT

Acid-forming ability of collection's strains (primary screening) belonging to the species *Aspergillus niger* has been studied. Thirty strains did not show any zones of chalk dissolution around the colonies in a solid nutrient medium among 56 strains of studied species. It was established that the 3 strains under #6, #26 and #29 had the highest ability to form chalk dissolution zones around the colony, while the chalk dissolution zones were 5.5, 5.1 and 5.8 mm, respectively. In result of the initial screening 15 strains of fungi have been selected. It was shown that the selected strains, when cultured in the liquid medium, were able to synthesize citric acid (CA) in amounts from 1.41 to 2.98 g/l. The maximum value of the CA was observed in 3 strains: #6, #26 and #29, where CA was 2.83, 2.63 and 2.98 g/l, respectively.

Ключевые слова: микробный синтез, лимонная кислота, *Aspergillus niger*, скрининг.

Keywords: microbial synthesis, citric acid, screening.

Метаболиты, продуцируемые микроорганизмами, находят широкое применение в различных отраслях народного хозяйства. Важнейшая среди них является лимонная кислота (ЛК), которая применяется в пищевой, фармацевтической, легкой, электронной, радиотехнической, нефтяной и газовой промышленности [1, 2]. В настоящее время ежегодное производство ЛК составляет 1,6 млн тонн, и годовой прирост составляет 3-5% от существующего уровня [3]. Широкое применение ЛК связано с тем, что она также входит в состав моющих средств в виде ее натриевых солей, где цитрат натрия успешно заменяет триполифосфаты (ТПФ), которые являются экологически опасными. Установлено, что основной механизм действия фосфатов связан с их способностью взаимодействовать с липидно-белковыми компонентами клеточных мембран и проникновением через них в различные структурные элементы клеток. Кроме этого, загрязнение водоемов ТПФ, входящими в состав синтетических моющих средств (СМС) является основной причиной массового размножения в водоемах сине-

зеленых водорослей (цианобактерий). Очень опасная, особенность цианобактерий заключается в их способности синтезировать вторичные метаболиты (циклопептиды, алкалоиды, гепатоксины, нейротоксины и др.), которые являются сильнейшими токсинами, вызывающими гибель животных и человека. Учитывая высокую гигиеническую опасность фосфатов для человека и животных мировое сообщество установило жесткие требования к содержанию фосфатов в сточных водах, питьевой воде и продуктах питания. В результате с начала 90-х годов во многих странах законодательно запретили крупнейшим компаниям производство фосфат содержащих СМС. В Японии уже к 1986 году в СМС фосфаты не применяются. В настоящее время в Германии, Италии, Австрии, Норвегии, Швейцарии и Нидерландах стирают только порошками без фосфатов. В Бельгии более 80% порошков безфосфатные, в Дании – 54%, Финляндии и Швеции – 40%, Франции – 30%, Великобритании и Испании – 25%, Греции и Португалии – 15%. Законы о запрете фосфатов в СМС действуют в Корейской Республике, на Тай-

ване, в Гонконге, Таиланде, ЮАР. Известно, что соли лимонной кислоты (заменители триполифосфатов), являясь хорошими хелатообразователями, снижают жесткость воды и безопасны для человека и животных [4]. На сегодняшний день самым крупным производителем лимонной кислоты являются США, в частности фирмы «Ch.Pfizer» и «Miles Laboratories, Inc», которые вырабатывают ее как внутри страны, так и на своих предприятиях во многих других странах. В России в настоящее время лимонную кислоту вырабатывают в основном на Белгородском заводе «Цитробел» лимонной кислоты [2, 5]. Известно, что представители рода *Aspergillus*, в частности, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. terreus*, являются наиболее важными для коммерческого использования, так как они способны в больших количествах продуцировать широкий спектр низкомолекулярных органических кислот, в том числе лимонную кислоту [6-8]. В настоящее время в Республике Узбекистан пищевая лимонная кислота широко представлена зарубежными фирмами. Переработка местных отходов в частности мелассы и получение на её основе лимонную кислоту способствует частично или полностью заменить импортируемое сырье. В настоящее время в Институте микробиологии АН РУз в лаборатории «Коллекции микроорганизмов» поддерживается большая коллекция местных штаммов относящийся к виду *A. niger*, которые были выделены из различных субстратов нашего региона. Получение местного активного штамма – продуцента лимонной кислоты в дальнейшем будет способствовать использованию и переработки местного отхода сахарного производства – меласса.

Цель данной работы – скрининг коллекционных штаммов мицелиальных грибов относящийся к виду *Aspergillus niger* по биосинтезу лимонной кислоты.

Объектом исследования служили 56 штаммов мицелиальных грибов относящихся к виду *A. niger* которые были получены из лаборатории «Коллекции микроорганизмов» Института микробиологии АН РУз и поддерживались на среде Чапека следующего состава (г/л): Сахароза – 20; NaNO_3 – 2; KH_2PO_4 – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; KCl – 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Агар – 15 рН=6.5. Способность коллекционных штаммов относящихся к виду *A. niger* синтезировать кислоты (первичный отбор) оценивали на агаризованной среде Чапека с содержанием CaCO_3 – 6 г/л и другими компонентами [9]. Следует отметить, что коллекционные штаммы были способны расти и развиваться на среде с сахарозой в концентрации не более 20 г/л, в связи с этим первичный отбор коллекционных штаммов проводили на среде содержащий 20 г/л сахарозы. Следует отметить, что концентрация других использованных компонентов были аналогичными, как представлено в патентной заявке [9]. Культивирование мицелиальных грибов проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 70 мл питательной среды Чапека. Для инокуляции среды использовали суспензию спор мицелиальных грибов с содержанием 10^6 спор/мл. Продолжительность культивирования осуществляли в течение 96 часов, при температуре 28°C. По окончании

культивирования колбы с глубинной культурой гриба предварительно нагревали на водяной бане при 80°C в течении 45 мин для инактивации мицелия грибов. Затем колбы охлаждали до комнатной температуры, отделяли мицелий грибов от культуральной жидкости фильтрованием, затем определяли содержание биомассы. Для определения биомассы мицелиальных грибов использовали весовой метод. Определение рН культуральной жидкости определяли потенциометрическим методом. Содержание сахарозы в растворах определяли на спектрофотометре UV-5100, при длине волны 490 нм в кювете с толщиной 10 мм [10]. Количество титруемых органических кислот (общей кислотности) определяли по методу Ермакову [11]. Количественное содержание ЛК определяли химическим способом по методу Жаболовской Н.А с соавторами [12]. Количество ЛК в анализируемой пробе определяли по соответствующей калибровочной кривой. На первом этапе работы для оценки кислотообразующей способности микроскопических грибов был использован качественный скрининг (первичный отбор) штаммов. Оценка кислотообразующей способности проводилась на агаризованной питательной среде с мелом. По зонам растворения мела вокруг колонии, которая образуется, за счёт выделения органических кислот устанавливалось, кислотообразование. Скрининг коллекционных штаммов относящихся к виду *A. niger* по кислотообразующей способности показало, что среди 56 штаммов микроскопических грибов 30 штаммов не проявляли зону растворения мела на твердой питательной среде (Рисунок.1). Одиннадцать штаммов №3, №9, №11, № 489, №491, №492, №602, №604, №620, № 624, № 789 имели зону растворения мела от 1 мм до 3 мм, три штамма №14, №17, №493 имели зону растворения мела равную 3 мм. У девяти штаммов №1, №8, №23, №24, №30, №597, №601, №618, №788 зона растворения мела варьировала от 3.5 до 4,2 мм. Исследование показало, что наиболее высокая экскреция кислот наблюдалась у трех штаммов №6, №26, №29, где зона растворения мела составила 5,5, 5,1 и 5,8 мм (соответственно). Следует отметить, что штамм №6 был выделен из плодов чеснока Ташкентской области, штамм №26 был изолирован из почвы Ферганской области и штамм № 29 был выделен из почвы Бухарской области. В результате скрининга на среде с мелом было отобрано 15 штаммов коллекционных культур микроскопических грибов. Варианты образующие небольшие зоны растворения мела (менее 3 мм) исключили из дальнейших исследований как слабые кислотообразователи. Следует отметить, что тестом на агаризованной среде на кислотообразующую способность штаммов невозможно точно оценить уровень синтеза ЛК в среде. С целью количественного определения ЛК, а также для проверки результатов, полученным методом селекции на твердой среде, проводили культивирование отобранных штаммов в жидкой питательной среде Чапека. Культивирование микроскопических грибов проводили на питательной среде с начальной величиной рН 6,0. Величина рН является важным условием среды, оказывающим большое влияние на интенсивность образования конечных продуктов превращения источников углерода и энергии.

Рисунок 1. Скрининг коллекционных штаммов *Aspergillus niger* по кислотообразующей способности на твердой среде с мелом

От величины pH зависит состояние ионогенных групп на поверхности клеток, а если ионы H^+ и OH^- проникают внутрь, то и на внутренних структурах клетки. Под влиянием pH может изменяться активность внутриклеточных ферментов, интенсивность конструктивного и энергетического обмена микроорганизмов [2].

Результаты исследований по изменению pH среды в процессе культивирования показало, что через 72 ч у штаммов №6, №17, №26, №29, №788 наблюдалось подкисление среды в 1,4 раза ниже по сравнению с исходным значением pH 6,0. (Таблица 1).

Таблица 1.

Биосинтез лимонной кислоты коллекционными штаммами относящихся к виду *Aspergillus niger*

№ штаммов	pH среды			Биомасса, г/л	Органические кислоты, г/л	ЛК, г/л
	Исх	Через 72 ч	Через 96 ч			
1	6,0	5,1	4,90	4,67	2,73	1,31
6		4,35	3,87	6,10	3,72	2,83
8		5,25	4,84	5,22	2,72	1,73
14		5,32	4,79	4,92	2,59	1,64
17		4,34	4,19	6,87	3,65	1,25
23		5,53	4,76	5,84	2,72	1,52
24		4,51	4,79	4,98	1,03	0,84
26		4,31	3,95	6,07	3,69	2,63
29		4,30	3,78	6,84	3,90	2,98
30		5,63	4,91	4,88	2,75	0,73
493		5,21	4,86	4,90	2,67	1,68
597		5,25	4,81	4,84	2,71	1,10
601		5,57	4,83	5,91	1,72	0,93
618		5,20	4,52	4,87	1,74	1,14
788		4,25	3,94	6,89	3,73	1,68

На 96 ч культивирования наиболее интенсивное снижение pH среды было обнаружено у четырех штаммов №6, №26, №29 и №788, за этот период pH среды снизился от 6,0 до 3,87; 3,95; 3,78 и 3,94 (соответственно). Исследования показали, что среди изученных штаммов наиболее высокое накопление биомассы наблюдалось у 5 штаммов №6, №17, №26, №29 и №788, высокое накопление биомассы этих штаммов сопровождалось интенсивным накоплением органических кислот. При этом содержание органических кислот этих штаммов варьировало от 3,65 до 3,90 г/л. Исследования показали, что интенсивное накопление органических кислот не всегда сопровождается высоким содержанием образования ЛК в среде культивирования. Показано, что отобранные штаммы при культивировании на жидкой питательной среде способны синтезировать ЛК в количестве от 1,41 до 2,98 г/л. Более высокое значение образование ЛК отмечено у трех штаммов №6,

№26 и №29, где содержание ЛК составило 2,83, 2,63 и 2,98 г/л (соответственно).

Таким образом, изучение кислотообразующей способности (первичный отбор) коллекционных штаммов относящихся к виду *A. niger* показало, что среди 56 штаммов мицелиальных грибов у 30 штаммов зона растворения мела вокруг колонии на твердой питательной среде не была обнаружена. У девяти штаммов зона растворения мела варьировала от 3,5 до 4,2 мм. Установлено, что наиболее высокой способностью образовать зоны растворения мела вокруг колонии обладали три штамма №6, №26, №29, где зона растворения мела составила 5,5, 5,1 и 5,8 мм (соответственно). Показано, что отобранные штаммы (15 штаммов) при культивировании на жидкой питательной среде способны синтезировать ЛК в количестве от 1,41 до 2,98 г/л. Максимальное значение образование ЛК отмечено у трех штаммов №6, №26 и №29, где содержание ЛК составило 2,83, 2,63 и 2,98 г/л (соответственно).

Список литературы:

1. Никифорова Т.А. Теоретические и практические аспекты микробиологического производства лимонной кислоты: диссертация в форме научного доклада на соискание ученой степени доктора технических наук: – Санкт-Петербург. – 1999. – С. 3.
2. Авчиева П.Б. Направленный биосинтез лимонной кислоты при периодической и непрерывной ферментации гриба *Aspergillus niger*: диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук: – М. –1997. – С. 6 - 7.
3. Soccol C.R., Vandenberghe P.S., Rodrigues C., Pandey A. New perspectives for citric acid production and application // Food. Technol. and Biotechnology. – 2006. – V. 44. – P. 141 - 149.

4. Финогенова Т.В., Моргунов И.Г., Лауринавичюс К.С., Мельников В.А. Загрязнение полифосфатами как причина массового размножения цианобактерий в водоемах // Вода: химия и экология. – 2009. – №3. – С. 30-35.
5. Прахова М.С., Выборнова Т.В., Шарова Н.Ю. Биосинтез лимонной и глюконовой кислот микромицетом *Aspergillus niger* // Сборник: Научное обеспечение инновационных технологий производства и хранения сельскохозяйственной и пищевой продукции. – 2014. – С. 94-98.
6. Bentley R. A., Bennett J.W. Ferment of Fermentations: Ref lections on the Production of Commodity Chemicals Using Microorganisms // Advan. Appl. Microbiol. – 2008. – V. 63(7). – P. 1- 32.
7. Scazzocchio C. *Aspergillus*: A. multifaceted Genus: Encyclopedia of Microbiology. – Boston: Academic Press Inc. – 2009. – P. 401- 421.
8. Plassard C., Fransson P. Regulation of low molecular weight organic acid production in fungi // Fungal Biol. Rev. Elsevier Ltd. – 2009. – V. 23 (1, 2). – P. 30 - 39.
9. Патентная заявка РУз №IAP 20190069. Экспресс-способ для первичного отбора кислотообразующих мицелиальных грибов // Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Махсумханов А.А., Ташбаев Ш.А., Камбаралиева М.И., Холмурадова Н.К. – 2019.
10. Злобин А.А. Выделение лимонной кислоты из культуральной жидкости *Aspergillus niger*: Лабораторный практикум по «Основам биотехнологии». –Киров. – 2014. – С. 7-8.
11. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. // Методы биохимического исследования растений. Под ред. А.И. Ермакова. – 3-е изд. – Л. Агропромиздат. Ленинградское. Отд., –1987. – С. 430.
12. Жаболовская Н.А., Агеев Л.М., Петрова Л.Ф. Сравнительная оценка методов количественного определения лимонной кислоты // Хлебопекарная и кондитерская промышленность. – 1968. –№ 5. – С. 22-24.

СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ-БИОСИНТЕТИКОВ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ДЛЯ ОБРАБОТКИ КАОЛИНОВ С ЦЕЛЬЮ УЛУЧШЕНИЯ ИХ КАЧЕСТВА

Исмамов Азамат Муйдинжонович

ст. преп. Наманганского Университета, РУз,

Узбекистан, г. Наманган

E-mail: zartem1994@mail.ru

Зайнитдинова Людмила Ибрахимовна

д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией Института микробиологии АН РУз,

Узбекистан, г. Ташкент

E-mail: zajn-lyudmila@yandex.ru

Куканова Светлана Ивановна

канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института микробиологии АН РУз,

Узбекистан, г. Ташкент

E-mail: kukanova_s@mail.ru

SCREENING OF MICROORGANISMS-BIOSYNTHESIZERS OF ORGANIC ACIDS FOR KAOLINS' TREATMENT TO IMPROVE THEIR QUALITY

Azamat Ismatov

Senior teacher of Namangan University,

Uzbekistan, Namangan

Lyudmila Zaynitdinova

Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief of the lab Institute of microbiology AS RUz,

Uzbekistan, Tashkent

Svetlana Kukanova

Candidate of Biological Sciences, Senior scientists, Institute of microbiology AS RUz,

Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

Получены микроорганизмы, синтезирующие лимонную кислоту: *Aspergillus niger* шт.2 - 64 мг/мл и *Aspergillus terreus* шт.1 - 33 мг/мл. Составлена дешевая питательная среда на основе компонентов растительных отходов для культивирования силикатразрушающих микроорганизмов. Показана возможность использования данных микроорганизмов для обработки каолинов с целью повышения их качества.

ABSTRACT

Microorganisms synthesizing citric acid were obtained: *Aspergillus niger* 2 - 64 mg/ml and *Aspergillus terreus* 1 - 33 mg/ml. The cheap nutrient medium for cultivation of silicate destructing microorganisms was composed on basis of components of plants wastes. The possibility of use of these microorganisms for kaolins' treatment to improve their quality was revealed.

Ключевые слова: микроорганизмы, лимонная кислота, биосинтез, каолин.

Keywords: microorganisms, citric acid, biosynthesis, kaolin.

Узбекистан располагает богатейшими залежами первичных и вторичных каолинов и занимает третье место среди стран СНГ после Украины и России [1]. Разведанные запасы каолина в республике сосредоточены на крупнейшем Ангренском комплексном месторождении, которое является единственным столь крупным месторождением в Центральной

Азии [2,3]. В то же время, есть ряд причин сдерживающих комплексное использование глинистого сырья республики, к ним относится недостаточность фундаментальных исследований по улучшению его качества. Повысить характеристики глин и керамических масс позволяют как традиционные (механическое измельчение каолиновой породы и сепарат-

ное разделение в вихревых гидромельницах (гидроциклонах) дезинтеграцию, электромагнитную сепарацию и др.) так и новые методы воздействия, к которым можно отнести биотехнологические методы обработки каолинов [4]. Суть этих методов состоит в обработке каолинов культуральной жидкостью бактерий [5]. Такой нетрадиционный подход к решению вопросов обогащения каолинов представляет определенный интерес. Кроме всего прочего, он является приемлемым как в плане экологии, так и экономичности и успешно сочетает как обезжелезнение каолинов, так улучшение его белизны.

Работы по обезжелезнению каолинов имеют место в мировой практике [6] однако, применительно к местным каолинам до сих пор не разработана технология и проблема остается открытой.

В связи с вышесказанным, целью данной работы поиск микроорганизмов, активных продуцентов органических кислот с целью их использования для обезжелезнения и улучшения качества каолинов Ангреноского месторождения.

Известно, что белизна каолинов зависит от многих показателей и, в том числе, от соотношения окислов железа и титана [7]. Так, при содержании в фарфоре 0,5% Fe_2O_3 , она не влияет на цвет черепка при отсутствии TiO_2 , который будучи бесцветным, влияет на окраску изделий только в присутствии оксида железа. Даже 1% TiO_2 в сочетании с 0,4 % Fe_2O_3 окрашивает фарфоровый черепок также интенсивно, как 0,7% Fe_2O_3 без TiO_2 [8]. Таким образом, проблема обезжелезнения каолинов тесно связана с содержанием в продукте окислов железа и титана, что учитывалось нами в проведении лабораторных опытов по отработке некоторых параметров выщелачивания.

Известно, что после обработки тионовыми железомокисляющими бактериями происходит образование на поверхности многих минералов довольно прочных пленок гидроокислов железа [9]. Оттирка от них возможна как за счет абразивного действия, так и в присутствии различных органических кислот или соляной кислоты, причем применение последней очень эффективно. Однако применение соляной кислоты требует значительных расходов (кислотоустойчивое оборудование и природоохранные меро-

приятия). В связи с этим применение силикатных микроорганизмов, способных синтезировать органические кислоты, способствует эффективному растворению вторичных образований железа в виде выпавших гидроокислов железа после обработки ассоциацией железомокисляющих микроорганизмов [10].

В процессах деструкции силикатных и алюмосиликатных минералов участвуют представители различных физиологических групп микроорганизмов. Это и автотрофные микроорганизмы родов *Acidithiobacillus* и *Thiobacillus*. Среди гетеротрофных микроорганизмов активными в деструкции силикатных минералов являются представители микроскопических грибов, относящиеся к родам *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*. Как известно многие из этих микроорганизмов являются активными продуцентами минеральных и органических кислот, полисахаридов, а также активных комплексообразователей, что, очевидно, можно связать с активизацией процессов деструкции силикатных минералов в присутствии микроорганизмов и предположить косвенность механизма микробиологической деструкции минералов [4, 11]. Вместе с тем, из проведенных до настоящего времени исследований не ясно, как влияют условия культивирования на количество и состав этих метаболитов, имеющиеся данные разрознены и порой противоречивы. Задача наших исследований заключалась в установлении влияния условий культивирования на свойства культуральной жидкости, свидетельствующей о накоплении метаболитов.

Исходя из вышеизложенного, в коллекции лаборатории были отобраны различные штаммы микроорганизмов, обладающие способностью к синтезу органических кислот. Данные микроорганизмы исследовались нами на способность синтезировать органические кислоты как на питательной среде, так и на среде с добавлением каолина (табл. 1).

Исследуемые нами микроорганизмы обладали различной степенью активности в отношении синтеза лимонной кислоты. Наиболее активными оказались штаммы *Aspergillus niger* шт. 1 и шт. 2, а также и *Aspergillus terreus* шт. 1 и шт. 2, которые были отобраны для следующих экспериментов.

Таблица 1.

Способность микроорганизмов к образованию органических кислот

№	Наименование микроорганизмов	Количество лимонной кислоты, мг/мл	
		На питательной среде	На среде с каолином
1.	<i>Aspergillus niger</i> шт. 1	42,24 ± 0,04	30,0 ± 0,05
2.	<i>Aspergillus niger</i> шт. 2	52,48 ± 0,02	50,4 ± 0,04
3.	<i>Aspergillus niger</i> шт. 3	29,31 ± 0,03	21,12 ± 0,03
4.	<i>Aspergillus niger</i> шт. 4	12,9 ± 0,02	13,6 ± 0,02
5.	<i>Aspergillus terreus</i> шт. 1	35,1 ± 0,04	28,5 ± 0,03
6.	<i>Aspergillus terreus</i> шт. 2	19,3 ± 0,02	18,9 ± 0,04
7.	<i>Bacillus subtilis</i> шт. к-9	8,9 ± 0,02	9,9 ± 0,05
8.	<i>Bacillus subtilis</i> шт. кс-1	11,4 ± 0,01	11,8 ± 0,02
9.	<i>Bacillus mucilaginosus</i> шт. 1-1	7,8 ± 0,01	7,7 ± 0,01

10.	<i>Bacillus mucilaginosus</i> шт. 1-2	$7,7 \pm 0,02$	$9,9 \pm 0,03$
11.	<i>Bacillus mucilaginosus</i> шт. 1-3	$7,7 \pm 0,04$	$9,9 \pm 0,05$
12.	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>mycoides</i>	$8,1 \pm 0,02$	$9,5 \pm 0,01$
13.	<i>Bacillus megaterium</i>	$7,8 \pm 0,04$	$7,7 \pm 0,04$
14.	<i>Bacillus</i> sp.	$7,7 \pm 0,05$	$7,7 \pm 0,03$
15.	<i>Penicillium orizae</i>	$19,7 \pm 0,03$	$20,1 \pm 0,01$
16.	<i>Trichoderma harzianum</i> шт. 24	$12,0 \pm 0,01$	$13,7 \pm 0,04$
17.	<i>Trichoderma harzianum</i> шт. 4	$12,4 \pm 0,04$	$11,3 \pm 0,03$

Проведенные исследования по накоплению органических кислот в динамике установили, что максимальное его количество на элективной среде Чапека-Докса проявляется на 3-4 сутки культивирования и составляет 64 мг/мл для *Aspergillus niger* шт. 2 и 33 мг/мл для *Aspergillus terreus* шт. 1 (рис. 1).

Рисунок 1. Динамика накопления лимонной кислоты культурами *Aspergillus niger* (1) и *Aspergillus terreus* (2)

Одна из особенностей микроорганизмов - их необычайная зависимость от условий окружающей среды. Известно, что соотношение и количество компонентов питательной среды могут оказать большое влияние на рост бактерий и их способность к синтезу различных метаболитов, в частности органических кислот [6, 12]. Нами был предпринят поиск дешевых компонентов питательной среды для культивирования гетеротрофных микроорганизмов – различных растительных отходов и предлагается оригинальный подход для культивирования силикатразрушающих микроорганизмов с использованием растительных отходов.

В качестве растительных отходов нами были взяты отработанная биомасса высших водных растений и растительная масса кукурузы. Были приготовлены питательные среды на основе минеральной среды Мандельса с содержанием растительных отходов 2, 3 и 4%, на которых культивировались отобранные нами микромицеты *Aspergillus niger* шт.2 и *Aspergillus terreus* шт.1.

Полученные результаты свидетельствуют, что максимальная активность проявляется при 3% растительной биомассы кукурузы и 3-4% отработанной биомассы высших водных растений (табл. 2,3).

Таблица 2.

Влияние содержания ВВР на накопление лимонной кислоты

Наименование микромицетов	Количество лимонной кислоты, мг/мл			
	1%ВВР	1%ВВР	1%ВВР	1%ВВР
<i>Aspergillus niger</i> шт.2	$19,2 \pm 0,04$	$20,4 \pm 0,02$	$35,0 \pm 0,05$	$27,0 \pm 0,01$
<i>Aspergillus terreus</i> шт.1	$14,0 \pm 0,03$	$22,0 \pm 0,05$	$31,0 \pm 0,02$	$31,0 \pm 0,01$

Таблица 3.

Влияние содержания растительная биомасса кукурузы на накопление лимонной кислоты

Наименование микромицетов	Количество лимонной кислоты, мг/мл			
	1% растительная биомасса кукурузы	1% растительная биомасса кукурузы	1% растительная биомасса кукурузы	1% растительная биомасса кукурузы
<i>Aspergillus niger</i> шт.2	$17,0 \pm 0,03$	$19,0 \pm 0,05$	$27,0 \pm 0,02$	$22,0 \pm 0,025$
<i>Aspergillus terreus</i> шт.1	$12,0 \pm 0,04$	$15,0 \pm 0,02$	$19,0 \pm 0,01$	$20,0 \pm 0,04$

Таким образом, проведенный скрининг микроорганизмов по способности синтезировать органические кислоты позволил отобрать микроорганизмы, обладающие высокой активностью синтеза лимонной кислоты - микроскопические грибы *Aspergillus niger* шт.2 и *Aspergillus terreus* шт.1. Данные микро-

организмы обладают высоким потенциалом для использования их в обработке каолинов с целью повышения их качества. Использование питательной среды на основе растительных отходов для культивирования данных микроорганизмов позволяет существенно удешевить процесс.

Список литературы:

1. Горбачев Б.Ф. Среднеазиатская каолиновая территория. // В кн. «Месторождения каолинов в СССР». – Москва. – Недра. - 1974. – 248с.
2. Ситнова М. Обзор рынка каолина в СНГ // Ситнова М. – Доклад на семинаре № 24 симпозиума «Неделя горняка-2006» - «Инфолайн». - Москва. – 2007.
3. Гончаренко А.И. Каолиновые глины. // В кн. «Минерально-сырьевые ресурсы Узбекистана»; под ред. В. И. Попова, Х. Т. Туляганова. – Ташкент. – Фан. - 1977. — Ч. 2. — 271с.
4. Platova R.G., Platov Yu.T. Application of biotechnology for the ceramic industry. // «Глины и глинистые минералы». – Пущино. – 2006. - 106 с.
5. Лелеко А.И., Ахунув А.И., Куканова С.И. Биотехнология обогащения каолинов: проблемы и перспективы. // «Горный вестник Узбекистана». – 1998. - №1. - с.60-64.
6. Styriakova I., Styriak I., Nandakumar M.P., Mattiasson B. Bacterial destruction of mica during bioleaching of kaolin and quartz sand by *Bacillus cereus* // World J. Microbiol. and Biotechnol. – 2003. - V.19. - № 6. - P.583–590.
7. Платов Ю.Т., Платова Р.А. Способ отбеливания каолина. // (20.04.2016) Российская федерация. - Федеральная служба по интеллектуальной собственности (19) - RU(11) - 2582164(13)C1.
8. Каравайко Г.И. Микробная деструкция силикатных минералов. // Труды Института микробиологии им. С.Н.Вернадского. - Вып.12. - Юбилейный сборник к 70-летию института. - М. - 2004.-с.172-196.
9. Наймарк Е.Б., Ерощев-Шак В.А., Чижикова Н. П., Компанцева Е.И. Взаимодействие глинистых минералов с микроорганизмами: обзор экспериментальных данных. // Журнал общей биологии. - Том 70. - № 2. – 2009. - с. 155-167.
10. Maurice P.A., Vierkorn M.A., Hersman L.E., Fulghum J.E., Ferryman A. Enhancement of kaolinite dissolution by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium // Geomicrobiol. J. - 2001. - V.18. - № 1. – P.21–35.
11. Mera M.U., Beveridge T.J., Mechanism of silicate binding to the bacterial cell wall in *Bacillus subtilis*. // J. Bacteriol. - 1993. - V. 175. - № 7. - P. 1936–1945.
12. Tyriakov I., Tyriak I., Nandakumar M.P., Mattiasson B. Bacterial destruction of mica during bioleaching of kaolin and quartz sands by *Bacillus cereus*. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2003. –V.19. -№ 6, P. 583-590.

ВЛИЯНИЕ ПЕСТИЦИДОВ НА МИКРОБИОЦЕНОЗЫ И ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРОЗЕМОВ

Зайнитдинова Людмила Ибрахимовна

д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией Института микробиологии АН РУз,
Узбекистан, г.Ташкент

E-mail: zajn-lyudmila@yandex.ru

Косимов Диербек Илхом угли

докторант Института микробиологии АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент

E-mail: diyor-qosimov91@mail.ru

Ташпулатов Жавлон Жамондинович

канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института микробиологии АН РУз,
Узбекистан, г.Ташкент

E-mail: javlon@mail.ru

Куканова Светлана Ивановна

канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института микробиологии АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент

E-mail: kukanova_s@mail.ru

IMPACT OF PESTICIDES ON MICROBIOCENOSIS AND ENZYMATIC ACTIVITY OF SEROZYOMS

Lyudmila Zaynitdinova

Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief of the lab Institute of microbiology AS RUz,
Uzbekistan, Tashkent

Diyorbek Kosimov

Postgraduate Institute of microbiology AS RUz,
Uzbekistan, Tashkent

Javlon Tashpulatov

PhD, Senior scientists, Institute of microbiology AS RUz,
Uzbekistan, Tashkent

Svetlana Kukanova

Candidate of Biological Sciences, Senior scientists, Institute of microbiology AS RUz,
Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

Проведен анализ микробиологической и ферментативной активности почв, загрязненных пестицидами. В модельных испытаниях показано, что применение шлама биогазовой установки, *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas stutzeri* способствует деструкции смеси ДДЭ и ДДТ. Проведенный анализ ферментативной активности модельных опытов выявил корреляцию между деструкцией пестицидов и ферментативной активностью почв. С уменьшением концентрации пестицидов увеличивается ферментативная активность почв.

ABSTRACT

Analysis of microbiological and enzymatic activity of soils polluted with pesticides was conducted. Model trials revealed that joint application of sludge of biogas unit, *Azotobacter sp.* and *Pseudomonas stutzeri* promotes to destruction of the DDE and DDT mixture. Conducted analysis of enzymatic activity of the model trials revealed correlation between pesticides' destruction and enzymatic activity of soil. The enzymatic activity of soil increased with lowering pesticides' concentration.

Ключевые слова: пестициды, деградация, *Bacillus*, *Pseudomonas*, шлам биогазовой установки, ферментативная активность почв.

Keywords: pesticides, degradation, sludge of biogas unit, enzymatic activity of soil.

Введение

Как известно, на сегодняшний день пестициды широко используются в мире несмотря на то, что их использование нарушает микробный баланс почвы, загрязняет атмосферу и водные системы. Наиболее известный пестицид ДДТ повсеместно применяемый в 20 веке, остаточные концентрации которого до сих пор загрязняют почву, обладает значительной устойчивостью к разложению. Никакие физические факторы не способны сильно повлиять на процесс разложения ДДТ. В настоящее время ДДТ запрещен для использования [1], однако, многолетнее применение его во все возрастающих масштабах привело к значительному накоплению во внешней среде, почве, воде.

Необходимость исследования взаимодействия пестицидов с почвенной микрофлорой обусловлена важнейшей ролью микроорганизмов в создании почвенного плодородия и детоксикации почвы от ксенобиотиков [2]. Главную пестицидную нагрузку в почве берут на себя микроорганизмы, которые, благодаря своему видовому разнообразию и ферментативному аппарату, способны частично или полностью утилизировать химические средства защиты растений. Как известно, пестициды снижают микробиологическую активность почвы, тем самым увеличивая токсическое действие, в результате чего нагрузка на почвенные микроорганизмы при разложении химических веществ многократно усиливается. Многочисленными исследованиями показано, что пестициды в различных концентрациях могут подавлять рост отдельных групп микроорганизмов, либо стимулировать их развитие [3-7]. В работах Бабкиной Э.И. [8], Ксенофонтовой О.Ю. [9], установлено, что естественные процессы самоочищения почв не способны справиться с нынешними объемами загрязнений.

В связи с этим, одной из актуальных задач современной биотехнологии является создание биопрепаратов на основе штаммов-деструкторов, полученных из аборигенной микрофлоры, для решения комплекса задач, связанных с реабилитацией почв, загрязненных ксенобиотиками. На настоящий момент выделено и депонировано большое количество штаммов-деструкторов пестицидов, как в виде монокультур, так и в консорциумах. Основную группу почвенных микроорганизмов, разрушающих ксенобиотики, составляют бактерии рода *Pseudomonas*, способные расщеплять более 100 органических со-

единений. Многие бактерии рода *Pseudomonas* несут плазмиды, кодирующие ферменты, которые катализируют расщепление ароматических и галогенсодержащих органических соединений [10,11], которые также встречаются у микроорганизмы рода *Bacillus*, таких, как *Bacillus pumilus* *Bacillus sp.* [12-15]. Из азотфиксирующих микроорганизмов чаще всего идентифицировались *Azomonas agilis* и *Azotobacter chroococcum* [16,17]. Применение диазотрофов способствует не только деструкции пестицидов, но и обогащает почву усвояемым азотом.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования служили образцы сероземных почв с территории опытного участка. Отбор проб почвы осуществляли по принципу «конверта» в стерильный пакет. Средний образец почвы массой 2.5 кг доставляли в лабораторию, где помещали в четыре пластмассовых сосуда и вносили экспериментальные дозы пестицида. Почву по килограмму вносили в емкость в стерильном и нестерильном виде. Исследование проводили с исходной почвой и с микроорганизмами в течение 60 дней.

Для оценки влияния пестицидов на микробный комплекс почвы сравнивали численность и структуру комплексов бактерий. Для определения численности и выделения микроорганизмов из почвы использовали методы посева на агаризованные питательные среды из разведений почвенных суспензий [18]. Структуру комплекса бактерий характеризовали с использованием физиолого-биохимических и морфологических показателей отдельных культур [19]. Материалом исследований явились пестициды ДДТ и ДДЭ, микроорганизмы, выделенные из почв Южного Приаралья и шлам биогазовой установки. Для определения микробиологической активности был проведен анализ их развития на следующих средах: Мясо-пептонный агар, Эшби, Гильтай, среда Чапека и среда Виноградского. Кислотность определяли на рН метре Меттлер Тоledo. Определение ферментативной активности почв проводили по общепринятым методикам [19]. Агрохимический анализ провели на базе лабораторий Узгидромета.

Результаты исследований.

В результате изучения в исходной почве состава автохтонной микробиоты были выделены основные группы микроорганизмов, участвующие в почвообразовательном процессе, и определены их количественные показатели (табл.1).

Таблица 1.

Микробиологический анализ исходной пробы почвы для модельных опытов

Количество микроорганизмов кое, кл /г почвы					
Общее количество гетеротрофов	Аммонификаторы	Денитрификаторы	Олигонитрофилы	Нитрификаторы	Микроскопические грибы
17 *10 ⁶	2,5 *10 ⁴	6 *10 ⁵	35*10 ⁵	2.5*10 ⁴	10 ⁴

Как видно из таблицы 1, анализ развития различных физиологических групп микроорганизмов выявил наличие характерных для сероземов бактерий. Выявляются аммонификаторы, денитрификаторы и нитрификаторы, а также микроскопические грибы. Также в достаточном количестве выявляются органотрофы, среди которых преобладают спороспособные микроорганизмы.

Дальнейшие работы по проведению модельных испытаний укладывались в общую схему характер-

ную для испытаний. Была подготовлена почва, отобранная с опытного участка и поделена пополам. Одна часть была простерилизована. Затем в почву внесен dust как в стерильную, так и в нестерильную. Почва была увлажнена и в каждый опытный образец вносились суспензия отобранных микроорганизмов и жидкий шлам биогазовой установки из расчета 10% (рис.1).

Рисунок 1. Модельные опыты по деградации пестицидов

Анализ разложения пестицидов представлен через 60 суток на рис. 2-3. Исследование проводили с различными штаммами микроорганизмов. Инокуля-

ция загрязненной почвы *Bacillus sp.* №2, *Bacillus sp.* №17, *Azotobacter*, *Pseudomonas stutzeri* и шлам биогазовой установки.

Рисунок 2. Нестерильная почва через 60 суток

Рисунок 3. Стерильная почва через 60 суток

Анализ результатов по изменению содержания пестицидов показывает, что в нестерильной почве заметно снижается концентрация пестицидов (рис. 3) как в контрольной почве, так и в опытных образцах. Очевидно, что этот эффект в первую очередь свидетельствует о роли аборигенной микрофлоры, количество которой в исходной почве соответствует экологическому уровню и в комплексе с внесенными деструкторами она способствовала интенсивному разложению ДДТ в почве.

Развитие микроорганизмов и микробных комплексов в стерильной почве показывает конкретную роль каждого микроорганизма. Следует отметить, что интенсивно шло разложение ДДТ (исходное 8 мг/кг почвы) гораздо менее труднодоступным субстратом оказалось наличие ДДЭ (исходное 20 мг/кг почвы) как в стерильной почве, так и природной среде.

Важным показателем для разрушения пестицидов является ферментативная активность почвы, т.к. активность почвенных ферментов изменяется в ответ на попадание в почву пестицидов и других техногенных химических соединений. В наших модельных испытаниях определяли активность полифенолоксидазы и пероксидазы, так как им в почвах

принадлежит важная роль в процессах гумусообразования. Полифенолоксидаза катализирует окисление полифенолов, фенолов, которыми так богаты пестициды в хиноны в присутствии свободного кислорода воздуха. Пероксидаза же катализирует окисление полифенолов в присутствии перекиси водорода или органических перекисей. Биокаталитическая активность почв находится в значительном соответствии со степенью обогащенности их микроорганизмами и зависит от типа почв и изменяется по генетическим горизонтам. Активность биокаталитических реакций почв изменяется в течение года. Наименьшая она весной и осенью, а наиболее высокая обычно в июле-августе, что соответствует динамике общего хода биологических процессов в почвах. Однако в зависимости от типа почв и их географического положения динамика ферментативных процессов весьма различна.

Проведенный нами анализ ферментативной активности модельных опытов показал, что наблюдается корреляция между деструкцией пестицидов и ферментативной активностью - уменьшение концентрации пестицидов увеличивает ферментативную активность (табл.2).

Таблица 2.

Ферментативная активность почвы

Культуры	Нестерильная почва		Стерильная почва	
	Полифенолоксидаза	Пероксидаза	Полифенолоксидаза	Пероксидаза
контрольная почва	0,563	0,597	0,523	0,527
Шлам биогаза	0.666	0.633	0.6	0.442
<i>Alternaria 4</i>	0.414	0.47	0.666	0.456
<i>Azotobacter</i>	0.70	0.456	0.63	0.47

Заключение

Анализируя полученные результаты можно сделать вывод, что все культуры, отобранные нами для проведения модельных испытаний способны к деструкции смеси ДДЭ и ДДТ. Однако, лучшие результаты показали шлам биогазовой установки, бинарная культура и *Pseudomonas stutzeri*, неплохие результаты и у остальных микроорганизмов. При

участии микроорганизмов и их ферментов в почве и воде происходят процессы гидролиза, окисления и восстановления пестицидов [2,20,21]. Проблема детоксикации старых пестицидов и продуктов их деструкции, а также исследования по влиянию новых поколений пестицидов на почвенную микробиоту для оценки степени их безопасности по-прежнему

входят в число первоочередных задач биомониторинга.

Изучение развития микробиоты установило, что в природной почве активно развивается спонтанная или аборигенная микрофлора, что несколько затормаживает процесс деструкции.

Также важно отметить, что ферментативная активность почвы является нестабильным параметром в естественных условиях, и зависит как от изменения внешних факторов (температура, влажность), так и от количественного содержания в ней токсичных веществ, таких как пестициды.

Список литературы:

1. Стокгольмская конвенция о стойких органических загрязнителях. UNEP Chemicals. - 2002. - 53 с.
2. Круглов Ю.В. Микрофлора почвы и пестициды. - М.: Агропромиздат. - 1991. - 128 с.
3. Олискевич В.В., Талаловская М., Третьякова С.Э. Оптимизация технологий биоремедиации сельскохозяйственных земель, загрязненных гербицидом «Гезагарт» // Известия Саратовского университета. - Серия «Химия. Биология. Экология». - 2013. - Вып.2. - Т.13. - С. 101-107.
4. Арипов Т.Ф., Ташпулатов Ж.Ж., Зайнитдинова Л.И., Куканова С.И. Микроорганизмы зон пестицидного загрязнения // Биотехнология состояние и перспективы развития: тез. докл. VIII Московского международного конгресса. - М. - Россия. - 2015. - часть 2. - с.394-395.
5. Зайнитдинова Л.И., Куканова С.И., Ташпулатов Ж.Ж. Микробиота районов Южного Приаралья. // Science and world. (International scientific journal, Russia). 2016. - №9 (37). - Vol.1. - p. 64-66.
6. Fenner K., Canonica S., Wackett L.P., Elsner M. Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. // Science 2013. - 341:752-758.
7. Jacobsen C.S., Hjelmsø M.H. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. //Curr. Opin. - 2014. - Biotech. 27. - 15-20 10.1016/j.
8. Бабкина Э.И., Сурин В.А., Самсонов Д.П. Полигоны захоронения пестицидов как источник загрязнения окружающей среды // Природные ресурсы. Использование и охрана природных ресурсов в России. - 2003. Бюл. № 11-12. С. 115-122.
9. Ксенофонтова О.Ю. «Микроорганизмы почвы и пестициды». LAP LAMBERT Academic Publishing. - 2015. - 01-16. 136 с.
10. Satish G., Patel S., Ashokrao D. Mohekar and Arun S. Kharat *Microbial degradation of pesticide: A review Article // African journal of microbiology research. - 11(24):992-1012 - June 2017.
11. Parte S., Rokade K., Mali G., Kudale S. Biodegradation of sulfonated aromatic amine by *Pseudomonas demolyticum* NCIM2112. - Chem. Pharm. Res. -2013. -5(4):335-339.
12. Gilani R.A., Rafique M., Rehman A., Munis M.F., Rehman S.U., Chaudhary H.J. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas* // J. Basic Microbiol. - 2016. - 56(2):105-119. DOI: 10.1002/jobm.201500336
13. Кочетков В.В., Балакшина В.В., Мордухова Е.А., Боронин А.М. Плазмиды биодegradации нафталина в ризосферных бактериях рода *Pseudomonas* // Микробиология - 1997. - Т. 66. - №2. - С. 211-216.
14. Anwar S., Liaquat F., Khan Q.M., Khalid Z.M., Iqbal S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. // J. Hazard. Mater. - 2009. - 168:400-405.
15. Batisson I., Crouzet O., Besse-Hoggan P., Sancelme M., Mangot J.F., Mallet C., Bohatier J. Isolation and characterization of mesotrine-degrading *Bacillus* sp. from soil. // Environ. Pollut. - 2009. - 157:1195-1201.
16. Chennappa G., Adkar-Purushothama C.R., Naik M.K., Suraj U., Sreenivasa M.Y. Impact of Pesticides on PGPR Activity of *Azotobacter* sp. Isolated from Pesticide Flooded Paddy Soils Greener // Journal of Agricultural Sciences. - 2012. - 6.15. - Vol. 4 (4). - pp. 117-129.
17. Kadam T. Degradation of phorate by *Azotobacter* isolates // Bull Environ Contam. Toxicol. - 2012. - p 156-171.
18. Нетрусов А.И., Егоров М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии // - М.: Академия. - 2005. - С. 96-242.
19. Звягинцев Д.Г. Биологическая активность почв и шкалы для оценки некоторых её показателей // Почвоведение. - 1978. - № 6. - С. 48-54.
20. Добровольский Г.В., Никитин Е.Д. Сохранение почв как незаменимого компонента биосферы - М.: Наука. - МАИК «Наука/Интерпериодика». - 2000. - 185 с.
21. Ашихмина Т.Я., Домрачева Л.И., Огородникова С.Ю., Олькова А.С., Кантор Г.Я., Кондакова Л.В. Изучение воздействия фосфорсодержащих поллютантов на почвенные микроорганизмы // Рос. Химический журн. - 2010. - Т. LIV. - No 4. - С.183 - 186.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ**БИОТЕХНОЛОГИЯ (В ТОМ ЧИСЛЕ БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ)****БИОТРАНСФОРМАЦИЯ АКРИЛОНИТРИЛА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ
В СТРУКТУРЕ ГЕЛЯ АГАРОЗЫ БАКТЕРИИ RHODOCOCCLUS RUBER – 8/4/1****Алимова Барно Хасановна**

канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: balimova@list.ru

Камбаралиева Маргуба Иброхимжановна

мл. науч. сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: k_marguba@mail.ru

Пулатова Озодахон Мансуровна

канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: opulatova@inbox.ru

Шарифов Мансурбек Рахимбергенович

мл. науч. сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: shmansur@mail.ru

Кадирова Дильдора Эргашбаевна

канд. биол. наук, доцент Ташкентского фармацевтического Института,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: dildora72_72@mail.ru

Давранов Кахрамон Давранович

д-р биол. наук, проф. Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, г.Ташкент.
E-mail: k_davranov@mail.ru

Махсумханов Ахмаджан Абзамханович

канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г.Ташкент
E-mail: amakhsum@mail.ru

**BIOTRANSFORMATION OF ACRYLONITRILE BY THE BACTERIUM RHODOCOCCLUS
RUBER – 8/4/1 IMMOBILIZED IN AGAROSE GEL STRUCTURE****Barno Alimova**

candidate of biological sciences, senior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent

Marguba Kambaralieva

junior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent

Ozodakhon Pulatova*candidate of biological sciences, senior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences, Uzbekistan, Tashkent***Mansurbek Sharifov***junior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences, Uzbekistan, Tashkent***Dildora Kadirova***candidate of biological sciences, docent of the Tashkent Pharmaceutical Institute, Uzbekistan, Tashkent***Kakhramon Davranov***Doctor of Science, Prof. Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences, Uzbekistan, Tashkent***Akhmadzhan Makhsumkhanov***candidate of biological sciences, senior researcher of the Institute of Microbiology, Uzbekistan Academy of Sciences, Uzbekistan, Tashkent*

АННОТАЦИЯ

Изучен процесс биотрансформации акрилонитрила в акриламид иммобилизованными в структуру агарозного геля клеток *Rhodococcus ruber* -8/4/1. Подобраны оптимальные условия для иммобилизации. Показано, что конверсия акрилонитрила в акриламид клеточной биомассы иммобилизованной в структуру агарозного геля культуры *R. ruber* – 8/4/1 позволяет использовать иммобилизованные клетки в течении 4 циклов с образованием 10-11% акрилаида.

ABSTRACT

The process of biotransformation of acrylonitrile into acrylamide by immobilized in agarose gel structure of *Rhodococcus ruber* - 8/4/1 cells has been studied. Optimum conditions for immobilization have been selected. It was shown that the conversion of acrylonitrile to acrylamide by cell biomass immobilized in the structure of the agarose gel of *R. ruber* - 8/4/1 allows the use of immobilized cells for 4 cycles with the formation of 10-11% acrylamide.

Ключевые слова: *Rhodococcus ruber* – 8/4/1, иммобилизованные клетки (ИК), гель агарозы, биоконверсия, акрилонитрил (НАК), акриламид (АА).

Keywords: *Rhodococcus ruber* – 8/4/1, immobilized cells (IC), agarose gel, bioconversion, acrylonitrile (AN), acrylamide (AA).

В настоящее время получение амидов и карбоновых кислот с использованием бактерии рода *Rhodococcus* с помощью их нитрилгидратазно-амидазного и нитрилазного пути метаболизма нитрилов является активно развивающимся направлением биотехнологии [1-4]. Биотехнологическим способом из соответствующих нитрилов могут быть получены такие продукты, как акриламид [5], акриловая кислота [6], никотинамид, никотиновая, изоникотиновая и пиколиновая кислоты [7-9], путем стереоселективного гидролиза получают энантиомерно чистые органические вещества, используемые в качестве интермедиатов при получении фармпрепаратов и химических веществ различного назначения [10, 11].

Как известно, интенсификация биотехнологических процессов может быть достигнута за счет иммобилизации микробных клеток. Применение иммобилизованных биокатализаторов имеет ряд преимуществ, среди которых их стабилизация, возможность внедрения непрерывных технологий, упрощение процедуры выделения и очистки конечных продуктов и снижение количества отходов [12, 13]. Ис-

пользование ИК родококков при биотрансформации НАК повышает устойчивость клеток к токсичным действиям субстрата НАК и конечного продукта АА, увеличивая время работы биокатализатора без снижения нитрилгидратазной активности и выходом конечного продукта.

Цель данного исследования подбор оптимальных условий иммобилизации в структуру агарозного геля клеток *Rhodococcus ruber*- 8/4/1 и изучение процесса биотрансформации НАК в АА с использованием ИК.

В работе был использован штамм бактерии *R. ruber*- 8/4/1 – продуцент нитрилгидратазы, депонированный под номером СКБ-318 коллекции микроорганизмов Института микробиологии АН РУз [14].

Клетки штамма *R. ruber*- 8/4/1 обладающего нитрилгидратазной активностью, выращивали на среде ПС следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 0,5; KH_2PO_4 – 0,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 1,0; Пептон – 2,0; Глюкоза – 10,0; Мочевина – 12,0; $CoCl_2 \times 6H_2O$ – 0,03; с исходным значением pH 7.2-7.5. Культуру выращивали в конических колбах объемом 250 мл в 70 мл питательной среды при температуре 28°C при

постоянном перемешивании со скоростью вращения 150 об/мин в течении 72 часов. Клеточную суспензию центрифугировали 10 мин., со скоростью вращения 12000 об/мин, клеточный осадок отмывали 10 мМ фосфатным буфером. Осадок клеток ресуспендировали в 10 мл фосфатным буфером.

Для ИК в структуру агарозного геля использовали агарозу в различных концентрациях. Агарозу нагревали до температуры кипения, затем охлаждали до 35-40 °С и смешивали с бактериальной суспензией клеток, с таким расчётом, чтобы конечная концентрация агарозы составила от 0.5 до 3.0%. Полученную суспензию клеток разливали в 96 луночный планшет объемом 0.2 мл каждой лунки. После застывания получали гранулы, которые в дальнейшем использовали для биотрансформации.

Биотрансформацию НАК в АА иммобилизованными в структуру агарозного геля клетками *R. ruber* - 8/4/1 проводили в 10 мМ фосфатном буфере (pH=7.0-7.2). В колбу объемом 100 мл с 50 мл фосфатным буфером помещали гранулы ИК. Для изучения устойчивости ИК к НАК, НАК вносили как одноразово, так и дробно в концентрации от 0.6 до 12%. Время конверсии от 20 до 180 минут.

Концентрацию АА в реакционной смеси анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе LKB HPLC-system, используя колонку Силосорб SPHC₁₈ (150×4 мм, 8 мкм) или DISCOVERY-C18 (75×4 мм, 5 мкм), УФ-детектор фильтром 206 нм, потоком подвижной фазы 1 мл/мин следующего состава: 10 мМ фосфатный буфер – 97.0%, CH₃CN – 3.0%, pH=2.5 (доводили с ортофосфорной кислотой). В качестве контроля использовали серийные разведения чистых препаратов АА.

Операционную стабильность иммобилизованного биокатализатора оценивали по сохранению нит-

рилгидратазной активности при последовательном проведении биотрансформации НАК, вносимого в каждом цикле. Цикл реакции представляет собой полную конверсию НАК вносимого в реакционную среду с концентрацией 14%, с последующей промывкой гранул ИК водой или 10 мМ фосфатным буфером.

В настоящее время, биотехнологическое производство акриламида основано, главным образом, на использовании высокопродуктивных штаммов *R. rhodochrous* J1 и *R. rhodochrous* M8, M33 [6, 15]. В результате проведенных экспериментов были подобраны условия для иммобилизации на агарозе клетки *R. ruber* - 8/4/1, оптимальным объемным соотношением клеточной массы и агарозы составляет 1:1 (об/об), с концентрацией агарозы 0.8-1.0%. Показано, что при концентрации клеток 10-12 мг/мл происходит полное связывание клеток с агарозой. Подобранные условия иммобилизации обеспечили высокую концентрацию жизнеспособных клеток, способствовали равномерному распределению клеточной массы внутри гранул агарозы и увеличили механическую прочность биокатализатора.

Было изучено влияние НАК на устойчивость ИК. НАК вносили в реакционную среду в концентрации от 1.2 до 12 %. Установлено, что при одновременном внесении НАК в концентрации 1.2-2.4% через 30 мин степень конверсии составила 50% и 86%, соответственно. Полная конверсия НАК в АА была получена через 90 мин конверсии и составила 98% и 97% соответственно, тогда как через 180 мин конверсии наблюдается трансформация АА в акриловую кислоту (АК) в обеих концентрациях. При внесении НАК в концентрации 4.8% полная конверсия была достигнута через 90 и 180 мин конверсии и составила – 100%.

Таблица 1.

Биоконверсия НАК клетками *Rhodococcus ruber* – 8/4/1 включёнными в структуру геля агарозы при одновременном внесении НАК

Концентрация НАК (%)	Концентрация АА в среде (%)			Степень конверсии (%)		
Время конверсии (мин)	30	90	180	30	90	180
1.2	0.6	0.6	АК	50	98	АК
2.4	2.08	3.0	АК	86	97	АК
4.8	2.8	6.4	5.6	58	100	100
7.2	2.0	6.0	6.4	27	83.3	88.0
9.6	1.7	5.4	5.8	17.7	56.2	60.0
12.0	1.88	2.4	4.0	15	20	33.3

При дальнейшем увеличении НАК в концентрациях 9.6 и 12.0% в течении 180 мин степень конверсии уменьшается и составляет 60.0% и 33.3%. Установлено, что ИК способны выдерживать высокие концентрации НАК длительное время. Показано, что при одновременном внесении НАК в концентрации 4.8% в течении 90 мин клетки полностью конвертируют НАК в АА, тогда как при концентрации НАК 9.6 и 12.0% ИК теряют свою активность.

Возможно, устойчивость штамма к высоким концентрациям НАК 4.8% - 7.2% объясняется тем, что культура была выделена из почв на территории предприятия по производству НАК.

При дробном внесении НАК в реакционную среду при достижении НАК в концентрации 3.6% степень конверсии составила 77%, при дальнейшем внесении НАК степень конверсии не изменяется и варьирует в пределах 73-88%.

Таблица 2.

Биоконверсия НАК клетками *Rhodococcus ruber* 8.4.1 включёнными в структуру геля агарозы при
дробном внесении НАК

Концентрация НАК (%)	Время конверсии(мин)	Концентрация АА в среде (%)	Степень конверсии, (%)
1.2	20	0.88	73.0
2.4	40	1.65	68.0
3.6	60	2.8	77.0
4.8	80	2.32	79.0
6.0	100	5.2	86.6
7.2	120	5.8	80.0
8.4	140	6.4	77.0
9.6	160	7.5	78.1
10.8	180	8.2	76.0
12.0	200	10.6	88.3

Следует учитывать, что при воздействии НАК на клетки одновременно начинается гидролиз, который сопровождается накоплением АА, таким образом, воздействие на клетки становится многофакторным, включающим влияние токсического субстрата и продукта реакции. Ранее было установлено, что нативные клетки способны выдерживать АА, который накапливается в реакционной среде в процессе конверсии, в концентрации 10-12%. Установлено, что после иммобилизации устойчивость клеток к АА увеличивается и составляет не менее 14-16%. Следовательно, НАК вносимый, в реакционную среду также оказывал токсическое действие на клетки, тогда, когда его вносили с коротким интервалом времени. При увеличении интервала времени вносимого НАК с 20 мин до 30 мин степень конверсии увеличивается и составляет не менее 80-88%.

Для того чтобы оценить операционную стабильность биокатализатора, проводили последовательные циклы конверсии субстрата, после каждого цикла биокатализатор отделяли от реакционной среды, промывали 10 мМ фосфатным буфером и использовали в дальнейших реакциях. При определении операционной стабильности клеток иммобилизованных в структуру агарозного геля установлено, что ИК не теряли своей активности при проведении повторных циклов трансформации НАК в АА в течении 4 циклов, с сохранением активности 85, 78, 70% от исходной активности соответственно. Снижение нитрилгидратазной активности клеток наблюдается только к 5-му циклу и составило не более 40% от исходной активности (Рисунок 1).

Рисунок 1. Операционная стабильность клеток штамма *Rhodococcus ruber* – 8/4/1 иммобилизованных в структуру геля агарозы

Снижение ферментативной активности при многократной конверсии субстрата может происходить либо в результате ингибирования фермента, либо из-за десорбции клеток и вымывания их из реакци-

онной среды. В наших исследованиях потеря активности происходила, главным образом, вследствие ингибирования клеток высокими концентрациями токсического продукта реакции, в частности АА.

Следует отметить, что при достижении АА в реакционной среде 8-10% с использованием свободных клеток, цикл заканчивается, клетки невозможно использовать повторно, тогда как при иммобилизации микробных клеток, клетки возможно использовать в течении 3-4 циклов.

Таким образом, установлено, что включение клеток в структуру агарозы позволяет получить достаточно стабильный биокатализатор, так как не

происходит потеря клеток из агарозного геля. Преимуществом использования иммобилизованных в структуру агарозного геля микробных клеток в возможности использования их в течении 4 циклов с образованием 10-11% АА. Недостатком использования агарозного геля является потеря активности микробной биомассы с сохранением активности 75% в процессе иммобилизации из-за температуры, используемой в процессе иммобилизации.

Список литературы:

1. Дебабов В.Г., Яненко А.С. Биокаталитический гидролиз нитрилов // Обзорный журнал по химии. – 2011. – Т. 1. – № 4. – С. 376–394.
2. Martínková L., Křen V. Biotransformations with nitrilases // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2010. – V. 14. – P.130–137.
3. Kim D., Choi K.Y., Yoo M., Zylstra G.J., Kim E. Биотехнологический потенциал биodeградации *Rhodococcus* // J. Microbiol. Biotechnol. – 2018. – V.28 (7). – P. 1037-1051.
4. Забазная, Е.Б., Козулин С.В., Воронин С.П. Отбор штаммов, трансформирующих акрилонитрил и акриламид в акриловую кислоту // Прикл. биохим. микробиол. – 1998. – Т. 34, № 4. – С. 377–381.
5. Watanabe I. Optimal conditions for cultivation of *Rhodococcus* sp. N-774 and for conversion of acrylonitrile to acrylamide by resting cells // Agric. Biol. Chem. – 1987. – V. 51(12). – P. 3201–3206.
6. Nagasawa T., Nakamura T., Yamada Y. Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase // Appl. Microbiol. Biotchnol. –1990. –V. 34. –P. 322–324.
7. Webster N.A., Ramsden D.K., Hughes J. Comparative characterisation of two *Rhodococcus* species as potential biocatalysts for ammonium acrylate production //Biotech. Lett. – 2001. – V. 23. – P. 95–101.
8. Almatawah Q.A. Cowan D.A. Thermostable nitrilase catalysed production of nicotinic acid from 3-cyanopyridine // Enzyme Microb. Technol. – 1999. – V. 25. – P. 718–724.
9. Mathew C.D., Nagasawa T., Kobayashi Yamada H. Nitrilase-catalyzed production of nicotinic acid from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochrous* J1 // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – V. 54. – P. 1030–1032.
10. Максимова Ю.Г., Васильев Д.М., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Трансформация 2 и 4 цианопиридинов свободными и иммобилизованными клетками нитрилгидролизующих бактерий // Прикл. биохим. микробиол. –2013. – Т. 49. – № 4. – С. 358–363.
11. Елькин А.А., Гришко В.В., Ившина И.Б. Окислительная биотрансформация тиаанизола клетками *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 66 // Прикл. биохим. микробиол., – 2010, –Т. 46, – № 6, – С. 637–643
12. Сеницын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И., Спасов С.Д. //Иммобилизованные клетки микроорганизмов – М. Изд-во МГУ. –1994. – С. 288.
13. Куюкина М.С., Коршунова И.О., Рубцова Е.В., Ившина И.Б. Методы иммобилизации микроорганизмов для динамических атомно-силовых исследований (обзор) // Прикл. биохим. микробиол. – 2014.–Т. 50, – № 1,– С. 7–16.
14. Патент РУз IAP №05723 от 28.12.2018г. Штамм бактерий *Rhodococcus ruber* – 8/4/1 – продуцент нитрилгидратазы // Патент Узбекистана №05723 от 28.12.2018г /Махсумханов А.А., Алимова Б.Х., Пулатова О.М. [и др.].
15. Kobayshi M., Komeda H., Ynaka N. Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. Sequencing and overexpression of the gene and identification of an essential cysteine residue //J.Biol.Chem. – 1992. –V.267, – №.29, – P. 20746-20751.
16. Рогачева С.М., Игнатов О.В. Респираторная активность микробных клеток *Rhodococcus rhodochrous* M8, продуцирующего акрилонитрил-гидролизующие ферменты // Прикл. биохим. микробиол. – 2001. – Т. 37, – № 3, – С. 326–331.

БИОФИЗИКА

**ВАЗОРЕЛАКСАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ
АЛКАЛОИДА 1-(4'-ХЛОРФЕНИЛ)- 6,7- ДИМЕТОКСИ-1,2,3,4-ТЕТРАГИДРОИЗОХИНОЛИН
НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК
АОРТЫ КРЫСЫ**

Зарипов Абдисалим Абдикаримович

*базовый докторант Каракалпакского Государственного университета им. Бердаха,
Узбекистан, г. Нукус
E-mail: salimz10@mail.ru*

Есимбетов Адилбай Тлепович

*доцент Каракалпакского Государственного университета им. Бердаха,
Узбекистан, г. Нукус
E-mail: adil_et78@mail.ru*

Усманов Пулат Бекмуратович

*профессор, Институт биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: Pulat.Usmanov@mail.ru*

Журакулов Шерзод Нияткобилович

*Ph.D., Институт химии растительных веществ АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: j.sherzod.78@mail.ru*

**THE VASORELAXANT EFFECT
OF 1-(4'-CHLOROPHENYL)-6,7-DIMETHOXY-1,2,3,4-TETRAHYDROISOQUINOLINE A
LKALOID ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF RAT AORTA SMOOTH MUSCLE CELLS**

Abdisalim Zaripov

*basic doctoral student, Karakalpak State University named after Berdakh,
Uzbekistan, Nukus*

Adilbay Esimbetov

*docent, Karakalpak State University named after Berdakh,
Uzbekistan, Nukus*

Pulat Usmanov

*Professor, Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent*

Sherzod Jurakulov

*Senior researcher, Institute of the Chemistry of Plant Substances, Academy of Sciences,
Uzbekistan, Tashkent*

АННОТАЦИЯ

Изучено действие алкалоида 1-(4'-хлорфенил)-6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (F-37) на функциональную активность гладкомышечных клеток аорты крысы. Регистрацию изометрической силы проводили с помощью преобразователя силы типа FT-03 (*Grass Instrument Co.*, США). Обнаружено, что F-37 (5-100 мкМ) обладает выраженным релаксантным действием и установлено, что релаксантный эффект F-37 обусловлен модуляцией активности Ca^{2+} -каналов сарколеммы ГМК.

ABSTRACT

The effect of 1-(4'-Chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (F-37) on the functional activity of the rat aorta smooth muscle cells was studied. Isometric tension forces were recorded using a force transducer FT-03 (*Grass Instrument Co.*, USA). Obtained results suggest that F-37 (5-100 micromol/L⁻¹) relaxes the aorta SMC by suppressing of Ca^{2+} -channels of SMC.

Ключевые слова: аорты крысы, ГМК, Ca^{2+} -канал, F-37, вазорелаксантный эффект.

Keywords: rat aorta, SMC, Ca^{2+} -channel, F-37, vasorelaxant effect.

Гипертония является глобальной проблемой общественного здравоохранения, которая общепризнанно считается важным прогностическим фактором сердечно-сосудистых заболеваний и преждевременной смертности. Поэтому профилактика и лечение гипертонии остаются приоритетом для медицинского сообщества [1, с.201-259].

В настоящее время существуют огромное количество лекарственных препаратов для лечения гипертонии, однако большинство этих препаратов обладают побочными эффектами. Они неэффективны при нормализации артериального давления, а также негативно действуют на здоровье пациентов [2, с.3263-3268; 3, с.313-315; 4, с.298-306].

Поэтому разработка нового поколения эффективных лекарственных средств для профилактики и лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы остается одной из важнейших научных задач современной фармакологии и медицины [5, с.521-555; 6, с.12237-12242].

Цель работы – изучение влияния алкалоида 1-(4'-хлорфенил)-6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (F-37) на сократительную активность ГМК аорты крысы (рис. 1).

Рисунок 1. Химическая структура алкалоида 1-(4'-хлорфенил)-6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин

Материалы и методы. Эксперименты проводились на препаратах, представляющих собой кольца шириной 3-4 мм, выделенных из аорты белых бес-

породных крыс (200-250 г) и помещенных в специальную камеру (5 мл), перфузируемую физиологическим раствором Кребса Хенселейта. В работе с экспериментальными животными полностью соблюдались международные принципы Хельсинкской декларации и гуманного отношения к животным.

В работе использовали раствор Кребса Хенселейта, следующего состава (мМ): NaCl-120; KCl-4,8; CaCl_2 -2; MgSO_4 -1,2; KH_2PO_4 -1,2; NaHCO_3 -20; глюкоза 10, pH 7,4. В некоторых опытах также использовали бескальциевые растворы, для чего из раствора Кребса исключали ионы кальция, а для связывания их следов добавляли ЭГТА (1 мМ). Растворы оксигенировали карбогеном (O_2 -95%, CO_2 -5%), температура раствора поддерживалась на уровне $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ с помощью ультратермостата U-8.

Регистрацию силы изометрического сокращения проводили с помощью механотрона FT-03 (*Grass-Telefactor*, USA), самописца Z 4221 (Чехия).

Статистическую обработку данных и оформление иллюстраций проводили с помощью компьютерной программы Origin 6.1 (Microsoft, США).

Результаты и обсуждение. В предварительных экспериментах алкалоид F-37 в широком диапазоне концентраций не влияет на базальный тонус препаратов аорты крысы. Эти данные свидетельствуют о том, что в состоянии покоя исследуемые алкалоида F-37 не действуют на функциональную активность сократительного аппарата гладкомышечных клеток (ГМК) аорты крысы. Однако алкалоида F-37 вызывал расслабление на силу сокращения препарата аорты в гиперкалийной среде, вызванного с помощью 50 мМ KCl. Таким образом, алкалоида F-37 при концентрации 5 мкМ расслабляет силу сокращения на $14.7 \pm 4.2\%$ по сравнению с контролем, а при максимальной концентрации 100 мкМ расслабление препарата составляет $91.1 \pm 3.6\%$, по сравнению с контролем.

В этих условиях значение EC_{50} (концентрация, вызывающая подавление силы сокращения на 50%) для алкалоида F-37 составляло 13.7 мкМ. (рис. 2).

Рисунок 2. Влияние F-37 на сокращения препаратов аорты крысы, индуцируемые 50 мМ KCl. По оси ординат - сила сокращения препаратов аорты в процентах от амплитуды контрольного сокращения (50 мМ KCl); по оси абсцисс - концентрация алкалоидов (мкМ). Во всех случаях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ($n=5$)

Учитывая то, что развитие сократительных ответов, индуцированных KCl в основном обеспечивается входом ионов Ca^{2+} в гладкомышечные клетки через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы L-типа, эти результаты могут свидетельствовать о том, что наблюдаемые эффекты F-37 обусловлены его взаимодействием с этими каналами.

Рисунок 3. Влияние F-37 на Ca^{2+} -индуцируемые сокращения препаратов аорты крысы, в присутствии 50 мМ KCl. По оси ординат - сила сокращения препаратов аорты в процентах от амплитуды контрольного сокращения (50 мМ KCl); по оси абсцисс - концентрация CaCl_2 (мМ). Во всех случаях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ($n=5$)

Для проверки этого предположения были изучены эффекты исследуемых алкалоидов в условиях отсутствия ионов Ca^{2+} в среде инкубации. В этой

серии экспериментов обнаружено, что при предварительной инкубации препаратов аорты крысы в бескальциевых растворах Кребса, содержащих KCl (50 мМ), F-37 (100 мкМ), кумулятивное добавление ионов Ca^{2+} сопровождалось развитием сократительных ответов, которые, по амплитуде были значительно меньше по сравнению с контролем, полученном в нормальном растворе Кребса, содержащем ионы Ca^{2+} (рис. 3).

Результаты этих экспериментов показывают, что релаксantный эффект алкалоида F-37 является Ca^{2+} -зависимым процессом, что может указывать на то, что в его обеспечении лежит подавление поступления ионов Ca^{2+} в гладкомышечные клетки через Ca^{2+} -каналы L-типа. Для дополнительной проверки этого предположения были изучены эффекты F-37 в присутствии верапамила - специфического блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа. В этих экспериментах было обнаружено, что в присутствии 0.1 мкМ верапамила, концентрации соответствующей его значению EC_{50} при которой он подавляет сокращения, индуцируемые 50 мМ KCl, на 50%, добавление в среду инкубации F-37 (13.7 мкМ), приводило к дальнейшему расслаблению препаратов аорты крысы (рис.4).

Рисунок 4. Влияние блокатора потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов верапамила на релаксantное действие F-37. По оси ординат - сила сокращения препаратов аорты в процентах от амплитуды контрольного сокращения (50 мМ KCl). Во всех случаях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ($n=4-5$)

При этом было установлено, что в присутствии в среде инкубации верапамила, добавление F-37 сопровождается снижением амплитуды сокращений препаратов аорты, индуцированных 50 мМ KCl, всего на $12.4 \pm 3.9\%$, что несущественно отличается от эффектов алкалоида и верапамила, при их использовании в отдельности.

Вместе с тем способность алкалоида F-37 дополнительно расслабляет препараты аорты на фоне эффекта верапамила указывает на то, что на основе релаксantного действия лежит не только поступление ионов Ca^{2+} через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, но и его влияние и на другие пути поступления ионов Ca^{2+} в цитоплазму ГМК.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что вазорелаксантное действие алкалоида F-37, в основном обусловлены

блокированием потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов гладкой мускулатуры клеток.

Список литературы:

1. Elliott WJ. Systemic hypertension// Curr. Probl. Cardiol. –2007.–V.32–P. 201–259
2. Curb J.D., Borhani N.O., Blaszkowski T.P., Zimbaldi N., Fotiu S., Williams W. Long-term surveillance for adverse effects of antihypertensive drugs // JAMA–1985. –V.253 – P.3263–3268
3. Düsing R., Weisser B., Mengden T., Vetter H. Changes in antihypertensive therapy-the role of adverse effects and compliance // Blood Press. 1998 –V.7–P.–313–315
4. Waeber B. Fixed low-dose combination therapy for hypertension. Curr. Hypertens. Rep – 2002–V.4–P.298–306.
5. Catterall W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} -channels // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2000. – V.16. – P.521–555.
6. Gao B. Functional properties of voltage-dependent calcium channel // J.Biol.Chem. – 2000. – V.275. – P.12237–12242.

ФИЗИОЛОГИЯ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ

КЛЕТКА – ОСНОВА ЖИЗНИ НА ЗЕМЛЕ

Гусейнова Назакет Таги кызы

канд. биол. наук, доц. кафедры генетики и эволюционного учения Бакинского государственного университета,
Азербайджан, г. Баку

Мамедова Рена Фирудин кызы

д-р филос. по биологии, ст. преподаватель кафедры генетики и эволюционного учения
Бакинского государственного университета,
Азербайджан, г. Баку
E-mail: Abhelby@mail.ru

THE CELL IS THE BASIS OF LIFE ON EARTH

Nazaket Huseynova

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Genetics and evolutionary teachings
of Baku State University
Azerbaijan, Baku

Rena Mamedova

Doctor of Philosophy in Biology, Art. Lecturer, Department of Genetics and evolutionary teachings
of Baku State University
Azerbaijan, Baku

АННОТАЦИЯ

В данной статье рассмотрены основные структурные и функциональные составляющие животной и растительной клетки как элементарной единицы всего живого и важная роль при передаче генетического материала из поколения в поколение. Коротко описана клеточная теория и неклеточные формы жизни, а также типы клеточной организации. Описания бактериальной, животной и растительной клеток и ядра клетки сопровождаются красочными рисунками с подробным описанием составляющих элементов. Также отмечается важная роль в жизнедеятельности организмов апоптоза – естественной, запрограммированной гибели клеток.

ABSTRACT

This article discusses the basic structural and functional components of an animal and plant cell, as an elementary unit of all living things and an important role in the transfer of genetic material from generation to generation. Cell theory and non-cellular life forms are briefly described, as well as types of cellular organization. Descriptions of bacterial, animal and plant cells and the cell nucleus are accompanied by colorful drawings with a detailed description of the constituent elements. An important role in the life of organisms apoptosis is also noted - the natural, programmed cell death.

Ключевые слова: клетка, клеточная теория, ядро клетки, хромосомы, белки, апоптоз.

Keywords: cell, cellular theory, cell nucleus, chromosomes, proteins, apoptosis.

Введение

Клетка – это основная структурная и функциональная единица всех живых организмов, живая элементарная единица, способная к самовоспроизведению. Живые организмы могут состоять из од-

ной клетки (бактерии, одноклеточные водоросли и одноклеточные животные) или многих клеток.

Тело взрослого человека образуют около ста триллионов клеток. Форма клеток различна и обусловлена их функцией – от круглой (эритроциты) до

древообразной (нервные клетки). Размеры клеток также различны – от 0,1-0,25 мкм (у некоторых бактерий) до 155 мм (яйцо страуса в скорлупе). Тело человека образовано клетками различных типов, характерным образом организующихся в ткани, которые формируют органы, заполняют пространство между ними или покрывают снаружи. Клетки окружены межклеточным веществом, обеспечивающим их механическую поддержку и осуществляющим транспорт химических веществ. Самые короткоживущие из них (1-2 дня) – это клетки кишечного эпителия. Ежедневно погибает около 70 миллиардов этих клеток. Примером других короткоживущих клеток являются эритроциты – их ежедневно погибает около 2 миллиардов [3].

Однако есть и такие клетки (например, нейроны, клетки волокон скелетных мышц), продолжительность жизни которых соответствует жизни организма. Нервные клетки мозга, однажды возникнув, уже не делятся, и до конца жизни человека они способны поддерживать необходимые связи в нервной системе. Интересно то, что при нашем рождении в мозгу уже существует около 14 миллиардов клеток. И это количество не увеличивается до самой смерти, а, наоборот, постепенно уменьшается, т. е. поврежденные ткани мозга неспособны восстанавливаться путем регенерации. После того как человеку исполняется 25 лет, ежедневно происходит сокращение количества клеток мозга на 100 тысяч [1].

Несмотря на свои малые размеры, клетка представляет собой сложнейшую биологическую систему, жизнедеятельность которой поддерживается благодаря разнообразным биохимическим процессам, которые происходят под строгим генетическим контролем. Генетический контроль развития и функционирования клетки осуществляют материальные носители информации – гены. Они сосредоточены главным образом в ядре клетки, но некоторая их часть находится в других клеточных органоидах (митохондриях, пластидах, центриолях).

Строение и функционирование генетических структур клеток на микроскопическом уровне, их количественную и качественную изменчивость изучает одно из направлений генетики, называемое **цитогенетикой**.

Представление о клетке как об элементарной структурно-функциональной единице всех живых организмов сложилось в результате цепи изобретений и открытий, сделанных в XVI-XX веках:

1590 г. – Янсен изобрел микроскоп, в котором большое увеличение достигалось соединением в тубусе двух линз;

1965 г. – в Кембридже (Англия) установлена первая промышленно изготовленная модель электронного микроскопа.

Естественно, между этими двумя датами происходило множество событий, в результате которых были усовершенствованы микроскопы (основное средство изучения клеток), а также исследования и открытия в области генетики и, в частности, цитологии.

Клеточная теория и неклеточные формы жизни

Результатом длительного исследования строения клеток различных организмов стало создание клеточной теории, у истоков которой в ее современном виде стояли немецкий ботаник М.Я. Шлейден (1804-1881) и зоолог Т. Шванн (1810-1882). В настоящее время эта теория содержит три главных положения:

- только клетка обеспечивает жизнь в ее структурно-функциональном и генетическом отношении;
- единственным способом возникновения жизни на Земле является деление ранее существующих клеток;
- клетки являются структурно-функциональными единицами многоклеточных организмов [2].

Отсюда следует, что клетка – это элементарная единица живого, вне клетки нет жизни, так как в клетке сохраняется и реализуется биологическая информация (даже у вирусов). Современная биология подтверждает, что все клетки одинаковым образом хранят биологическую информацию, передают генетический материал из поколения в поколение, хранят и переносят информацию, регулируют обмен веществ и т. д. Вместе с тем многоклеточный организм обладает свойствами, которые нельзя рассматривать как простую сумму свойств и качеств отдельных клеток.

Таким образом, клетка является обособленной и организационно наименьшей структурой, для которой характерна вся совокупность свойств жизни и которая в соответствующих условиях окружающей среды способна поддерживать в себе эти свойства и передавать их следующим поколениям.

Все многообразие живых существ можно разделить на две резко отличающиеся группы: *неклеточные* и *клеточные* формы жизни. Первая группа представляет собой *вирусы*, способные проникать в определенные живые клетки и размножаться только внутри этих клеток. Подобно всем другим организмам вирусы обладают собственным генетическим аппаратом, кодирующим синтез вирусных частиц, которые собираются из биохимических предшественников, находящихся в клетке-хозяине, используя биосинтетическую и энергетическую системы этой клетки [8].

Вирусы резко отличаются от всех других форм жизни. По строению и организации они представляют собой нуклеопротеидные частицы, по способу репродукции являются внутриклеточными паразитами. Таким образом, вирусы являются внутриклеточными паразитами на генетическом уровне.

Типы клеточной организации

Клеточная структура присуща основной массе живых существ на Земле. Все эти организмы представлены клетками двух типов: *прокариотическими* и *эукариотическими* клетками. К прокариотическим клеткам относят бактерии и синезеленые водоросли. Прокариоты – доядерные организмы, не имеющие типичного ядра, заключенного в ядерную мембрану.

Вместо ядра у них находится так называемый *нуклеотид* – ДНК-содержащая зона клетки прокариот (рис. 1.).

Строение бактериальной клетки:

1 – цитоплазматическая мембрана; 2 – клеточная стенка; 3 – слизистая капсула; 4 – цитоплазма; 5 – хромосомная ДНК; 6 – рибосомы; 7 – мезосома; 8 – фотосинтетические мембраны; 9 – включения; 10 – жгутики; 11 – пили.

Прокариотическая ДНК не содержит гистоновых белков, но связана с небольшим количеством негистоновых белков. Этот комплекс ДНК и негистоновых белков и образует нуклеотид, который обычно располагается в центре клетки. *Мезосомы* – это складчатые мембранные структуры, на поверхности которых находятся ферменты, участвующие в процессе дыхания. *Клеточная стенка* придает бактериям определенную форму и упругость. *Капсулы и слизистые слои* – это слизистые или клейкие выделения бактерий. Капсула представляет собой относительно толстое и компактное образование, а

слизистый слой намного рыхлее. И капсулы, и слизистые слои служат дополнительной защитой для клеток. Многие бактерии подвижны, и эта подвижность обусловлена наличием у них одного или нескольких *жгутиков*, которые по своей структуре напоминают одну из микротрубочек эукариотического жгута. *Пили*, или *фимбрии* – это тонкие выросты на клеточной стенке некоторых грамотрицательных бактерий. Их число варьирует у разных видов от одной до нескольких сотен. *Рибосомы* – органоиды клетки, участвующие в синтезе белка. У прокариот они несколько мельче эукариотических [6].

Эукариотические клетки представлены двумя подтипами: клетками *одноклеточных* организмов, которые структурно и физиологически являются самостоятельными организмами, и клетками *многоклеточных* организмов. Последние разделяют на *растительные* и *животные* клетки. На рисунке 2 представлены составы животной и растительной клетки.

Рисунок 1. Схема строения бактериальной клетки

В клетке можно выделить 4 группы структурных компонентов: 1) мембранная система; 2) клеточные органоиды; 3) цитоплазматический матрикс; 4) клеточные включения. В свою очередь, мембранную систему составляют: 1) клеточная плазматическая мембрана; 2) цитоплазматическая сеть и 3) пластичный комплекс Гольджи. *Клеточная мембрана* отделяет цитоплазму клетки от наружной среды или клеточной стенки (у растений) и выполняет три основные функции: *отграничивающую, барьерную и транспортную*. Она играет важную роль в обмене веществ между клеткой и внешней средой, в движении клеток и в сцеплении друг с другом. Цитоплазму всех эукариотических клеток пронизывает сложная система мембран, получившая название *цитоплазматической сети*. Пластичный комплекс Гольджи обычно локализуется вблизи клеточного ядра и состоит из многочисленных групп цистерн, которые ограничены мембранами, имеющими гладкую поверхность. Одной из основных функций комплекса Гольджи является транспорт веществ и химическая

Рисунок 2. Животная и растительная клетка

модификация поступающих в него веществ. Другой важной функцией этого комплекса является формирование лизосом [2].

Клеточные органоиды и ядро клетки

Клеточные органоиды (клеточные органеллы) – это постоянные дифференцированные клеточные структуры, имеющие определенные функции и строение. К клеточным органоидам относят *ядро, центриоль, митохондрии, рибосомы, лизосомы, пероксисомы, пластиды, жгутики и реснички*.

Ядро – важнейшая составная часть клетки. Это наиболее крупный органоид клетки, составляющий 10-20 % ее объема. Оно может находиться в состоянии покоя или деления (*мейоза*). Ядро управляет всеми процессами жизнедеятельности клетки. Эти процессы сложны и многообразны: клетка должна поддерживать форму, получать извне вещества для пластического и энергетического обмена, синтезировать органические вещества

Клеточное ядро имеет шаровидную или вытянутую форму. Основная функция ядра – хранение

наследственной информации или генетического материала. Ядро состоит из ядерной оболочки и расположенных под ней нуклеоплазмы, ядрышка и хроматина (рис. 3). Как видно из рисунка, ядерная оболочка пронизана порами диаметром 80-90 нм, количество которых в типичной животной клетке составляет 3-4 тыс. пор. Содержимое клеточного ядра называется нуклеоплазмой, или кариоплазмой. *Нуклеоплазма* отделена от цитоплазмы ядерной оболочкой. Ядерная оболочка образована двумя мембранами – наружной и внутренней. Химический состав ядерной оболочки достаточно сложен, основными химическими компонентами ядерных оболочек являются *липиды* (13-35%) и *белки* (50-75%) [4].

Рисунок 3. Строение ядра клетки

Ядра клеток могут содержать одно и более *ядрышек*. Ядрышки состоят из рибонуклеопротеидов, из которых в дальнейшем образуются субъединицы рибосом. Здесь происходит синтез рРНК (рибосомальной РНК).

Хроматин следует считать главным компонентом ядра. В нем заключена наследственная информация, которая передается при каждом делении клетки, а также реализуется в процессе жизнедеятельности самой клетки. Хроматин ядра клетки состоит из хроматиновых нитей. Каждая хроматиновая нить соответствует одной хромосоме, которая образуется из нее путем спирализации.

Из многочисленных свойств и функций ядерной оболочки следует подчеркнуть ее роль как барьера, отделяющего содержимое ядра от цитоплазмы и активно регулирующего транспорт макромолекул между ядром и цитоплазмой. Другой важной функцией ядерной оболочки следует считать ее участие в создании внутриядерной структуры.

Строение и химический состав хромосом.

Хромосомы – это самовоспроизводящиеся организмы клеточного ядра, являющиеся носителями генов и определяющие наследственные свойства клеток и организмов. Основная функция хромосом – хранение, воспроизведение и передача генетической информации при размножении клеток и организмов. Хромосомы эукариотических клеток состоят в основном из ДНК и белков, которые образуют нук-

леопротеиновый комплекс. Белки составляют значительную часть состава хромосом (65%). Все хромосомные белки разделяют на *гистоновые* и *негистоновые* [7].

Гистоновые белки, или гистоны – это белки, богатые остатками аргинина и лизина, определяющими их щелочные свойства. Гистоны присутствуют в ядрах в виде комплекса с ДНК. Они выполняют две важные функции – структурную и регуляторную. Структурная функция заключается в том, что они обеспечивают пространственную организацию ДНК в хромосомах и играют важную роль в ее упаковке. Регуляторная функция гистоновых белков состоит в регуляции синтеза нуклеиновых кислот (как ДНК, так и РНК).

Негистоновые белки представлены большим количеством молекул, которые разделяют более чем 100 функций. Среди этих белков есть ферменты, ответственные за репарацию, репликацию, транскрипцию и модификации ДНК. Помимо ДНК и белков в составе хромосом обнаружены небольшие количества РНК, липидов, полисахаридов и ионы металлов.

Морфологию хромосом изучают во время митоза методом микроскопии. В этот период хромосомы максимально спирализованы. В первой половине митоза хромосомы состоят из двух одинаковых по форме структурных и функциональных элементов, называемых *хроматидами*, которые соединены между собой в области первичной перетяжки. В месте первичной перетяжки расположена *центромера* – особым образом организованный участок хромосомы, общий для обоих сестринских хроматид.

Рисунок 4. Составные части материнской и дочерней центриоли

Во второй половине митоза происходит деление центромеры и отделение хроматид друг от друга. Из них образуются однонитчатые *дочерние хромосомы*, распределяющиеся между дочерними клетками. Для каждой хромосомы положение центромеры строго постоянно.

В некоторых растительных клетках и всех животных клетках находится характерно окрашивае-

мая часть цитоплазмы, которую называют *центросомой* или клеточным центром. В состав центросомы входит пара *центриолей*, расположенных под прямым углом друг к другу (рис. 4). Стенка центриолы образована 27 микротрубочками, сгруппированными в 9 триплетов. Пару центриолей иногда называют *диплосомой*. В каждой диплосоме одна центриоль зрелая, *материнская*, другая – незрелая, *дочерняя*, является уменьшенной копией материнской [5].

Митохондрии – это органоиды эукариотической клетки, обеспечивающие организм энергией. Форма и размеры митохондрий очень разнообразны. Обычный диаметр митохондрий от 0,2 до 1 мкм, длина достигает 10-12 мкм. Число митохондрий в различных клетках варьирует в широких пределах – от 1 до 10^7 . Митохондрия имеет две мембраны – наружную и внутреннюю, между которыми расположено межмембранное пространство.

Основная функция митохондрии – синтез АТФ, т. е. образование энергии – около 95% в животной клетке и чуть меньше – в растительной, специфических белках и стероидных гормонах.

Рибосома – органоид клетки, осуществляющий биосинтез белка. Представляет собой рибонуклеопротеиновую частицу диаметром 20-30 нм. В прокариотической клетке около 10 тыс. рибосом, а в эукариотической – 50 тыс. Рибосомы состоят из двух субчастиц – большой и малой. В цитоплазме клетки рибосома связывается с мРНК и осуществляет синтез белка.

Лизосома – органоид клеток животных и грибов, осуществляющий внутриклеточное пищеварение. Местом формирования лизосом является комплекс Гольджи. Внутри лизосом содержится более 20 различных ферментов. В клетке обычно находятся десятки лизосом.

Пластиды – это органоиды эукариотической растительной клетки. Каждая пластид ограничена двумя элементарными мембранами. Пластиды разнообразны по форме, размерам, строению и функции. По различной окраске различают *хлоропласты*, *хромопласты* и *лейкопласты*. Обычно в клетке встречается только один из перечисленных пластид. Каждая клетка содержит несколько десятков хлоропластов, в каждом из которых находится 10-60 копий ДНК.

Жгутик – органелла движения ряда простейших. В клетке бывает 1-4 жгутика, а редко и более. Жгутик эукариотической клетки – это вырост толщиной около 0,25 мкм и длиной 150 мкм, покрытый плазматической мембраной. Как и другие органеллы, жгутик имеет сложную структуру. Двигаются жгутики, в отличие от ресничек, волнообразно. *Ресничка* – органелла движения или рецепции у клеток животных и некоторых растений. Двигаются реснички обычно маятникообразно.

Цитоплазма клетки состоит из цитоплазматического матрикса и органоидов. Цитоплазматический матрикс заполняет пространство между клеточной мембраной, ядерной оболочкой и другими внутриклеточными структурами. Химический состав цито-

плазматического матрикса разнообразен и зависит от выполняемых клеткой функций, а также образует внутреннюю среду клетки и объединяет все внутриклеточные структуры, обеспечивая их взаимодействие.

Клеточные включения – это компоненты цитоплазмы, представляющие собой отложения веществ, временно выведенных из обмена, и конечных его продуктов. Особый вид клеточных включений – остаточные тельца – продукты деятельности лизосом [4; 8].

Естественная гибель клетки (апоптоз).

Апоптоз – регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Фрагменты погибшей клетки обычно очень быстро фагоцитируются макрофагами либо соседними клетками, минуя развитие воспалительной реакции.

К сожалению, до сих пор процесс естественной гибели клеток до конца не изучен. Известно, что в клетке из-за блокирования ферментов прекращается синтез белка, а нет белка – нет и жизни. Морфологически апоптоз характеризуется разрушением ядра и цитоплазмы. «Осколки» погибшей клетки поглощаются и перерабатываются специальными клетками иммунной системы – фагоцитами. Но ведь клетки могут погибнуть и под воздействием случайных факторов (механических, химических и любых других). Случайная гибель клеток (а также ткани, органа) в биологии называется некрозом. Важно то, что естественная клеточная гибель (апоптоз) в отличие от некроза не вызывает воспаления в окружающих тканях [5].

В организме запрограммированная клеточная гибель выполняет функцию, противоположную митозу (делению клетки), и, тем самым, регулирует общее число клеток в организме. Апоптоз играет важную роль в защите организма при вирусных инфекциях. В частности, иммунодефицит при ВИЧ-инфекции определяется нарушениями в контроле апоптоза.

Заключение

В этой статье рассмотрена лишь обобщенная информация о строении растительных и животных клеток. На Земле много живых организмов, но только одна Жизнь: один генетический код, схожее клеточное строение, несколько десятков общих генов. Клетка имеет сложную внутреннюю организацию и специфическое взаимодействие органелл в процессе жизнедеятельности, является элементарной единицей полноценной живой системы. Клетка – это наименьшая самовоспроизводящаяся единица жизни, на уровне клетки протекают рост и развитие, размножение клеток, обмен веществ и энергии. Она является морфологической и физиологической структурой, элементарной единицей растительных и животных организмов. В многоклеточном организме протекающие процессы складываются из совокупности координированных функций его клеток. Без клетки, вне клетки и с разрушением клетки жизнь прекращается. Клетка – это Жизнь!

Список литературы:

1. Ахундова Э.М., Салаева С.Д. Генетика: вопросы и ответы. – Баку, 2019. – 381 с.
2. Гринев В.В. Генетика человека. – Минск: БГУ, 2006. – 131 с.
3. Гусейнова Н.Т. Цитология: Учебник. – Баку, 2018. – 224 с.
4. Курчанов Н.А. Генетика человека с основами общей генетики: Учебное пособие. – СПб.: СпецЛит, 2005. – 185 с.
5. Стволинская Н.С. Цитология / Н.С. Стволинская. – М.: Прометей, 2012. – 208 с.
6. Цаценко Л.В., Бойко Ю.С. Цитология. – Ростов-н/Д: Феникс, 2009. – 186 с.
7. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. – М.: Академкнига, 2004. – 495 с.
8. Ченцов Ю.С. Общая цитология: Учебник. – М.: МГУ, 1984. – 442 с.

ФИЗИОЛОГИЯ

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КВЕРЦЕТИНА И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА

Тухтаева Феруза Шоназаровна*Национальный Университет Узбекистана имени М.Улугбека,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: tuxtaevaf@bk.ru***Зулайхо Аминжановна Маматова***зав. кафедры Физиологии человека и животных, доцент,
Национальный Университет Узбекистана имени М.Улугбека,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: mamatiovazul@mail.ru***Гайибов Улугбек Гаппаржанович***мл. науч. сотр., Институт биоорганической химии АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: gayibov.ulugbek@gmail.com*

ANTIRADICAL ACTIVITY OF QUERCETINE AND DIHYDROQUERCETINE

Feruza Tuxtaeva*National University of Uzbekistan named after M.Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent.***Zulayho Mamatova***Head of the Human and animal physiology department, dots.,
National University of Uzbekistan named after M.Ulugbek,
Uzbekistan, Tashkent.***Ulugbek Gayibov***Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences, Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent*

АННОТАЦИЯ

В данной статье изучена антирадикальная активность (АРА) по отношению к свободному радикалу 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилу (ДФПГ) кверцетина и его производного дигидрокверцетина. Установлены количественные характеристики реакции восстановления ДФПГ исследованными полифенолами. Показана высокая способность изученных соединений тушению свободных радикалов.

ABSTRACT

In this article the antiradical activity (ARA) of quercetine and its derivative dihydroquercetine with respect to scavenge free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was discussed. The quantitative characteristics of the reaction of DPPH reduction by the studied polyphenols were established. The high ability of the studied compounds to quench free radicals has been shown.

Ключевые слова: свободные радикалы, ДФПГ, константа реакции**Keywords:** free radicals, DPPH, rate constant

Известно, фенольные антиоксиданты широко применяются для предотвращения различных окис-

лительных процессов. Антиоксидантное действие полифенолов объясняют связыванием ионов тяже-

лых металлов, служащих катализаторами окислительных процессов, и взаимодействием с высокоактивными свободными радикалами. Благодаря этому фенольные соединения способны гасить цепные свободнорадикальные процессы [2, с.28]. Биологическая активность фенольных соединений таких как, антиоксидантные, адаптогенные, иммуномодулирующие, противоопухолевые и гипогликемические обусловлена их специфической структурой [6, с. 941; 4, с. 751].

Однако, несмотря на достигнутые успехи в области создания высокоэффективных препаратов с антиоксидантной активностью, во многих случаях их применение оказалось недостаточно эффективным. В связи с этим до сих пор остается актуальной задача синтеза и изучения новых антиоксидантных соединений для производства лекарственных препаратов.

Целью настоящей работы является изучение антиоксидантных свойств фенольных соединений и их взаимосвязь с химической структурой.

Материалы и методы.

Митохондрии выделяли из печени крыс массой 150-200 гр. методом дифференциального центрифугирования [8, с. 10]. Среда выделения митохондрий содержала 250 мМ сахарозы, 10 мМ трис-хлорида, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4.

Индукцию неферментативного Fe^{2+} /аскорбат-

зависимого ПОЛ проводили добавлением 10 мкМ FeSO_4 и 600 мкМ аскорбата. Инкубационная среда содержала 125 мМ KCl, 10мМ трис-HCl, pH 7,4. Количество белка митохондрий составляло 0,5мг на 1 мл среды инкубации.

Антиоксидантную активность исследуемых соединений измеряли по ингибированию Fe^{2+} /аскорбат-зависимого набухания митохондрий печени крыс при 540 нм на фотометре ЛМФ-69. Выбор такого методического подхода обусловлен тем, что ранее была установлена линейная корреляционная взаимосвязь между интенсификацией процессов ПОЛ, индуцированного системой Fe^{2+} /аскорбиновая кислота и набуханием митохондрий [7, с. 1200]. Пероксидация липидов в системе Fe^{2+} /аскорбат на митохондриальной мембране оценивалась также другими авторами, измерением набухания митохондрий в условиях активации процессов ПОЛ [3, с. 505], что свидетельствует о пригодности использования этой модели, как тест-системы изучения антиоксидантных свойств различных веществ.

Белок определяли по биуретовой реакции [5, с. 755].

Структурные формулы фенольных соединений приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Исследуемые фенольные соединения и их химические структуры

№	Исследуемые соединения	Химическая структура
1	Дигидрокверцетин
2	Кверцетин

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программы "Origin 6.1". Данные оценивали, используя параметрический t-критерий Стьюдента, выражали в виде $M \pm m$. Достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. кверцетин – флавоноид, содержит в своем каркасе две OH^- группы, обладает, как и другие фенольные соединения, протонотворной активностью [1, с. 110]. Изучение действия кверцетина на Fe^{2+} -аскорбат-зависимое набу-

хание показало, что начиная с концентрации 1 мкМ исследуемое соединение ингибирует процесс ПОЛ.

Из рисунка 3 видно, что кверцетин, начиная с концентрации 1 мкМ, ингибирует Fe^{2+} /аскорбат-зависимое набухание митохондрий, при этом значение ингибирования составило $10,1 \pm 1,5\%$. Эффект кверцетина на процесс ПОЛ в мембранах митохондрий зависел от концентрации препарата, т.е. с увеличением концентрации кверцетина в инкубационной среде процент ингибирования становится более высоким.

Рисунок 1. Действия кверцетина на ПОЛ-индуцированное набухание митохондрий

Примечание: Условия эксперимента см. в раздел материалы и методы, $n = 4$, $P < 0,05$.
 Концентрация пирогаллола IC_{50} – считали в $\log$ (мкМ).

Рисунок 2. Действие дигидрокверцетина на набухание митохондрий в условиях активации ПОЛ

Примечание: Условия эксперимента см. в раздел материалы и методы, $n = 4$.

При исследовании флавоноида дигидрокверцетина в концентрациях 0,1-3 мкМ его ингибирующее действие на Fe^{2+} -аскорбат-индуцированное набухание митохондрий оказался концентрационно-зависимым. Эксперименты показали, что

максимальная эффективность наблюдается при концентрации 3 мкМ дигидрокверцетина, при этом составила $IC_{50} = 1$ мкМ (рис.2).

Рисунок 3. Действие дигидрокверцетина на ПОЛ-индуцированное набухание митохондрий печени крыс

Примечание: Условия эксперимента см. в раздел материалы и методы, $n = 4$, $P < 0,05$. Концентрация пирогаллола IC_{50} – считали в $\log$ (мкМ).

Таким образом, антиоксидантная активность изученных фенольных соединений зависит от их структуры и концентраций, усиливается по мере

увеличения количества ОН-групп в их структуре, соответственно, что представлено в нижеследующей таблице 2.

Таблица 2.

Ингибирование флавоноидными соединениями Fe^{2+} -аскорбат-индуцированное набухание митохондрий

Фенольные соединения	Количество ОН-групп в кольце	IC_{50} (мкМ)	Максимальная ингибирующая концентрация (мкМ)
Дигидрокверцетин	5	$3,0 \pm 4,2$	$5,0 \pm 3,2$
Кверцетин	5	$1,0 \pm 8,0$	$3,0 \pm 2,7$

Примечание: Концентрации, вызывающие полумаксимальное ингибирование фенольных соединений IC_{50} – считали в $\log$ (мкМ).

Таким образом, нами установлено, что фенольные соединения: кверцетин и дигидрокверцетин оказывают протекторное действие на митохондрии, уменьшая повреждающее действие Fe^{2+} /аскорбат. На основании IC_{50} , антиоксидантная активность фенольных соединений может быть представлена следующим рядом: кверцетин > дигидрокверцетин. Из исследованных соединений наиболее эффективным на модели митохондрий оказался флавоноид кверцетин.

Причиной развития многих заболеваний человека и животных являются свободные радикалы. Тушению этих свободных радикалов способствует антиоксидантная система организма. Также в современной практике широко используются антиоксиданты. Антиоксиданты способны нейтрализовать активность свободных радикалов, защищая таким образом клетки от окисления [1, с. 110].

В литературных данных широко представлена способность полифенольных соединений к высокой антиоксидантной активности за счет электрон - донорных функциональных групп в их молекуле, таких как альдегидная и гидроксильная.

Определение антиоксидантной активности биологически активных соединений методом набухания митохондрий является одним из классических методов изучения антиоксидантной активности (АОА). В литературе АОА полифенолов связывают как с их способностью хелатировать различные ионы металлов [9, с. 16248], так и непосредственно взаимодействовать с такими активными формами кислорода как $O_2^{\bullet}$ [10, с. 1035], ОН-радикалами и синглетным кислородом [11, с. 18]. Полифенолы могут также взаимодействовать и/или связывать компоненты реакционной среды, что может приводить к искажению результатов [12, с. 7]. В этом случае применение метода накопления МДА не позволяет непосредственно оценивать вклад каждого из этих эффектов в общую антиоксидантную активность препаратов. Исключение данных ошибок позволяет использование соединений, несущих свободную валентность, каковыми являются стабильные органические радикалы [13, с. 242]. К примеру, орто-замещенные дифенолы имеют четыре электрона, которые могут восстанавливать различные радикалы [14, с. 789]. В этом случае, антирадикальная актив-

ность полифенолов непосредственно коррелирует с их АОА.

Таким образом, далее исследовали антирадикальную активность полифенольных соединений кверцетин и дигидрокверцетин. Для оценки АРА в

данной работе использована методика спектрофотометрического измерения кинетики восстановления молекул стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) антиоксидантами [15, с. 565].

Таблица 3.

Значения K , IC_{50} и t_{50} при реакции ДФПГ с исследуемыми полифенолами

$K \cdot 10^{-3}, c^{-1}$		$IC_{50}, \text{мкМ}$		$t_{50}, \text{сек}$	
DQ	Q	DQ	Q	DQ	Q
1,2	5,3	14,3	7,2	105	9,6

Анализ полученных данных позволяет заключить, что изученные препараты обладают высокой антирадикальной активностью по сравнению с известными антиоксидантами механизм действия которых заключается в отдаче подвижного водорода свободному радикалу, в

результате чего происходит обрыв цепи реакции ПОЛ. Скорость реакции изученных препаратов с ДФПГ различна.

Данный факт, также, подтверждается коэффициентом корреляции $r=0.94$ между проявлением антиоксидантных и антирадикальных свойств.

Список литературы:

1. Асраров М.И., Комилов Э.Ж., Эшбакова К.А. Матер. Межд. науч. конф. «Роль протонотрофной активности флавоноида ороксилина в проявлении его биологически активных свойств». – Ташкент, Узбекистан, 2013. – С.110.
2. Саламатов, А. А. Разработка комплексной технологии биологически активных веществ из шрота яблок и лекарственных форм на их основе : автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук / А. А. Саламатов. – Курск, 2009 – 28 с.
3. Almeida A.M., Bertoncini C.R. Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe^{2+} -citrate // *An. Acad. Bras. Cienc.* – 2006. – 78. – P.505-514.
4. Cao G., Sofic E., Prior R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships // *Free Rad. Biol. Med.* – 1997. – 22. – P. 749-760.
5. Gornal A.G., Bardawill C.J., David M. Determination of serum protein by means of biuret reaction // *J. Biol. Chem.* – 1949. – 177. – P. 751-766.
6. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids // *Free Radic. Biol. Med.* – 1996. – 20. – P. 933-956.
7. Takei M., Hiramatsu M., Mori A. Inhibitory effects of calcium antagonists on mitochondrial swelling induced by lipid peroxidation or amchidonic acid in the rat brain in vitro // *Neurochem. Res.* – 1994. - 19. – P. 1199-1206.
8. Schneider W.C., Hogeboom G.H. Cytochemical studies of mammalian tissues: the isolation of cell components by differential centrifugation // *Cancer. Res.* – 1951. – 11. – P. 1-22.
9. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interaction with the environment // *Molecules.* – 2014. – V. 16. – P. 16240-16265.
10. Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants // *J. Nat. Prod.* – 2000. – V. 63. – P. 1035-1042.
11. Гайилов У.Г., Комилов Э.Дж., Эргашев Н.А., Рахимов Р.Н., Абдуллажанова Н.Г., Асраров М.И., Арипов Т.Ф. Антиоксидантные и мембраноактивные свойства ПС-1 // *Узбекский биологический журнал.* – 2017. – № 2. – С. 19-23.
12. Абдуллаева Г.Т., Гайилов У.Г., Комилов Э.Дж., Миробидов С.А., Абдуллажанова Н.Г., Асраров М.И. Гетасан полифенолининг антиоксидантлик ва антирадикаллик хоссалари // *ЎзМУ хабарлари.* – Ташкент, 2017. – № 3/2. – С. 6-9.
13. Салахутдинов Б.А., Гайилов У.Г., Максимов В.В., Сонькина С.Н., Тукфатуллина И.И., Убеков В.В., Салихов Ш.И. Влияние энантиомеров госсипола на модельные и биологические мембраны // *Международный симпозиум по фенольным соединениям.* – Москва, 2009, С. 242-243.
14. Fruehauf J.P., Meyskens F.L. Reactive oxygen species: A breath of life or death? // *Clinical Cancer research.* – 2007. – V. 13. – P. 789-796.
15. Мельничук В.А. Экспресс-метод определения антирадикальной активности лекарственных веществ // *Хим. Фарм. журн.* – 1985. – V.5. – С. 565-567.

ИЗУЧЕНИЕ ЭНДОТЕЛИЙ - ЗАВИСИМОЕ ВАЗОРЕЛАКСАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЛАВОНОИДА ХРИЗИНА

Есимбетов Адилбай Тлепович

канд. биол. наук, доцент Нукусского филиала Самаркандского института ветеринарной медицины,
Узбекистан, г. Нукус
E-mail: adil_et78@mail.ru

Зарипов Абдисалим Абдикаримович

докторант Каракалпакского государственного университета,
Узбекистан, г. Нукус.
E-mail: salimz10@mail.ru

Усманов Пулат Бекмуратович

д-р биол. наук, проф., Институт биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: Pulat.Usmanov@mail.ru

STUDY OF ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASORELAXANT ACTION OF CHRYSIN FLAVONOID

Adilbay Esimbetov

The docent, Nukus branch of Samarkand Institute of Veterinary Medicine, k.biol.sci.,
Uzbekistan, Nukus

Abdisalim Zaripov

doctorant, Karakalpak state university,
Uzbekistan, Nukus

Pulat Usmanov

d.biol.sci., prof., Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

В настоящей работе изучена роль эндотелия в релаксантном действии флавоноида хризина. Анализ полученных данных позволяет предположить, что релаксантное действие хризина в условиях фенилэфрин индуцированной контрактуры является эндотелий-зависимым и обусловлено активацией NO/гуанилатциклазной системы.

ABSTRACT

In this paper, the role of the endothelium in the relaxant effect flavonoid chrysin has been studied. The results of these experiments indicate that the relaxant effect of the flavonoid chrysin - under conditions of phenylephrine-induced contracture is endothelium-dependent and, possibly, mediated by its interaction with the NO- synthase system and its activation.

Ключевые слова: флавоноид, гладкомышечные клетки, аорта крысы, эндотелия, NO/гуанилатциклаза, релаксантная действия.

Keywords: flavonoid, smooth muscle cells, rat aorta, endothelium, NO/guanylatcyclaza, relaxant action.

Ведущую роль в регуляции функционального состояния кровеносных сосудов играет эндотелий, который контролируя их тонус и, соответственно, артериальное давление, участвует в обеспечении оптимального уровня кровоснабжения органов и тканей к их метаболическим потребностям [1; с. 302-312]. Установлено, что эндотелиальные клетки

продуцируют ряд сосудорасширяющих и сосудосуживающих факторов, которые, модулируя сократительную активность гладкомышечных клеток (ГМК), играют важную роль в регуляции сосудистого тонуса [2; с.373–376].

Вместе с тем к настоящему времени накоплены многочисленные данные свидетельствующие о клю-

чевой роли нарушений функции эндотелия в развитии многих заболеваний сердечно-сосудистой системы таких как атеросклероз, артериальная гипертензия, хроническая сердечная недостаточность и сахарный диабет [3; с. 640–642; 4; с. 801–809]. Эти данные свидетельствуют о том, что эндотелий участвует не только в регуляции сосудистого тонуса, но и непосредственно связан с процессами лежащими в основе патогенеза многих заболеваний [5; с. 1928–1929; 6; с. 1631–1674].

Учитывая центральную роль дисфункции эндотелия в патогенеза многих заболеваний разработка новых подходов коррекции нарушений функции эндотелия является одной из актуальных задач современной экспериментальной фармакологии.

В настоящее время при создании протекторов нарушений функции эндотелия в качестве наиболее перспективных соединений рассматриваются растительные флавоноиды, которые обладают выраженным антиоксидантным, вазопротекторным и кардиопротекторным действием [7; с. 1874–84, 8; с. 46–52]. В связи с этим целью настоящих исследований было изучение особенностей вазорелаксантного действия флавоноида хризина и оценка роли в его обеспечении.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При выполнении настоящей работы использовано флавоноид хризин выделенный из растения вида *Scutellaria phyllostachya* Juz.

Эксперименты проводились на препаратах, представляющих собой кольца шириной ~3–4 мм, выделенных из аорты белых беспородных крыс (150–200 гр) и помещенных в специальную камеру (5 мл), перфузируемую физиологическим раствором Кребса–Хензеляйта. Эксперименты выполнялись в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», принятыми Международным советом медицинских научных обществ (CIOMS) в 1985 г. В экспериментах использовали модифицированный раствор Кребса–Хензеляйта следующего состава (мМ): NaCl – 158,3; KCl – 4; CaCl₂×2H₂O – 2; MgCl₂×2H₂O – 1,5; NaHCO₃ – 10; NaH₂PO₄×H₂O – 0,42; глюкоза – 5,6 (pH=7,4). Растворы оксигенировали карбогеном (O₂–95%, CO₂–5%), а температура раствора поддерживалась на уровне +37±0,5°C с помощью ультратермостата U–8 (Болгария). Для регистрации сократительной активности кольца аорты подвешивались с одной стороны к неподвижному крючку экспериментальной камеры, а с другой стороны – к датчику механотрона FT–03 (Grass Instrument Co., США), предназначенного для измерения изометрического напряжения. Перед экспериментом сегменты аорты предварительно растягивали нагрузкой 1 гр. (~9,8 мН) и промывали физиологическим раствором в течение ~45–60 минут для достижения равновесия.

Для оценки роли эндотелия в вазорелаксации, вызываемой флавоноидом хризином, эндотелиальный слой аорты крысы удаляли механически с помощью миниатюрных ватных тампонов. Проверку наличия эндотелия осуществляли с помощью ацетилхолина, который вызывает релаксацию препаратов аорты предварительно сокращенных фенилэфрином или гиперкалиевым раствором при наличии интактного эндотелия [9; с. 1237–1244].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ OriginLab OriginPro v. 8.5 SR1 (EULA, Northampton, MA 01060–4401, США). Полученные результаты в экспериментах подвергали статистической обработке с использованием *t*–критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что флавоноид хризин обладает выраженным вазорелаксантным действием и вызывает расслабление препаратов аорты крысы, предварительно сокращенных фенилэфрином и гиперкалиевым раствором [10; с. 14–19].

При дальнейшем изучении эффектов хризина на препаратах аорты крысы с удаленным эндотелием нами было обнаружено, что хризин в этих условиях сохраняет способность вызывать расслабление препаратов, предсокращенных фенилэфрином, но не в такой степени как на препаратах с интактным эндотелием. При этом на препаратах аорты с интактным эндотелием хризин (100 мкМ) вызывал расслабление препаратов, предсокращенных фенилэфрином, на 92,18±3,1%, а на препаратах с удаленным эндотелием он вызывал расслабление только на 22,7±3,2% (рис.1).

Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что в реализации вазорелаксантного действия хризин важную роль могут играть эндотелиальные клетки и синтезируемые ими вазоактивные факторы. При этом сохранение незначительного вазорелаксантного эффекта хризина, на препаратах с удаленным эндотелием, указывает на то, что в этих условиях его эффект связан с его влиянием на сократительный аппарат гладкомышечных клеток.

Ведущую роль в процессах расслабления (вазодилатации) гладкой мускулатуры играет оксид азота (NO), продуцируемый в эндотелиальных клетках NO-синтазой [11; с. 122–131; 12; с. 490–497]. Предполагая возможность того, что вазорелаксантное действие хризина может быть опосредовано через его влияние на продукцию NO, нами были изучены эффекты флавоноида в присутствии ингибитора NO-синтазы – L-NAME. Как показали результаты этих экспериментов, предварительная инкубация интактных препаратов аорты с 100 мкМ L-NAME приводит к существенному подавлению способности хризина расслаблять препараты, предсокращенные фенилэфрином (рис. 2).

Рисунок 1. Зависимость вазорелаксационного действия хризина от наличия и отсутствия эндотелия у препаратов аорты крысы. По оси ординат сила сокращения препарата аорты, выраженная в процентах от силы, индуцированной 1 мкМ фенилэфрином и принятой за 100%. ($P < 0,05$; $n = 5$)

Рисунок 2. Влияние L-NAME и метиленового синего на вазорелаксационное действие хризина, в условиях фенилэфрин - индуцированной контрактуры. По оси ординат сила сокращения препарата аорты, выраженная в процентах от силы, индуцированной 1 мкМ фенилэфрином и принятой за 100%. ($P < 0,05$; $n = 6$)

Результаты этих экспериментов могут свидетельствовать о том, что вазорелаксационное действие хризина, по-видимому, является эндотелий-зависимым и, возможно, обусловлено его влиянием на систему NO-синтазы и подавлением синтеза NO. При этом подавление синтеза NO и снижение его поступления в ГМК может приводить к недостаточ-

ной активации гуанилатциклазной системы и уменьшению продукции циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) [13; с. 212]. Снижение уровня цГМФ в ГМК, в свою очередь, может приводить к ингибированию протеинкиназы G (PKGI) сопровождаемого инактивацией Ca^{2+} -транспортирующих систем и последующим уменьшением внутриклеточ-

ной концентрации Ca^{2+} в ГМК и их расслаблением. Дополнительное подтверждение такого механизма действия хризина нами было получено в экспериментах с метиленовым синим – специфическим ингибитором гуанилатциклазы [14; с. 231–236]. Как можно видеть на рис.2, предварительная инкубация препаратов аорты с метиленовым синим также сопровождалась существенным снижением релаксанта действия хризина, в условиях фенилэфрин-индуцированной контрактуры.

Результаты этих экспериментов являются убедительным подтверждением того, что релаксанта действие хризина реализуется благодаря модуляции активности NO/гуанилатциклазной системы.

В эндотелиальных клетках наряду с NO также продуцируется другой эффективный вазорелаксирующий фактор – простагландин PGI_2 , синтез которого обеспечивает циклооксигеназа. Вазорелаксанта эффект PGI_2 реализуется благодаря активации аденилатциклазы, сопровождаемой стимуляцией

продукции цАМФ и процессов приводящих к снижению уровня Ca^{2+} в ГМК и последующему их расслаблению [15; с. 894–912]. В наших экспериментах предварительная инкубация препаратов аорты с индометацином – специфическим ингибитором циклооксигеназы, существенно не влияла на вазорелаксанта эффективность хризина (рис.3).

Эти результаты свидетельствуют о том, что вазорелаксанта действие хризина не связано с его взаимодействием с аденилатциклазной системой.

Таким образом, результаты, полученные в этой серии экспериментов, убедительно свидетельствуют о том, что хризин обладает выраженным эндотелий – зависимым вазорелаксанта действием. При этом существенное подавление вазорелаксанта эффекта хризина ингибиторами NO- синтазы L-NAME и гуанилатциклазы метиленовым синим, является убедительным свидетельством его взаимодействия с NO/гуанилатциклазной системой.

Рисунок 3. Влияние индометацина на вазорелаксанта действие хризина в условиях фенилэфрин – индуцированной контрактуры. По оси ординат сила сокращения препарата аорты, выраженная в процентах от силы, индуцированной 1 мкМ фенилэфрином и принятой за 100%. ($P < 0,05$; $n = 6$)

В целом, на основании полученных данных можно заключить, что вазорелаксанта эффект хризина имеет эндотелий-зависимый характер и в основном обеспечивается благодаря активации NO-гуанилатциклазной системы, сопровождаемой уменьшением внутриклеточного уровня ионов Ca^{2+} в ГМК и их релаксацией. При этом ключевую роль,

по-видимому, играет PKGI активация, которой может инактивировать потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы плазмалеммы, стимулировать Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического ретикулаума СР и снижать Ca^{2+} -чувствительность сократительных белков ГМК, что также может быть причиной их релаксации [16; 19819–19825].

Список литературы:

1. Sandoo, A., Zanten, J. J., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. // The Open Cardiovascular Medicine Journal, -2010, V.4(1), -P.302-312.

2. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. //Nature. –1980; 288: –P.373–376.
3. Vita JA, Keaney JF. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk?. //Circulation. –2002; –V.106: 640–642.
4. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990.// –Nature. -1993; –V.36 2: 801–809.
5. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. //– N.Engl. J. Med. -1999; 340: – P.1928–1929.
6. Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities.//– Antioxid Redox Signal. - 2008;10(9): –P.1631-74.
7. Qin CX, Chen X, Hughes RA, Williams SJ, Woodman OL. Understanding the cardioprotective effects of flavonols: discovery of relaxant flavonols without antioxidant activity.// J.Med. Chem. –2008;51(6): –P.1874-84.
8. Scholz E.P., Zitron E., Katus H.A., Karle C.A.. Cardiovascular Ion Channels as a Molecular Target of Flavonoids. //– Cardiovascular Therapeutics. –2010, –V.28. –P.46–52
9. Wang G.J., Wu X. Ch., Chen Ch. F., Lin L. Ch., Huang Y.T., Shan J., Pang P. K. Vasorelaxing Action of Rutaecarpine: Effects of Rutaecarpine on Calcium Channel Activities in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1999. – V.289 (3). – P.1237–1244.
10. Esimbetov A.T., Omanturdiyev S.Z., Zaripov A.A., Usmanov P.B. Characteristics of the vasorelaxant action of chrysin flavonoid on isolated thoracic rat aorta. // Science and Education in Karakalpakstan .-2019, –№3.– P.14-19.
11. Blatter LA, Wier WG. Nitric oxide decreases Ca^{2+}_i in vascular smooth muscle by inhibition of calcium current. //Cell Calcium. –1994; V.15: –P.122–131.
12. Hatanaka Y, Hobara N, Honghua J, Akiyama S, Nawa H, Kobayashi Y, et.al. Neuronal nitric-oxide synthase inhibition facilitates adrenergic neurotransmission in rat mesenteric resistance arteries. //J.Pharmacol Exp. Ther. – 2006; V.316: – P.490-497.
13. Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. Mechanism of nitric oxide–induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and inhibition of store-operated Ca^{2+} influx. //Circ Res. –1999, –V.84 (2): –P.210-9.
14. Somlyo A.P. and Somlyo A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. //Nature, –1994, –V.372, –P.231–236.
15. Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. //Br J Pharmacol. –2011; –V.164(3): –P.894–912.
16. Yoshida Y., Sun H.T., Cai J.Q., Imai S. Cyclic GMP–dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca^{2+} pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240–kDa protein // J. Biol. Chem.–1991.– V. 266. –P. 19819–19825.

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИОНОВ РТУТИ(II)

*Турабов Нурмухаммат Турабович**и. о. проф. химического факультета Национального Университета Узбекистана,
Узбекистан, г. Ташкент, Вузгородок НУУз,**Тоджиев Жамолиддин Насириддинович**преподаватель химического факультета Национального университета Узбекистана,
Узбекистан, г. Ташкент, Вузгородок НУУз,*

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF IONS MERCURY(II)

*Nurmukhammad Turabov**Professor of the Chemistry Department, the National University of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent, Vuzgorodok NUU**Jamoliddin Todjiev**lecturer of the Chemistry Department, the National University of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent, Vuzgorodok NUU*

АННОТАЦИЯ

Изучен ряд факторов, влияющих на комплексообразование ионов Hg(II) с 5МПААHS,S-2,4 и найдены оптимальные условия их спектрофотометрического определения. Определены чувствительность и избирательность метода ($\text{pH}=8,60$, $\epsilon=52632$, $K_{\text{равн}}=9,02810^{-7}$, $\Delta\lambda=105\text{nm}$). С помощью разработанной спектрофотометрической методики проведен анализ модельных смесей и дана метрологическая оценка полученным результатам. Во всех случаях относительное стандартное отклонение (Sr) не превышает 0,016.

ABSTRACT

Some factors influenced on the complexformation of ions Hg(II) with 5MPAANS,S-2,4 and also optimal conditions of their spectrophotometrical determination were founded. Sensitivity of developed method was determined. ($\text{pH}=8,60$, $\epsilon=52632$, $K_{\text{eq}}=9,02810^{-7}$, $\Delta\lambda=105\text{nm}$). By elaborated spectrophotometrical method analysis of model systems was carried out and also a metrological value of obtained results was given. In all cases the relative standart deviation (Sr) didn't excess 0,016.

Ключевые слова: ртуть(II), органический реагент, чувствительность, устойчивость комплекса.

Keywords: mercury (II), organic reagent, sensitivity, stability of the complex.

Введение. В настоящее время известно свыше тысячи разнообразных областей применения ртути и ее соединений. Они применяются в химической технологии, металлургии, медицине, электропромышленности, химических источниках тока, сельском хозяйстве, производстве красителей, горном деле и других отраслях современной техники[5, с.17].

Широкое применение и высокие токсические свойства ртути и ее производных объясняют заинтересованность в разработке методов их количествен-

ного определения, поэтому аналитическое определение ионов ртути (II) представляет собой важную практическую задачу. К настоящему времени предложено значительное число различных методов анализа. К ним относятся: титриметрические, электрохимические, спектрофотометрические, спектральные, ядерно-физические, радиохимические методы [5, с.17].

Известно, что азореагенты на основе пиридина представляют несомненный интерес для определе-

ния многих элементов. Производные пиридина являются избирательными реагентами для спектрофотометрического определения ионов ртути(II) в природных и промышленных объектах. Предварительные опыты показали, что синтезированный по методике [2, с. 65-67, с. 213] органический реагент – мононатриевая соль 5-метил-(пиридил-2-азо)-1,8-аминонафтол-2,4-дисульфокислоты (5МПААНС, S-2,4) также является комплексообразователем и избирательным реагентом на ионы ртути (II). Для контроля чистоты реагента использовали метод спектрофотометрии. Полученный реагент хорошо растворим в воде, спирте и представляет собой порошок красно – фиолетового цвета [6, с. 11-12].

Экспериментальная часть

Растворы, реагенты и приборы. В работе использовали 0,1% ный водный раствор 5МПААНС, S-2,4 и $5,0 \cdot 10^{-6}$ М раствор ртути(II), который готовили поточной навеске $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [3, с. 8]. Тетраборатный буферный раствор готовили перемешиванием раствора 0,05М тетрабората натрия (12,367 г $\text{H}_3\text{BO}_3 + 100$ мл 1 М NaOH в 1 л) с добавлением 0,1М HCl для получения соответствующего значения pH [4, с. 267-275]. Оптическую плотность растворов измеряли на концентрационном фотоколориметре КФК-2, КФК-3 и спектрофотометре СФ-46 в кювете с толщиной поглощающего слоя 1,0 см. Величину pH растворов контролировали с помощью pH-метра pH/mV/-TEMPMETERP25 (Юж. Корея).

Результаты и их обсуждение

Оптимальные условия образования комплекса ртути(II). Ионы ртути взаимодействуют с новым азореагентом 5МПААНС, S-2,4 в слабощелочной среде ($\text{pH}_{\text{опт.}} = 8,0-9,0$) в Na-тетраборатном буферном растворе с образованием соединения, интенсивно окрашенного в фиолетовый цвет.

Влияние времени. При изучении влияния времени при pH 8,6 для взаимодействия $\text{Hg}(\text{II})$ с 5МПААНС, S-2,4 результаты показали, что при комнатной температуре оптическая плотность комплекса не меняется в течении 70 мин., что свидетельствует об его устойчивости.

Рисунок 1. Спектры поглощения реагента 5МПААНС, S-2,4 (1) и его комплекса с Hg(II) (2).

Влияние концентрации реагента. Для нахождения минимально-необходимого количества 5МПААНС, S-2,4 к определенному количеству раствора $\text{Hg}(\text{II})$ прибавляли 10,0 мл Na-тетраборатного буферного раствора со значением pH=8,6, содержащего 40,0 мкг ртути(II) и возрастающие количества 0,1%-ного раствора 5МПААНС, S-2,4 и раствор доводили дистиллированной водой до 25 мл. Растворы перемешивали и измеряли их оптические плотности на КФК-2 со светофильтром № 7 при $\ell = 1,0$ см относительно раствора холостого опыта. Полученные результаты показали, что полное постоянство оптической плотности наступает при 1,3 мл 0,1 % ного раствора 5МПААНС, S-2,4. Это количество реагента считается достаточным для связывания в комплекс добавленного количества (40 мкг ионов ртути(II)).

Подчинение закону Бугера-Ламберта-Бера.

Изучение подчинения растворов комплекса $\text{Hg}(\text{II})$ с 5МПААНС, S-2,4 закону Бугера-Ламберта-Бера проводили в найденных оптимальных условиях. Для этого приготовили растворы в мерных колбах на 25,0 мл: 10,0 мл Na-тетраборатного буферного раствора со значением pH=8,6; переменной концентрацией растворы $\text{Hg}(\text{II})$, по 1,3 мл реагента (0,1% ного) и объем доводили до метки дистиллированной водой. Растворы перемешивали и измеряли их оптические плотности на КФК-2 со светофильтром № 7 при $\ell = 1,0$ см относительно раствора холостого опыта. Полученные экспериментальные данные показали, что в интервале 1,0 - 40,0 мкг ионов ртути(II) в 25,0 мл раствора наблюдается подчинение закону Бугера-Ламберта-Бера, что даёт возможность количественно определять $\text{Hg}(\text{II})$ в этом интервале концентраций.

Спектры поглощения реагента(HR) и его комплекса с Hg(II). Сняты спектры светопоглощения реагента 5МПААНС, S-2,4 и его комплекса с $\text{Hg}(\text{II})$. Результаты представлены на рисунке 1, можно выбрать одну рабочую длину волны 645 нм для комплекса ртути(II) ($\lambda_{\text{HR}} = 540$ нм) при pH 8,6, которая показала высокую чувствительность и контрастность ($\Delta\lambda = 105$ нм).

Рисунок 2. Определение молярных соотношений комплекса ртути(II) с 5МПААНС, S-2,4 методом прямой линии Асмуса.

Определение состава комплекса Hg-5МПААНС,S-2,4. Стехиометрия комплекса ртути с реагентом была изучена методами Остромысленского - Жоба (метод изомолярных серий) [1, с. 241-244] и прямой линии Асмуса [1, с. 251] (Рис.2). Излом на кривой в методе изомолярных серий наблюдается при соотношении Hg:HR=1:2, а при методе прямой линии Асмуса зависимость $(1/V)^n$ от ℓ/A линейна при $n=2$, что свидетельствует о том, что в обоих случаях комплекс состава HgR_2 .

Определение истинного коэффициента молярного светопоглощения и константы равновесия при оптимальной кислотности среды. При определении истинного коэффициента молярного светопоглощения и константы равновесия комплекса $Hg(II)$ -5МПААНС,S-2,4 по методу Толмачева [1, с. 286-287] в мерные колбы емкостью 25,0 мл приливали 10,0 мл Na-тетраборатного буферного раствора со значением $pH=8,6$, растворы реагента и металла в стехиометрическом соотношении при равных концентрациях ($2,000 \cdot 10^{-4}$ моль/л) и объемы доводили дистиллированной водой до метки. Растворы перемешивали и измеряли оптическую плотность на КФК-3 при $\lambda=645$ нм, $\ell=1,0$ см относительно раствора холостого опыта. По полученным данным строили график зависимости $1/\varepsilon \cdot 10^{-n}$ от $1/\sqrt{A}$. Взяв экстраполяцией точку пересекаемую с осью ординат, рассчитывали истинный коэффициент молярного светопоглощения. Из полученных

данных рассчитывали $\varepsilon_{ист.}$ и $K_{равн.}$, которые соответственно равны 52632 и $9,028 \cdot 10^{-7}$.

Определение константы устойчивости комплекса ртути(II) с 5МПААНС,S-2,4. Одними из важнейших характеристик комплексных соединений, определяющих их прочность и возможность применения в спектрофотометрическом анализе являются $K_{нест}$ и $K_{уст.}$. Константа устойчивости комплекса $Hg(II)$ определена по методу Бабко (методом разбавления). При этом использовали растворы с равными концентрациями: $C_{Hg^{2+}}: C_{HR} = 2,000 \cdot 10^{-4}$ моль/л [1, с. 267-269].

Методика определения: в мерные колбы емкостью 25,0 мл приливали 10 мл Na-тетраборатного буферного раствора с $pH=8,60$; в стехиометрическом соотношении реагирующие компоненты ($Me^{2+}:R^-$) и объем доводили до метки дистиллированной водой. Растворы перемешивали и измеряли оптическую плотность на КФК-3, при $\ell=1$ см. В качестве раствора сравнения использовали раствор холостого опыта. Затем растворы комплексов последовательно разбавляли 2 раза, измеряли оптическую плотность после каждого разбавления. Раствор сравнения дистиллированная вода. Результаты измерений и полученные расчетные данные представлены в таблице 1.

По полученным данным табл. 1 найдено среднее значение $\lg K_{уст.}$ ($\lg \beta_k$) комплекса $Hg(II)$, равное 22,07.

Таблица 1.

Результаты определения констант устойчивости комплексов иона ртути (II)

№	$V_{Hg^{2+}}$, мл	V_{HR} , мл	$C_1 \cdot 10^{-6}$	A_1	$C_2 \cdot 10^{-6}$	A_2	$K_{нест.} (MeR)$	$K_{уст.} (MeR) (\beta_k)$	$\lg K_{уст.} (MeR) (\lg \beta_k)$
1	1,0	2,0	8,0	0,235	4,0	0,110	$2,00 \cdot 10^{-22}$	$5,00 \cdot 10^{21}$	21,70
2	1,5	3,0	12,0	0,354	6,0	0,175	$2,57 \cdot 10^{-24}$	$3,89 \cdot 10^{23}$	23,59
3	2,0	4,0	16,0	0,474	8,0	0,243	$5,26 \cdot 10^{-23}$	$1,90 \cdot 10^{22}$	22,28

Для оценки правильности и воспроизводимости спектрофотометрического определения ионов ртути(II) реагентом 5МПААНС,S-2,4 проводили определение ее различных количеств в оптимальных условиях при трёхкратном повторении. Результаты опытов показали, что относительное стандартное отклонение при определении 1,0-40 мкг ртути(II) не превышает 0,017. Рассчитано уравнение градуировочного графика [1, с. 312-319] методом наименьших квадратов, при этом $a=0,0033$ и $b=0,0055$; по полученным расчетным данным построен градуировочный график зависимости $Y_{расч}$ (Y_i) от C_{Hg} , мкг (X_i).

Определение ионов ртути (II) с помощью 5МПААНС,S-2,4 в присутствии посторонних ионов. С целью выяснения возможности использования реагента в анализе и избирательности метода проводили определение ионов ртути(II) в присутствии посторонних ионов. Определение проводили по выше указанной методике в оптимальных условиях, с той лишь разницей, что в раствор вводили различные количества посторонних ионов, изучение влияния которых представляло интерес. На определение ионов ртути(II) не

мешают ионы щелочных (1:800) и щелочноземельных (1:600) металлов, Al^{3+} , CH_3COO^- (500); Ag^+ , V^{5+} , NO_3^- (1:100); Zn^{2+} , Tl^{3+} , NH_4^+ , F^- , SCN^- , SO_4^{2-} (1:50); Ni^{2+} (1:40); Cu^{2+} , Pb^{2+} , Bi^{3+} , (1:33); Cr^{3+} и Co^{3+} (1:30). Мешают ионы Sn^{2+} , Pd^{2+} (1:33); Cd^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} (1:10); Br^- , I^- (1:3); Cl^- (1:1) и др. Изучено влияние посторонних ионов и маскирующих веществ [1, с. 143-148] на комплексообразование $Hg(II)$ с 5МПААНС,S-2,4. При сравнении избирательности известных из литературы [2, с. 66-67] реагентов для определения иона ртути(II) видно, что синтезированный реагент является более избирательным. Данные по избирательности позволяют применить разработанную методику для спектрофотометрического определения ионов ртути(II) в сложных объектах.

Определение ртути(II) с 5МПААНС,S-2,4 в модельных смесях. Разработанная методика определения ртути(II) с 5МПААНС,S-2,4 апробирована в анализе модельных смесей по вышеуказанной методике с добавлением маскирующих агентов. Результаты измерений и их метрологические данные приведены в нижеприведенной таблице 2.

Таблица 2.

Определение количества ртути (II) в искусственных смесях

Состав искуств. смесей (соотн.)	Введено Hg^{2+} , мкг,	A_{645}	Найдено Hg^{2+} , мкг $\bar{X} \pm \Delta X$	S	S_r	$\bar{X} \pm \Delta X$	Отн. ошиб., %
K^+, Na^+ (500) Ba^{2+}, Al^{3+} (200) V^{5+}, Ag^+ (100) $Ni^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}$ (30) Zn^{2+} (50)	30,00	0,164 0,166 0,165 0,168 0,170	29,22 29,58 29,40 29,95 30,31	0,464	0,016	$29,69 \pm 0,58$	1,03

Как видно из полученных данных (Табл. 2.) спектрофотометрическое определение ионов ртути(II) в сложных модельных смесях, имитирующих

реальные объекты, вполне возможно, причём S_r не превышает 0,016, что говорит о хорошей воспроизводимости и правильности разработанной методики.

Список литературы:

1. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим и спектрофотометрическим методам анализа. –Л.:Химия,–1986,–432 с.
2. Бусев А.И. Синтез новых органических реагентов для неорганического анализа. –М.:МГУ,–1986,–432 с.
3. Коростелев П.П. Приготовление растворов для химико – аналитических работ. - М.:–Химия,–1964,–386 с.
4. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. 6-е изд., –М.: Химия. –1989. –448 с.,
5. Хабаров Ю.Г., Яковлев М.С. Спектрофотометрический метод определения катионов ртути. // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология . –2007. –Т. 50. №. 5 –С. 17-20.
6. Турабов Н.Т., Тоджиев Ж.Н. Абсорбционная фотометрия как метод определения микросодержаний меди(II) новым оксидореагентом // Universum: Химия и биология : электрон. научн. журн. 2018. № 5(47). С.11-16. URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/5826> (дата обращения: 25.10.2019).

ОПТИМИЗАЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРА АМИНА В ОЧИСТКЕ КИСЛОГО ГАЗА**Завқиев Муродали Завқи угли***ведущий инженер-технолог Шуртанского НГДУ,
Узбекистан, Кашкадарьинская область, Касанский район***Панжигев Олимжон Холлиевич***заведующий кафедры химической технологии КИЭИ
Узбекистан, Кашкадарьинская область, город Карши***Усманова Мухлиса Баходиркизи***студент III курса КИЭИ
Узбекистан, Кашкадарьинская область, город Карши***Мамашаев Ихтиёр Абдикодир угли***студент III курса КИЭИ,
Узбекистан, Кашкадарьинская область, город Карши***OPTIMIZATION OF AMINE SOLUTION CONTENT IN ACID GAS PURIFICATION****Murodali Zavqiyev***Leading engineer-technologist of Shurtan oil and gas production Department,
Uzbekistan, Kashkadarya region, Kasan district***Olimjon Panjiyev***Head of the Department of chemical technology KEEI
Uzbekistan, Kashkadarya region, Karshi town***Muxlisa Usmonova***The third year student of the KEEI
Uzbekistan, Kashkadarya region, Karshi town***Ixtiyor Mamashayev***The third year student of the KEEI,
Uzbekistan, Kashkadarya region, Karshi town***АННОТАЦИЯ**

При очистке газов от кислых газов с помощью аминного раствора, образуются термостойкие соли и хелатный механизм. Ионообменные смолы могут быть использованы для предотвращения проблемы.

ABSTRACT

The amine solution produces heat-resistant salts and a chelate mechanism during purifying gases from sour gases with amine solution. Ion-exchange resins may be used to prevent the problem.

Ключевые слова: ионообменные смолы, бицин, термостойкие солей, формиат, оксалат, ацетат, хелатный механизм.

Keywords: ion exchange resins, bicine, heat resistant salts, formate, oxalate, acetate, chelating mechanism.

В результате рационального использования местного сырья в республике, усиления конкуренции за счет дешевого и качественного производства, улучшения взаимоотношений между отраслями, сущность и цель производственной деятельности изменились.

В этом случае возникают проблемы с поддержанием фиксированных позиций. Это включает в себя разработки производственной стратегии и внедрения современных технологий.

Следовательно, повышения конкурентоспособности производства можно добиться путем поддер-

жания стабильной экономики, снижения себестоимости продукции и производственных затрат.

В настоящее время в основном используются аминовые растворы для очистки природного газа от сернистых соединений. В частности, диэтаноламин и моноэтаноламин широко используются для очистки газов от сероводорода и углекислого газа.

Дегградация аминовых растворов — это одна из серьезных проблем при эксплуатации установок очистки газа. В абсорбционных растворах образуются и накапливаются продукты дегградации аминного раствора, которые по разному влияют на технологические показатели процесса очистки газа. Одни снижают абсорбционную способность растворов, другие в дополнение к этому еще и вызывают вспенивание, третьи приводят к ускорению коррозии оборудования. Сегодня принято решать эти проблемы посредством добавления в раствор антипенных веществ, антикоррозионных добавок, нейтрализаторов или свежего растворителя. Однако, эти добавки изменяют химические свойства раствора амина и тем самым усугубляют положение. Вязкость, поверхностное натяжение, теплопроводность, электропроводность — вот те важные характеристики, которые изменяются в присутствии добавок и загрязняющих примесей. Существует много проблем отделения кислых газов от природного газа методом абсорбции: увеличение количества ионов хлора и механической примеси, образование термостойких солей в аминовых растворах, а также появление формиата, оксалата, ацетата, гидроксиэтилленглицина, гидроксиэтилсаркозина и бицина, которые являются причиной возникновения коррозии оборудования. Кроме того, причины этих проблем также зависят от состава газа, подаваемого на установку обработки кислого газа. Например, газ

регенерации цеолитовой установки передается на аминовые установки в Шуртанском нефтегазодобывающем управлении. Это связано с высоким содержанием механических примесей в газе и резкими колебаниями уровней сероводорода, что может привести к недостаткам в управлении параметрами процесса. Мубарекскому газоперерабатывающему заводу из Мубарекского нефтегазодобывающего управления на аминные установки подается частично очищенный газ от жидкостей и механических примесей. В этих случаях из-за большого количества жидких углеводородов происходит вспенивание аминовых растворов в аминовых установках. Основным средством предотвращения этих проблем в технологических процессах является концентрация раствора амина на необходимом уровне, абсорбция, проводимая в закрытой среде, и технологические параметры, основанные на технологических регламентах. Многочисленные эксперименты показывают, что раствор амина следует контролировать, чтобы поддерживать содержание воды в растворе амина в пределах, установленных регулярами химическими анализами, чтобы не увеличивать содержание ионов хлора. Основными причинами образования термостойких солей, формальдегида, оксалата, ацетата, гидроксиэтилглицина, гидроксиэтилциллина и бицина является прямое влияние воздуха на аминовые растворы подающихся очистке устройствах, аминокислотном и антиоксидантном растворе, используемом для предотвращения образования пены в процессе регенерации. Это использование веществ, используемых для уменьшения количества кислорода в растворе амина.

Количество кислых газов, содержащихся в неочищенном газе, подаваемом на аминовые установки, показано в таблице 1 ниже.

Таблица 1.

Состав кислого компонента газа разных газоперерабатывающих предприятий

Кислые газы	Шуртанское нефтегазодобывающее управление		ООО «Шуртанский ГХК»		Мубаракский газоперерабатывающий завод	
	Вход	Выход	Вход	Выход	Вход	Выход
Водород сульфид, %	1-1,2	0,0004-0,0005	0,08	0,0003-0,0004	3,-,3,5	0,0004-0,0005
Карбонат ангидрид, %	1,5		2,5		1,5-2,0	

Превышение количества аминокислот (рекомендуемая дозировка менее 250 ppm.), термостойких солей (рекомендуемая дозировка менее 0,5%), формиатов (рекомендуемая дозировка менее 500 ppm), ацетатов (рекомендуемая дозировка менее 1000 ppm) приводит к образованию хелатного механизма. В результате взаимодействия аминного раствора и кислорода образуется бицин. Бицин и кислые газы действуют как агенты хелатного механизма. Хелатный механизм вызывает окисление железа в оборудовании. Это приводит к разрушению внутренних элементов колонн, выходу из строя насосов и дефектам в теплообменнике. Это также усложняет регенерацию раствора амина и приводит к большо-

му расходу энергии, что снижает энергоэффективность аминовых установок.

Важно избегать образования хелатного механизма, чтобы предотвратить коррозию в аминовых установках. Ионнообменные смолы могут быть использованы для предотвращения образования бицина и для уменьшения количества бицина, образующихся в растворе амина.

Для этого был активирован ионнообменная смола и хранен в 50% растворе NaOH в течение 24 часов. Затем в дистиллированной воде промывают декантацией до тех пор, пока pH не станет равным 7. Определено количество ионов хлора и термостойких солей в регенерированном растворе амина. Регене-

рированный раствор амина проводился через смолы. Снова было определено количество ионов хлора и

термостойких солей в растворе амина. Результаты представлены в таблице 2

Таблица 2.

Результаты испытания

Наименование показателей	Регенерированный аминовый раствор	Регенерированный аминовый раствор проводимый через ионообменной смолы
Ионы хлора, г/м ³	16,5	14,5
Термостойкие соли, %	1,0	0,88

Результаты показывают, что систематический анализ выполняется путем замены выбранных ионообменных смол на другие смолы. Ожидаемый результат: в составе регенерированного аминового раствора проводимого через ионообменной смолы количество ионов хлора должно быть на 60-70%

ниже, чем в регенерированном растворе амина по сравнению с регенерированным раствором амина.

Показано, что после очистки рабочих растворов метилдиэтанолamina наионнообменной смоле содержание термостабильных солей, ионов хлора и электропроводность растворов значительно снижается.

Список литературы:

1. Спунер Б., ШейланМ. Сульфиды железа – воздействие на аминовые установки //Нефтегазовые технологии. 2010.
2. Стрючков В.М., Афанасьев А.И., Шкляр Р.Л. Интенсификация процессов очистки природного газа от кислых компонентов // Подготовка и переработка газа и газового конденсата: обз. информация – М.: ВНИИЭгазпром. – 1984.
3. Гриценко А.И., Бекиров Т.М., Стрючков В.М., Акопова Г.С. Опыт эксплуатации установок очистки газа от кислых компонентов на Оренбургском и Мубарекском ГПЗ. М.: ВНИИЭгазпром, 1979.

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТИМУЛЯТОРА РОСТА ДЛЯ ТЕХНИЧЕСКИХ КУЛЬТУР****Холбоев Юсубжон Хакимович**

канд. хим. наук, доц., зав. кафедрой медицинской химии, Андижанский Государственный медицинский институт,
Узбекистан, г. Андижан
E-mail: holboev70@mail.ru

Абдурахманов Улугбек Курганбаевич

канд. хим. наук, доц. кафедры медицинской химии, Андижанский Государственный медицинский институт,
Узбекистан, г. Андижан
E-mail: Chemist_au@list.ru

Юсупов Мухаммадишуккур Мамадалиевич

канд. хим. наук, доц. кафедры биологической химии, Андижанский государственный медицинский институт,
Узбекистан, г. Андижан
E-mail: m.yusupov@mail.ru

Махсумов Абдухамид Гофурович

д-р хим. наук, проф. Ташкентский химико-технологический институт,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: abduhamid.mahsumov@mail.ru

TECHNOLOGY FOR PRODUCING GROWTH STIMULATOR FOR TECHNICAL CULTURES**Yusubzhon Kholboev**

Ph.D. of Chemistry, Andijan State Medical Institute,
Uzbekistan, Andijan

Ulugbek Abduraxmanov

Kandidat of Chemical Sciences, Andijan State Medical Institute,
Uzbekistan, Andijan

Muxammadshukur Yusupov

Kandidat of Chemical Sciences, Andijan State Medical Institute,
Uzbekistan, Andijan

Abdukhamid Makhsumov

Doctor of Chemical Sciences, professor Tashkent Institute of Chemical Technology,
Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

Несмотря на огромные успехи, достигнутые за последние годы в развитии технологии органических веществ, проблема биостимуляторов для технических растений, прежде всего в хлопководстве, селекции пшеницы и кукурузоводстве остается актуальной. Выпускаемые за рубежом биостимуляторы зачастую дороги и не всегда доступны. В связи с этим необходим дальнейший поиск новых высокоэффективных биостимуляторов, потребность в которых не уменьшается. С этой точки зрения, производные мочевины и бис- мочевины представляют несомненный интерес как вещества, обладающие различной биологической, фармакологической и технической активностью.

Цель – разработка и описание технологического процесса производства N,N¹-гексаметилен бис-[(дибензиламино)мочевины], обладающей биологической активностью.

Создание технологической линии включающей: весы, реактор, азотную рамку, емкости, мерники, Нутч-фильтры, сборник продукта, сушилку, перегонный куб, конденсатор, смотровой фонарь, ловушку.

Выводы: описанный технологический процесс синтеза биологически активных соединений позволяет получать конечные продукты с высоким выходом, безопасным путем.

ABSTRACT

Despite the tremendous successes achieved in recent years in the development of the technology of organic substances, the problem of biostimulants for industrial plants, primarily in cotton growing, wheat breeding and maize breeding, remains relevant. Biostimulants produced abroad are often expensive and not always available. In this regard, a further search is needed for new highly effective biostimulants, the need for which is not decreasing. From this point of view, urea and bisurea derivatives are of undoubted interest as substances with different biological, pharmacological and technical activities.

The goal - the development and description of the technological process for the production of N, N1-hexamethylene bis - [(dibenzylamino) urea], which has biological activity.

Method of implementation: creating production line consisting of scales, reactor, nitric frame, tanks, measuring tanks, suction filter, a collection of product, dryer, alembic, a condenser, an observation lantern trap.

Conclusion: The described process synthesis of biologically active compounds allows to obtain final products with a high yield, in a safe way.

Ключевые слова: N,N¹-гексаметилен бис-[(дибензиламино)мочевина], технологический процесс.

Keywords: N,N¹- bis- hexamethylene [(dibenzylamino) urea], process.

Актуальность работы. Несмотря на огромные успехи, достигнутые за последние годы в развитии технологии органических веществ, проблема биостимуляторов для технических растений, прежде всего в хлопководстве, селекции пшеницы и кукурузоводстве остается актуальной. Выпускаемые за рубежом биостимуляторы зачастую дороги и не всегда доступны. В связи с этим необходим дальнейший поиск новых высокоэффективных биостимуляторов, потребность в которых не уменьшается.

Большое количество исследований в области производных мочевины и бис-мочевины, проводимых в настоящее время, побуждается не только фундаментальными, научными, но и практическими потребностями [1]. С этой точки зрения, производные мочевины и бис- мочевины представляют несомненный интерес как вещества, обладающие различной биологической, фармакологической и технической активностью [2,3]. Они успешно применяются в технике как ракетное топливо, присадки к смазочным маслам и в качестве вулканизирующего агента. В сельском хозяйстве они нашли применение как пестициды, гербициды, акарициды, фунгициды, инсектициды (для плодовых деревьев, цитрусовых, кофе, чая, какао), ростостимуляторы и другие.

Поэтому развитие этой отрасли органической химии является сегодня актуальной проблемой, требующей глубоких разработок и научно обоснованных подходов. Разработка безотходной технологии получения и синтеза новых соединений на основе ароматических вторичных аминов и их практическое применение имеет широкие перспективы в решении первоочередных задач прежде всего, развития сельского хозяйства, и в целом, всего народного хозяйства и роста благосостояния народа Республики Узбекистан.

В статье описана разработка получения и описание технологического процесса производства N,N¹-гексаметилен бис-[(дибензиламино)мочевины].

Раствор дибензиламина готовится в реакторе Р-2. Для этого из мерника М-6 самотеком загружают 3,6719 кг (3,5788 л) дибензиламина и 10,2516 кг (10,5982 л) диметилформамида (ДМФА) из мерника М-7, все это перемешивают в течение 20 – 25 минут до полного растворения дибензиламина в диметилформамиде.

Перед началом работы все оборудование и коммуникации установки промывают водой и при необходимости продувают азотом [4]. Азот подают из азотной рамки АР-3 через понижающий редуктор. Загрузка компонентов в мерник происходит из емкости Е 4,5 вакуумом, создаваемым вакуум-насосом. Приготовление раствора и получение продукта осуществляется в реакторе Р-2, снабженном конденсатором, паровой рубашкой для обогрева и мешалкой для перемешивания. В реактор Р-2 с приготовленным раствором дибензиламина в ДМФА загружают 3,35551 кг (4,6412 л) катализатора триэтиламина самотеком из мерника М-8 и при интенсивном перемешивании из мерника М-9 медленно через смотровой фонарь загружают 1,5843 кг (1,5139 л) гексаметилендиизоцианата. Реакция протекает при температуре 25 – 35⁰С подачей пара в рубашку реактора. Продолжительность реакции - 4 часа. Затем мешалку реактора останавливают, охлаждают продукты реакции затем и отстаивают. Далее передают на фильтрацию и промывку. Продукты реакции фильтруют на нутч-фильтре НФ-10, который состоит из НФ-10 и сборника 12. Фильтровальную бумагу замачивают с водой и покрывают фильтр. Затем из реактора продукты реакции пропускают через фильтр. Фильтрат собирают на фильтре в сборнике 12 поз сб. 13. Осадок на фильтре промывают дистиллированной водой, которую подают из мерника М-11 самотеком. Дистиллированную воду можно подогреть до 30 – 35⁰С для ускорения фильтрации. Промытый осадок поступает на сушку. Сушку осадка продукта проводят в сушильном шкафу СШ-15 при температуре 100 – 110⁰С в течение 2 – 3 часов.

Фильтрат из сборника Сб-13 загружают в реактор Р-2, состоящей из смеси диметилформамида и триэтиламина, далее вакуумом забирают в перегонный куб ПК-16, снабженный змеевиком для обогрева, и доводят до кипения. Пары отводят в конденсатор 17. Фракции дистиллята поступают через смотровой фонарь в отдельные сборники (Сб-19 и Сб-20). Первая фракция - катализатор триэтиламин перегоняет-

ся при температуре 89,5⁰С. После отгона триэтиламина смесь охлаждают. Создается вакуум в перегонном кубе. При остаточном давлении 35 мм. рт. ст. диметилформамид отгоняется при температуре 76⁰С. По окончании операции остаток сливают из куба, после чего в него вновь загружают разделяемую смесь [5].

Рисунок 1. Схема технологического процесса

1-весы; 2-реактор; 3-азотная рамка; 4,5-емкости; 6,7,8,9-мерник для гексан-1,6-диизоцианата, дибензиламина, диметилформамида, триэтиламина; 10-Нутч-фильтр; 11-дистиллированная вода; 12,13,14,19,20-сборники; 15-сушилка; 16-перегонный куб; 17-конденсатор; 18-смотровой фонарь; 21-ловушка

N,N'-гексаметилен бис-[(дибензиламино) мочевины] представляет собой бесцветный порошок с температурой плавления 224 – 225⁰С. Растворяется

во многих органических растворителях: ДМФА, ДМСО, ДМАЦ, НСООН, нитробензоле, диоксане и т.д.

Список литературы:

1. Холбоев Ю.Х. Синтез и разработка технологии получения N,N'-гексаметилен бис-[(аминоароил) мочевины] и их свойства: Автореф. дис. канд. хим. наук. – Ташкент, 2012. – 23 с.
2. Мельников Н.Н., Басаков Ю.А., Бокарев К.С. Химия гербицидов и стимуляторов роста растений. – М.: Госхимиздат, 1954. – 261 с.
3. Мельников Н.Н. Пестициды: химия, технология, применение. – М., 1987. – С. 255-288
4. Баратов А.Н., Корольченко А.Я., Кравчук Г.Н. Пожаровзрывоопасность веществ и материалов и средства их тушения. Справочник. – М.: Химия, 1990. — кн. 1—496 с., кн. 2—384 с.
5. Махсумов А.Г., Болтабоев У.А., Махсумова Н.А. Синтез производных бис-мочевины и механизм их образования// Химический журнал Казахстана — Алматы, 2006. №3. – С. 65-71.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ ИЗ СОИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ ДЛЯ ИФА

Эшбоев Фарход Бакир угли

*мл. науч. сотр., Институт химии растительных веществ АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент*

E-mail: farkhod.eshboev@gmail.com

Юсупова Элвир Гайнатовна

*канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Институт химии растительных веществ АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент*

Пякина Галина Аликсандровна

*канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Институт химии растительных веществ АН РУз.,
Узбекистан, г. Ташкент*

Межлумян Лариса Гайковна

*канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Институт химии растительных веществ АН РУз.,
Узбекистан, г. Ташкент*

Зиявитдинов Жамолитдин Фазлитдинович

*канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Центр передовых технологий,
Узбекистан, г. Ташкент*

Ишимов Учкун Жомуродович

*канд. хим. наук, старший научный сотрудник, Центр передовых технологий,
Узбекистан, г. Ташкент*

Азимова Шахноз Садыковна

*док. биол. наук, проф., Институт химии растительных веществ АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент*

ISOLATION AND STUDY OF THE AMINO ACID COMPOSITION OF PROTEINS FROM SOYABEAN FOR PRODUCING CONJUGATES FOR ELISA

Farkhod Eshboev

*junior researcher of the Institute of the Chemistry of Plant Substances,
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent*

Elvira Yusupova

*PhD., senior researcher of the Institute of the Chemistry of Plant Substances,
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent*

Galina Piyakina

*PhD., senior researcher of the Institute of the Chemistry of Plant Substances,
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent*

Larisa Mejlumyan

*PhD., senior researcher of the Institute of the Chemistry of Plant Substances,
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent*

Djamaliddin Ziyaviddinov*PhD., senior researcher of the Center for Advanced Technologies,
Uzbekistan, Tashkent***Uchkhun Ishimov***PhD., senior researcher of the Institute of the Center for Advanced Technologies,
Uzbekistan, Tashkent***Shakhnoz Azimova***DSc., Professor, Institute of the Chemistry of Plant Substances, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent*

АННОТАЦИЯ

Проведено выделение, очистка и изучение аминокислотного состава белков из сои с целью синтеза конъюгата морфин-белок для разработки диагностического средства с целью выявления антител, связывающих производные алкалоидов группы опиата на основе твердофазного иммуноферментного анализа.

ABSTRACT

Isolation, purification and study of amino acid composition of soybean protein in order to synthesis of morphine-protein conjugate for developing a test-system for detection of antibodies to alkaloids of the group of opiates on the basis of enzyme-linked immunosorbent assay.

Ключевые слова: белок, аминокислота, ВЭЖХ, гаптен, конъюгат, ИФА.

Keywords: protein, amino acid, HPLC, hapten, conjugate, ELISA.

Введение

Актуальной задачей медицинской диагностики является разработка высокочувствительных и специфичных методов анализа наркотических веществ и антител к ним в биологических жидкостях организма [1]. Известно, что наиболее широкое распространение в практике для диагностики наркомании получили иммунохимические [2] и ВЭЖХ-МС [3] методы определения наркотических веществ. К ним относятся: иммунохроматографический, иммунофлуоресцентный, радиоиммунный методы анализа. Перечисленные методы анализа, используемые для диагностики наркомании, основаны на определении в биологической жидкости человека продуктов метаболизма употребляемого наркотического препарата.

Такой подход к диагностике наркомании имеет существенный недостаток, поскольку позволяет диагностировать наркотическую интоксикацию только в течение 24-48 часов с момента принятия препарата. Этот факт связан с быстрым выведением из организма наркотических соединений и их производных [4]. Однако, известно [5], что к опиатам вырабатываются специфические белки, вызывающие привыкание к наркотику. Наиболее оптимальным методом является метод ИФА диагностики, позволяющий определять наличие белков, связывающих наркотики, так как эти белки, образованные к опиатам, сохраняются в организме человека в течение 2-3 месяцев.

Для разработки ИФА диагностического средства необходим белковый носитель-конъюгат белка с морфином, поскольку низкомолекулярный опиат (гаптен) невозможно адсорбировать на поверхности полимерного носителя. Диагностический ИФА набор, используемый для определения наркотических ве-

ществ, состоит из нескольких компонентов, среди которых основной - это иммуносорбент, содержащий конъюгат гаптен - белок.

Целью данной работы является подбор белкового носителя для разработки ИФА диагностического средства. Имеются работы, [6,7.] по использованию в качестве белка-носителя - БСА, ЧСА, овальбумина, лизоцима и фибриногена для получения конъюгатов белок-гаптен при создании ИФА диагностических средств. В нашей работе был выбран соевый белок в связи с тем, что на него нет перекрестных реакций антител с сывороткой крови человека, что позволяет избежать ложноположительных результатов.

Методы

Выделение белка. Соевые бобы измельчали с помощью гомогенизатора (PX-MFC 90D) и обезжиривали ацетоном (10:1) в течение одного часа. Обезжиренный гомогенат экстрагировали при комнатной температуре в течение 2 часов при соотношении 10/1 0,2 М буфером (0,5 М трис-ОН pH 7,4; 10% SDS; 0,5 М ЭДТА). Затем экстракт центрифугировали в течение 30 минут при 6000 об/мин и супернатант диализовали в течение 12 часов против дистиллированной воды. После диализа супернатант высушивали лиофильно и определяли содержание белка в образцах методом Лоури [8].

Гель-фильтрация. Гель-фильтрацию белка проводили на колонке (2,5 x 70 см) с Сефадексом G-75. В качестве элюирующего буфера использовали 1 кратный pH 7,4 фосфатный буфер (PBS), при скорости потока 1 мл/мин.

Электрофоретический анализ белков. Электрофоретический анализ белков проводили в 10% ПААГ по методу Леммли [9].

Определение аминокислотного состава.

Гидролиз образцов белковых фракций

проводили с помощью 5,7 н HCl в вакууме, в течение 24 ч при 110 °С.

Синтез и определение фенилтиокарбонил (ФТК) производных аминокислот проводили по методу Steven A., Cohen D [10]. Идентификацию ФТК-аминокислот проводили на хроматографе Agilent Technologies 1200 на колонке 75x4,6 Discovery HS C₁₈. Раствор А: 0,14 М CH₃COONa + 0,05 % ТЭА, pH 6,4; В: CH₃CN. Скорость потока 1,2 мл/мин, поглощение 269 нм. Градиент %В/мин: 1-6 %/0-2,5 мин; 6-30 % /2,51- 40 мин; 30-60 %/40,1-45 мин; 60-60 %/45,1-50 мин; 60-0 %/50,1-55 мин.

Результаты и обсуждение.

Суммарный соевый белок получали по методу как описано [8]. Затем соевый белок разделяли методом гель-фильтрации на низко- и высокомолекулярные фракции, которые анализировали методом гель-электрофореза в ПААГ. Результаты электрофореза приведены на рисунке (рис.1).

Как видно из рис.1, высокомолекулярная фракция (3) содержит белки с молекулярной массой от 50 до 100 кД и низкомолекулярная (2)- ниже 30 кД.

Рисунок 1. Гель – электрофореграмма белковых фракций сои в 10 % ПААГ

1-маркер, 2- вторая фракция, 3- первая фракция, 4- суммарный белок сои.

Для того чтобы морфин провзаимодействовал с белком-носителем на первом этапе следует получить гемисукцинат морфина (см.рис.2 А). Далее получали конъюгат морфина с белком, в результате образования ковалентной связи между аминогруппами белка и карбоксильной группой гемисукцината морфина (см.рис. 2 Б).

Рисунок 2. Схема получения конъюгата морфина

Несомненно, чем больше в белке свободных аминогрупп, способных взаимодействовать с карбоксильными группами гемисукцината морфина, тем больше молей морфина свяжется с одним молем белка-носителя. В этой связи, исследование аминокислотного состава белковых фракций сои, используемых для получения конъюгатов имеет важное значение.

Аминокислотный состав фракций белков сои сорт Узбек-6 (см. рис1) определяли методом ВЭЖХ [10]. Исследование аминокислотного состава фракций соевых белков показало, что наибольшее количество ε-аминокислот (лизин, аргинин), содержится

в высокомолекулярной фракции сои. Очевидно, что наличие вышеперечисленных аминокислот в большем количестве в составе этой фракции сои повышает эффективность получения конъюгатов гаптен-белок (см. табл.1).

Таким образом, высокомолекулярную фракцию соевого белка можно использовать в качестве носителя для получения конъюгата для диагностических ИФА тест-систем, для определения низкомолекулярных соединений (алкалоиды группы опиатов и их производные и др.).

Таблица 1.

Аминокислотный состав белковых фракций соевого белка, в %.

АМИНОКИСЛОТЫ	ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ФРАКЦИЯ (1)	НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ФРАКЦИЯ (2)
АСПАРАГИНОВАЯ КИСЛОТА	4,9436	7,9863
ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА	0	10,735
СЕРИН	3,2848	2,7102
ГЛИЦИН	3,923	2,4028
АСПАРАГИН	0	0
ГЛУТАМИН	0	0
ЦИСТЕИН	0,5014	0,7322
ТРЕОНИН	2,2597	1,632
АРГИНИН	6,8781	3,6215
АЛАНИН	2,9997	1,9397
ПРОЛИН	2,69	1,8186
ТИРОЗИН	2,159	1,3291
ВАЛИН	3,9094	2,0003
МЕТИОНИН	0	0,2945
ИЗОЛЕЙЦИН	5,502	3,1467
ЛЕЙЦИН	6,7436	3,1123
ГИСТИДИН	0	0
ТРИПТОФАН	0	0
ФЕНИЛАЛАНИН	2,4034	1,3404
ЛИЗИН	1,2983	0,7047

Список литературы:

1. А.Д. Фурсова, М.А. Мягкова, А.И. Воложин. С.Н. Петроченко, Г.В. Виха., Диагностическое значение иммуноферментного анализа иммуноглобулинов класса А в слюне и сыворотке крови больных наркоманией. Стоматология, (2008).
2. Н.М. Солодухина, М.А. Мягкова, Т.В. Амбраменко, И.А. Грицкова. Анализ Наркотических Веществ в Физиологических Жидкостях Человека Методом Латексной Агглютинации. Вестник МИТХТ, т. 6, №4, (2011).
3. A. B. Ruzilawati*, W. N. Wan Yusuf, N. Ramli, Z. Hussain, A. H. G. Rasool. Determination of Morphine in Human Urine by A Simple Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography Method with UV Detection. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research; 5(1): 18, (2013).
4. Мягкова М.А. Копоров Д.С. Морозова В.И Паршин А.Н. Абраменко Т.В. Панченко О.Н. № 3 – С. 82-84, (2004).
5. Мягкова М.А. Панченко Л.Ф., Наркология. № 6. (2004).
6. Anton P, Leff G., Mex. Pat. EP 1767221 A2 (2007), European Patent Application, Art.158(3) EPA. (2007).
7. K. V. Singh, Jasdeep Kaur, Grish C. Varshney, Manoj Raje, and C. Raman Suri. Molecules Bioconjugate Chem., 15, 168. (2004).
8. Р. Скоупс. методы очистки белков. «МИР», Москва, 197. 1985.
9. Laemmli, U. K. *Nature* 227(5259): 680, (1970).
10. Steven A., Cohen David J. Analytical Biochemistry, (1988). V.17.-№ 1. P.1

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ**СОРБЦИЯ ИОНОВ МЕДИ (II) И НИКЕЛЯ (II) НА АЗОТ-
И СЕРОСОДЕРЖАЮЩЕМ ПОЛИАМФОЛИТЕ****Хушвактов Суюн Юсуп угли**

науч. сотр., Национальный университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: xsuyunbek@mail.ru

Жураев Мурод Махмаражаб угли

науч. сотр., Национальный университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: murodjurayevkimyo@gmail.com

Сагдиев Наиль Жадитович

канд. хим. наук, доцент, Национальный университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: n_sagdiev@mail.ru

Бекчанов Давронбек Жумазарович

д-р хим. наук, доцент Чирчикского государственного педагогического института,
Узбекистан, Ташкентской обл., г. Чирчик
E-mail: bekchanov100987@mail.ru

Мухамедиев Мухтаржан Ганиевич

д-р хим. наук, проф., Национальный университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека,
Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: mmukhamediev@mail.ru

**SORPTION OF COPPER (II) AND NICKEL (II) IONS ON NITROGEN AND SULFUR
CONTAINING POLYAMPHOLITE****Suyun Xhushvaqtov**

research associate, National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
100174, Uzbekistan, Tashkent, Universitetskaja st, 4

Murod Jo'rayev

research associate, National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
100174, Uzbekistan, Tashkent, Universitetskajast, 4

Nail Sagdiev

candidate of chemical sciences, associate professor, National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
100174, Uzbekistan, Tashkent, Universitetskaja st., 4

Davronbek Bekchanov

doctor of chemical sciences, Chirchik State Pedagogical institute
111700, Uzbekistan, Tashkent, Chirchik, A. Temurst., 104

Mukhtarjon Mukhamediev

doctor of chemical sciences, professor, National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
100174, Uzbekistan, Tashkent, Universitetskajast, 4

АННОТАЦИЯ

В этой работе использовали азот- и серосодержащий полиамфолит на основе гранулированного поливинилхлорида. При статических условиях изучена закономерность сорбции ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} на азот и серосодержащем полиамфолите. На основании результатов исследования рассчитаны термодинамические параметры процесса сорбции: изменения значений свободной энергии (ΔG), энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) системы.

ABSTRACT

Nitrogen and sulfur-containing polyampholyte based on granular polyvinyl chloride were used in this work. Under static conditions, the pattern of sorption of Cu^{2+} and Ni^{2+} ions on nitrogen and a sulfur-containing polyampholyte was studied. Based on the results of the study, the thermodynamic parameters of the sorption process are calculated: changes in the values of free energy (ΔG), enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) system.

Ключевые слова: поливинилхлорид, полиамфолит, сорбция, ионит, ионы меди и никеля, изотерма, кинетика, термодинамические параметры.

Keywords: polyvinylchloride, sulphocationite, cuprum and nickel ions, sorption, isotherm, kinetics, thermodynamic functions.

ВВЕДЕНИЕ

Гидрометаллургический способ разделения металлов широко используется в металлургической промышленности. Технологические растворы, образующиеся при извлечении металлов гидрометаллургическим методом, содержат ионы цветных и тяжелых металлов, такие как медь, никель, свинец и ртуть [1]. Сброс загрязненных этими металлами сточных вод вызывает ряд экологических проблем, которые требуют очищения их от токсичных ионов тяжелых металлов [2]. Для решения этой важной социальной и экологической проблемы существует несколько способов. Традиционные методы, такие как обратный осмос, нанофильтрация и электродиализ являются энергоемкими и производят большое количество отходов [3].

В последние годы наиболее рентабельным и экономически выгодным методом очистки сточных вод от токсичных ионов является метод ионного обмена, который наиболее часто используется для их удаления [4, 5]. В качестве ионообменных материалов используются различные искусственные и нерастворимые сорбенты [6]. Ионообменные материалы с комплексообразующими свойствами, относящиеся к классу полиамфолитов, широко используются для концентрирования цветных металлов из технологических растворов. Эти материалы способны высокоэффективно отделять токсичные вещества даже из воздуха и водных сред при очень их низких концентрациях [7]. Комплексообразующие полимеры включают в себя также и сетчатые аминосulфоновые сополимеры, которые обладают высокой сорбционной способностью и селективностью по отношению к ряду тяжелых и цветных металлов. Это связано с полидентатностью полимерного комплекса и хелатным эффектом при образовании комплексов с участием amino- и сульфатных групп [8]. Полиамфолиты представляет собой полимерные вещества, которые одновременно содержат в своем составе как анионные, так и катионные группы, которые в зависимости от pH среды могут сорбировать катионы и анионы. При определенных условиях существуют формы, которые образуют внутреннюю соль полиамфолита. Из-за низкой осмотической ак-

тивности полианионов сорбент слабо гидратирован и обладает относительно слабыми гидрофильными свойствами.

В полиамфолитах анионные и катионные центры расположены в различных звеньях матрицы [9]. Существуют много теорий для оценки ионообменного процесса [10, 11].

В течение многих лет при моделировании различных изотерм равновесия Фриейндлих, Ленгмюр, Дубинин Радужкевич, Темкин и др. обращали внимание, в основном, на кинетический анализ и на изменения термодинамических параметров процесса [12, 13].

В приведенных выше данных по извлечению цветных металлов из растворов можно сделать вывод о необходимости синтеза новых высокоселективных полиамфолитов, содержащих сульфо- и аминогруппы.

В этой статье был использован серо- и азотсодержащий полиамфолит [14] на основе ПВХ для извлечения ионов цветных металлов из искусственных растворов. Изучено влияние различных факторов на процессы сорбции ионов Cu^{2+} и Ni^{2+} на полиамфолите.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте готовили растворы кристаллогидратов $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 0,5; 0,25; 0,125; 0,07; 0,05; 0,025; 0,0125 моль / л. Сорбцию ионов металлов на полиамфолите из приготовленных искусственных растворов, исследовали в течение 12 часов, при температурах 303, 313 и 313 К. Для этого сухой сорбент со статической обменной емкостью по отношению к HCl 4,58 мг-экв / г, и по отношению к NaOH равной 3,45 мг-экв / г взвесили на аналитических весах (0,3 г) и поместили в конические колбы объемом 250 мл и налили по 100 мл приготовленных солевых растворов. Изменения концентрации ионов металлов до и после сорбции изучали с помощью спектрофотометра (Micro plate rider Perkin Elmer) (США) [14].

Количество ионов металлов, поглощенных сорбентом, рассчитывали по следующему уравнению:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{m} \times V$$

Где: q_e - количество ионов металла, поглощенного в ионитом, ммоль/г, C_0 - начальная концентрация, ммоль/л; C_e - равновесная концентрация, ммоль / л; V - объем раствора, л; m - масса сухого сорбента (г).

Изучалось влияние концентрации ионов металлов в растворе, температуры и продолжительности

сорбции на процесс извлечения анализируемых веществ.

АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что гетерогенные химические процессы присоединения и замещения, протекающие с участием постоянного числа функциональных групп, при их рассмотрении, на базе закона действующих масс, характеризуются уравнениями, имеющими «ленгмюровские» свойства.

Рис. 1. Изотерма сорбции ионов меди (II) из модельных растворов при различных температурах (время - 12 ч.)

Рис. 2. Изотерма сорбции ионов никеля (II) из модельных растворов при различных температурах (время - 12 ч.)

Из рис. 1 и 2 видно, что при увеличении температуры количество поглощенных ионов меди (II) и никеля (II) возрастает. Возрастание адсорбции с увеличением температуры, в основном, наблюдается для хемосорбционных процессах. Следовательно, сорбция изучаемых ионов металлов протекает за счёт обмена между ионами натрия на катионите и ионами щелочноземельных элементов находящихся в растворе.

Для описания изотерм сорбции применено уравнение Ленгмюра в следующем виде:

$$q_e = q_{\max} \cdot \frac{K \cdot C}{1 + K \cdot C}$$

Где: K - константа равновесия адсорбции, а $q_{\max}$ - максимальная величина адсорбции для данной

температуры. Обычно для нахождения величин K и $q_{\max}$ уравнение Ленгмюра приводят к следующему виду:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{\max}} + \frac{B}{q_{\max}} \frac{1}{C}$$

Где: $B=1/C_e$.

Строят график зависимости $1/q_{\max}$ от $1/C_e$. Тангенс угла наклона данной прямой даёт значение $B/q_{\max}$, а отрезок отсекаемый от оси ординат величину $1/q_{\max}$. На рис. 3 и 4 приведены зависимости $1/q_e$ от $1/C_e$ для процесса сорбции ионов меди (II) и никеля (II) сорбентом при различных температурах.

Рисунок 3. Зависимость $1/q_e$ от $1/C_e$ для сорбции ионов Си(II) на полиамфолите

Рисунок 4. Зависимость $1/q_e$ от $1/C_e$ для сорбции ионов Ni (II) на полиамфолите

Термодинамические функции были определены из зависимости констант равновесия от температуры: $\Delta G = -RT \ln K$. Исходя из того, что $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, находили значения ΔH и ΔS . Для этого строили график зависимости $R \ln K$ от $1/T$. Из тангенса угла наклона этой прямой рассчитывали

ΔH , а ΔS рассчитывали из уравнения: $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$.

Используя вышеприведенные уравнения рассчитаны значения термодинамических параметров.

Таблица 1.

Константа равновесия сорбции ионов Cu (II) и Ni (II) на полиамфолит и изменения термодинамических функций

Ионов металлы	T, К	$q_{\max}$, ммоль/г	K, л/моль	$-\Delta G$, Дж/моль	$-\Delta H$, Дж/моль	$-\Delta S$, Дж/моль·К
Cu	303	1,6987	22,397	7831	1154	22,04
	313	1,8226	22,429	8094		22,17
	323	1,9563	25,623	8710		23,39
Ni	303	2,381	20,282	7582	1085	21,44
	313	2,451	22,653	8120		22,47
	323	2,5891	24,189	8556		23,1

Из таблицы видно, что отрицательные значения изменения свободной энергии и энтропии системы и положительное значение изменения энтальпии показывает, что поглощение ионов меди (II) и никеля (II) полиамфолитом протекает самопроизвольно. Увеличение $1/q_{\max}$ и констант равновесия сорбции с возрастанием температуры показывает, что поглощение ионов металла на полиамфолит протекает за счёт химической сорбции. Положительное значение изменения энтальпии показывает, что процесс хемосорбции протекает за

счёт ионного обмена между ионами натрия в полиамфолите и ионами меди (II) и никеля (II) в растворе.

Из полученных данных видно, что с помощью азот- и серосодержащих полиамфолитов можно селективно извлекать ионы цветных металлов из технологических растворов металлургических комбинатов, а также улучшить экономическую эффективность и решить ряд экологических проблем, связанных с загрязнением окружающей среды.

Список литературы:

1. Dundar M., Nuhoglu C. and Nuhoglu Y. Biosorption of Cu(II) ions onto the litter of natural trembling poplar forest // Journal of Hazardous Materials. - 2008;151.-С. 86–95.
2. Мамяченков, Сергей Владимирович Исследование гидрометаллургических процессов в многокомпонентных системах производства вторичных цветных металлов // Дис... док. тех.наук. – Екатеринбург, 2008. - С. 20-25.
3. Ayoub G.M., Semerjian L., Acra A., E.I. Fadel M. and Koopman B. Heavy Metal Removal by Coagulation with Seawater Liquid Bittern // Journal of Environmental Engineering - 2001;127. – С. 196–202.
4. Gadd G.M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment // Journal of Chemical Technology. - 2009;84. – P. 13–28.
5. Thompson H.S. «On the Absorbent Power of Soils». The Journal of the Royal Agricultural Society of England - 2011. – P. 68-75.
6. Clifford D.-A. Ion Exchange and Inorganic Adsorption. Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies (5th ed.), American Water Works Association, McGraw-Hill, New York, 1999.
7. Лейкин Ю.А., Мясоєдов Б.Ф., Лосев В.В., Кириллов Е.А. Модифицированные сорбенты для селективного извлечения аммиака и его производных. // Хим. Физика. - 2007. - Т. 26. № 10. - С. 18–33.
8. Brown, C.-J., Sheedy, M.: A new ion exchange process for softening high TDS produced water, SPE/Petroleum Society of CIM/CHOA, Technical Paper No 78941, Eco-Tec Inc., 2002
9. Лейкин Ю.А. Исследование в области химии комплексобразующих фосфорсодержащих полимеров трехмерной структуры // Дис.... доктора хим. наук. - М.: МХТИ им. Д.И. Менделеева, 2009.- 440 с.
10. Keno David Kowanga, Erastus Gatebe, Godfrey Omare Mauti, Eliakim Mbaka Mauti Kinetic, sorption isotherms, pseudo-first-order model and pseudo-second-order model studies of Cu(II) and Pb(II) using defatted Moringa oleifera seed powder // The Journal of Phytopharmacology - 2016; 5(2). – P.71-78.
11. Нецкина О.В. Адсорбция из растворов на твёрдой поверхности. – Новосибирск, 2015. – С.3-15.
12. Foo K.Y., Hameed B.H.: Insights into the modeling of adsorption isotherm systems // Chemical Engineering Journal. - 2010, 156(1). – P. 2-10.

13. Rengaraj S., Yeon J.-W., Kim Y., Yongju J. Adsorption characteristics of Cu(II) onto ion exchange resins 252H and 1500H: Kinetics, isotherms and error analysis // Journal of Hazardous Materials. - 2007, 143(1–2). –P. 469-477;
14. Bekchanov D.J. , Mukhamediev M.G. , Sagdiev N.J. Study sorption of heavy metals nitrogen and phosphorus containing polyampholytes // American Journal of Polymer Science. 2016, № 6. (2). – P. 46-49.

ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗИРОВАННОГО АЗОТ И ФОСФОРСОДЕРЖАЩЕГО ТИОКОЛОВОГО ОЛИГОМЕРА

Нормуродов Бахтиёр Абдуллаевич

ст. науч. сотр., Термезский государственный университет,
Узбекистан, г. Термез
E-mail: sh_kasimov@rambler.ru

Тураев Хайит Худайназарович

д-р хим. наук, профессор, Термезский государственный университет,
Узбекистан, г. Термез
E-mail: hhturaev@rambler.ru

Набиев Дилмурод Абдуалиевич

преподаватель, Термезский государственный университет,
Узбекистан, г. Термез

Суюнов Жаббор Рўзиевич

преподаватель, Термезский государственный университет,
Узбекистан, г. Термез

Хайиталиева Хурсандой Абдулла кизи

студент химического факультета, Термезский государственный университет,
Узбекистан, г. Термез

RESEARCH OF SYNTHESIZED NITROGEN AND PHOSPHORUS-CONTAINING THIOL OLIGOMER

Bakhtiyor Normurodov

Senior researcher, Termez State University,
Uzbekistan, Termez

Hayit Turaev

Doctor of Chemical Sciences, Professor, Termez State University,
Uzbekistan, Termez

Dilmurod Nabiev

Lecturer, Termez State University,
Uzbekistan, Termez

Jabbor Suyunov

Lecturer, Termez State University,
Uzbekistan, Termez

Hursanday Khayitalieva

student of the Faculty of Chemistry, Termez State University,
Uzbekistan, Termez

АННОТАЦИЯ

Данное статье изучена физико-химические свойства: плотности, температуры плавлений, растворимости синтезированного сера-, азот и фосфорсодержащего тиоколового олигомера на основе тетрасульфид натрия и полифосфата аммония. Состав и термические характеристики тиоколового олигомера были исследованы методами ИК спектроскопии и дифференциального сканирующего калориметрии.

ABSTRACT

In this work we studied the physicochemical properties: density, melting point, solubility of the synthesized sulfur, nitrogen and phosphorus-containing thiokol oligomer based on sodium tetrasulfide and ammonium polyphosphate. The composition and thermal characteristics of the thiokol oligomer were studied by IR spectroscopy and differential scanning calorimetry.

Ключевые слова: фосфорсодержащий олигомер, азотсодержащие соединения, вязкость, олигомеры.

Keywords: phosphorus-containing oligomer, nitrogen-containing compounds, viscosity, oligomers.

Введение. Тиоколовых олигомеры представляют несомненный интерес для разработки герметизирующих и защитных покрытий. Потребление герметизирующих материалов в строительстве на сегодняшний день достигает 50% от общего объема их производства [1, с. 23]. В последнее время широкое распространение приобретают герметизирующие материалы на основе реакционноспособных олигомеров. Особое место среди них занимают герметики на основе жидкого тиокола. В настоящее время существует множество новых методов синтеза тиоколовых олигомеров и их модифицированных аналогов [2, с.301].

Введение в состав молекулы тиокола фрагментов реакционноспособных соединений приводит к существенному увеличению адгезионного взаимодействия с субстратами, а также к повышению прочностных характеристик и химической стойкости отвержденных материалов. Это позволяет значительно расширить области практического применения модифицированных олигомеров [2, с. 302; 3, с.194].

В целом комплекс свойств наполненных полимеров определяется совместным действием ряда факторов, наиболее значимыми из которых являются: природа термопласта и наполнителя, форма и размер частиц наполнителя, взаимное расположение частиц наполнителя и изменение их локальной

плотности по объему образца, концентрация наполнителя [4, с.40].

Данная работа посвящена получению эффективных наполнителей на основе сера-, азот и фосфорсодержащих олигомеров для полиэтилена. Поэтому модификация известных полимеров, разработка наполненных функциональными добавками полимерных композиционных материалов, либо смесевых композиций, является сегодня одним из приоритетных направлений в создании полимеров и композитов с прогнозируемыми свойствами.

Получение новых синтезированных высоконаполнительных добавок для полимерных материалов, обладающих высокой термостойкостью и огнезащитной эффективностью, стабилизации полимеров, экологически безопасных и экономичных на сегодняшний день является актуальной задачей.

Обсуждение полученных результатов. Были изучены физико-химические свойства: плотность, температура плавления, растворимость, ИК-спектроскопия и ДСК в сера-, азот- и фосфорсодержащими олигомерами. Данные физико-химических характеристик синтезированного высоконаполнительного олигомера марки NMA-5 (тетрасульфид натрия и полифосфата аммония с органическими галогенидами) представлены в табл.1.

Таблица 1.

Физико-химические показатели тиокол олигомера

Показатели	Тиокол олигомер
	NMA-5
Плотность, г/см ³ ГОСТ 15139-69	1,28
T _{пл} °C	124
η _{хв}	0,065
Растворимость	диметилформамид
Внешний вид и цвет	вязкое вещество коричневого цвета

На ИК-спектре NMA-5 в областях 2850-1470 см⁻¹ имеются полосы поглощения, подтверждающие наличие -CH₂- групп, и полосы поглощения в области 1650 см⁻¹, подтверждающие наличие в свободном состоянии -CONH₂ группы. ИК-спектр содержит полосы поглощения в области 3400 см⁻¹, соответствующие первичным -CONH₂ группам и полосы поглощения в областях 3300-3440 см⁻¹, соответствующие вторичным -CONHR группам. Деформационные колебания всех активных групп проявляются в виде сильных узких полос между обычными полосами деформационных колебаний -CH₂-CO- в

области 1400 – 1465 см⁻¹. Полосы поглощения в областях 800 и 1600 см⁻¹, подтверждают наличие -NH₂ групп. Наличие групп, содержащих фосфор P=O и P-O-C в области 1000–1180 см⁻¹, подтверждает широкая интенсивная полоса и серосодержащие соединения в областях 400-900 см⁻¹, 1040-1060 см⁻¹ и 1100-900 см⁻¹.

Кроме того, на ИК-спектроскопии в областях 600-800 см⁻¹ и 1460 см⁻¹ появляются узкие малоинтенсивные полосы, содержащие связи серосодержащего соединения. При рассмотрении ИК-спектров NMA-5 наблюдается сильная интенсивная

-CH₂-N- группа с показателями 1400-1440 см⁻¹ и органические фосфаты 1180 см⁻¹ -1150 см⁻¹ (Рис.1).

Исследование влияния олигомеров на процесс ДСК сера-, азот- и фосфорсодержащий олигомер марки NMA-5. Масса образца NMA-5 не меняется до 216 °С. На кривой ДСК в этом температурном диапазоне 20 -210°С наблюдаются три эндотермических пика (106, 151 и 194°С), что соответствует

двум фазовым переходам (структурным перестройкам) и плавлению образца. Выше температуры 216°С образец начинает разлагаться в два этапа – до 275°С со скоростью 5%/мин, потерей массы 29.32%, и выше 280°С со скоростью 2.5%/мин, потерей массы 34.23%. Первый этап разложения – экзотермический (Энергия 39.7 J/g), второй эндотермический (Энергия -28.3 J/g). Рис.2.

Рисунок. 1. ИК-спектр сера-, азот- и фосфорсодержащий олигомер марки NMA-5

Рисунок. 2. ДСК сера-, азот- и фосфорсодержащий олигомер марки NMA-5

Выводы. Таким образом, характеристические свойства сера-, фосфор- и азотсодержащего олигомера были определены методом ИК-спектроскопии и ДСК, в результате лабораторных испытаний и можно предложить, благодаря высоких термических

устойчивости что олигомер может быть использован в качестве высоконаполнительных добавок для полимерных материалов и компонента тиоколовых герметиков.

Список литературы:

1. Нормуродов Б.А. Синтез модифицированных тиоколовых олигомеров на основе местного сырья и их применение / автореферат дисс. на. соиск. степ. доктора философии по т.н. по спец. 02.00.14., Термез, 2019. – 44, с. 23.
2. Хакимуллин Ю.И. Герметики на основе полисульфидных олигомеров: синтез, свойства, применение / Ю. И. Хакимуллин, В. С. Минкин. Ф. М. Малютин [и др.] - М.: Наука, 2007.- С.301.
3. Deryagina E. N., Levanova E. P., Grabel'nykh V. A., Sukhomazova E. N., Russavskaya N. V., Korchevin N. A. Thiylolation of Polyelectrophiles with Sulfur in Hydrazine Hydrate Amine Systems // Russian Journal of General Chemistry, - 2005, -V.75, -I. 2, p.194 -199.
4. Шостак Т. С., Будащ Ю. А., Пахаренко В. В., Сташкевич И. А., Пахаренко В. А. Композиции на основе ПЭ, наполненные алюмосиликатом//Пластические массы, 2011.№4 .С. 39-43.

СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО МОДИФИЦИРОВАННОГО КРАХМАЛА И ПОЛИМЕРОВ

Жумаев Жаббор Хамрокулович

ассистент Бухарский инженерно-технологический института,
Республика Узбекистан, г Бухара

Шарипова Насиба Уктамовна

ассистент Бухарский инженерно-технологический института,
Республика Узбекистан, г Бухара

STRUCTURAL –MECHANICAL CHARACTERISTICS OF COMPOSITIONS BASED ON ELECTROCHEMICAL MODIFIED STARCH AND POLYMERS

Jabbor Jumayev

Assistant of Bukhara Institute of Engineering and Technology,
Uzbekistan, Bukhara

Nasiba Sharipova

Assistant of Bukhara Institute of Engineering and Technology,
Uzbekistan, Bukhara

АННОТАЦИЯ

В статье показано существенное изменение структурно – механических свойств систем загущающих составов созданных на основе электрохимический модифицированного рисового крахмала (ЭМК) от добавки такого полиакрилата, как унифлока, приведены результаты.

ABSTRACT

The article shows a significant change in the structural and mechanical properties of thickening systems created on the basis of electrochemical modified rice starch (EMC) from the addition of such polyacrylate as unifloc, the results are given.

Ключевые слова: унифлок, модифицированного рисового крахмала (ЭМК), микроцеллюлозы (МКЦ), крахмал, загустки, полиакрилат, гомополимер, сополимер, метакрил кислота, деструкции.

Keywords: uniflock, modified rice starch (EMC), microcellulose (MCC), starch, thickeners, polyacrylate, homo-polymer, copolymer, methacrylic acid, degradation.

Структурно-механические характеристики используют для оценки консистенции продукта как одного из основных показателей его качества. К ним относятся вязкость, прочность, пластичность, упругость. Пластическая прочность характеризует прочность структуры дисперсной системы при малых скоростях деформации, т.е. является реологическим показателем текучей фазы, синтезирующим влияние физико-механических и физико-химических свойств. [1]

В процессах набивки текстильных материалов загущающие полимерные составы претерпевают разные механические воздействия, при которых изменяются реологические свойства систем загущающих составов на основе электрохимический модифицированного рисового крахмала (ЭМК), микроцеллюлозы (МКЦ) и унифлока. Можно ожидать, что в силу реакции комплексообразования ЭМК и унифлока реологические свойства систем должны

подвергаться существенными изменениям. Включение в состав загустки ЭМК и МКЦ синтетического полимера, такого как унифлока приводит к существенному изменению структурно – механических свойств. Преимущество полиакрилатных композиций в качестве загущающего препарата заключается в его высоком адгезионном свойстве. Кроме того, полиакрилаты могут быть получены гомополимерного и сополимерного характера, с различными производными акриловой и метакриловой кислот, что позволяет комбинировать различное соотношение мономеров в полимерной молекуле и получать широкий спектр физических и химических свойств в синтезированном материале [3].

Изменение химического состава этих соединений позволяет широко варьировать их свойства, что значительно труднее осуществляется полимерами других групп. Поэтому в данной работе приводятся результаты экспериментального обоснования влия-

ния МКЦ и унифлока, входящего в состав загущающих композиций, на структурно – механические свойства растворов ЭМК. Растворы полимеров, в том числе крахмалов, не являются бесструктурными. Под структурой растворов понимают взаимное расположение молекул растворителя и полимера, кон-

формацию макромолекул, взаимодействие между макромолекулами полимера. О стабильности структуры можно судить по значениям степени тиксотропного восстановления, приведенными в таблице 1.

Таблица 1.

Предел текучести и степень тиксотропного восстановления растворов модифицированного крахмала с различным содержанием МКЦ и унифлока

Состав и содержание компонентов в растворе композиции			Предел текучести (Па)	Степень тиксотропного восстановления, %
ЭМК, %	МКЦ, %	Унифлок, %		
5	0,5	0,2	47,17	87,43
5	0,6	0,2	43,85	89,74
5	0,7	0,2	43,36	90,13
6	0,7	0,3	37,56	91,32
6	0,7	0,4	31,42	93,43
6	0,7	0,5	21,43	94,23
7	0,5	0,3	13,76	95,21
7	0,6	0,4	12,88	96,56
7	0,7	0,5	4,11	97,18

Из таблицы видно, что клейстеры ЭМК, содержащие МКЦ и унифлока, характеризуются более высокими значениями степени тиксотропного восстановления. Такое постепенное восстановление структуры и, следовательно, нарастание ее прочности происходит, не только когда система находится в покое, но и при течении системы со скоростью меньшей той, которая обусловила данную степень разрушения первоначальной структуры.

Однако, при обратном переходе от установившегося режима течения с высокой скоростью к течению с меньшей скоростью, происходит некоторое восстановление структуры и соответственно, эффективная вязкость и прочность структуры увеличивается и, чем больше содержание унифлока в системе, этот эффект более выражен.

Изучение зависимости вязкости систем и скорости деформации от напряжения сдвига 7% ных клейстеров ЭМК, содержащих МКЦ в диапазоне 0,5-0,8% и унифлока в диапазоне 0,2-0,5% показали, что все исследуемые растворы композиции являются псевдопластичными системами (рис. 1). При этом с повышением концентрации МКЦ от 0,5% до 0,8% и унифлока от 0,2 до 0,5% ных клейстерах ЭМК наблюдается существенное изменение структурно-механических свойств крахмальных клейстеров.

Как показали результаты исследований при изучении зависимости предела текучести водорастворимых полимерных композиций, хорошие результаты получены в случае применения загущающих композиций, содержащих одновременно ЭМК, МКЦ и унифлока. Пластическая прочность вторичной структуры полимерной композиции определялась через напряжение сдвига P_m . Результаты отражены в рисунке 2

Рисунок 1. Зависимость предела текучести композиции от концентрации унифлока.
 Загустки на основе: 1-ЭМК; 2- МКЦ; 3- ЭМК-МКЦ

Из рис. 2. виден плавный ход и отсутствие минимумов на кривых зависимости P_m от состава композиции, что свидетельствует о хорошей совместимости загустителей независимо от их соотношения в смеси (кривая 1) и независимо от добавок и компонентов печатной краски (кривая 2). Наличие хорошей совместимости подтверждается также высокой стабильностью получаемых смесей. Из представленных данных видно, что по характеру реологических кривых клейстер ЭМК без добавления МКЦ и унифлока можно отнести к упруго-хрупким или эластично-хрупким твердообразным системам, для описания структурно-механических свойств, которых обычно используют такие характеристики, как модули упругости и вязкость упругого последствия. Растворы крахмалопродуктов, которые долго стояли, способны к старению в силу явлений ретрогра-

дации и биологического разложения. Способность к ретроградации чрезвычайно сильно проявляется у растворов чистой амилозы, которая со временем агрегируется и наконец образует нерастворимый микрокристаллический осадок [4].

В заключении следует отметить что, при малом содержании унифлока как синтетического компонента композиции в полимерной системе он сам не может образовывать надмолекулярную структуру, но оказывает влияние на процесс ее формирования. В свою очередь знание закономерностей формирования надмолекулярных структур позволяет целенаправленно формировать физико-механические свойства пленкообразующих полимеров.

Рисунок 2. Зависимость пластической прочности P_m вторичной структуры полимерной композиции от концентрации унифлока.
 Загустки на основе: 1- ЭМК; 2- МКЦ; 3- ЭМК-МКЦ

Список литературы:

1. Mali, S.; Grossmann, M. V. E.; Garcia, M. A; Martino, M. N. and Zaritzky, N. E. Microstructural characterization of yam starch films. Carbohydrate Polymers, 2002, 50, 379-386.
2. H. Panda. The Complete Technology Book On Starch And Its Derivatives// New-Delhi.: Asia Pacific Business Press Inc. 2004.- 465 p.
3. Weber H., Ströhle J. Современное состояние технологий предварительной и последующей обработок тканей.// Текс.пром., 1997. №3. С.7-9.
4. Wulff G., Kubic S. Helical amilose complexes with organic complexands. Microcalorimetrik and circular dichroitic investigations. «Macromol. Chem.», 1992, 193, №5, p. 1071-1080.

КОЛЛОИДНАЯ ХИМИЯ

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ТЕПЛОТА И ИЗОТЕРМА АДсорбЦИИ ОКСИДА УГЛЕРОДА
В ЦЕОЛИТАХ ТИПА NH₄ZSM-5*Кулдашева Шахноза Абдулазизовна**ведущий научный сотрудник, д.х.н., Институт общей и неорганической химии АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент**Абдулхаев Толибжон Долимжонович**базовый докторант Наманганского инженерно-технологического института,
Узбекистан, г. Наманган
E-mail: abdulxayev_1987@mail.ru**Рахматкариева Фируза Гайратовна**ст. научный сотрудник, PhD, Институт общей и неорганической химии АН РУз,
Узбекистан, г. Ташкент*DIFFERENTIAL HEAT AND ISOTHERM OF CARBON OXIDE ADSORPTION IN ZEOLITES
OF TYPE NH₄ZSM-5*Shakhnoza Kuldasheva**institute of General and Inorganic Chemistry, Academy of Sciences, Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent**Tolibdjon Abdulkhaev**PhD researcher, Namangan engineering technological institute,
Uzbekistan, Namangan**Firuz Rakhmatkarieva**institute of General and Inorganic Chemistry, Academy of Sciences, Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent*

АННОТАЦИЯ

Измерены изотерма, дифференциальные теплоты, энтропия и термокинетика адсорбции диоксида углерода в цеолите NH₄ZSM-5 при температуре 303K с помощью адсорбционной калориметрии. Среднемольная интегральная энтропия адсорбции аммиака в NH₄ZSM-5 -5,82 Дж/моль*К, откуда следует, что подвижность адсорбированных молекул аммиака заметно ниже, чем у молекул аммиака в жидкости. Изотерма адсорбции описана трехчленным уравнением теории объемного заполнения микропор (ТОЗМ).

ABSTRACT

Isotherm, differential heats, entropy and thermo kinetics of carbon dioxide adsorption in NH₄ZSM-5 zeolite at 303K have been measured by means of adsorption calorimetry. The mean molar integral entropy of ammonia adsorption in NH₄ZSM-5 is - 5,82 J / mol*K, the mobility of adsorbed ammonia molecules is noticeably lower than that of ammonia molecules in liquid. The adsorption isotherm is quantitatively reproduced by three-term VOM theory equations.

Ключевые слова: Дифференциальные теплоты, цеолит NH₄ZSM-5, диоксид углерода, адсорбционная калориметрия.

Keywords: Differential heats, NH₄ZSM-5 zeolite, carbon dioxide, adsorption calorimetry.

Энергия адсорбции газов и паров важна для понимания интересных данных и практических

процессов, происходящих при адсорбционном поглощении различных адсорбентов, а также для

сбора, систематизации и стандартизации наиболее важных термодинамических свойств гетерогенных систем.

Различный адсорбционный нагрев и другие дифференциальные свойства энергии адсорбции (энтальпия, свободная энергия и энтропия) полностью характеризуют физическую, химическую, кристаллохимическую и геометрическую природу поверхности адсорбента и позволяют проводить молекулярно-структурные исследования адсорбционных явлений.

Одним из высокоэффективных катализаторов для различных процессов в нефтехимической и нефтеперерабатывающей промышленности является цеолит типа ZSM-5. Многочисленные данные по адсорбции оксида углерода в цеолитах типа ZSM-5 были получены различными физико-химическими методами исследования [1,2,3]. Авторы изучали адсорбцию CO₂ в катионообменных формах цеолита типа ZSM-5 [1,2].

Физико-химические свойства цеолитов, помимо других свойств, зависят от соотношения кремния и алюминия в их кристаллической структуре. Одним из наиболее интересных свойств цеолита является то, что его можно модифицировать, в результате чего образуются новые материалы с заданными свойствами. Благодаря своим полифоническим свойствам и широкому использованию практически во всех отраслях, интерес к цеолиту постоянно растет. Данные по адсорбции различных соединений цеолитов NH₄ZSM-5 очень распространены. Например, в этом исследовании была исследована адсорбция пропановой кислоты из водного раствора на образцах цеолита с высоким содержанием кремнезема, полученных с помощью современных нанотехнологий в American Zeolite International (знак: CBV 28014). В качестве адсорбентов использовался ксенол HZSM-5, а его модифицированной формой был NH₄ZSM-5 с соотношением SiO₂/Al₂O₃ 280. Адсорбция изучалась при температуре от 283 до 303 К. Повышение температуры адсорбции показало увеличение количества адсорбированной пропановой кислоты, и в измененной форме цеолита ZSM-5, помимо этой физической адсорбции, происходила химическая сорбция, включая молекулы кислоты. Было показано, что NH₄ZSM-5-цеолит, как и ожидалось, является лучшим адсорбентом пропановой кислоты по сравнению с цеолитом HZSM-5 с активными центрами при химическом контакте [4]. В этом исследовании измеряли дифференциальную теплоту адсорбции оксида углерода (IV) на цеолите NH₄ZSM-5 с кристаллической структурой, подобной структуре цеолита ZSM-5, но с более высоким соотношением, с использованием устройства вакуумной адсорбционной калориметрии высокого разрешения. Используемый в исследовании образец NH₄ZSM-5 имеет отношение Si/Al = 72,7.

Методы и объекты исследования.

Структурная формула цеолита NH₄ZSM-5, полученного в качестве объекта исследования: (NH₄)_{1.35}(Al_{1.35})(Si_{94.65})(O₁₉₂). Изучены адсорб-

ционные свойства молекул диоксида углерода на адсорбенте NH₄ZSM-5 в высоковакуумном адсорбционном дифференциально-калиброванном приборе ДАК-1-1А [5,6].

Адсорбент NH₄ZSM-5 сначала очищали при 4500° С в течение 8 часов в вакуумном насосе и при давлении 10⁻⁶ в цеолитном насосе. Диоксид углерода, полученный в виде адсорбата, также очищали с помощью соответствующих методов, то есть с помощью различных адсорбатов, очищенных с помощью стеклянных пробирок и подготовленных для эксперимента в сухом газе. Исследования проводились на высоковакуумном адсорбционном устройстве объемным методом.

Результаты и обсуждения. Изотермы адсорбции измеряли объемным методом. Адсорбция CO₂ при деколонизации NH₄ZSM-5 показана на рисунке 1, а объем адсорбции выражен в ммоль / г, а изотермический индекс выражен в ln (P / P₀).

Рисунок 1. Изотерма адсорбции CO₂ при 303 К в цеолите NH₄ZSM-5. D- экспериментальные значения

Из линий изотермы адсорбции видно, что молекулы CO₂ на деколонизацию NH₄ZSM-5 первоначально демонстрируют постепенное увеличение до 0,75 ммоль/г по прямой линии до ~1,5 ммоль/г. Мы можем видеть, что индекс изотермы адсорбции составляет -16,20 при небольшом насыщении. Постепенное увеличение изотерм адсорбции до 0,75 ммоль/г можно объяснить проникновением молекул диоксида углерода в цеолитные каналы с последующим насыщением цеолита по прямой линии. Когда скорость адсорбции составляет α-1,41 ммоль/г, давление составляет P = 609 мм.

Изотерма адсорбции CO₂ для NH₄ZSM-5 была описана с использованием двухслойной теории объемного насыщения микробов (ТОЗМ) [5].

$$a = 10,12 \exp[(A/22,09)^2] + 11,92 \exp[(A/12,19)^5],$$

a - адсорбция в микроволнах (ммоль / г), $A = RT \ln (P_0 / P)$ - работа со свободной энергией (кДж / моль).

Рисунок 2. 2-расм. $\text{NH}_4\text{ZSM-5}$ цеолитида 303 К да CO_2 адсорбция дифференциал теплотаси

Адсорбция диоксида углерода (Q_d) на ксенолите $\text{NH}_4\text{ZSM-5}$ является постепенной с дифференциальной тепловой кривой. На рис.2 показана разность теплоты адсорбции CO_2 (Q_d) на $\text{NH}_4\text{ZSM-5}$ при 303 К. Непрерывные прямые 303 К ($\Delta H_v = 27$ кДж / моль) Приведена теплота конденсации оксида углерода (IV). Для этого ксенолита Q_d начинается с $\sim 62,98$ кДж / моль со скоростью адсорбции 0,01 ммоль / г.

Сначала дифференциальная тепловая кривая уменьшается с 62,98 кДж/моль до 53,73 кДж/моль адсорбции (a) до 0,14 ммоль/г. Тогда адсорбционная теплота продолжит уменьшаться. Третий участок составляет $\sim 50,76$ кДж/моль до 0,24 ммоль/г. Последующая адсорбция происходит в несколько этапов до 0,86 ммоль/г, и тепло адсорбции постепенно уменьшается. Нагрев на этих этапах заключается в следующем. $A = 0,86$ ммоль/г со снижением от 50,76 до 49,54 кДж / моль, от 49,54 до 48,81 кДж/моль, от 48,81 до 47,21 кДж/моль и от 47,21 до 43,11 кДж/моль.

Кроме того, тепло продолжает снижаться до 43,11 кДж/моль до 0,96 ммоль/г. Затем адсорбция CO_2 протекает с тепловой мощностью от 35,75 кДж/моль до $= 1,10$ ммоль/г. Кроме того, тепло уменьшается до $= 1,39$ ммоль/г с 30,40 кДж/моль до температуры конденсации 27,31 кДж/моль. Длина этих сегментов находится в разных кристаллографических положениях цеолита $\text{NH}_4\text{ZSM-5}$ и связана с числом катионов аммония, ранее обнаруженных при адсорбции метанола [6]. На основании полученных данных можно сделать

вывод, что молекула CO_2 0,86 ммоль/г координирована вокруг катионов NH_4 (I), а молекулы CO_2 - до 1,39 ммоль/г вокруг катионов NH_4 (II).

Дифференциальную молярную энтропию адсорбции диоксида углерода в ксенолите $\text{NH}_4\text{ZSM-5}$ рассчитывали по уравнению Гиббса-Гельмгольца с использованием изотерм и дифференциальной теплоты адсорбции. На рис. 3 показана дифференциальная энтропия адсорбции газа CO_2 (ΔS_d) $\text{NH}_4\text{ZSM-5}$ при 303 К. В начальном процессе адсорбции SO_2 энтропия наблюдается в жидкой форме. В общем, газообразные молекулы CO_2 находятся в энтропии жидкого состояния в начале адсорбции и до тех пор, пока адсорбция не достигнет 1,25 ммоль/г. Начальная адсорбционная энтропия достигает $\sim -13,78$ Дж/моль * К. Средняя молярная интегральная энтропия адсорбции составляет 15,24 Дж/моль * К и намного ниже, чем у жидкой двуокиси углерода, что указывает на состояние локализации молекул CO_2 в матрице цеолита.

График времени равновесия для адсорбции молекул газа CO_2 к цеолиту $\text{NH}_4\text{ZSM-5}$. Сначала время равновесия велико, т.е. равновесие достигает 9 часов. Скорость адсорбции составляет 0,01 ммоль/г. В этом случае время равновесия больше для распределения молекул газа CO_2 по цеолитным каналам. Затем наблюдается, что время равновесия резко уменьшается от одного часа до нескольких минут.

Закключение. Адсорбция показывает постепенное прогрессирование кривых дифференциальной теплоты за счет адсорбции молекул диоксида углерода на катионах NH_4^+ в цеолитных каналах на основе стехиометрических закономерностей. В общей сложности 1,41 ммоль/г диоксида углерода адсорбируется на цеолитных каналах $\text{NH}_4\text{ZSM-5}$. Энтропия адсорбции молекул диоксида углерода в изоците $\text{NH}_4\text{ZSM-5}$ находится в жидком и газообразном состоянии. Начальное время равновесия адсорбции велико, за которым следует постепенное уменьшение времени равновесия. Насыщение цеолита до CO_2 можно объяснить сокращением времени равновесия и взаимодействием молекул арсорбата с адсорбцией.

Список литературы:

1. Wang J.C., Yang Y.C., Ma Y.N., Li H.D., Tang T.D. //Proc. 7-th Int.Zeolite Conf., Tokyo, Aug.17-22, 1986.- Tokyo: Amsterdam, 1986. -P.555-562.
2. Bas Delphine, Goursot Annick, Weber Jacques, Wesolowski Tomasz // Chimia 2004, N 7-8, -v.58, -P.471
3. Sillar Kaido, Burk Peeter. Adsorption of carbon monoxide on LiZSM-5 : Theoretical study of complexation of Li^+ cation with two CO molecules. //Phys. Chem. Chem. Phys. 2007 9, №7, c. 824-827.
4. S. Sladojevic, J. Penavin-Skundric, and others. Adsorption of propane acid on high-silica ZSM-5 zeolites of nanostructure dimensions // Glasnik hemičara,tehnologa i ekologja Republike Srpske, 9 (2013) 1-9
5. B.F. Mentzen, G.U. Rakhmatkariev. Host/Guest interactions in zeolitic nanostructured MFI type materials: Complementarity of X-ray Powder Diffraction, NMR spectroscopy, Adsorption calorimetry and Computer Simulations // Узб. хим. журнал. 2007, №6, С. 10-31.
6. Абдулхаев Т.Д., Кулдашева Ш.А., Якубов Й.Ю. Взаимодействие молекул метанола с активными центрами и каналами цеолита $(\text{NH}_4)_{1,35}\text{ZSM-5}$ // UNIVERSUM Химия и биология, (Москва ,Россия), 2018, №8(62). - С.32-36.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИК-СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА СВЯЗУЮЩЕГО ДЛЯ АСФАЛЬТОВЫХ ДОРОГ ИЗ ЖИДКОГО НЕФТЕШЛАМА

Юсупов Фарход Махкамович

*д-р техн. наук, Институт общей и неорганической химии Академии Наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г. Ташкент*

Шукуруллаев Ботир Аманбоевич

*мл. науч. сотр., Институт общей и неорганической химии Академии Наук Республики Узбекистан,
Узбекистан, г. Ташкент*

RESULTS OF IR-SPECTRAL BINDING ANALYSIS FOR ASPHALT ROADS FROM LIQUID OIL SLUDGE

Farod Yusupov

*Doctor Science, Institute of General and Inorganic Chemistry of Uzbek Academy Science,
Uzbekistan, Tashkent*

Botir Shukurullaev

*Junior Researcher, Institute of General and Inorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent*

АННОТАЦИЯ

В статье приводятся результаты анализа ИК-спектра нефтешлама Мубарекского газоперерабатывающего комплекса. Согласно сложной химической группе, анализ ИК-спектра, привел к поглощению линий при 1600-1699 cm^{-1} , которые включали парафин, полициклические ароматические углеводороды, смолы и асфальтены.

ABSTRACT

The article presents the results of the analysis of the IR spectrum of oil sludge from the Mubarek gas processing complex. According to a complex chemical group, the analysis of the IR spectrum led to the absorption of lines at 1600-1699 cm^{-1} , which included paraffin, polycyclic aromatic hydrocarbons, resins, and asphaltenes.

Ключевые слова: нефтешлам, связующее, ИК-спектр, ароматические углеводороды, кривые колебания, сера.

Keywords: oil sludge, binder, IR spectrum, aromatic hydrocarbons, vibrational curves, sulfur.

Проблема использования нефтешламов актуальна как с экологической точки зрения, так и с использованием нефтяных отходов в качестве вторичного материального ресурса для получения полезных композиционных материалов.

Переработка нефтешлама с предварительным механическим разделением фаз экономически целесообразна, поскольку в качестве добавок в коксующихся или топливных продуктах используются большие количества органических веществ. Кроме того, в смесях, смешанных с угольной пылью, другими горючими веществами и отходами, нельзя использовать для строительных материалов без предварительной сепарации [1].

С учетом различных исследований в области использования нефтешламов была предложена схема создания сети промышленных предприятий по испытанию нефтешламов, а также строительных материалов и топливных продуктов. Такая линия в общем виде включает в себя следующие

технологические узлы: узел сбора и смешивания нефтешламов; устройство для испарения воды и легких углеводородных фракций; оборудование для испарения нежирных масел в результате конденсации; оборудование для дозирования и смешивания нефтешлама с отобранными горючими компонентами. Оборудование для естественной или технологической сушки смесей (приготовления сухого порошка); пресс или сушилка топливных брикетов; метание сухих строительных изделий (огнеупорных) [2-4]. В зависимости от конкретной задачи некоторые стадии процесса могут быть удалены или полностью заменены технологическим циклом.

По этой причине важной задачей является упрощение процесса получения связующих для асфальтового покрытия из жидких нефтешламов на основе новой технологии с легкой и не сложной конструкцией.

Обработка нефтешлама делится на термические, химические и биологические группы. Термическими методами использования нефтешлама являются сжигание, сушка, пиролиз и другие высокотемпературные процессы. Согласно данным, химическая обработка выбросов нефтешлама тепловыми методами является экономически эффективной. С учетом вышеизложенного разработана технологическая схема эффективной переработки нефтешлама.

Хорошо известно, что нефтешламы состоят из очень сложных компонентов, и использование современных аналитических методов в их исследованиях способствует лучшему исследованию продукта. Важное значение имеет использование инфракрасной спектроскопии при изучении компонентов нефтешламов. В настоящее время с использованием этого метода невозможно полностью идентифицировать структуру химической группы и индуцированные соединения очень сложных физико-химических соединений, но с использованием множества дополнительных методов (хроматография и по групповому химическому составу, инфракрасный и масс-спектры) можно сделать нужные и правильные заключения об исследуемых сложных соединениях.

В частности, метод ИК-инфракрасной спектроскопии определяет реакционные процессы при термическом анализе, наблюдая изменения качества, связанные с химическими циклами компонентов нефтешламов. В этом случае при сравнении инфракрасных спектров до- и постреакционных фракций можно дать четкое представление о поглощении химических изменений.

Использование жидких нефтешламов в качестве углеводородного сырья в технологии производства связующих для асфальтовых дорог требует глубокой переработки сжиженного топлива и производства промежуточных продуктов для нефтехимии. Согласно результатам разработки технологии для нефтешламовых смесей сохраняющих нефтяные ресурсы, температура окисления составляет около 250-260°C. Продолжительность окисления составляет 40-45 часов и расход воздуха на молярную массу составляет 45 гр/моль [5,6].

Процесс окисления обеспечивает процесс превращения нефтешлама в связующее для асфальтовых дорог. Непрерывная добыча нефтешлама и процесс окисления шлама осуществляются в интерактивном режиме, и их свойства сильно различаются. По результатам залежей нефти нефтепродуктами являются вода и механические примеси (в том числе вода, песок, глина, ржавчина и т. Д.). Соотношение варьируется в очень широком диапазоне. Углеводороды 5-90%, вода 1-52%, твердые отходы 0,8-65% результирующее изменение их состава также обусловлено их плотными химическими характеристиками. Плотность нефтешлама может составлять 93-1300 кг/м³. В нефти содержится 70-80% воды, масла

6-25%, асфальтена 7-20%, 1-4% парафина. Часто встречается в верхней части месторождения, от новообразованной глубины, до свойств хранимых натуральных нефтепродуктов. Это обычно происходит на автозаправках.

Использование жидкого нефтешлама в производстве связующих является одним из разумных способов достижения экологического и экономического эффекта.

Полученный спектр используется для сравнения результатов анализа и его элементов. Следовательно, согласно этой технологии, сырье превращается в комплекс нефтешламов, что дает им наиболее выгодное содержание углеводородов и требования для получения асфальтового битума и качественных связующих.

Проведен анализ компонентов в инфракрасной спектроскопии для определения качества связующих из местного нефтешлама и импортных нефтепродуктов для асфальтовых покрытий.

Экстракт нефтешлама был анализируем на ИК-спектре «ИК-20».

Жидкость для оптического экранирования использовалась в двухлучевом сменном светоизлучающем устройстве A4 площадью 9000-3400 см² A4 между кюветами.

На основе этой принципиальной схеме связующее нагревают до температуры 50-60°C и направляют в приводную колонну под атмосферным давлением. При нагревании колонны до 350°C из шлама отделяются легкие фракции и вода. Затем воздух подается для окисления. После завершения процесса получается кубовый остаток (связующее).

Используя анализ ИК-спектра нефтешлама, извлеченного из природной нефти, сильные линии поглощения при 2922 см⁻¹ и 2853 см⁻¹ можно различить по симметричным и антисимметричным колебаниям в соответствии с группой CH₂.

Поглощение линий 1461 см⁻¹, 1376 см⁻¹ и 749 см⁻¹ относится к колебаниям длинных парафиновых цепей CH₂-CH₂ и относится к метиленовой группе 1467 см⁻¹, при 1461 см⁻¹ к метильной группе.

Анализ ИК-спектра выявляет не только разницу в парафинах, циклопарафинах и тяжелых комплексных углеводородах, но и в менее значимой группе асфальтеновых углеводородов.

Основой вышеуказанных различий является линейное поглощение конденсированных углеводородов с линией 1040 см⁻¹, а интенсивность триплета 700-800 см⁻¹ отчетливо наблюдается в ИК-спектре композиции.

Наличие в составе свойств смолы напоминает спектры конденсированных бициклических ароматических углеводородов. Основное различие между ними заключается в поглощении кривых колебаний в спектрах смол, соответствующих требованиям групп C = O и -C - O - C -.

Рисунок 1. ИК-спектральный анализ нефтешлама Мубарекского газоперерабатывающего комплекса

Поглощение линий 1461 см^{-1} указывает на то, что масло содержит группу CO_2 , которая является дополнительным элементом. Присутствие серы в нефтешламе повышает устойчивость при ее использовании.

Поглощение линий 1603 см^{-1} обусловлено присутствием более мелких ароматических кольцевых структур, то есть присутствием соединений бензольного типа по поглощению линий 1703 см^{-1} .

Для определения качества компонентов масс-спектрального анализа и химических изменений в технологическом процессе был получен ИК-спектр веществ, входящих в состав нефтешлама

Мубарекского газоперерабатывающего комплекса. Как видно по результатам большой разницы между ними нет.

Согласно сложной химической группе, анализ ИК-спектра нефтешлама Мубарекского газоперерабатывающего комплекса, привел к поглощению линий при $1600\text{--}1699\text{ см}^{-1}$, которые включали парафин, полициклические ароматические углеводороды, смолы и асфальтены. Их результаты характеризуют $\text{C}=\text{O}$ карбонильные группы кислот, содержащихся в ароматических кислотах. Структура этих групп показывает, что в формировании дисперсионной фазы происходят сложные химические изменения.

Список литературы:

1. Рудин М.Г., Драбкин А.Е. Краткий справочник нефтепереработчика. - М.: Химия, 1989. - 382 с.
2. Баширов В. В. Способы переработки нефтешламов / В.В.Баширов, Д.М.Бриль, В.М.Фердман и др. // Защита окружающей среды. - М.: ВНИИОЭНГ, 1994. - 68с.
3. Дияров И.Н., Хамидуллин Р.Ф. Проблемы подготовки высоковязких нефтей и природных битумов к переработке / Сб.труд. Международной конференции "Нефть и битумы". - Казань. - 1994. - Том V. С. 1622-1626.
4. Захарова А.А., Бахшнева Л.Т., Кондауров Б.Д. др. Процессы и аппараты химической технологии. Под редакцией проф. А.А. Захаровой. -М: Издательский центр «Академия», 2006. - 645 с .
5. Шукуруллаев Б.А., Юсупов Ф.М., Бектурдиев Г.М. Сульфирование резервуарных нефтешламов Ангренского терминала с целью получения асфальтобитума.// Узбекистон химические журнал, 2012. №5, - С. 54-56.
6. Юсупов Ф.М., Нурмуродов Ж.Ш., Бектурдиев Г.М., Юсупов Ш.Ф., Тошматов Д.А., Б.А.Шукуруллаев. Новые поверхностно-активные вещества и другие химические реагенты для нефтегазовой и химической промышленности.//Монография. Издательство Навруз. Ташкент, 2018. 118с.
7. Шукуруллаев Б.А., Юсупов Ф.М., Байматова Г.А. К вопросу утилизации нефтяных шламов.//Узбекский журнал нефти и газа. 2018. №2, -С.60-62.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Научный журнал

**UNIVERSUM:
ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ**

Часть 1

№ 11(65)
Ноябрь 2019

Свидетельство о регистрации СМИ: ПИ № ФС 77 – 66239 от 01.07.2016
Свидетельство о регистрации СМИ: ЭЛ № ФС 77 – 55878 от 07.11.2013

Подписано в печать 05.11.19. Формат бумаги 60x84/16.
Бумага офсет №1. Гарнитура Times. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 5,25. Тираж 550 экз.

Издательство «МЦНО»
123098, г. Москва, улица Маршала Василевского, дом 5, корпус 1, к. 74
E-mail: mail@7universum.com
www.7universum.com

Отпечатано в полном соответствии с качеством предоставленного оригинал-макета в типографии «Allprint»
630004, г. Новосибирск, Вокзальная магистраль, 3

16+