

**TOSHKENT KIMYO-TEXNOLOGIYA INSTITUTI
HUZURIDAGI ILMIY DARAJALAR BERUVCHI
DSc.03/30.12.2019.T.04.01 RAQAMLI ILMIY KENGASH**

TOSHKENT KIMYO-TEXNOLOGIYA INSTITUTI

ZOKIROV BEKZOD ULASHEVICH

**TOPINAMBUR ILDIZ MEVASIDAN INULINAZA FERMENTI
YORDAMIDA KRISTALL FRUKTOZA OLIH**

02.00.14 - Organik moddalar va ular asosidagi materiallar texnologiyasi

**KIMYO FANLARI BO‘YICHA FALSAFA DOKTORI (PhD)
DISSERTATSIYASI AVTOREFERATI**

Toshkent - 2024

Falsafa doktori (PhD) dissertatsiyasi avtoreferati mundarijasi
Оглавление автореферата диссертации доктора философии (PhD)
Contents of dissertation abstract of doctor of philosophy (PhD)

Zokirov Bekzod Ulashevich

Topinambur ildiz mevasidan inulinaza
fermenti yordamida kristall fruktoza olish3

Зокиров Бекзод Улашевич

Получение кристаллической фруктозы из клубней
топинамбура с использованием фермента инулиназы 21

Zokirov Bekzod Ulashevich

Obtaining crystalline fructose from Jerusalem
artichoke tubers using the enzyme insulinase 41

E'lon qilingan ishlar ro'yxati

Список опубликованных работ
List of published works 45

**TOSHKENT KIMYO-TEXNOLOGIYA INSTITUTI
HUZURIDAGI ILMIY DARAJALAR BERUVCHI
DSc.03/30.12.2019.T.04.01 RAQAMLI ILMIY KENGASH**

TOSHKENT KIMYO-TEXNOLOGIYA INSTITUTI

ZOKIROV BEKZOD ULASHEVICH

**TOPINAMBUR ILDIZ MEVASIDAN INULINAZA FERMENTI
YORDAMIDA KRISTALL FRUKTOZA OLIH**

02.00.14 - Organik moddalar va ular asosidagi materiallar texnologiyasi

**KIMYO FANLARI BO'YICHA FALSAFA DOKTORI (PhD)
DISSERTATSIYASI AVTOREFERATI**

Toshkent - 2024

Falsafa doktori (PhD) dissertatsiyasi mavzusi O'zbekiston Respublikasi Oliy ta'lim, fan va innovatsiyalar huzuridagi Oliy attestatsiya komissiyasida B2023.4.PhD/K708 raqam bilan ro'yxatga olingan

Dissertatsiya Toshkent kimyo-texnologiya instituti bajarilgan.

Dissertatsiya avtoreferati uch tilda (o'zbek, rus, ingliz (резюме) (rezyume)) Ilmiy kengash veb-sahifasida (www.ttiame.uz) va «ZiyoNet» Axborot ta'lim portalida (www.ziynet.uz) joylashtirilgan

Ilmiy rahbar:	Xusenov Arslonnazar Shernazarovich kimyo fanlari doktori, professor
Rasmiy opponentlar:	Ikromov Abduvaxab texnika fanlari doktori, professor
	Atxamova Saida Quddusovna kimyo fanlari nomzodi, dotsent
Yetakchi tashkilot:	Buxoro muhandislik-texnologiya instituti

Dissertatsiya himoyasi Toshkent kimyo-texnologiya instituti huzuridagi DSc.03/30.12.2019.T.04.01 raqamli Ilmiy kengashning 2024 yil «___» _____ soat ___dagi majlisida bo'lib o'tadi. (Manzil: 100011, Toshkent shahar, Shayxontoxur tumani, A. Navoiy ko'chasi, 32, tel. (99871) 244-79-21, 244-79-17, faks: (99871) 244-79-17; e-mail: tsti_info@edu.uz.)

Dissertatsiya bilan Toshkent kimyo-texnologiya institutining Axborot-resurs markazida tanishish mumkin (___) raqami bilan ro'yxatga olingan). Manzil: 100011, Toshkent shahar, Shayxontoxur tumani, A.Navoiy ko'ch., 32. Tel.:(99871) 244-79-21.

Dissertatsiya avtoreferati 2024 yil «___»_____kuni tarqatildi.
(2024 yil «___»_____dagi № ___ raqamli reestr bayonnomasi).

S.M. Turobjonov
Ilmiy darajalar beruvchi ilmiy
kengash raisi, t.f.d., akademik

H.I. Kadirov
Ilmiy darajalar beruvchi ilmiy
kengash kotibi, t.f.d., professor

G. Raxmonberdiyev
Ilmiy darajalar beruvchi ilmiy
kengash qoshidagi ilmiy seminar
raisi, k.f.d., professor

KIRISH (falsafa doktori (PhD) dissertatsiyasi annotatsiyasi)

Dissertatsiya mavzusining dolzarbligi va zaruriyati. Bugungi kunda dunyo bo‘ylab 470 milliondan ortiq odam qandli diabet bilan kasallangan va har yili 2,1 million kishi bu kasallikdan vafot etadi. Qandli diabet ko‘rlik, buyrak etishmovchiligi, yurak hurujlari, insult va oyoq-qo‘llarning amputatsiyasining asosiy sabablaridan biri hisoblanib, diabetga chalinganlarning 70 % dan ortig‘i profilaktika va sog‘lom ovqatlanish imkoniyatiga ega emas. Shu bilan birga diabetga qarshi kurash va uning oldini olishda sog‘lom ovqatlanish, kasallikning oldini olish uchun turli xil xom ashyolardan, jumladan topinambur - yer nokidan olingan mevalar tarkibidagi fruktoza monosaxaridi asosida yangi profilaktik xususiyatli mahsulotlar ishlab chiqarish muhim ahamiyatga ega hisoblanadi.

Bugungi kunda jaxonda noan‘anaviy qishloq xo‘jalik xomashyosi topinambur (*helianthus tuberosus*) ni qayta ishlash, tarkibidagi qimmatli inulin moddasini ajratish bo‘yicha ilmiy izlanishlar olib borilmoqda. Bu borada inulinning chuqur gidrolizida samarali fermentlarini izlash, inulinning tabiiy inulinaza bilan fermentativ gidrolizi jarayoniga ta‘sir qiluvchi biologik omillarni aniqlash, Quddus artishok ildizlarini qayta ishlash, topinambur ildiz mevasidan inulinaza fermenti yordamida kristall fruktoza ishlab chiqarish texnologiyalarini yaratish va sinovdan o‘tkazishga alohida e‘tibor berilmoqda.

Respublikamizda topinambur o‘simligining mahalliy navlari yetishtirish, ularni funksional oziq-ovqat mahsulotlar tarkibiga kiritish, mahsulotlarning kimyoviy va organoleptik ko‘rsatkichlarini yaxshilash, inson organizmiga profilaktik ta‘sir etuvchi xususiyatlarni boyitish, shu jumladan topinambur asosida fruktoza ishlab chiqarish texnologiyasini takomillashtirish bo‘yicha bir qancha yutuqlarga erishildi. Yangi O‘zbekistonning taraqqiyot strategiyasida «ishlab chiqarish sohalarini rivojlantirish, sanoatni modernizatsiya va diversifikatsiya qilish, amaliyotga kam sarfli energiyatejamkor usullarni qo‘llash, import o‘rnini almashtiruvchi raqobatbardosh va eksport bob mahsulotlarni tayyorlash»¹ bo‘yicha muhim vazifalar belgilab berilgan. Bu borada, Respublikamizda yetishtirilgan noan‘anaviy qishloq xo‘jalik xomashyosi topinambur o‘simligi «Fayz baraka» va «Mujiza» navlari asosida ekologik toza va tabiiy mahsulot olishning resurstejamkor texnologiyasini yaratish, ularni qayta ishlash va xalq xo‘jaligi uchun zarur mahsulotlar olish muhim ahamiyatga ega.

O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2022 yil 28 yanvardagi PF-60-son «2022-2026 yillarga mo‘ljallangan yangi O‘zbekiston taraqqiyot strategiyasi to‘g‘risida»gi, 2019-yil 10-apreldagi PF-5707-son “2019-2021-yillarda respublika farmatsevtika tarmog‘ini yanada jadal rivojlantirish chora-tadbirlari to‘g‘risida”gi, 2022-yil 26-yanvardagi PQ-102-son “Endokrinologik xizmatni takomillashtirish va ko‘lamini kengaytirish chora-tadbirlari to‘g‘risida”gi farmon va qarorlari hamda mazkur faoliyatga tegishli boshqa me‘yoriy-huquqiy hujjatlarda belgilangan vazifalarni amalga oshirishda ushbu dissertatsiya tadqiqoti muayyan darajada xizmat qiladi.

¹ O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2022 yil 28 yanvardagi PF-60 «2022-2026 yillarga mo‘ljallangan yangi O‘zbekiston taraqqiyot strategiyasi to‘g‘risida»gi farmoni

Tadqiqotning respublika fan va texnologiyalari rivojlanishining ustuvor yo‘nalishlariga mosligi. Mazkur tadqiqot respublika fan va texnologiyalar rivojlanishining VII. «Kimyoviy texnologiyalar va nanotexnologiyalar» ustuvor yo‘nalishiga muvofiq bajarilgan.

Muammoning o‘rganilganlik darajasi. Topinambur ildiz mevasidan inulinaza fermenti yordamida kristall fruktoza olish bo‘yicha Bakushinskaya, O.A., Belova L.D., Bukanova V.I., Lozenko M.F., Semixatova N.M., Jiao J Zhan W. Xu, H., Liang, M., Xu, L., Li, H., Zhang, X., Kang, J., Yefremov A.S., Orlova A.V., Melnik I.M., Shenderov B.A., Bredixina V.A., Brovina F.Ya., Krivitskaya Ye.N., Potashev D.A., Rudnitskova T.A., Savchenko A.F., Mel’nik I.M., Yefimov A.S., Vanyutina L.T., Shenderov B.A., Manvelova N.A., Eyxe Ye.P. Raxmonberdiyev G. Abdurazakova S. X. Raximov D. Aminov S. Dodayev Q. va boshqalar ilmiy-tadqiqot ishlari olib borishgan.

Ular tomonidan topinambur ildizlarini kompleks qayta ishlashni tashkil etilgan, Quddus artishok ildizlarining tabiiy inulinazalari ta’sirida inulinning bo‘linishi ilmiy asoslangan, inulinning tabiiy inulinaza bilan fermentativ gidrolizi jarayoniga ta’sir qiluvchi biologik omillarni aniqlangan, kristall fruktoza olish tizimlari taklif etilgan.

Shu bilan birga, inulinning chuqur gidrolizida samarali bo‘lgan ferment preparatlarini topish, inulinaza fermentini kodlovchi tripletlarning faolligini va achitqi hujayralarida ekspressiya qilingan tabiiy inulinazalarni aniqlash, topinambur ildiz mevasidan inulinaza fermenti yordamida kristall fruktoza ishlab chiqarish texnologiyasini takomillashtirish yo‘nalishida ilmiy ishlar olib borilmoqda.

Tadqiqotning dissertatsiya bajarilgan ilmiy-tadqiqot muassasasining ilmiy-tadqiqot ishlari bilan bog‘liqligi. Dissertatsiya tadqiqoti Toshkent kimyo-texnologiya instituti ilmiy - tadqiqot ishlari rejasining №MU-PZ-20171025237 «Poliz ekinlaridan har xil maqsadlar uchun tsellyuloza olish» (2017-2020 yy.) mavzusidagi fundamental loyihasi doirasida bajarilgan.

Tadqiqotning maqsadi topinambur o‘simligining tunganagi tarkibidagi ekzoinulinaza (Ht-FEH I) fermentini sintezlash, tozalash va undan topinambur tunganagi sharbati tarkibidagi inulinni gidrolizlashda samarali foydalanishdan iborat.

Tadqiqotning vazifalari:

«Mo‘jiza» navli topinambur tunganagining genom DNKsini ajratib olish, Ht-FEH I inulinaza fermenti translatsiyasiga javob beruvchi genni Polimeraza zanjir reaksiyasi yordamida *in vitro* sintezlash

in vitro sintez qilingan Ht-FEH I genini pPICZ(alfa)A transfer vektoriga fosfodiefir bog‘lari orqali ulash

Ht-FEH I oqsilini *Pichia pastoris* GS-115 metilotrof achitqisida sintezlash

sintezlangan Ht-FEH I ekzoinulinaza fermentini ajratish va tozalashning eng maqbul sharoitlarni aniqlash

tozalangan va qayta modifikatsiyalangan Ht-FEH I ekzoinulinaza fermentining fizik-kimyoviy va kinetik xususiyatlarini o‘rganish

tuganakdan ultratovush (akustika), superkritik suyuqlik ekstraksiyasi va klassik usul yordamida erkin fruktoza va inulinni qiyosiy ajratish

sintezlangan ekzoinulinaza Ht-FEH I yordamida topinambur tunganagi sharbati tarkibidagi inulindan fruktoza monosaxaridini olish

Tadqiqot ob'ekti sifatida topinamburning mahalliy «Mo'jiza» navining tunganagi, inulin polisaxaridi va ketogeksoza - fruktoza monosaxaridi olingan.

Tadqiqotning predmetini *Pichia pastoris* GS-115 da ekspressiyalangan topinambur tunganaging rekombinant ekzoinulinaza Ht-FEH I fermenti tashkil etadi.

Tadqiqotning usullari. Dissertatsiya ishida DNK va oqsilni miqdoriy va sifat jihatidan aniqlashda organik va bioorganik kimyo usullaridan, oqsillarni ajratish va tozalashda spektrofotometriya, IFA, pH-metriya, usullaridan, HPLC kabi monosaxaridlarni miqdoriy va sifat jihatidan aniqlash Afin xromatografiyadan va boshqa usullardan foydalanilgan.

Tadqiqotning ilmiy yangiligi quyidagilardan iborat:

ilk bor «Mo'jiza» navli topinambur ildizidan rekombinant Ht-FEH I ekzoinulinaza geni klonlangan;

Pichia pastoris GS-115 metilotrof achitqi hujayralarida topinambur ildiz mevalaridan ajratib olingan rekombinant Ht-FEH I fermenti ekspressiyalangan;

Pichia pastoris GS-115 achitqi hujayralarida ekspressiya qilingan rekombinant Ht-FEH I ekzoinulinaza fermentini tozalashning maqbul parametrlari aniqlangan;

«Mo'jiza» navli topinambur ildizidan olingan rekombinant Ht-FEH I ekzoinulinaza fermentining fizik-kimyoviy va kinetik xossalari aniqlangan;

ultratovush, superkritik suyuqlik ekstraksiyasi va klassik usul yordamida topinambur ildizlaridan erkin fruktoza va inulin ajratilgan hamda ularning qiyosiy natijalari asoslangan;

ilk bor topinambur o'simligining «Mo'jiza» navi ildizidan toza holda ajratib olingan rekombinant Ht-FEH I ekzoinulinaza fermenti yordamida Inulindan kristalli fruktoza olingan.

Tadqiqotning amaliy natijalari quyidagilardan iborat:

topinambur o'simligining «Mo'jiza» navi ildizidan amplifikatsiyalangan Ht-FEH I genini ajratishning maqbul parametrlari aniqlangan;

Pichia pastoris GS-115 achitqi hujayralarida rekombinant Ht-FEH I ekzoinulinaza fermentini ekspressiyalash uchun optimal sharoitlar aniqlangan;

Pichia pastoris GS-115 achitqi hujayralarida sintez qilingan Ht-FEH I rekombinant fermentini tozalash uchun optimal sharoitlar tanlangan:

topinambur ildiz mevasidan inulinaza fermenti yordamida kristall fruktoza olish texnologiyasi ishlab chiqilgan.

Tadqiqot natijalarining ishonchliligi eksperimental natijalarni olishda yuqori aniqlikdagi pH-metrlar, elektron titrantlar, analitik tarozilar va zamonaviy fizik-kimyoviy, biokimyoviy usullar, zamonaviy kompyuter dasturlardan foydalanilganligi hamda mahalliy «Mo'jiza» topinambur navlari asosida fruktoza ishlab chiqarish jarayoniga joriy etilganligi bilan asoslanadi.

Tadqiqot natijalarining ilmiy va amaliy ahamiyati. Tadqiqot natijalarining ilmiy ahamiyati shundan iboratki, polimeraza zanjir reaksiyalari yordamida in vitro ekzoinulinaza fermentini sintezlash va uni ajratib olish va tozalash uchun maqbul sharoitlarni tanlashda; tozalangan fermentning fizik-kimyoviy va kinetik

hususiyatlarini o'rganish bilan izohlanadi.

Tadqiqot natijalarining amaliy ahamiyati shundan iboratki, hosil bo'lgan rekombinant Ht-FEH I ekzoinulinaza fermenti yordamida topinambur ildiz mevalari sharbati tarkibidagi inulin polisaxarididan fruktoza monosaxaridini sanoat miqyosida ishlab chiqarish, profilaktik xususiyatli mahsulotlari ishlab chiqarishning takomillashtirilgan texnologik sxemasi taklif qilinganligi bilan isbotlanadi.

Tadqiqot natijalarini joriy qilinishi. Topinambur ildiz mevasidan inulinaza fermenti yordamida kristall fruktoza olish texnologiyasi ishlab chiqish, topinambur sharbati tarkibidagi inulin gidrolizida samarali foydalanish bo'yicha olingan ilmiy natijalar asosida:

«Mo'jiza» navli topinambur o'simligidan ajratib olingan "*Komagataella pastoris* - BZ" achitqi shtammi Genetika va o'simliklar eksperimental biologiyasi institutining "Fitopatogen va boshqa mikroorganizmlar" noyob obekti kolleksiyasi genofondiga topshirilgan (O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi 2023 yil 4 dekabrda 4/1255-789-son ma'lumotnomasi). Natijada, fitopatogen mikroorganizmlar shtammlari kolleksiya genofondini boyitish, xilma-xilliklari elektron ba'zasi axborot tahlil tizimini shakllantirish imkonini bergan;

ajratib olingan "*Komagataella pastoris*-BZ" achitqi shtami Jahon mikroorganizmlar ma'lumotlar markazining Patogen Mikroorganizmlar Milliy kolleksiyasining (World Data Center for Microorganism (WDCM) Collection of plant pathogenic and other microorganisms) ma'lumotlar bazasiga GEPB WDCM 1228-raqami (http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/1228/) orqali ro'yxatdan o'tkazilgan (O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi 2023 yil 4 dekabrda 4/1255-789-son ma'lumotnomasi). Natijada, dunyoning turli mintaqalarida *Komagataella pastoris* - BZ achitqisini tadqiq qilishda global doirada foydalanish imkonini bergan;

Rekombinant ekzoinulinazani (Ht-FEHI) kodlaydigan gen ketma-ketligi NCBI xalqaro ma'lumotlar bazasiga kiritilgan (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna/>) ma'lumotlar bazasiga GenBankID ON745303.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/ON745303.1/>) raqami orqali ro'yxatdan o'tkazilgan. Natijada bazaga kiritilgan ma'lumotlar analogik genlarni aminokislota ketma-ketligini, antigenlik xususiyatlarini hamda mavjud antigen determinantlarining joylashgan o'rnini aniqlash imkonini bergan;

Pichia pastoris achitqisida rekombinant ekzoinulinazani (Ht-FEHI) genini kodlovchi nukleotidlar ketma-ketligi The European Nucleotide Archive (ENA) ON745303.1 ma'lumotlar bazasida ro'yhatdan o'tkazilgan (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/ON745303>). Natijada keltirilgan ma'lumotlar analogik oqsillarning qiyosiy tahlilini global masshtabda amalga oshirish imkonini bergan.

Tadqiqot natijalarining aprobatsiyasi. Mazkur tadqiqot natijalari 2 ta xalqaro va 3 ta respublika ilmiy-amaliy anjumanlarida muhokamadan o'tkazilgan.

Tadqiqot natijalarining e'lon qilinganligi. Dissertatsiya mavzusi bo'yicha jami 10 ta ilmiy ish chop etilgan, shundan O'zbekiston Respublikasi Oliy attestatsiya

komissiyasining doktorlik dissertatsiyalari asosiy ilmiy natijalarini chop etish uchun tavsiya etilgan ilmiy nashrlarida 6 ta maqola, jumladan, 3 tasi respublika va 3 tasi xorijiy ilmiy jurnallarda nashr etilgan.

Dissertatsiyaning hajmi va tuzilishi. Dissertatsiya tarkibi kirish, uchta bob, xulosa, foydalanilgan adabiyotlar ro'yxati va ilovalardan iborat. Dissertatsiyaning hajmi 136 betni tashkil etgan.

DISSERTATSIYANING ASOSIY MAZMUNI

Kirish qismida mavzuning dolzarbligi va zarurati asoslangan, tadqiqotning maqsadi va vazifalari, ob'ekt va predmeti, o'rganilganlik darajasi, tadqiqotning usullari tavsiflangan, tadqiqotning O'zbekiston Respublikasi fan va texnologiyalar rivojlanishining ustuvor yo'nalishlariga mosligi ko'rsatilgan, tadqiqotning ilmiy yangiligi va amaliy ahamiyati ochib berilgan, tadqiqot natijalarini amaliyotga joriy etish, o'tkazilgan tadqiqotlarning ishonchliligi, aprobatsiyasi va natijalarning nashr qilinishi, dissertatsiyaning hajmi, tuzilishi bo'yicha ma'lumotlar keltirilgan.

Dissertatsiyaning «**Topinamburni qayta ishlash va undan foydalanish istiqbollari**» deb nomlangan **birinchi** bobida mavzu bo'yicha olib borilgan tadqiqot natijalari, xorijiy va mahalliy adabiyotlar tahlili batafsil yoritilgan. So'ngi yillarda topinambur o'simligining tuganagi tarkibidagi ekzoinulinaza (Ht-FEH I) fermentini sintezlash, tozalash va undan topinambur tuganagi sharbati tarkibidagi inulinni gidrolizlashda samarali foydalanish jarayoniga ta'sir qiluvchi omillari taxlili keltirilgan. Ma'lumotlar umumlashtirilgan va ilmiy-tahliliy xulosalar chiqarilgan hamda ilmiy adabiyotlardagi ma'lumotlardan kelib chiqqan holda dissertatsiya ishining maqsadi, vazifalari, dolzarbligi va muhimligi bilan tugaydi.

Dissertatsiyaning «**Inulinaza fermentini Polimeraza zanjir reaksiyasi yordamida *in vitro* sintezlash, xamda fermentni tozalashning fizik kimyoviy usullari**» deb nomlangan **ikkinchi** bobida tadqiqotlarni olib borish bo'yicha dastlab xom-ashyolar tanlash, ularning asosiy fizik-kimyoviy xossalari tadqiq qilish usullari keltirilgan. sifatida topinamburning mahalliy «Mo'jiza» navining tuganagi, inulin polisaxaridi va ketogeksoza - fruktoza monosaxaridi ishlab chiqarish usullari bayon qilingan xamda laboratoriya tajribalari keltirilgan, mahsulotlari tuzilishi o'zgarishlarini DSK, IK spektroskopik usullar yordamida aniqlandi.

Dissertatsiyaning «**Topinambur ildiz mevalari sharbatidan Inulinaza fermenti yordamida kristal fruktoza olish**» deb nomlangan **uchinchi bobida** topinambur o'simligining tuganagi tarkibidagi ekzoinulinaza (Ht-FEH I) fermentini sintezlash, tozalash va undan topinambur tuganagi sharbati tarkibidagi inulinni gidrolizlash tadqiqotlari bayoni keltirilgan.

*Praymerlarning sintezi. Mo'jiza navli topinambur tuganagining nukleotidlarini ajratib olish, inulinaza fermenti sinteziga javob beruvchi qismini polimeraza zanjir reaksiyasi yordamida *in vitro* sintezlash*

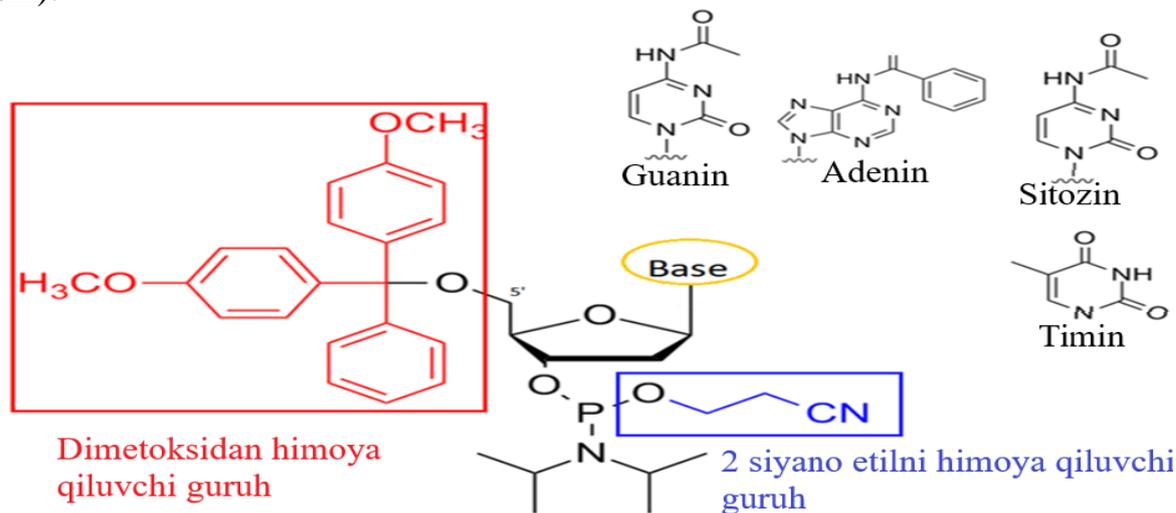
NCBI xalqaro ma'lumotlar bazasidan foydalangan holda Topinamburning Ht1-FEH I ketma-ketligini amplifikatsiya qilish uchun mos ravishda (EcoRI va XbaI) restriktaza fermentlarining saytlari birlashtirilgan primerlar sintezini amalga oshirdik.

Kerakli praymerlar sintezi 4 bosqichda kimyoviy-fosfoamidid usulda sintez qilinadi. Bunda birinchi navbatda sintez uchun kerakli nukleozidlarni tayyorlaymiz. Nukleozidlarning biriktirilishini va molekulaning barqarorligini taminlab turgan himoya guruhlarini olib tashlash kerak (detritillash jarayoni).

1) Forward EcoRI 5'-CTGAATTCATGGTAAAGGAGATGGCTG-3'

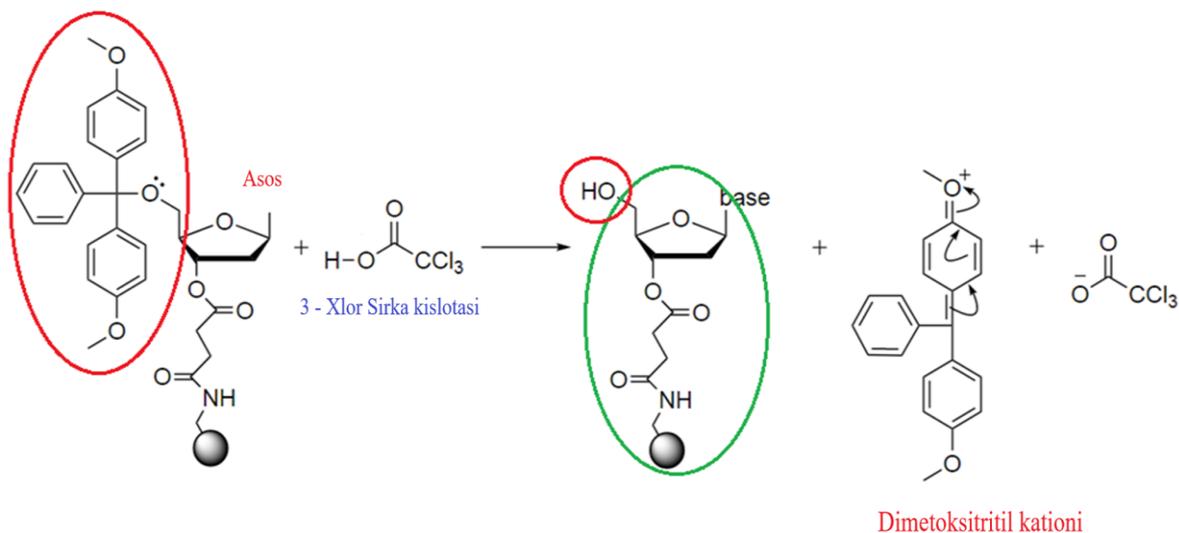
2) Reverse XbaI 5'-TTTCTAGATCAATCCATAGGAAGTATTTGAGC-3'

(1-rasm).



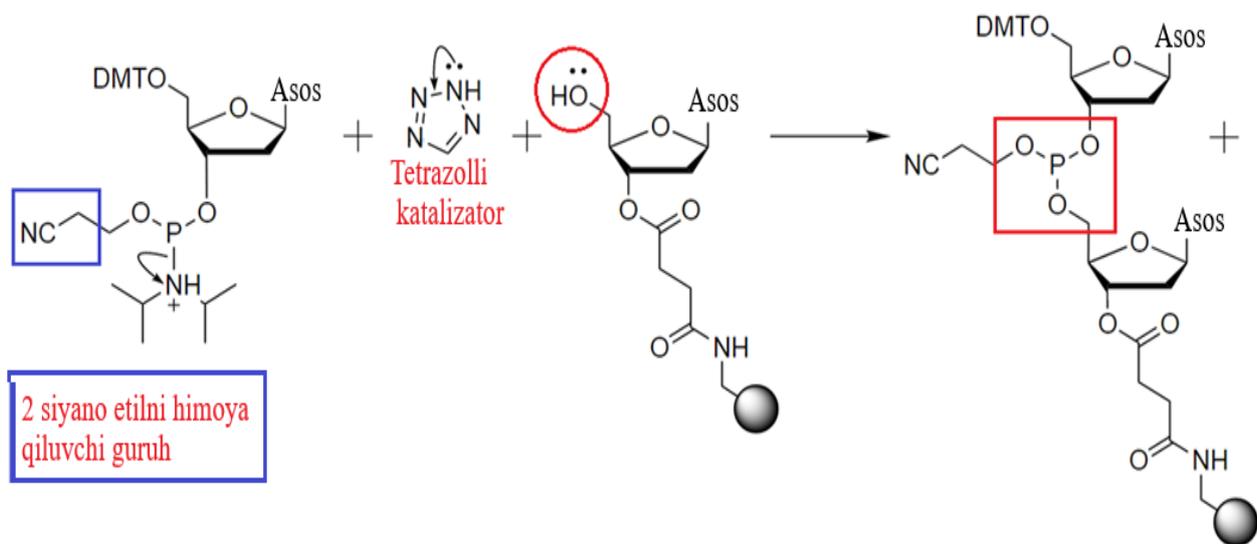
1 – Rasm. Kerakli nukleotidlar ketma ketligini sintezlashning umumiy ko’rinishi

Keyingi bosqichda biz fosforamidit nukleozidlarining detritillanishi himoya guruhini olib tashlashladik.



2 – Rasm. Fosforamiditdan himoya guruhini olib tashlash 3 xloroasetik kislota yordamida amalga oshirilishi

Tadqiqotimizni davom ettirgan holda birinchi bosqichdan faollashtirilgan (himoya guruhleri yechilgan) fosforamidit keyingi asos (nukleotid) bilan reaksiyaga kirishishadi va di nukleotid hosil bo’ladi.

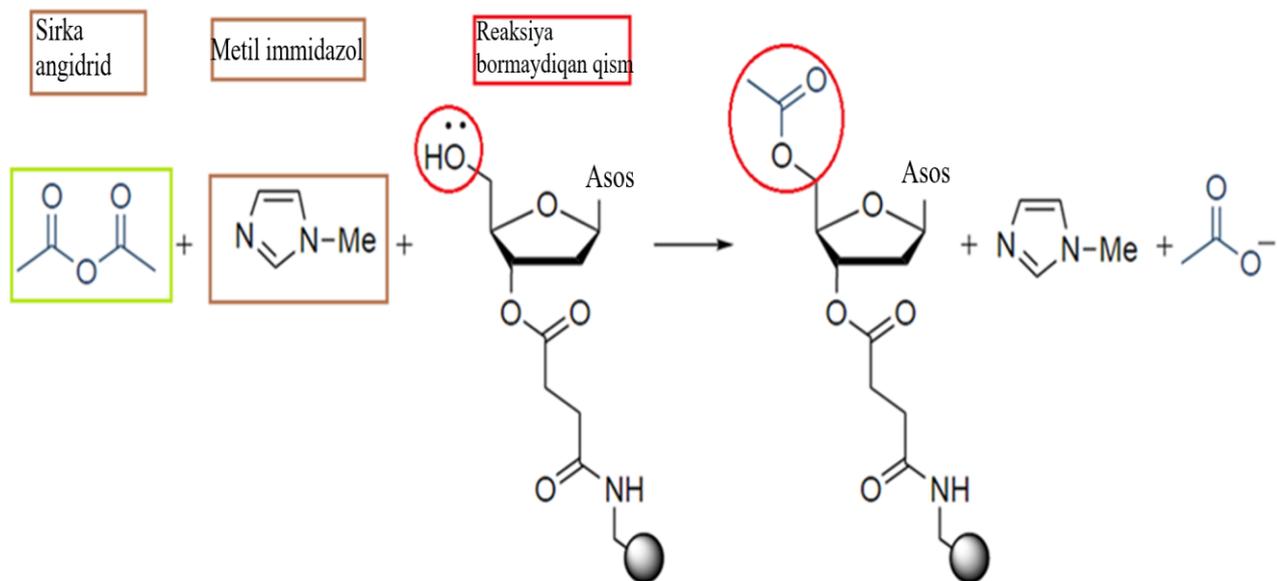


3 – Rasm. Fosforamiditlarning qo'shilishi

Reaksiyaga kirishmagan fosforamiditlarning keyingi reaksiyasida ishtirok etishini oldini olish maqsadida, ularni metil imidazol katalizatori ishtirokida sirka anhidrid qo'shib inaktivatsiya qilish kerak. Natijada inaktivlangan fosforamiditlar sintez jarayonidan chiqariladi.

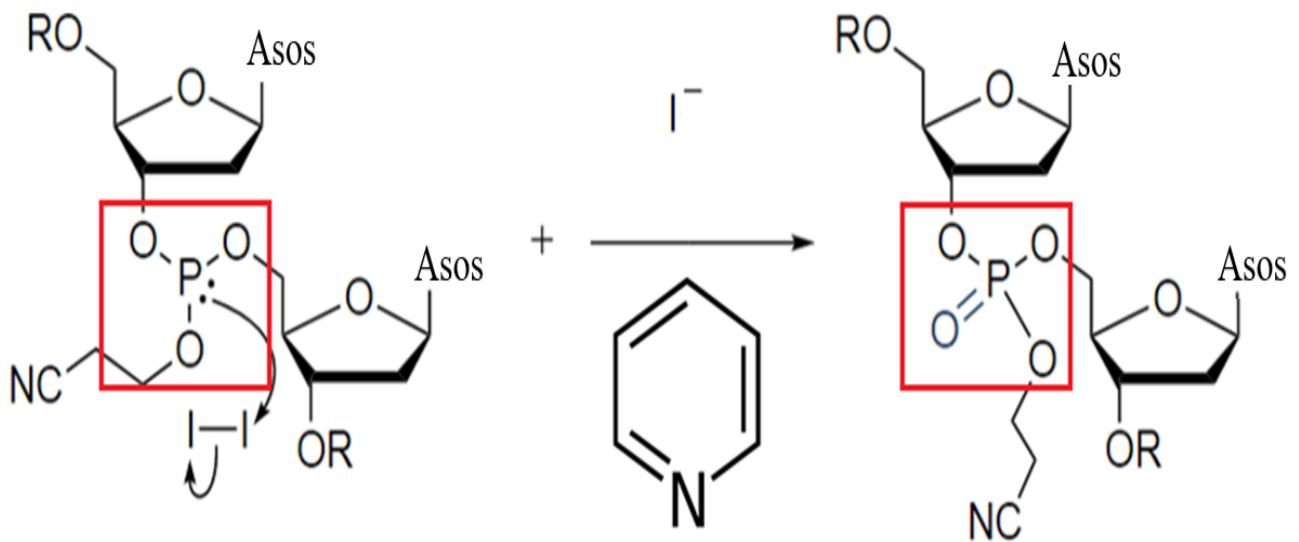
Ikki nukleotidni birlashtirgandan so'ng, bir nechta reaksiyaga kirishmagan 5'-gidroksil guruhlari bo'ladi; agar faollashtirilmasa, bu 5'-gidroksil guruhlari kiruvchi fosforamidit bilan reaksiyaga kirishib, keyingi bog'lanish bosqichida ishtirok etadi va kalta praymerlar hosil bo'lishi mumkin.

Olingan oligonukleotid bitta asos yo'qoladi va kerakli oligonukleotidning delesiya mutatsiyasiga mos keladi.

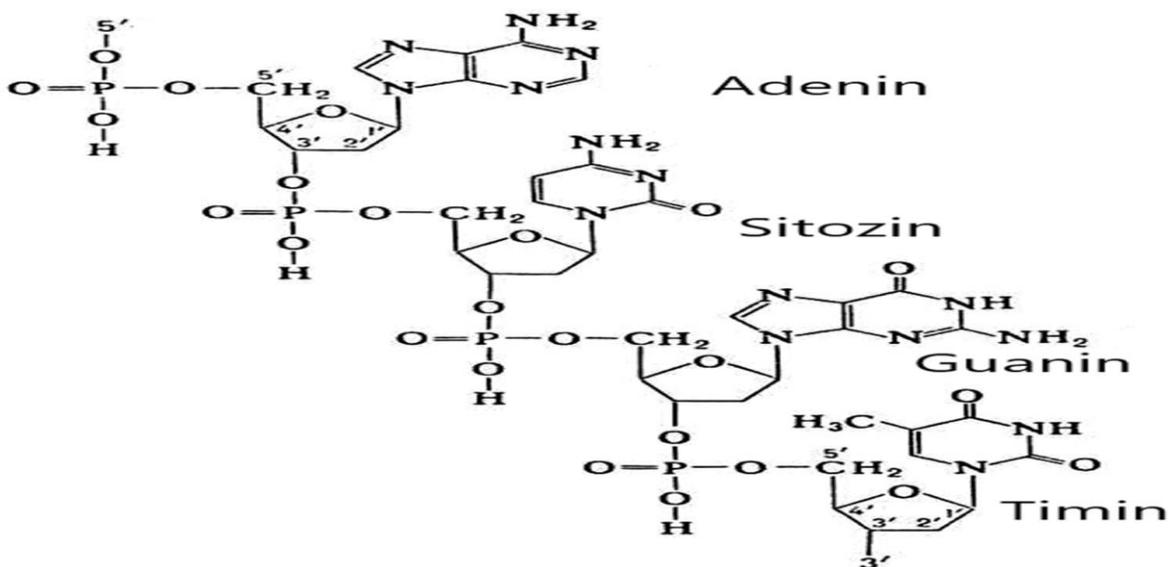


4 – Rasm. Fosforamiditlarning kepirovaniyasi

Ikkinchi bosqichda hosil bo'lgan trifir fosfit (P(III)) kislota bog'i beqarorligi uchun yod ionlari, piridin va suv bilan bog' oksidlanib barqaror holatga o'tkaziladi.



5 – Rasm. Fosforamiditning oksidlanishi



6 – Rasm. Sintezlangan praymerlarning umumiy kimyoviy strukturasi

Bu yerda tanlangan kerakli nukleotidlarni ketma ketliklarini bilgan holda mos ravishda DNK sturukturasi hosil bo'lganligini ko'rishimiz mumkin.

Tadqiqotimizni davom ettirgan holda keyingi bosqichlarda sintezlangan ekzoinulinaza fermentini achitqi hujayralariga kiritib ko'paytirish ishlarini amalga oshirdik. Buning uchun pPICZ(alfa)A plazmidasining genetik xaritasiga asoslanib, plazmida va inulinaza *EcoRI* va *XbaI* restriktaza fermentlari bilan ishlov berildi. Olingan komplementar DNK molekullari T4 DNK ligaza fermenti yordamida 1:3 nisbatda (vektor: gen) ligirlash amalga oshirildi.

Natijada, *Pichia pastoris* achitqi hujayralarida Ht1-FEH I fermentni o'z ichiga olgan pPICZ(alfa)A-ekzoinulinazani genni kodlovchi rekombinant transfer vektori olindi.

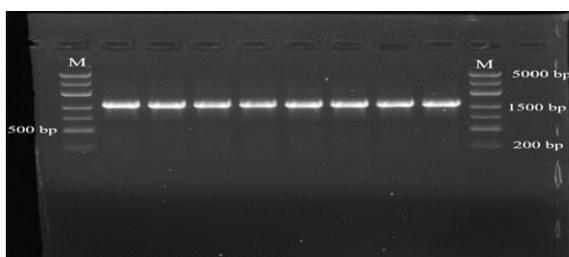
Rekombinant pPICZalpha(A)-ekzoinulinaza plazmidasini *Pichia pastoris* achitqilariga transformatsiyasi.

Shunday qilib, elektrotransformatsiya jarayonining eng yuqori unumdorligini ta'minlash uchun achitqi hujayralarining optik zichligini OD₆₀₀ **1,5** gacha yetkazish hamda DNK miqdori 200 ng tashkil qilishi kuchlanishni V=1500 ga yetkazish maqsadga muvofiqligi aniqlandi.

Transformatsiya jarayonidan keyin rekombinant hujayralar *zeotsin* (100 mkg / ml) saqlagan YPDS ozuqa muhitga ekildi. So'ngra bir kundan keyin o'sib chiqqan kolloniyalardan keyingi tadqiqotlar uchun yangi tayyorlangan YPD muhitiga (*zeotsin* bilan) (jami 27 ta koloniya) qayta ekildi.

O'sib chiqqan 27 koloniyadan 7 ta rekombinant shtammlarning genom DNK si ajratib olindi va Ht1-FEH I genining mavjudligi bilish uchun PZR tahlili amalga oshirildi(7-rasm).

Olingan PZR natijalardan shunday xulosa qilish mumkinki, tanlangan barcha 7 ta rekombinant *P. pastoris* shtammlari kerakli o'lchamdagi 1683 bp Ht1-FEH I genini o'z ichiga oladi.



7 - rasm. Rekombinant ekzoinulinazalarni o'z ichiga olgan rekombinant *Pichia pastoris* shtammlarini PZR tahlili

Bu yerda: 1-7 namunalar *P. pastoris* rekombinant shtammlari; 8 - musbat nazorat (K+ sifatida rekombinant pPICZalpha(A)-ekzoinulinaza plazmidasi ishlatilgan) namunasi.

Mo'jiza navli topinambur ildiz mevalaridan olingan ekzoinulinaza fermentini sintezlashning optimal sharoitlarini tanlash.

Tadqiqotning bir qismi sifatida biz Ht1-FEH I genining ekspressiya darajasini vaqtga (24-96 soat), ozuqa muhitidagi metanol miqdoriga (0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%) va maqsadli oqsilning sekretsiyalanish darajasiga qarab o'zgarishini o'rgandik.

1-jadval

Rekombinant Ht1-FEH I fermentining Metanol miqdori va vaqtga qarab ekspressiya darajasining o'zgarishi

Metanol konsentratsiyasi (%)	Inkubatsiya vaqti	Suyultirish darajasi	Ht1-FEH I fermentining IFA testi natijalari (OD-450 nm)	Ht1-FEH I miqdori (mg/ml)
0.5	24	1:30000	0.961	0.515
	48	1:30000	1.504	0.811
	72	1:30000	1.996	1.11
	96	1:30000	1.78	0.96
1	24	1:30000	0.969	0.521
	48	1:30000	1.517	0.823
	72	1:30000	2.05	1.115
	96	1:30000	1.79	0.967
1.5	24	1:30000	0.96	0.511

	1-jadval davomi			
	48	1:30000	1.501	0.803
	72	1:30000	1.802	1.017
	96	1:30000	1.74	0.937
standart namuna (tijorat fermenti)	1:10000	≥ 3000 (out)	≥ 1.5	
	1:30000	2.915	1.5	
standart salbiy nazorat	---	0.087	---	

Ushbu jadvaldan ko'rinib turibdiki, Ht1-FEH I fermentining eng yuqori ekspressiyalanish darajasi har 24 soatda ozuqa muhitiga 1,0% miqdorda metanol qo'shilganda jarayonning 72-soatida kuzatildi. Ammo yuqoridagi natijaga yaqin ko'rsatkichni har 24 soatda ozuqa muhitiga 0,5% miqdordagi metanol qo'shilganda jarayonning 72-soatida ham kuzatishimiz mumkin. Bu ikki natija orasidagi farq metanol sarfi uchun yo'qotilgan sarf-xarajatni oqlamaydi. Shu munosabat bilan biz metanolning 0,5% miqdorini va ekspressiya jarayonning 72-soatini Ht1-FEH I rekombinant fermentini ekspressiyasi uchun eng maqbul sharoit sifatida tanlab oldik.

2-jadval

Rekombinant Ht1-FEH I fermentini ekspressiyalashda sekretiya signali α -faktorning roli

Ekspressiyalangan Ht1-FEH I fermentining to'planish joyi	Ht1-FEH I miqdori	Ht1-FEH I fermentining ulushi (%)	Umumiy oqsil miqdori
Achitqi hujayrasi ichida	0.203 g/l	18.3%	5.7 g/l
Ozuqa muhiti suyuqligida (Sekretiya)	0.907 g/l	81.7%	2.18 g/l

Affin xromatografiyasi yordamida rekombinant ferment tutuvchi fraksiyalarni tozalash

Ni²⁺ bilan zaryadlangan kolonkali xromatografiya yordamida oson tozalab olish maqsadida rekombinant Ht1-FEH I fermenti C-uchida 6xHIS bilan nishonlanib ekspressiyalangan edi. Biz affin kolonkani yuvish va maqsadli oqsilni ajratish bosqichlari sharoitlarini optimallashtirdik. Buning uchun biz imidazolning **10-80 mM** qiymatlarini kolonkani (Ni-NTA 5sm, cOmpete His-Tag Purification Column, Roche Diagnostics GmbH, Germany) yuvish/tayyorlash bosqichiga hamda **100-500 mM** qiymatlarini eluatsiya bosqichiga ta'sirini o'rgandik (3-jadval).

3-jadval

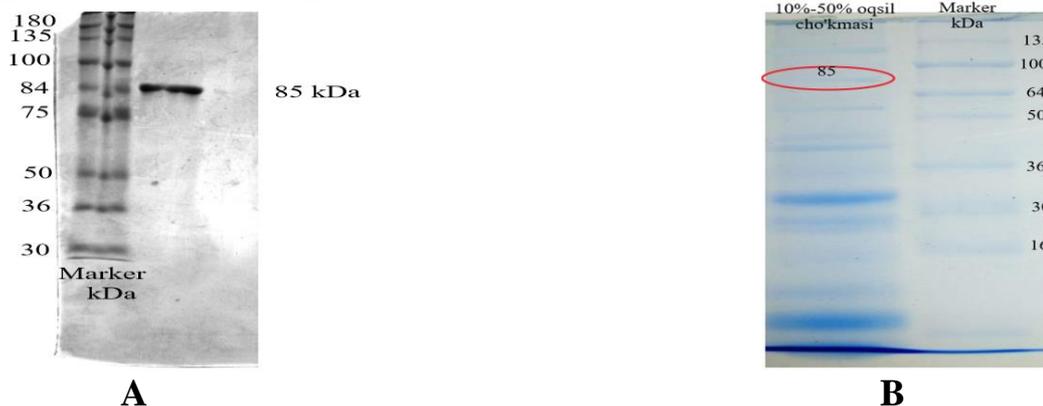
His₆ bilan nishonlangan rekombinant Ht1-FEH I fermentini affin kolonkasidan eluatsiyasi

Imidazol konsentratsiyasi (mM)	Yuvishlar soni (kolonka hajmi bo'yicha)	Kalonkadan eluatsiyalangan oqsilning umumiy miqdori (mg/ml)	Rekombinant Ht1-FEH I IFA natijalari	
			OD-450 nm	Suyultirish darajasi
200	2	1.899	0.963	1:60000
	3	2.548	1.489	1:60000
	4	2.889	1.655	1:60000
	5	3.121	2.012	1:60000
	6	3.197	2.115	1:60000

3-jadval davomi				
250	2	2.101	1.156	1:60000
	3	2.860	1.701	1:60000
	4	3.107	2.009	1:60000
	5	3.382	2.671	1:60000
	6	3.382	2.671	1:60000
300	2	2.107	1.158	1:60000
	3	2.866	1.705	1:60000
	4	3.112	2.021	1:60000
	5	3.382	2.673	1:60000
	6	3.382	2.673	1:60000

Shunday qilib, rekombinant Ht1-FEH I fermentini Affin xromatografiyasi bilan tozalash uchun optimal sharoitlar tanlandi: Bunda 60 mM imidazol (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 60 mM imidazol pH 8.0) kolonkani yuvish jarayoni uchun (kolonkani 10 marta yuvish uchun) va 250 mM imidazol (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM imidazol pH 8.0) elutsiya jarayoni uchun (kolonkani 5 marta yuvish uchun).

Keyin kerakli oqsilni o'zida saqlagan dializlangan fraktsiya bilan 10% PAAG elektroforegramma tahlili amalga oshirildi (8-rasm).



8 - rasm. Rekombinant Ht1-FEH I ni C-terminal His6 uchi bilan tozalanishi: A) Elutsiya qilingan fraktsiyaning 10% SDS-PAGE tahlili B) Ammoniy sulfat tuzi bilan 50% to'yintirilgan eritmadagi cho'kma tahlili

10% PAGE elektroforez tahlili natijalari shuni ko'rsatdiki, tozalangan rekombinant ekzoinulinaza fermentining molekulyar og'irligi 85 kDa tashkil etib, Ht1-FEH I geni kodlovchi aminokislotalar (560 aminokislota SnapGene v6.1 bo'yicha 62,8 kDa) hajmiga mos kelmasligi aniqlandi. Shunday qilib, Pichia pastoris ekspression tizimida olingan rekombinant Ht1-FEH I fermentining glikozillanishi tufayli molekulyar og'irligi 85 kDa tashkil qildi.

4-jadval

Rekombinant Ht1-FEH I fermentini tozalash bosqichlarining yakuniy natijalari

Tozalash bosqichlari	Umumi y oqsil miqdor, mg	Rekombinant Ht1-FEH I ferment miqdori, mg	Olingan fermentning solishtirma faolligi, U/mg	Tozalanish darajasi	Fermentning tozaligi, %	Unum, %

4-jadval davomi						
Suyuq ozuqa muhitiga ajralib chiqqan oqsillar	218,55	90,7	9,79	1	41,5	100
Ammoniy sulfat tuzi yordamida cho`ktirish	115,48	80,72	16,64	1,7	69,9	89
Affin xromatografiyasi	78,3	71,65	21,55	2,2	91,5	79

Bizning tadqiqotimizda, *Pichia pastoris* GS115 hujayralarida ekspressiyalanib, tozalab olingan rekombinant Ht1-FEH I fermentining eng yuqori solishtirma faolligi **21,55 U/mg** ni tashkil etdi. Rekombinant fermentni o'z ichiga olgan yakuniy tozalangan fraksiyadagi umumiy oqsillar miqdori **3,132 mg/ml**, **25 ml** hajmni tashkil etdi. Shunday qilib, rekombinant Ht1-FEH I ekzoinulinaza fermenti **79%** unum bilan tozalanish darajasi 2,2 va **91,5%** tozalikda olindi.

Tozalangan rekombinant Ht1-FEH I fermenti katalizining optimal sharoitlarini aniqlash.

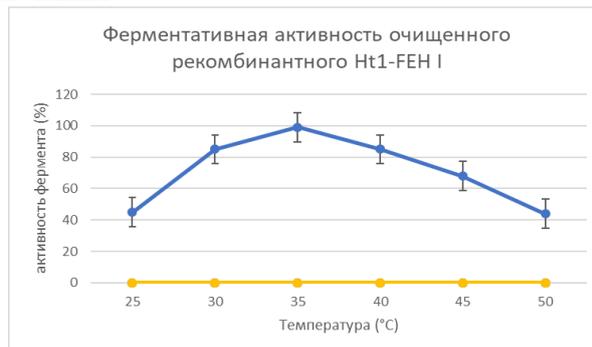
Natijalar tozalangan rekombinant Ht1-FEH I fermentining 10 mM 1-kestoza (1-K) bilan turli pH qiymatlarida inkubatsiya qilish natijasida fruktozaning maksimal ajralib chiqish tezligiga nisbatan hisoblangan (9 va 10-rasmlar).

Substrat sifatida 1-K dan foydalangan holda rekombinant Ht1-FEH I faolligi uchun optimal pH va harorat aniqlandi. Bunda rekombinant Ht1-FEH I fermenti uchun eng maqbul pH 6,0 (9-rasm) va temperatura 35° C (10-rasm) ni tashkil etdi. Bu mahalliy topinambur ildiz mevalaridan olingan sharbatni o'z - o'zini shakarlash uchun kerakli kinetik qiymatlarga mos kelmasligini ko'rsatdi.

Bir xil turdagi, ammo turli ekspresyon tizimlariga ega ferment uchun kerakli pH va maqbul haroratdagi farqni ularning translatsiyadan keyingi modifikatsiyalaridagi farq bilan izohlash mumkin.



9-rasm. Tozalangan rekombinant Ht1-FEH I faolligiga muhit pH ning ta'siri



10-rasm. Tozalangan rekombinant Ht1-FEH fermenti faolligiga haroratning ta'siri

Topinambur tunganagidan ultratovush (akustika), yuqori bosimli suyuqlik ekstraksiyasi va klassik usul yordamida erkin fruktoza va inulinni qiyosiy ajratish.

1 kg yuvilgan topinambur tunganagini (Mo'jiza navli) to'rtli maydalagichda 1 mm diametrgacha maydalandi va hosil bo'lgan mezzini siqib, Keyingi bosqichda erkin fruktoza va inulinni to'liq ekstraksiyalash maqsadida mezzgi-sharbatga ultratovush usuli yordamida ishlov berildi. Jarayonning unumi pH-metriya usuli

orqali eritmaga o'tgan erkin fruktozaning (F1) miqdori kalibrlash bilan belgilandi. Natijalar 5-jadvalda ko'rsatilgan.

5-jadval

Akustikadan keyin sharbatdagi erkin fruktoza miqdori

Chastota (kHz)	Vaqt (daq)			
	3	5	7	10
	Fruktoza miqdori (%)			
18	1.1%	1.17%	1.2%	1.25%
20	1.28%	1.15%	1.5%	1.2%
24	1.15%	1.1%	1.91%	1.91%
28	1.2%	1.1%	1.91%	1.91%

Jadvaldan ko'rish mumkinki, 7 daqiqada 24 kHz va 28 kHz sharoitlarda erkin fruktozaning miqdori mos ravishda eng yuqori 1,91% ko'rsatkichni tashkil qildi. Solishtirish grafigi yordamida yuqori bosimli suyuqlik ekstraksiyasi jarayonidan keyin (1,5 MPa, 7 daqiqada) olingan sharbat tarkibidagi F1 (erkin fruktoza) miqdori **F1 - 3,8%** ekanligi aniqlandi. An'anaviy usul bilan olingan sharbat tarkibida **F1 - 1,1%** ni tashkil etdi.

Ushbu bosqichda yuqori bosimli suyuqlik ekstraksiyasi usuli samarali ekanligi ko'rsatib berildi.

Topinambur tunganagi sharbatidan kislotali gidroliz orqali fruktoza monosaxaridini olish.

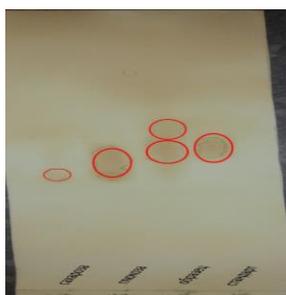
Ferment va kislotali gidroliz jarayonlarini solishtirish uchun tajribalar o'tkazildi. Sharbatning kislotali gidrolizi birinchi marta amalga oshirildi. Quyidagi 6-jadval va 11-rasmda pH, harorat va vaqtning o'zgarishi bilan tajriba natijalari ko'rsatilgan.

6-jadval

Inulinning sirka kislotasi (CH₃COOH) ishtirokidagi gidrolizi. Fruktoza miqdori (%) o'zgarishining pH va haroratga bog'liqligi

T ⁰ C	pH	t (soat)		
		2	4	6
		Fruktoza miqdori (%)		
37 ⁰ C	2.5	2.3%	4.1%	3.8%
	1	7.4%	8.6%	8%
50 ⁰ C	2.5	2.2%	5.3%	4.8%
	1	9.5%	11.4%	9.6%

Natijalardan shuni ko'rish mumkinki, inulinning gidrolizi pH 1, 50⁰C haroratda hamda 4 soat davomida o'zining eng yuqori darajasiga erishdi. Vaqtning ortib borishi bilan fruktoza monosaxaridi destruksiyasi yuzaga keldi.



11-rasm. Kislotali gidrolizlangan topinambur sharbatidagi inulinning QX tahlili

Xromatogrammadan ko'rinib turibdiki, hatto kislotali gidrolizning optimal sharoitlarida ham fruktoza parchalanishining ikkilamchi moddalari (furfurol, alkilamid, gidroksimetilfurfurol) hosil bo'ldi.

O'z-o'zini shakarlash usuli orqali kristalli fruktoza olish.

Tadqiqotlarimizning bu bosqichida turli usullar bilan olingan sharbatni o'z-o'zini shakarlash jarayoni o'rganildi. Tajribalar har xil harorat, vaqt va pH muhitli sharoitlarda o'tkazildi. Olingan monosaxarid (fruktoza) miqdori pH-metr usuli bilan aniqlandi.

Olingan natijalardan shuni xulosa qilishimiz mumkinki, "Mo'jiza" navli topinambur tunganagi sharbatini o'z-o'zini shakarlash jarayonida an'anaviy (8,1% fruktoza) va ultratovushli ekstraksiya usulida (8,9% fruktoza) olingan sharbat tarkibidagi native inulinaza fermenti faolligi uchun 40°C, pH = 5,3 - 5,5 va 24 soat qiymatlarda mos ravishda optimal sharoit ekanligi aniqlandi. CO₂ ekstraksiya usulida olingan sharbat tarkibidagi ferment uchun esa ushbu qiymatlar mos ravishda davomida 40°C, pH = 5,3 - 5,5 va 20 soatni hamda fruktozani hosil bo'lishi 11,1% tashkil etdi. Hosil bo'lgan fruktoza miqdori bo'yicha, CO₂ ekstraksiya usulida olingan sharbatni o'z-o'zini shakarlash eng samarali usul ekanligi aniqlandi.

Sintezlangan ekzoinulinaza yordamida fruktoza monosaxaridini olish

Tadqiqotimizning bu bosqichida sharbatni fermentatsiya jarayoni 35-40° C haroratda va pH 5,5 dan 6,0 oralig'ida olingan rekombinant ekzoinulinaza fermenti hamda tapinambur tunganagi tarkibida bo'lgan nativ inulinaza fermentlarining qo'llash orqali amalga oshirildi. Fermentning konsentratsiyasi - 0,005 dan 0,05% gacha o'zgartirildi. Olingan monosaxarid (fruktoza) miqdori pH-metr usuli bilan aniqlandi. Tadqiqot natijalari 7-jadvalda keltirilgan.

7-jadval

Ht1-FEH I rekombinant fermenti yordamida topinambur tunganagi sharbatidan fruktoza hosil bo'lishini muhitning pH, harorat va vaqtga bog'liqligi

pH	T°C	Rekombinant Ht1-FEH I ferment konsentratsiyasi	Vaqt (soat)				
			1	3	5	7	10
			Количество фруктозы (%)				
5,5	30	0,01	7,4%	10,6%	12,2%	11,9%	11,1%
		0,025	9%	11,3%	13,7%	12,5%	11,1%
		0,05	9,4%	11,7%	13,8%	12,5%	11,1%
	35	0,01	7,6%	11,3%	13,6%	13,6%	12,9%
		0,025	9,1%	12,1%	14,8%	14,1%	12,8%
		0,05	9,4%	12,5%	14,8%	14,1%	12,8%
	40	0,01	7,8%	11,3%	13%	13,1%	12,7%
		0,025	9,1%	11,4%	13,2%	13,4%	13,2%
		0,05	9,6%	11,9%	13,4%	13,4%	13,2%
6,0	30	0,01	7,6%	10,8%	14,3%	14,1%	13,4%
		0,025	9,2%	12,1%	15,7%	15,6%	14,1%
		0,05	9,5%	12,6%	15,8%	15,6%	14,1%
	35	0,01	7,7%	11,1%	14,5%	14,6%	14,1%
		0,025	9,4%	12,9%	23,2%	16,2%	14,9%
		0,05	9,6%	13,1%	16,2%	16,2%	14,9%
	40	0,01	7,7%	11%	13,8%	13,8%	13,3%

		7-jadval davomi					
		0,025	9,1%	11,9%	15,1%	15,2%	15,1%
		0,05	9,5%	12,3%	15,2%	15,2%	15,1%

Jadvaldan ko'rinib turibdiki, "Mo'jiza" navli topinambur tunganagidan CO₂ ekstraksiya usuli orqali olingan sharbatga **0,025%** miqdorda rekombinant Ht1-FEH I ekzoinulinaza fermenti qo'shilib, 5 soat davomida **35°C**, **pH - 6** sharoitlar ostida **23,2%** fruktoza monosaxaridi olishga erishildi.

CaSO₄ aktivatorining 0,01-0,05% miqdorlarda fermentatsiya jarayoniga ta'siri o'rganildi. Tadqiqot natijalari 8-jadvalda keltirilgan.

8-jadval

Muhitga inulinaza fermentining aktivatori (CaSO₄) qo'shilishi bilan reaksiya unumining o'zgarishi

Inulinaza aktivatori	CaSO ₄ konsentratsiyasi (%)	T°C	Vaqt (soat)		
			3	4	5
			Fruktoza miqdori (%)		
A ⁺ (CaSO ₄)	0,01	35°C	13,1%	23,8%	16,6%
	0,03		13,2%	16,6%	16,6%
	0,05		13,3%	16,6%	16,6%
A ⁻			12,9%	14,5%	16,2%

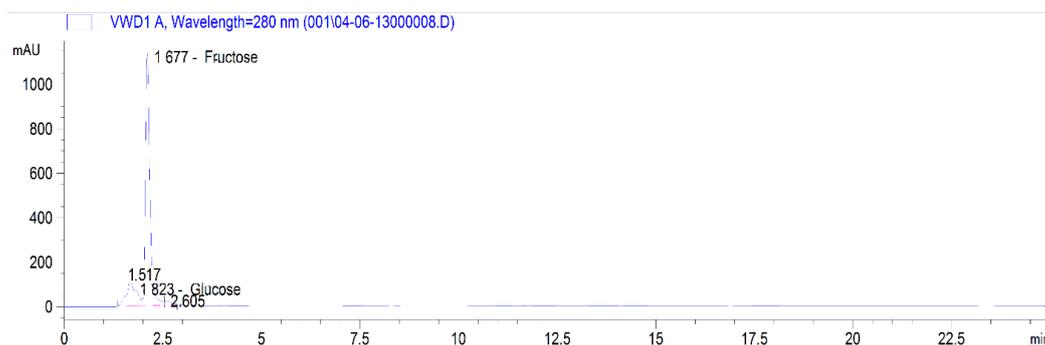
Jadvaldan ko'rish mumkinki, CaSO₄ aktivatori 0,01% miqdorda reaksiya muhitida mavjud bo'lishi bilan fruktoza monosaxaridi hosil bo'lish unumini 0,4% gacha va inkubatsiya muddatini 20% gacha oshirishi mumkinligi aniqlandi.

Olingan fruktoza monosaxaridini YuQX va HPLC usullari yordamida sifat va miqdoriy aniqlash.

Yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC) tomonidan tahlil qilish (12-rasm).

Method Info: Analyze of Monosacharides, *column* Zorbax – Eclipse XDB – C18, 3.0 x 100 mm, 3.5 μm

Sample Info: juice after fermentation



12-rasm. Olingan fruktozani HPLC usuli orqali miqdoriy va sifat jihatidan aniqlash

Unga ko'ra olingan fruktoza miqdori 23,8% ya'ni 238 mg/ml ni tashkil etdi.

Tadqiqotlarimiz natijasida 1 kg topinambur tunganagi ildizidan (CO₂ ekstraksiyasi natijasida olingan ekstrakt - sharbati hajmi 1200 ml) Ht1-FEH I ekzoinulinaza fermenti yordamida 285,6 g yoki 28,56% fruktoza monosaxaridini oldik.

YuQX tahlili.



A B C

13 – rasm. Mo’jiza navli topinambur tuganagi ildizi sharbatidan fermentativ gidroliz orqali olingan fruktozaning YuQX tahlili

Namunada quyidagilar aniqlandi: D-fruktoza (13-rasm).

YuQX natijasi shuni ko’rsatadiki, olingan rekombinant ekzoinulinaza fermenti ishtirokida toza fruktoza monosaxaridi olindi (A-Standard Glu, B-namuna C-Standard Fru). Ma’lumki, topinambur tuganagi tarkibida oz miqdorda glyukoza monosaxaridi mavjud. Bundan tashqari, inulin polisaxaridining 5% ni glyukoza tashkil etadi. YuQX tahlili natijalarida glyukoza aniqlanmaganligini fermentatsiyadan keying sharbat tarkibidagi uning miqdori juda oz ekanligi bilan tushuntirish mumkin.

Xulosa

1 Ilk bor Ht1-FEH I ekzoinulinaza fermenti uchun kerakli praymerlarni kimyoviy sintezi amalga oshirildi hamda kimyoviy strukturalari ishlab chiqildi.

2 Ilk bor Mo’jiza navli topinambur tuganagi Ht1-FEH I ekzoinulinaza fermenti sintezlandi. Sintezlangan Ht1-FEH I fermentning nukleotid ketma ketligi aniqlanib, molekulyar og’irligi 1683 j.a. ekanligi tasdiqlandi.

3 Ilk bor topinambur tuganagidagi Ht1-FEH I ekzoinulinaza fermenti *Pichia pastoris* GS-115 metilotrof achitqi hujayralarida ko’p miqdorda ko’paytirildi. Ushbu ferment sintezining optimal sharoitlari aniqlandi, unga ko’ra: metanol - 0,5%, sintez vaqti - 72 soat.

4 Ilk bor tozalab olingan Mo’jiza navli topinambur tuganagi Ht1-FEH I ekzoinulinaza fermentining fizik-kimyoviy xossalari o’rganildi. Unga ko’ra, fermentning tozalik darajasi – 91,5%, molekulyar og’irligi – 85 kDa, fermentatsiyasi uchun maqbul sharoitlar: pH -6 da harorat - 35°C hamda eng katta solishtirma faolligi 21,55 U/mg ekanligi Selivanov metodi yordamida aniqlandi.

5 Ilk bor Mo’jiza navli topinambur tuganagining Ht1-FEH I ekzoinulinazasi yordamida tuganak sharbati tarkibida fruktoza monosaxaridi olindi. Sharbat tarkibidagi inulin polisaxaridini kislotali gidrolizlash usuli, sharbatning o’z-o’zini shakarlash va Ht1-FEH I ekzoinulinaza fermenti ishtirokidagi gidrolizlash usullarining qiyosiy tahlili amalga oshirildi. Unga ko’ra, erkin fruktozaning miqdori mos ravishda 11,1%, 11,4% va 23,8% ni tashkil etdi. Yangi sintezlangan Ht1-FEH ekzoinulinaza fermenti ishtirokidagi fermentatsiya jarayonida fermentning optimal konsentratsiya 0,025% ekanligi aniqlandi.

6 Inulinaza fermenti aktivatori CaSO₄ 0,01% miqdorda reaksiya muhitida mavjud bo’lishi bilan fruktoza monosaxaridi hosil bo’lish unumini 0,4% gacha va inkubatsiya muddatini 20% gacha oshirishi mumkinligi aniqlandi. Tadqiqotlarimiz natijasida 1 kg topinambur tuganagidan 285,6 g yoki 28,56% fruktoza monosaxaridi olishga erishildi.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ
DSc.03/30.12.2019.Т.04.01 ПРИ ТАШКЕНТСКОМ
ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ИНСТИТУТЕ**

ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

ЗОКИРОВ БЕКЗОД УЛАШЕВИЧ

**ПОЛУЧЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ФРУКТОЗЫ ИЗ КЛУБНЕЙ
ТОПИНАМБУРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТА ИНУЛИНАЗЫ**

02.00.14-Технология органических веществ и материалов на их основе

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ
ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD) ПО ХИМИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Ташкент – 2024

Тема диссертации доктора философии (PhD) по химическим наукам зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Министерстве высшего образования, науки и инноваций Республики Узбекистан под номером B2021.2.PhD/T2263.

Диссертация выполнена в Ташкентском химико-технологическом институте.

Автореферат диссертации размещен на трех языках (узбекском, русском, английском (резюме)) на сайте Ученого совета (www.tiame.uz) и на информационно-образовательном портале «ZiyoNet» (www.ziynet).

Научный руководитель: **Хусенов Арслонназар Шерназарович**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Икрамов Абдувахаб**
доктор технических наук, профессор

Атхамова Саида
кандидат химических наук, доцент

Ведущая организация: **Бухарский инженерно-технологический институт**

Защита диссертации состоится на заседании Ученого совета за номером DSc.03/30.12.2019.T.04.01 в Ташкентском химико-технологическом институте «__»____ 2024 года в _____. (Адрес: 100011, город Ташкент, Шайхонтохурский район, улица А.Навои, 32, тел. (99871) 244-79-21, 244-79-17, факс: (99871) 244-79-17; e-mail: tsti_info@edu.uz).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Ташкентского химико-технологического институт (зарегистрирована за №____). Адрес: 100011, г. Ташкент Шайхонтохурский р-н, ул. А.Навои, 32. Тел.: (99871) 244-79-21.

Автореферат диссертации разослан «__» ____ 2024 года.

(протокол реестра № __ от «__» ____ 2024 г.).

Туробжонов С.М.
Председатель научного совета
по присуждению учёных степеней,
д.т.н., академик

Кадилов Х.И.
Учёный секретарь научного совета по
присуждению учёных степеней, д.т.н., профессор

Рахмонбердиев Г.
Председатель научного семинара
при научном совете по присуждению
учёных степеней, д.х.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Актуальность и востребованность темы диссертации. На сегодняшний день во всем мире число больных сахарным диабетом составляет более чем 470 млн человек, и ежегодно от него умирает 2,1 млн человек. Диабет является одной из основных причин слепоты, почечной недостаточности, сердечных приступов, инсультов и ампутаций конечностей, а более 70% людей с диабетом не имеют доступа к профилактике и здоровому питанию. В то же время в борьбе с диабетом и его профилактике важно соблюдать здоровое питание, для профилактики заболевания производить новые профилактические продукты на основе различного сырья, в том числе моносахарида фруктозы, содержащегося в топинамбуре.

В настоящее время в мире проводятся научные исследования по переработке нетрадиционного сельскохозяйственного сырья топинамбура (*Helianthus tuberosus*) и выделению содержащегося в нем ценного инулина. В связи с этим особое внимание уделяется поиску ферментов, эффективных при полном гидролизе инулина, выявлению биологических факторов, влияющих на процесс ферментативного гидролиза инулина природной инулиназой, созданию технологий получения кристаллическую фруктозу из топинамбура с помощью фермента инулиназы.

Ранее в нашей Республике ряд достижений достигнут в выращивании местных сортов топинамбура, включение их в продукты функционального питания, улучшение химических и органолептических показателей продукции, усиление профилактического воздействия на организм человека, в том числе совершенствование технологии производства фруктозы на основе топинамбура. Стратегия развития нового Узбекистана определяет важные задачи «развития производственных отраслей, модернизации и диверсификации промышленности, внедрения малозатратных энергосберегающих методов, подготовки конкурентоспособной и экспортоориентированной продукции, замещающей импорт»². В связи с этим важное значение имеет создание ресурсосберегающую технологию получения экологически чистой и натуральной продукции на основе нетрадиционного сельскохозяйственного сырья, выращенного в нашей республике топинамбура сортов «Файз барака» и «Мужиза», осуществлять их переработку и получение необходимой продукции для народного хозяйства.

Данное диссертационное исследование в определенной степени направлено на выполнение задач в Постановлений Президента Республики Узбекистан от 28 января 2022 года УП-60 «О новой стратегии развития Узбекистана на 2022-2026 годы», от 10 апреля 2019 года УП-5707 «О дальнейших мерах по ускоренному развитию фармацевтической отрасли Республики в 2019 — 2021 годах», от 26 января 2022 года ПП-102 «О мерах

² O'zbekiston Respublikasi Prezidentining 2022 yil 28 yanvardagi PF-60 «2022-2026 yillarga mo'ljallangan yangi O'zbekiston taraqqiyot strategiyasi to'g'risida»gi farmoni

по совершенствованию и расширению масштабов эндокринологической службы», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Актуальность исследований в приоритетных направлениях развития науки и техники в республике. Данные исследования проводились в соответствии с приоритетным направлением республиканского развития науки и технологий VII. «Химические технологии и нанотехнологии».

Степень изученности проблемы.

Бакушинская, О.А., Белова Л.Д., Буканова В.И., Лозенко М.Ф., Семихатова Н.М., Jiao J Zhan W. Xu, H., Liang, M., Xu, L., Li, H., Zhang, X., Kang, J., Ефремов А.С., Орлова А.В., Мельник И.М., Шендеров Б.А., Бредихина В.А., Бровина Ф.Я., Кривицкая Е.Н., Поташев Д.А., Рудницкова Т.А., Савченко А.Ф., Мельник И.М., Ефимов А.С., Ванютина Л.Т., Шендеров Б.А., Манвелова Н.А., Эйхе Е.П. Рахманбердиев Г. Абдуразакова С. Х. Рахимов Д. Аминов С. Додаев К. и другие провели научно-исследовательскую работу по получению инулина и его эфиров различные биологически активные добавки (БАД), путем химической модификации физиологически активные полимеры и т.д.

В то же время также ведутся научные работы в направлении поиска ферментных препаратов, эффективных при полном гидролизе инулина, определения активности триплетов, кодирующих фермент инулиназу и природные инулиназы, экспрессируемые в дрожжевых клетках, а также совершенствование технологии получения кристаллической фруктозы с использованием фермента инулиназы из топинамбура.

Связь диссертационного исследования с исследовательской работой научно-исследовательского учреждения. Диссертационные исследования выполнены в рамках фундаментального проекта плана научно-исследовательских работ Ташкентского химико-технологического института № МУ-ПЗ-20171025237 на тему «Получение целлюлозы из полевых культур для различных целей» (2017-2020 годы).

Цель на исследования является синтезирование и очистка нативной экзоинулиназы (Ht-FEN I) клубней топинамбура и его эффективное использование при гидролизе инулина, содержащегося в сиропе топинамбура.

Задачи исследования:

выделение геномной ДНК клубней топинамбура сорта Мужиза и синтез гена *in vitro* с помощью Полимеразной цепной реакции, ответственного за трансляцию фермента инулиназы Ht1-FEN I

соединение *in vitro* синтезированного гена Ht-FEN I с вектором переноса pPICZ(alpha)A через фосфодиэфирные связи

экспрессия белка Ht1-FEN I в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* GS-115;

определение наиболее оптимальных условий выделения и очистки синтезированного фермента экзоинулиназы Ht1-FEH I

изучение физико-химических и кинетических свойств очищенной и модифицированной экзоинулиназы Ht1-FEH I

сравнительное выделение свободной фруктозы и инулина из клубней с помощью ультразвука (акустика), сверхкритической флюидной экстракции и классическим методом

получение моносахарида-фруктозы из инулина с использованием синтезированной экзоинулиназы Ht1-FEH I содержащего в сиропе клубней топинамбура.

Объектом исследования являются клубни топинамбура сорта “Мужиза”, полисахарид-инулин и моносахарид-кетогексозы - фруктоза.

Предметом исследования является рекомбинантная экзоинулиназа Ht1-FEH I клубней топинамбура, экспрессируемая в *Pichia pastoris* GS-115.

Методы исследования. В исследовании использовались методы органической и биоорганической химии (количественное и качественное определение ДНК, белка: спектрофотометрия, ИФА, рН-метрия, методы выделения и очистки белка: Афинная хроматография, ВЭЖХ и т. д.).

Научная новизна диссертационного исследования заключается в следующем:

впервые клонированы рекомбинантный фермент экзоинулиназы Ht1-FEH I клубней топинамбура сорта “Мужиза”;

впервые в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* GS-115 экспрессирован нативный фермент экзоинулиназа Ht1-FEH I клубней топинамбура;

определены оптимальные условия очистки рекомбинантного фермента экзоинулиназы Ht1-FEH I, экспрессируемого в дрожжах *Pichia Pastoris* GS-115;

изучены физико-химические и кинетические свойства очищенной рекомбинантной экзоинулиназы Ht1-FEH I клубней топинамбура сорта “Мужиза”;

проведены сравнительное выделение свободной фруктозы и инулина из клубней с помощью ультразвука, сверхкритической флюидной экстракции и классическим методом;

впервые получена кристаллическая фруктоза из инулина с использованием очищенной рекомбинантной экзоинулиназы Ht1-FEH I клубней топинамбура сорта “Мужиза”.

Практические результаты исследования состоят в следующем:

показано, что молекулярная масса гена Ht1-FEH I, амплифицированного из клубней топинамбура сорта Мужиза, составляет 1683 п.н.;

определена оптимальное условие экспрессии рекомбинантной экзоинулиназы Ht1-FEH I в дрожжах *Pichia pastoris* GS-115;

подобрано оптимальное условие очистки рекомбинантного фермента Ht1-FEH I, синтезируемого в дрожжах *Pichia pastoris* GS-115;

разработана технология получения кристаллической фруктозы из клубней топинамбура с использованием синтезированного фермента инулиназы.

Достоверность результатов исследования обосновывается на том, что для получения экспериментальных результатов использовались высокоточные рН-метры, электронные титранты, аналитические весы и современные физико-химические, биохимические методы, современные компьютерные программы, которые были внедрены в процесс получения фруктозы на основе топинамбура местного сорта «Мужиза».

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследований заключается в клонировании рекомбинантного фермента экзоинулиназы Ht1-FEH I и его эффективной экспрессии в метилатрофных дрожжах *Pichia pastoris* GS-115, подборе оптимальных условий его выделения и очистки, изучении физико-химических и кинетически свойств очищенного фермента.

Практическая значимость результатов исследований заключается в том, что полученный рекомбинантный фермент экзоинулиназа Ht1-FEH I может быть использован в промышленном производстве моносахарида фруктозы из полисахарида инулина, содержащегося в соке топинамбура.

Внедрение результатов исследований. На основании полученных научных результатов по разработке технологии получения кристаллической фруктозы из корня топинамбура с использованием фермента инулиназы, эффективно используемое при гидролизе инулина, содержащегося в соке топинамбура:

штамм дрожжей «*Komagataella Pastoris* - BZ», выделенный из растения топинамбура «Мужиза», передан в генофонд уникальной предметной коллекции «Фитопатогенные и другие микроорганизмы» Института генетики и экспериментальной биологии растений (Справочный номер 4/1255-789 АН РУз от 4 декабря 2023 г.). В результате штаммы фитопатогенных микроорганизмов обогатили генофонд коллекции и позволили сформировать электронную базу данных системы анализа информации;

выделенный штамм дрожжей «*Komagataella Pastoris*-BZ» зарегистрирован в базе данных Национальной коллекции патогенных микроорганизмов (World Data Center for Microorganism Collection of plant pathogenic and other microorganisms) под номером 1228 (http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/1228/) всемирного информационного центра по микроорганизмам. В результате дрожжи *Komagataella Pastoris* - BZ могут использоваться в научных исследованиях по всему миру;

последовательность гена, который кодирует рекомбинантный экзоинулиназы (Ht-FEH I), включен в международную базу данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, Национальная

медицинская библиотека США, GenBankID ON745303.1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ON745303.1/>). В результате стало возможным использование данной информации для сравнительного анализа аналогичных ферментов в глобальном масштабе;

нуклеотидная последовательность гена, кодирующего рекомбинантный экзоинулиназы (Ht-FENI), в дрожжах *Pichia pastoris*, зарегистрирована в базе данных European Nucleotide Archive (ENA) (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/ON745303>) GenBankID ON745303.1. В результате стало возможным использование данной информации для сравнительного анализа аналогичных белков в глобальном масштабе.

Апробация результатов исследования. Результаты исследования обсуждались на 2 международных и 3 национальных научно-практических конференциях.

Публикация результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 10 научных работ. Из них 6 научных статей, в том числе 3 в зарубежных и 3 в республиканских научных журналах, рекомендованные Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 136 страницы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Введение основывается на актуальности и необходимости темы, цели и задачах исследования, описываются объект и предмет, уровень исследования, методы исследования, совместимость исследования с приоритетными направлениями исследования. развития науки и техники Республики Узбекистан, раскрыта научная новизна исследования и практическая значимость, сведения о внедрении результатов исследования, достоверности проведенных исследований, утверждения и публикации результатов, объеме и представлена структура диссертации.

В первой главе диссертации **«Перспективы переработки топинамбура и его использования»** изложены результаты проведенных по теме исследований, анализ зарубежной и отечественной литературы. Представлен анализ факторов, влияющих на процесс синтеза, очистки фермента экзоинулиназы (Ht-FEN I), содержащегося в клубнях топинамбура, и его эффективное использование при гидролизе инулина, содержащегося в соке топинамбура. Обобщаются данные и делаются научно-аналитические выводы, а на основе информации научной литературы излагаются цель, задачи, актуальность и значение диссертационной работы.

Во второй главе диссертации под названием **«Синтез фермента инулиназы *in vitro* с использованием полимеразной цепной реакции, а также физико-химические методы очистки фермента»** представлены методы первоначального подбора сырья для проведения исследований, исследования их основных физико-химических свойств. Описаны способы

получения кетогексозо-фруктозного моносахарида из полисахарида инулина, содержащегося в клубнях местного сорта топинамбура «Мужиза» и представлены лабораторные эксперименты.

Третья глава диссертации под названием «Получение кристаллической фруктозы из сока клубней топинамбура с помощью фермента инулиназы» содержит описание синтеза и очистки фермента экзоинулиназы (Ht-FEH I), содержащегося в клубнях топинамбура, и исследование гидролиза инулина, содержащегося в соке топинамбура.

Синтез праймеров. Выделение нуклеотидов топинамбура сорта «Мужиза», синтез in vitro части, ответственной за синтез фермента инулиназы методом полимеразной цепной реакции.

На основе последовательности ДНК гена Ht1-FEH I (по данным базы данных NCBI) и выбранных сайтов рестрикции (*EcoRI* и *XbaI*) были синтезированы следующие праймеры:

- 1) Forward *EcoRI* 5'-CTGAATTCATGGTAAAGGAGATGGCTG-3'
- 2) Reverse *XbaI* 5'-TTTCTAGATCAATCCATAGGAACSTATTTGAGC-3'

Необходимые праймеры были синтезированы в 4 этапа химико-фосфорамидным методом. Прежде всего удалялись защитные группы (процесс детритилирования), препятствующие прикреплению нуклеозидов (Рисунок 1, 2).

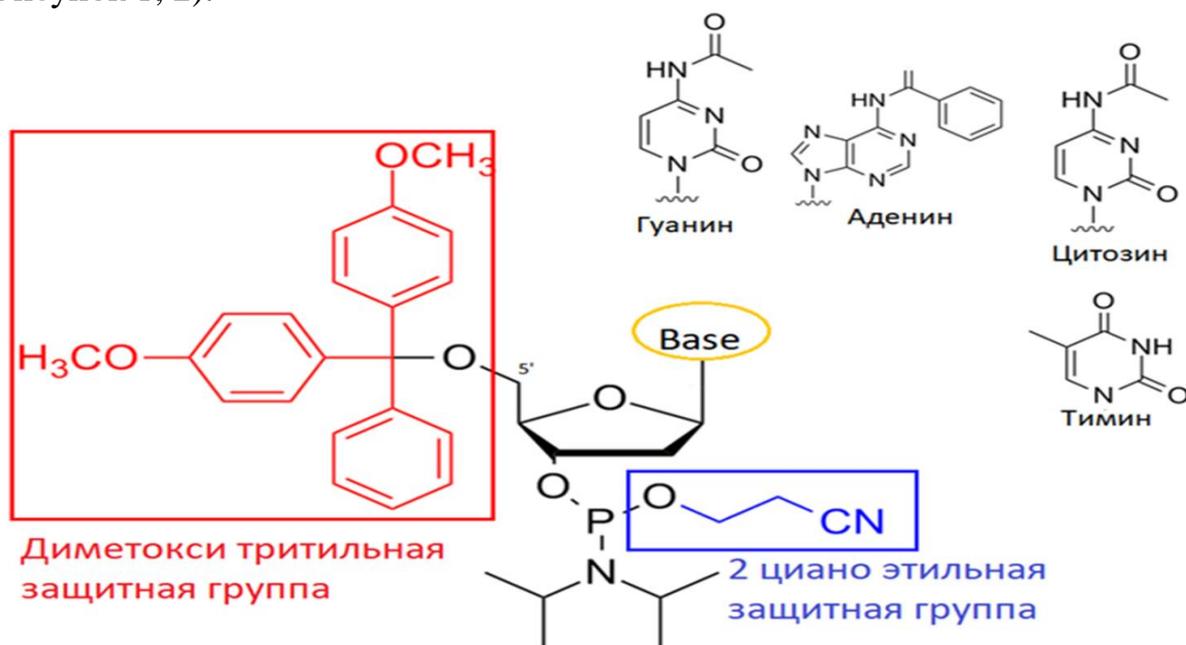


Рисунок 1. Схема синтеза нуклеотидных последовательностей

На следующем этапе удаляется защитная группа фосфорамидитных нуклеозидов.

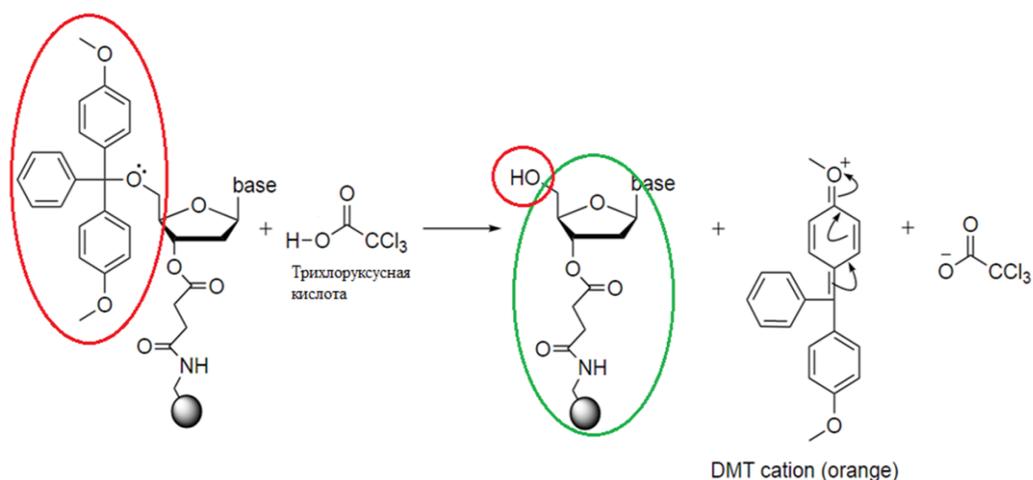


Рисунок 2. Удаление защитной группы фосфорамидита с помощью трихлоруксусной кислоты

В ходе исследований образуется динуклеотид путем реакции активированного (снятого с защиты) фосфорамидита со следующим основанием (нуклеотидом).

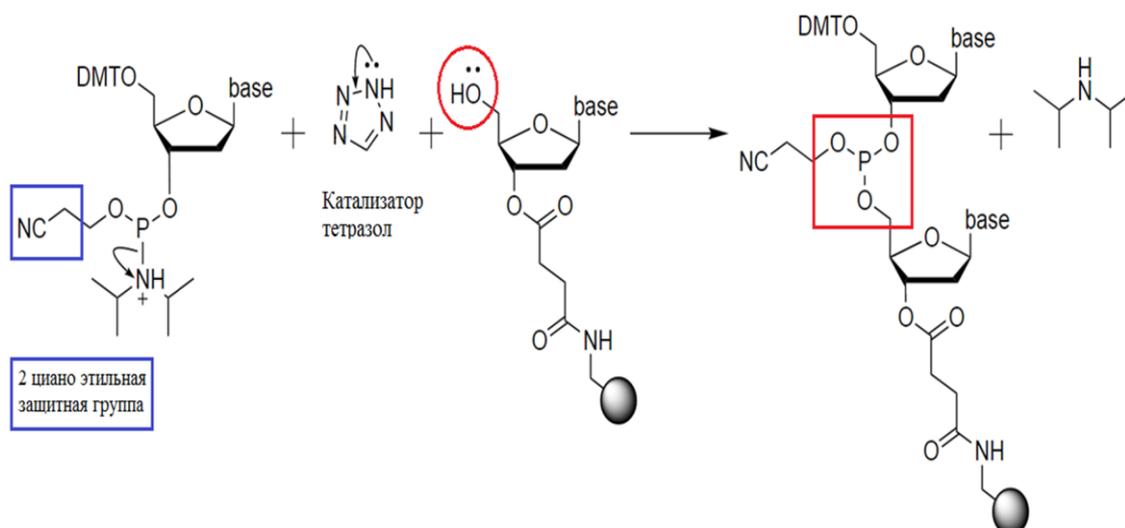


Рисунок 3. Реакция образование динуклеотида

Чтобы ограничить участие непрореагировавших фосфорамидитов в дальнейшей реакции, их инактивировали добавлением уксусного ангидрида в присутствии катализатора метилимидазола.

После объединения двух нуклеотидов остается несколько непрореагировавших 5'-гидроксильных групп. Если эти 5'-гидроксильные группы не активированы, они не смогут реагировать с фосфорамидитом на следующем этапе, и реакция может быть заблокирована. Блокированием этих групп создаются условия для следующей стадии реакции.

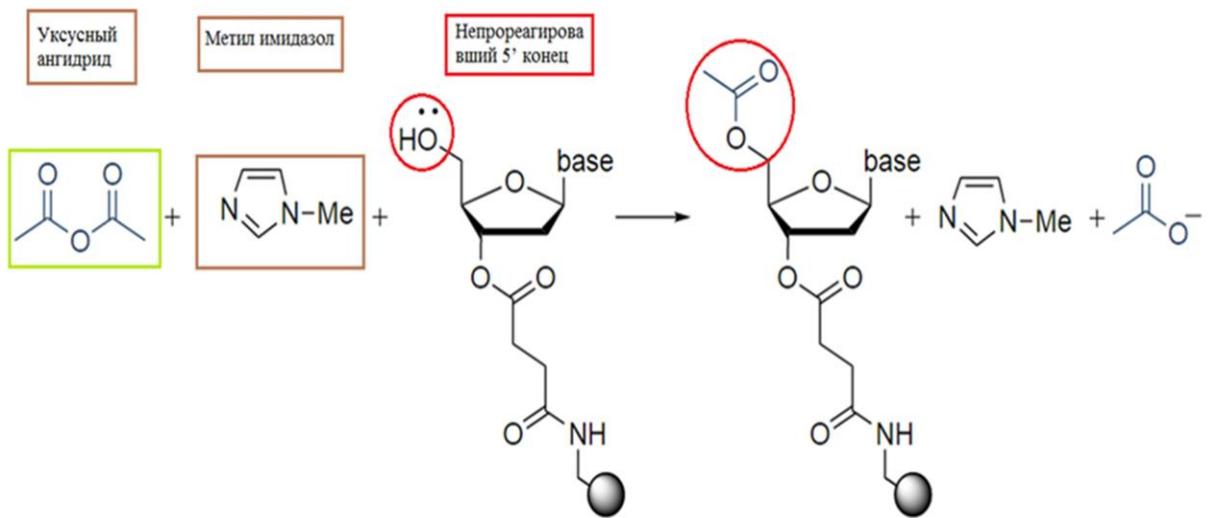


Рисунок 4. Блокирование фосфамидитов

Образующийся на второй стадии триэфирфосфит (P(III)) окисляется ионами йода, пиридином и водой для стабилизации кислотной связи.

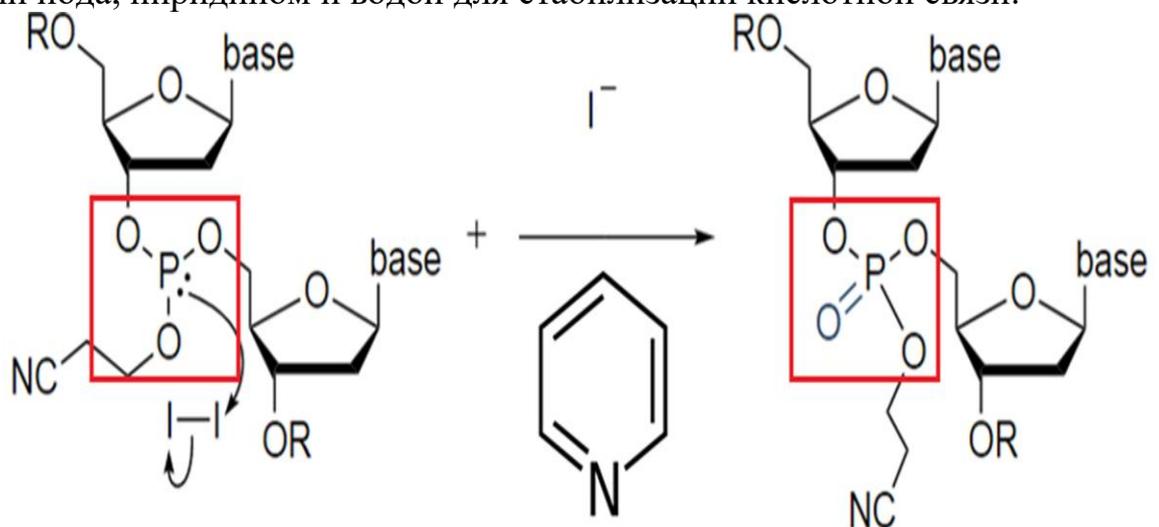


Рисунок 5. Окисление фосфамидита

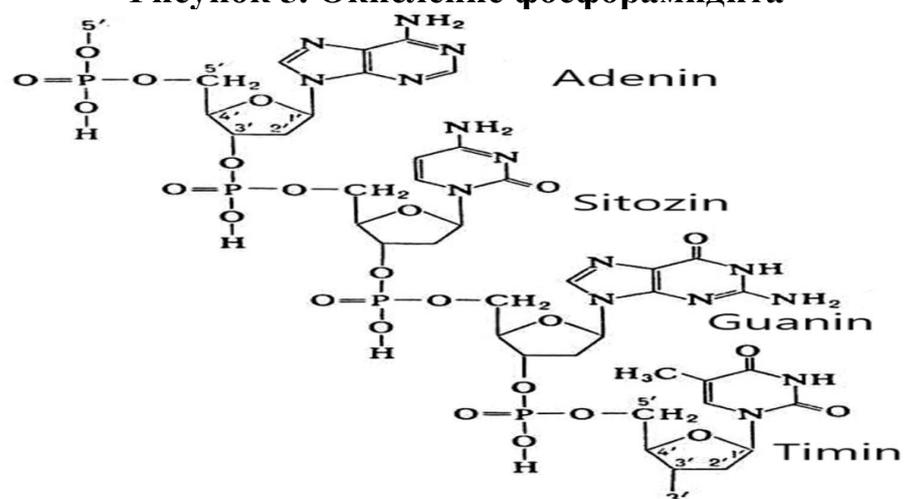


Рисунок 6. Общая химическая структура синтезированных праймеров

Таким образом, зная выбранные желаемые нуклеотидные последовательности, была синтезирована соответствующая структура ДНК.

На следующем этапе исследований мы трансформировали синтезированный фермент экзоинулиназу в клетки дрожжей. На основании физической карты плазмиды pPICZ(alpha)A (рис. 2) и ген Ht1-FEH I гидролизован с ферментом рестрикции *EcoRI* и *XbaI*. Полученные комплементарные молекулы ДНК лигированы с использованием фермента T4 ДНК-лигазы в соотношении 1:3 (вектор:ген).

В результате был получен рекомбинантный трансферный вектор дрожжей *Pichia pastoris*, содержащий ген, кодирующий фермент Ht1-FEH I - pPICZ(alpha)A-exoinulinase.

Трансформация рекомбинантную плазмиду pPICZalpha(A)-exoinulinase в Pichia pastoris.

В ходе исследования для обеспечения наиболее оптимальной производительности процесса было определено, что дрожжевые клетки надо выращивать при оптической плотности OD₆₀₀ 1.5, а оптимальное количество линейной ДНК составляет 200 нг, напряжения V=1500.

После трансформации рекомбинантные клетки выращиваны в YPDS, содержащей зеоцин (100 мкг/мл), затем отбирали изолированных колоний и повторно пересеивали (всего 27 колоний) на свежеприготовленную среду YPD (с зеоцином) для последующих процедур. Геномная ДНК 7 рекомбинантных штаммов из 27 колоний была выделена и проанализирована с помощью ПЦР на наличие гена Ht1-FEH I (рис. 7).

Из полученных результатов ПЦР можно сделать вывод, что все 7 отобранных рекомбинантных штаммов *P. pastoris* содержат целевой ген Ht1-FEH I размером 1683 п.н.

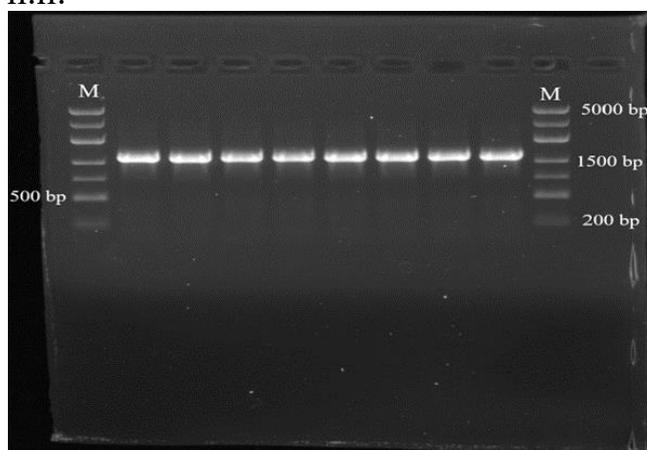


Рисунок 7. ПЦР-анализ рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*, содержащих рекомбинантные экзоинулиназы.

Здесь: образцы 1-7 представляют собой рекомбинантные штаммы *P. pastoris*; 8-й образец является образцом положительного контроля (в качестве К+ использовалась сама рекомбинантная плаزمида pPICZalpha(A)-экзоинулиназы)

Определение оптимальных условий для синтеза рекомбинантного фермента экзоинулиназы из топинамбура сорта “Мужиза”.

Были исследованы изменение уровня экспрессии Ht1-FEN I в зависимости от времени (24-96 часа), от количества метанола (0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%) в питательной среде и уровня секреции необходимого белка.

Таблица 1

Изменение уровня экспрессии Ht1-FEN I в зависимости от количества метанола и времени

Концентрация метанола (%)	Время инкубации	Степень разбавления	Результаты теста ИФА Ht1-FEN I (OD-450 нм)	Количество Ht1-FEN I (мг/мл)
0.5	24	1:30000	0.961	0.515
	48	1:30000	1.504	0.811
	72	1:30000	1.996	1.11
	96	1:30000	1.78	0.96
1	24	1:30000	0.969	0.521
	48	1:30000	1.517	0.823
	72	1:30000	2.05	1.115
	96	1:30000	1.79	0.967
1.5	24	1:30000	0.96	0.511
	48	1:30000	1.501	0.803
	72	1:30000	1.802	1.017
	96	1:30000	1.74	0.937
стандартный образец (коммерческий фермент)		1:10000	≥ 3000 (out)	≥1.5
		1:30000	2.915	1.5
стандартный отрицательный контроль		---	0.087	---

Как видно из таблицы 1 самый высокий уровень экспрессии фермента Ht1-FEN I наблюдается на 72-м часу культивирования при добавлении в питательную среду 1,0% метанола каждые 24 часа. Но очень близкий к этому результату показатель можно наблюдать на 72-м часу культивирования при добавлении в питательную среду 0,5% метанола каждые 24 часа. Разница между этими двумя результатами не оправдывает стоимость метанола. В связи с этим выбранные условия, такие как 0,5% метанол и время культивирования 72 часа, являются оптимальными условиями для экспрессии рекомбинантного фермента Ht1-FEN I.

Ниже показано процентное содержание внутриклеточного и секретируемого количества (уровень секреции) экспрессированного рекомбинантного фермента Ht1-FEN I (таб. 2).

Таблица 2

Роль сигнала секреции α -фактора в экспрессии рекомбинантного фермента Ht1-FEN I

Место экспрессии фермента Ht1-FEN I	Количество Ht1-FEN I	Процентное количество фермента Ht1-FEN I	Сумма общих белков
Внутриклеточная экспрессия	0.203 г/л	18.3%	5.7 г/л
Экспрессия в питательную среду (Секреция)	0.907 г/л	81.7%	2.18 г/л

Очистка фракций, содержащих рекомбинантный фермент с помощью аффинной хроматографии.

Рекомбинантный фермент Ht1-FEN I экспрессированы с меткой 6XHis на С-конце для облегчения очистки рекомбинантного белка была осуществлена с помощью колоночной хроматографии с зарядом Ni²⁺. При этом изучены влияние значений имидазола 10–80 мМ при промывке колонки (Ni-NTA 5cm, cOmplete His-Tag Purification Column, Roche Diagnostics GmbH, Germany) и 100–500 мМ количества имидазола в процессе элюирования (таб. 3).

Таблица 3

Восстановление меченого His6 рекомбинантного Ht1-FEN I во время процедуры очистки методом аффинной хроматографии

Концентрация имидазола (мМ)	Кратность промывания (по объему колонки)	Общее количество белка, элюированного с колонки (мг/мл)	Результаты теста ИФА рекомбинантного Ht1-FEN I	
			OD-450 нм	Степень разбавления
200	2	1.899	0.963	1:60000
	3	2.548	1.489	1:60000
	4	2.889	1.655	1:60000
	5	3.121	2.012	1:60000
	6	3.197	2.115	1:60000
250	2	2.101	1.156	1:60000
	3	2.860	1.701	1:60000
	4	3.107	2.009	1:60000
	5	3.382	2.671	1:60000
	6	3.382	2.671	1:60000
300	2	2.107	1.158	1:60000
	3	2.866	1.705	1:60000
	4	3.112	2.021	1:60000
	5	3.382	2.673	1:60000
	6	3.382	2.673	1:60000

Таким образом, были выбраны оптимальные условия очистки рекомбинантного фермента Ht1-FEN I методом аффинной хроматографии: 60 мМ имидазола (300 мМ NaCl, 50 мМ NaH₂PO₄, 60 мМ имидазол pH 8,0) для процесса промывки колонки (при 10-кратной промывке колонки) и 250 мМ имидазола (300 мМ NaCl, 50 мМ NaH₂PO₄, 250 мМ имидазол pH 8,0) для процесса элюирования (при 5-кратной промывке колонки).

Затем проводят электрофоретический анализ 10% ПААГ с диализированными фракциями, содержащими целевой белок (рис. 8)

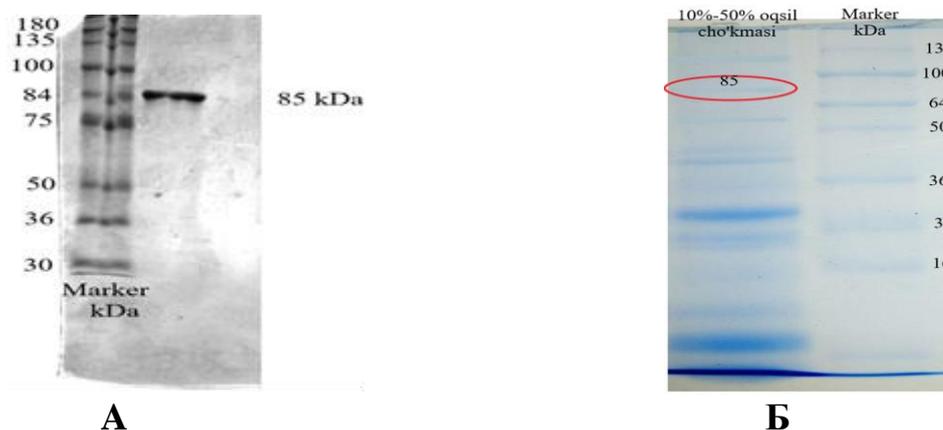


Рисунок 8. Очистка рекомбинантного фермента Ht1-FEN I с C-концевой His6-меткой: А) Анализ элюированных фракций в 10% SDS-PAGE Б) анализ осадка, осажденного раствором 50% насыщенного сульфата аммония

Результаты электрофореза 10% ПААГ показали, что очищенный рекомбинантный фермент Ht1-FEN I не соответствовал размеру аминокислот (560 аминокислот, 62,8 кДа согласно SnapGene v6.1), кодирующих ген Ht1-FEN I, то есть имел молекулярную массу 85 кДа. Таким образом, за счет гликозилирования очищенного рекомбинантного фермента Ht1-FEN I в системе экспрессии дрожжей *Pichia pastoris* его молекулярная масса равна 85 кДа.

Таблица 4

Окончательный расчет стадий очистки рекомбинантного фермента Ht1-FEN I

Стадии очистки	Количество общего белка, мг	Количество фермента Ht1-FEN I, мг	Удельная активность, ед/мг	Степен очистки	Чистота фермента, %	Выход, %
Белок, секретлируемый в питательную среду	218,55	90,7	9,79	1	41,5	100
Осаждение сульфатом аммония	115,48	80,72	16,64	1,7	69,9	89
Аффинная хроматография	78,3	71,65	21,55	2,2	91,5	79

Таким образом, в нашем исследовании самая высокая удельная активность очищенного рекомбинантного фермента Ht1-FEN I, экспрессированная в *Pichia pastoris* GS115, составляла около 21,55 ед/мг, рекомбинантный фермент Ht1-FEN I был очищен в 2,2 раза с выходом 79% при чистоте 91,5%. Количество общих белков в очищенной конечной фракции, содержащей рекомбинантный фермент, составляет 3,132 мг/мл, объем 25 мл (таб. 4).

Определение оптимальных условий катализа очищенного рекомбинантного фермента Ht1-FEN I.

Результаты представлены в виде значений относительно максимальной скорости высвобождения фруктозы после инкубации рекомбинантного Ht1-FEH I с 10 мМ 1-kestозы и обработки при различных значениях рН и различными температурами (рис. 9 и 10).

Оптимальное значение рН и температура для активности рекомбинантного Ht1-FEH I с использованием 1-К в качестве субстрата составило 6,0 (рис. 9) и 35°C (рис. 10), что не согласуется с оптимальными значениями для нативных 1-FEH из сока клубней топинамбура при самоосахаривании.

Различие рН и температурных оптимумов фермента одного типа, но с разными системами экспрессии можно объяснить различием их пост-трансляционных модификаций.



Рисунок 9. Влияние рН на активность очищенных рекомбинантных Ht1-FEH I

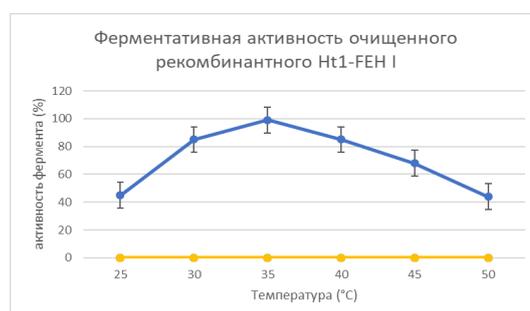


Рисунок 10. Влияние температуры на активность очищенного рекомбинантного Ht1-FEH I

Экстракция сахаридов ультразвуком (акустика), сверхкритической флюидной экстракцией и классическим методом из клубней топинамбура.

После измельчения 1 кг вымытых клубней топинамбура (сорта “Мужиза”) до 1 мм в диаметре сетчатым режущим и выжимающим автоматом, проведены ультразвуковую обработку мезги-сока. При окончании эксперимента проведен анализ с помощью калибровочного графика на количество свободной фруктозы (Ф1) методом рН-метрии, результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5

Количество свободной фруктозы в соке после акустики

Частота (кГц)	Время(мин)			
	3	5	7	10
Количество фруктозы (%)				
18	1.1%	1.17%	1.2%	1.25%
20	1.28%	1.15%	1.5%	1.2%
24	1.15%	1.1%	1.91%	1.91%
28	1.2%	1.1%	1.91%	1.91%

Как видно из таблицы при 7 мин 24 кГц 28 кГц достигается наибольшее количество свободной фруктозы, 1,91%.

Кроме того, определено количество Ф1 в составе сока, полученного после процесса сверхкритической флюидной экстракции (при 1,5 МПа, 7

минут), Φ_1 – 3,8%. Количество Φ_1 в составе сока полученный классическим методом, составил $\Phi_1 = 1,1\%$. На этом этапе метод сверхкритической флюидной экстракции показал себя более эффективным, простым и энергосберегающим.

Получение кристаллической фруктозы кислотным гидролизом из сиропа клубней топинамбура.

Проведены эксперименты с целью сравнения процессов ферментативного и кислотного гидролиза. Сперва проведено кислотный гидролиз сока. В ниже следующей таблице 6 и рисунке 11 показаны результаты эксперимента при изменении pH, температуры и времени.

Результаты показывают, что гидролиз инулина в показателях pH – 1, температуры – 50°C, во времени – 4 ч, достигает своего самого высокого уровня. С продлением времени в фруктозе наблюдается процесс деструкции.

Таблица 6

Кислотный гидролиз инулина CH_3COOH . Количество фруктозы (%) при изменении pH и температуры

T°C	pH	t (час)		
		2	4	6
Количество фруктозы (%)				
37°C	2.5	2.3%	4.1%	3.8%
	1	7.4%	8.6%	8%
50°C	2.5	2.2%	5.3%	4.8%
	1	9.5%	11.4%	9.6%



Рисунок 11. Анализ БХ кислотного гидролиза инулина в соке топинамбура в условиях pH – 1, температуры – 50°C, времени – 4 ч

Из хроматограммы видно, что даже при оптимальных условиях кислотного гидролиза, все равно образуются вторичные вещества расщепления фруктозы (фурфурол, алкиламид, оксиметилфурфурол).

Получения кристаллической фруктозы способом самоосахаривания.

На следующем этапе исследованы процесс самоосахаривания сока, полученного различными способами. Эксперименты проводили при разных градиентах температуры, времени и pH. Полученное количество моносахарида (фруктоза) определяли методом pH-метрии.

Общий вывод полученных результатов заключается в следующем. Самоосахаривания сока из клубней топинамбура сорта “Мужиза”,

обработанный классическим (количество образовавшейся фруктозы 8,1%) и ультразвуковым методом (количество образовавшейся фруктозы 8,9%), имеет высокую эффективность при 40⁰С, рН = 5,3 – 5,5 в течении 24 часов. Сок, полученный СО₂ экстракцией, эффективен при 40⁰С , рН – 5,3 – 5,5 в течении 20 часов, количество образовавшейся фруктозы 11,1%. По количеству образующейся фруктозы метод экстракции СО₂ является наиболее продуктивным в процессе самоосахаривания.

Получения кристаллической фруктозы с помощью рекомбинантной экзоинулиназы.

Ферментативная обработка сока проведена при температурах 35-40⁰С и рН от 5,5 до 6,0 согласно оптимальным ферментативным условиям полученного рекомбинантного и внутреннего фермента экзоинулиназы. Концентрацию фермента варьированы - от 0,005 до 0,05 %. Полученное количество моносахарида (фруктоза) определено методом рН-метрии. Результаты исследований приведены в таблице 7.

Таблица 7

Образование фруктозы в соке топинамбура под действием рекомбинантного фермента Ht1-FEH I зависит от рН среды, температуры и времени

рН	Т ⁰ С	Концентрация рекомбинантного фермента Ht1-FEH I	Время (час)				
			1	3	5	7	10
			Количество фруктозы (%)				
5,5	30	0,01	7,4%	10,6%	12,2%	11,9%	11,1%
		0,025	9%	11,3%	13,7%	12,5%	11,1%
		0,05	9,4%	11,7%	13,8%	12,5%	11,1%
	35	0,01	7,6%	11,3%	13,6%	13,6%	12,9%
		0,025	9,1%	12,1%	14,8%	14,1%	12,8%
		0,05	9,4%	12,5%	14,8%	14,1%	12,8%
	40	0,01	7,8%	11,3%	13%	13,1%	12,7%
		0,025	9,1%	11,4%	13,2%	13,4%	13,2%
		0,05	9,6%	11,9%	13,4%	13,4%	13,2%
6,0	30	0,01	7,6%	10,8%	14,3%	14,1%	13,4%
		0,025	9,2%	12,1%	15,7%	15,6%	14,1%
		0,05	9,5%	12,6%	15,8%	15,6%	14,1%
	35	0,01	7,7%	11,1%	14,5%	14,6%	14,1%
		0,025	9,4%	12,9%	23,2%	16,2%	14,9%
		0,05	9,6%	13,1%	16,2%	16,2%	14,9%
	40	0,01	7,7%	11%	13,8%	13,8%	13,3%
		0,025	9,1%	11,9%	15,1%	15,2%	15,1%
		0,05	9,5%	12,3%	15,2%	15,2%	15,1%

Из таблицы видно, что сок из клубней топинамбура сорта “Мужиза”, обработанный методом СО₂ экстракции, в присутствии 0,025% рекомбинантного фермента экзоинулиназы Ht1-FEH I обладает высокой эффективностью при 35⁰С, рН - 6 в течение 5 часов. В этих условиях в соке образовалось **23,2%** моносахарида фруктозы.

Был произведен процесс ферментация при участии активатора CaSO_4 0,01-0,05% по отношению к общей массе. Результаты приведены в таблице 8.

Таблица 8

Изменение количества фруктозы в (4%) с внесением в среду активатора инулиназ CaSO_4

Активатор инулиназ	Концентрация CaSO_4 (%)	Т°С	Время (час)		
			3	4	5
			Количество фруктозы (%)		
A ⁺ (CaSO_4)	0,01	35°С	13,1%	23,8%	16,6%
	0,03		13,2%	16,6%	16,6%
	0,05		13,3%	16,6%	16,6%
A ⁻	12,9%		14,5%	16,2%	

По результатам таблицы видно, что активатор - CaSO_4 при концентрации 0,01% может повысить эффект рекомбинантного фермента экзоинулиназы Ht1-FEH I по количеству продукта (образовавшейся фруктозы) до 0,4% и по времени инкубации до 20%.

Количественное и качественное определение полученной фруктозы методами ТСХ и ВЭЖХ.

Анализ методом ВЭЖХ (рис. 12).

Method Info: Analyze of Monosaccharides, column Zorbax- Eclipse XDB - C18, 3.0 x 100 mm, 3.5 μm

Sample Info: juice after fermentation

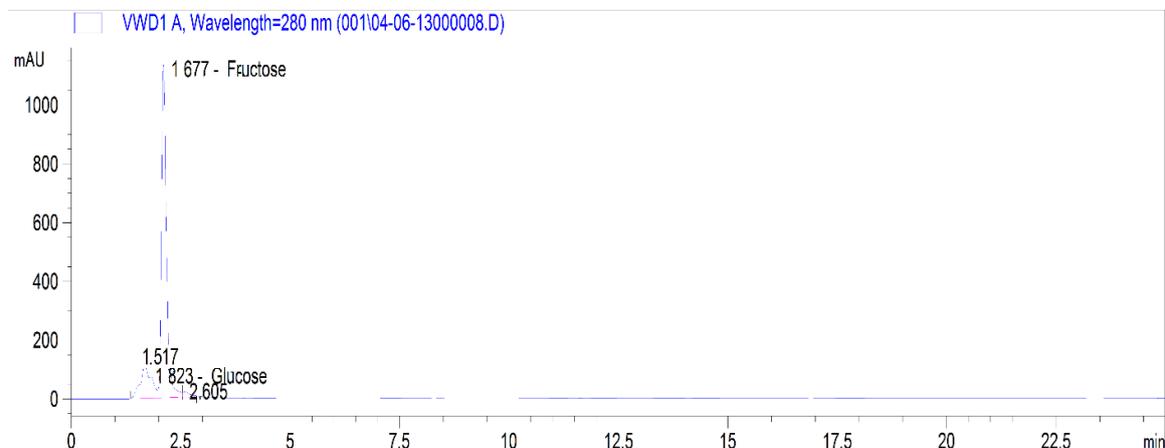


Рисунок 12. Количественное и качественное определение полученной фруктозы методом ВЭЖХ

Количество фруктозы определенное методом ВЭЖХ составило 23,8%, то есть 238 мг/мл.

Результатом исследования является то, что из 1 кг клубни топинамбура (объем экстракта - сока, полученного методом CO_2 экстракции составил 1200 мл) нами было получено 285,6 г или 28,56% моносахарида фруктозы с использованием рекомбинантного фермента экзоинулиназы Ht1-FEH I.

Анализ методом ТСХ.



Рисунок 13. Анализ ТСХ ферментативно гидролизованной фруктозы в соке топинамбура сорта Мужиза

В образце была обнаружена: D-фруктоза (рис. 13).

Результат ТСХ показывает, что процесс получения фруктозы прошел качественно (А-Стандарт Глю, Б-Образец В-Стандарт Фру). Как известно, топинамбур содержит небольшое количество моносахаридов глюкозы. Кроме того, 5% полисахаридного компонента инулина составляет глюкоза. Причину невозможности выявления глюкозы в результатах анализа можно объяснить низким ее содержанием в ферментативном соке.

Выводы

1. Впервые химически синтезированы необходимые праймеры для фермента экзоинулиназы Ht1-FEH I и разработана их химическая структура.

2. Впервые синтезированы фермент экзоинулиназы Ht1-FEH I клубней топинамбура сорта “Мужиза”. Определена нуклеотидная последовательность синтезированного фермента Ht1-FEH I и подтверждена ее молекулярная масса - 1683 п.н.

3. Впервые в мезофильных дрожжах *Pichia pastoris* GS-115 экспрессированы рекомбинантный фермент экзоинулиназа Ht1-FEH I клубней топинамбура. Определены оптимальные условия для синтеза данного фермента: количество метанола 0,5% и продолжительность культивирования 72 часа.

4. Изучены физико-химические и кинетические свойства очищенной рекомбинантной экзоинулиназы Ht1-FEH I клубней топинамбура сорта “Мужиза”. Методом Селиванова установлено, что самая высокая удельная активность данного фермента составила 21,55 Ед/мг при чистоте 91,5%, оптимальная температура и рН составляют 35°C и рН6 соответственно, а молекулярная масса составляет 85 кДа.

5. Впервые получена кристаллическая фруктоза из инулина с использованием очищенной рекомбинантной экзоинулиназы Ht1-FEH I клубней топинамбура сорта “Мужиза”. Сравнительная способность к самоосахаризации полисахарида инулина в соке, его кислотный гидролиз и способность к гидролизу в присутствии рекомбинантного фермента Ht1-FEH I, значения выхода свободного фруктоза составили 11,1%, 11,4% и 23,8% соответственно. В качестве оптимальной концентрации для ферментации рекомбинантным ферментом рекомендованы 0,025% очищенный фермент Ht1-FEH.

6. Добавление в среду активатора инулиназ - 0,01% CaSO₄ при инкубации может повысить эффект рекомбинантного фермента экзоинулиназы Ht1-FEH I по количеству образовавшегося продукта до 0,4% и по времени инкубации до 20%. В результате исследований нами было получено из 1 кг клубней топинамбура 285,6 г или 28,56 % моносахарида.

**SCIENTIFIC COUNCIL FOR ADDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc.03/30.12.2019.T.04.01 AT THE TASHKENT CHEMICAL
TECHNOLOGY INSTITUTE**

TASHKENT CHEMICAL-TECHNOLOGICAL INSTITUTE

ZOKIROV BEKZOD ULASHEVICH

**OBTAINING CRYSTALLINE FRUCTOSE FROM JERUSALEM
ARTICHOKE TUBERS USING THE ENZYME INSULINASE**

02.00.14-Technology of organic substances and materials based on them

**ABSTRACT OF THE DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD) THESIS OF CHEMICAL
SCIENCES**

Tashkent – 2023

The theme of the dissertation of the doctor of philosophy (PhD) on chemical sciences was registered by the Supreme Attestation Commission at the Ministry of higher education, science and innovations of the Republic of Uzbekistan under B2023.4.PhD/K708

The dissertation was completed at the Tashkent Institute of Chemical Technology.

The abstract of the dissertation was posted in three (Uzbek, English, and Russian (resume)) languages on the website of the Scientific Council (www.tiame.uz) and on the website of "Ziyonet" informational and educational portal (www.ziyonet.uz).

Scientific supervisor:

Khusenov Arslonnazar Shernazarovich
doctor of chemical sciences, professor

Official opponents:

Ikramov Abduvakhab
Doctor of technical science, professor
Saida Athamova
Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor

Leading organization

Bukharsky engineering and technological institute

The defense of the dissertation will take place on «_____» _____ 2023 at _____ at a meeting of once-only Scientific council on the based of Scientific council DSc.03/30.12.2019.T.04.01 at the Tashkent chemical-technological institute (Address: 100011, Uzbekistan, Shaykhantakhur district of Tashkent city, A. Navoi str., 32. Ph.: (99871) 244-79-21; fax: (99871) 244-7917; e-mail: tkti_info@mail.ru).

The dissertation can be reviewed at the Informational Resource Centre of Tashkent chemical-technological institute (registration number №_____) (Address: 100011, Uzbekistan, Shaykhantakhur district of Tashkent city, A. Navoi str., 32. Ph.: (99871) 244-79-21).

The abstract of the dissertation has been distributed on «___» _____ 2023 year
Protocol at the register № _____ dated «___» _____ 2024 year

S.M. Turobjonov

The Chairman of Scientific Council for awarding of scientific degrees, Doctor of Technical Sciences, akademician

X.I. Kadirov

The scientific secretary of Scientific Council for awarding of scientific degrees, Doctor of Technical Sciences, Professor

G. Rakhmonberdiev

Chairman of scientific seminar at the Scientific Council for awarding of scientific degrees, Doctor of Chemical Sciences, Professor

INTRODUCTION (abstract of PhD thesis)

The aim of research work is to synthesize and purify native exoinulinase (Ht-FEHI) from Jerusalem artichoke tubers and its effective use in the hydrolysis of inulin contained in Jerusalem artichoke syrup.

The objects of the research work are the tubers of the local variety of Jerusalem artichoke Mujiza, inulin polysaccharide and ketohexose monosaccharide - fructose contained in the tubers.

Scientific novelty of the research work:

for the first time, the recombinant enzyme Ht1-FEH I exoinulinase of Jerusalem artichoke tubers of the Mujiza variety was cloned;

for the first time in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* GS-115, the native enzyme exoinulinase Ht1-FEH I of Jerusalem artichoke tubers was expressed;

the optimal conditions for the purification of the recombinant enzyme Ht1-FEH I exoinulinase from the yeast *Pichia pastoris* GS-115 were determined;

for the first time, the physicochemical and kinetic properties of purified recombinant exoinulinase Ht1-FEH I of Jerusalem artichoke tubers of the Mujiza variety were studied;

a comparative isolation of free fructose and inulin from tubers was carried out using ultrasound, supercritical fluid extraction and the classical method;

for the first time, crystalline fructose was obtained from inulin using purified recombinant exoinulinase Ht1-FEH I of Jerusalem artichoke tubers of the Mujiza variety in syrup of Jerusalem artichoke tubers.

Implementation of the results. Based on the scientific results obtained on the development of technology for producing crystalline fructose from Jerusalem artichoke root using the enzyme inulinase, the effective use of inulin contained in Jerusalem artichoke juice in the hydrolysis is:

the yeast strain "*Komagataella Pastoris* - BZ", isolated from the Jerusalem artichoke plant "Mujiza", was transferred to the gene pool of the unique subject collection "Phytopathogenic and other microorganisms" of the Institute of Genetics and Experimental Plant Biology (Reference number 4/1255-789 of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan dated December 4, 2023). As a result, strains of phytopathogenic microorganisms enriched the gene pool of the collection and made it possible to create an electronic database of an information analysis system;

the isolated yeast strain "*Komagataella Pastoris*-BZ" is registered in the database of the National Collection of Pathogenic Microorganisms (World Data Center for Microorganism Collection of plant pathogenic and other microorganisms) under number 1228 (http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/1228) world microorganism information center. As a result, the yeast *Komagataella Pastoris* - BZ can be used in scientific research around the world;

the sequence of the gene that encodes recombinant exoinulinase (Ht-FEHI) is included in the international database NCBI (National Center for Biotechnology Information), GenBankID ON745303.1. As a result, it became possible to use this information for the comparative analysis of similar enzymes on a global scale;

the nucleotide sequence of the gene encoding the recombinant protein exoinulinase (Ht-FEHI), in the *Pichia pastoris* yeast is registered in the European Nucleotide Archive (ENA) (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/ON745303>) GenBankID ON745303.1. As a result, it became possible to use this information for a comparative analysis of similar proteins on a global scale;

The structure and volume of the thesis. The dissertation consists of the introduction, three chapters, conclusion and list of references. The volume of the thesis is 136 pages.

E'LON QILINGAN ISHLAR RO'YXATI
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I bo'lim (I часть; I part)

1. Зокиров Бекзод Улашевич, Равшанов Сувонкул Сапарович, Выделение, очистка фермента инулиназы из растения *hellanthus tuberosus* I и изучение его физико-химических и кинетических свойств. *Universum: химия и биология: научный журнал*. 2021. – № 6(84).pp 38-41.

2. Зокиров Бекзод Улашевич, Исмоилова Мафтуна Рустам кизи, Равшанов Сувонкул Сапарович. Производство кристаллической фруктозы из клубней *heliánthus tuberósus*. *Universum: химия и биология: научный журнал*. 2021. № 7(85).pp 30-35

3. Зокиров Бекзод Улашевич. *Helianthus tuberosus* илдиз меваси таркибидаги эркин моносахаридларни аниқлаш ва ажратиб олиш. *FarDU. ILMIY XABARLAR*, №-2021,pp 27-32.

4. Зокиров Б.У., Равшанов С.С. Получение моносахарида – фруктозы из клубней топинамбура. *Хоразм маъмун академияси ахборотномаси 2021-9*, 46-49 betlar

5. B.U. Zokirov, V.Z. Nurmukhamedova, A.Sh. Khusenov. Research on the technology of crystal fructose extraction from *Hellanthus tuberosus* I *Композиционные материалы №3, 2023/ 144-147 p.*

6. Zokirov B. U., Isobaev H. N., Umurqulova F. S., Khusenov A. Sh., Rakhimov K.N., Kaipbergenova G.R. Exploring the potential of recombinant inulinase from Jerusalem artichokes for sustainable enzyme Production. *Nar. Edu.a.sci.rev. 0362-8027 Vol.3. Issue 1*

II bo'lim (II часть, II part)

7. Зокиров Б.У. *Hellanthus tuberosus* I ўсимлигининг кимёвий таркибини тадқиқ қилиш. *Замонавий органик кимёнинг долзарб муаммолари, Республика илмий-амалий анжумани материаллари 1-май 2021йил*, pp 129.

8. Зокиров Б.У. Isolation, purification of inulinase from *helianthus tuberosus*. *Замонавий органик кимёнинг долзарб муаммолари, Республика илмий-амалий анжумани материаллари 1-май 2021йил* pp. 132.

9. B.U. Zokirov., S.S. Ravshanov. Study of the effect of temperature on the separation of fructose from *hellanthus tuberosus*. «Actual problems of the chemistry of natural compounds». Scientific conference of young scientists S.Yu. Yunusov Institute of the Chemistry of Natural Compounds Society of Chem is of Uzbekistan. March 17, 2022. pp.158.

10. B.U. Zokirov., Development of optimal separation conditions Inulinase from *helianthus tuberosus*. “Science and innovation in the xxi century: current issues, discoveries and achievements - ii” conference date 17-06-2021 Hawaii USA. pp. 7-10.

Автореферат «Кимё ва кимёвий технология» журнали тахририятида тахрирдан утказилиб, узбек, рус ва инглиз тилларидаги матнлар узаро мувофиқлаштирилди.

Бичими 84x60¹/16. «Times New Roman» гарнитураси. Рақамли
босма усули. Times гарнитураси.

Шартли босма табоғи: 3. Адади 100. Буюртма № 9

Гувоҳнома № 100624
“OUTDOOR MEDIA” Хусусий корхонаси
Чилонзор тумани ,чилонзон кўчаси 81 уй

