

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ

Қўл ёзма ҳуқуқида

УДК 577.152.321

Кулонов Абдулазиз Ибрагимович

ОЗИҚ-ОВҚАТ САНОАТИ УЧУН ИНУЛИНАЗА ФЕРМЕНТИ
АЖРАТИБ ОЛИШ БИОТЕХНОЛОГИЯСИ

5A140104 – Биотехнология

Магистр

академик даражасини олиш учун ёзилган

диссертация

Илмий раҳбар:

т.ф.н. доц. Д. Т. Мирзарахметова

Тошкент – 2014

МУНДАРИЖА

КИРИШ	2
1-боб. АДАБИЁТЛАР ШАРҲИ	6
1. Инулиназа продуцентлари учун табиий манба(субстрат)лар	6
2. Инулиназа продуцентлари	8
3. Продуцентларни ўстириш шароитлари	14
4. Инулиназанинг хусусиятлари	16
5. Инулиназаларнинг қўлланилиши	20
6. Инулиназа ферментининг фаоллигини аниқлаш	27
7. Инулиназани ажратиб олиш ва тозалаш усуллари	27
1- боб бўйича хулоса	30
2-боб. МАТЕРИАЛЛАР ВА МЕТОДЛАР	31
1. Ачиткиларни даврий тартибда ўстириш	31
2. Микроорганизмлар ҳужайрасини бевосита санаш	32
3. Ачиткилар ўстирилаётган культуранинг микробиологик тозалик даражасини назорат қилиш	34
4. Ачитқи инулиназаларини ажратиб олиш ва тозалаш	34
5. Оксилларни ПААГ да электрофорези	35
6. Инулиназа ферментини фаоллигини аниқлаш	36
7. Фруктоза миқдорини аниқлаш	37
8. Инулиназа ферменти миқдорини аниқлаш	38
9. Инулиназанинг физик-кимёвий кўрсаткичларини аниқлаш	38
10. Экспериментал олинган натижаларнинг статистик таҳлили	41
2-боб бўйича хулоса	43
3-боб. НАТИЖАЛАР ТАҲЛИЛИ	44
1. Инулиназа ҳосил қилувчи ачитқи замбуруғларини скрининг қилиш	44
2. Инулиназа ферментини ажратиб олиш ва тозалаш	47
3. Ачитқи инулиназасининг хусусиятлари	52
4. Фермент препаратини ишлаб чиқариш учун таклиф этилган биотехнология	59
3-боб бўйича хулоса	60
ХУЛОСА	61
Фойдаланилган адабиётлар рўйхати	63

КИРИШ

Мавзунинг долзарблиги. Ҳозирги кунда кўплаб тадқиқот йўналишлари сифатли озиқ-овқат маҳсулотлари ишлаб чиқариш биотехнологиясини яратишга қаратилган. Бунда асосий эътибор қандли маҳсулотлар, асосан фруктозага қаратилган. Бу қанд озиқ-овқатларнинг калориявийлигини камайтириш, даволовчи-профилактик ва диетик озиқ-овқат маҳсулотлари, асосан шарбатлар яратиш учун жуда ҳам зарур. Шунинг учун Ўзбекистон ишлаб чиқариш саноати учун фруктоза ажратиш олишнинг янги биотехнологиясини яратиш энг муҳим вазифалардан ҳисобланади. Дунёнинг турли мамлакатлари каби Ўзбекистон озиқ-овқат саноати учун ферментатив катализ асосида инулиндан фруктоза олиш биотехнологиясини яратиш катта муаммо бўлиб турибди.

Истиқболли ва экологик қулай, таркибида полисахарид-инулин бўлган фруктоза манбалари ўсимлик хом-ашёлари ҳисобланади. Фруктоза ишлаб чиқаришда микробиологик фермент препаратларидан фойдаланиб уларни парчалаб олиш муҳим ўрин эгаллайди.

Инулин тутувчи манбалардан истиқболли субстратлар ва микроорганизмлар орасидан инулиназанинг фаол продуцентларини танлаш, инулиназа ҳосил бўлишининг босқичлари ва унинг хоссаларини ўрганиш, фруктоза шарбатлари ва турли озиқ-овқат маҳсулотлари олиш биотехнологиясини яратиш каби келтирилган муаммолар долзарб ҳисобланади.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Инулиннинг ферментатив гидролизи бўйича кўплаб тадқиқотлар қилинган ва ўрганилган. Барча амалий тадқиқотларда инулиназанинг продуцентлари бўлиб замбуруғлар [Camelia NEAGU et al., 2011] ва бактериялар ташкил этади [Camelia NEAGU et al., 2011, Marcia Luciana Cazetta et al., 2010]. Хужайра ичи инулиназани бактериялардан [Marcin Skowronek and Jan Fiedurek, 2006] ва ачитқи замбуруғларидан [Рутковская Т.Р. и др., 2010] ажратиш олиш ва

тозалаш усуллари яратилган. Лекин ажратиб олинган эндоинулиназларни ишлаб чиқариш учун озиқ-овқат соноатида қўллаш имкониятлари жуда чегараланган. Муаммолардан бири замбуруғ микотоксинлари фермент культурасини ифлослаши ва озиқ-овқат саноатида қўллаш муаммоли бўлса, икинчиси – катта миқдорда эндоферментларни ажратиб олиш технологиясини тан нархи кимматлиги ҳисобланади. Шунинг учун, озиқ-овқат саноатида қўлланадиган ачитқи замбуруғлари орасидан фаол экзо-инулиназа продуцентини танлаб олиш ва унинг инулиназа ферментини тозалаб олиш ва кинетик хоссаларини ўрганиш муҳимдир.

Тадқиқотнинг мақсади

Мазкур магистрлик диссертация ишида микроорганизмдан озиқ-овқат саноати талабларига жавоб бера оладиган инулиназа ферментини ажратиб олиш ва уни хусусиятларини ўрганиш мақсад қилиб қўйилган.

Тадқиқот вазифалари

1. Озиқ-овқат саноатида қўлланадиган ачитқи замбуруғлар орасидан инулин гидролизлаш фаолликга эга бўлган продуцентларини скрининг қилиш;
2. Фаол продуцентни инулин гидролизлай оладиган фаолликга эга ферментни ажратиб олиш ва тозалаш;
3. Ажратиб олинган ва тозаланган ферментнинг кинетик хусусиятларини ўрганиш.

Тадқиқот объекти ва предмети. Ачитқи замбуруғ инулиназаси фаоллигини ўрганиш.

Тадқиқотнинг асосий масалалари ва фаразлари. Ачитқи замбуруғлари инулин тутган муҳитда экзо-инулиназа хосил қилиш фаоллигига эга. Озиқ-овқат саноатида қўлланадиган ачитқи замбуруғлар орасидан фаол инулиназа продуцентларини инулиназа ферментини хосил қилиш фаоллиги бўйича скрининг қилиб, танлаб олинган продуцентдан фаол инулиназа ферментини ажратиб олиб ва тозалаб, кинетик

хоссаларини ўрганилса, уни фруктоза таркибли шарбатлар ва функционал шарбатлар ишлаб чиқаришда қўллаш имкониятлари очилади.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги: Ачитқидан инулиназа ажратиб олинди, у тозаланди ва унинг кинетик хусусиятлари ўрганилди.

Тадқиқот методлари. Инулиназанинг фаол продуцентларини танлаб олиш – скрининги давомида ачитқиларни ўстириш, бижғиш жараёни ва микробиологик тозалигини назорат қилиш, инулиназа ферментини фаоллигини аниқлаш, оксиллар электрофорези ва ферментларни тозалаш хроматографик усулларида фойдаланилди.

Тадқиқот натижаларининг назарий ва амалий аҳамияти: *Saccharomyces cerevisiae* ҳосил қилган экзо-инулиназа инулинни парчалаш қобилияти юқори бўлганлиги ютуғи ва фермент барқарорлигининг пастлиги эса салбий томонидир. Ишлаб чиқаришда иммобилизация қилиш муҳимдир.

Диссертация бажарилган манзилгоҳ. Мирзо Улуғбек номидаги Ўзбекистон Миллий Университети.

Диссертация материалларининг матбуотда ёритилиши. Магистрлик диссертацияси бўйича илмий мақолалар: (Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Возможность получения функциональных соков на основе ферментативного гидролиза инулина. ВЕСТНИК КазНУ. 2013. –№ 3/1 (59). –С.134-137; Кулонов А.И., Мирзарахметова Д.Т. Ферментативный гидролиз инулина // УзМУ хабарлари. 2013. –№4/2. –С.238-241) ва тезислар (Кулонов А.И. Препарирование ферментов получения функциональных соков. ЎзМУ. 2013. –С.74; Kulonov A., Mirzarakhmetova D. Functional Juices Production on the Basis of Inulin Enzymatic Hydrolyses. TWAS Jawaharlal Nehru. 2014. –P. 55) эълон қилинган.

Магистрлик диссертациясининг тузилиши ва ҳажми. Ушбу диссертация иши кириш, адабиётлар шарҳи (1 боб), материал ва методлар (2 боб), тадқиқот натижалари ва муҳокамаси (3 боб), хотима, хулоса ва фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан ташкил топган. Шунингдек

диссертация 69 саҳифадан иборат ва уларда 7 жадвал, 14 расмлар келтирилган. 61 фойдаланилган адабиётлар номи қайд қилинган ва шулардан 57 таси ҳорижий адабиётлар ҳисобланади.

Мазкур магистрлик диссертация ишининг амалий қисми ЎзФА Биорганик кимё институти "Биорегуляторлар» лабораторияси мудури к.ф.н. Сағдиев Наил Жадитович ва кичик илмий ҳодим Сағдиева Лейля Абдуллаевна маслаҳатлари ва амалий ёрдамлари асосида бажарилди ва мен уларга ўз миннатдорчилигимни билдираман.

1-боб. АДАБИЁТЛАР ШАРҲИ

1. Инулиназа продуцентлари учун табиий манба(субстрат)лар

Инулиназалар ажратиб олишда углерод манбаи сифатида соф инулиндан тортиб қишлоқ хўжалик чиқиндиларигача турли субстратлардан фойдаланилган (1.1.1-жадвал). Инулиназа учун субстрат сифатида инулинга бой табиий ресурслардан фойдаланилар эди. Лекин, кейинчалик тадқиқотларда қишлоқ хўжалик чиқиндиларига эътибор ортди. Табиатда инулин бир ва икки уруғ паллали ўсимлик турларида учрайди: лоладошлар (*Liliaceae*), бойчечакдошлар (*Amaryllidaceae*), буғдойдошлар (*Gramineae*), мураккабгулдошлар (*Compositae*) [Chi ва б., 2011]. Буғдойдошлардан ташқари ўсимликларнинг пиёзбош, туганак, илдизларида инулин сақланади. Инулиназа ишлаб чиқаришда углерод манбаи сифатида жуда кўп фойдаланиладиган инулин (қуруқ массаси) нинг 50 % дан кўпроқ миқдори мураккабгулдошлар оиласи вакиллари топинамбур ва сачратқи таркибидан олинади [Chi ва б., 2011, Pvaeу ва б., 1999, Danilkenco ва б., 2008, Bekers ва б., 2008].

Топинамбур (*Helianthus tuberosus*) нинг олимлар диққатини тортадиган жиҳатлари, уларнинг совуқ ва қурғоқчиликка, шўрга, кучли шамол ва бўронларга қаршилиқ қила олиши ҳамда ҳосилдорлиги юқори ва турли зараркунанда, касалликларга чидамлилигидадир [Chi ва б., 2011]. Инулиназа ишлаб чиқаришда соф субстратлар орасида инулин ва сахароза афзал кўриладиган углерод манбалари ҳисобланади. Инулиназа олишда муҳитга қўшимча субстратлар қўшиш самарали туртки бўлади. Реакцион муҳитга сахароза, глюкоза, фруктоза, галактоза, малтоза ва декстроза қўшган ва натижада галактоза билан максимал инулиназа унумига эришган. Малтозада ҳам шунга яқин натижа кузатилган [Kumar ва б., 2005].

Инулиназа олиш учун фойдаланилган субстратлар

Субстратлар	Микроорганизмлар	Адабиётлар
Соф субстратлар		
Инулин	<i>Pichia guilliermondii</i> <i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i> spp. <i>Streptomyces</i> spp.	Yu ва б., 2009 Guerrero ва б., 2006 Sharma ва б., 2006
Сахароза	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Kalil ва б., 2001, Santisteban ва б., 2009
Фруктоза	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. ficuum</i>	Ge ва Zhang, 2005 Santisteban ва б., 2009
Глюкоза	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
Инулин сақловчи ўсимлик материаллари (жавдар, арпа, банан, саримсоқ пиёз, пиёз, буғдой, сачратқи, картошкагул, қоқи ўт, сарсабил илдизлари, топинамбур)	<i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i> spp. <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Streptomyces</i> spp. <i>A. niger</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> YS-1 <i>Rhizoctonia solanis</i>	Guerrero ва б., 2006 Santisteban ва б., 2009 Sharma ва б., 2006 Kango, 2008 Singh ва б., 2006 Singh ва Bhermi, 2008 Ertan ва б., 2003a
Қишлоқ хўжалик чиқиндилари (Cassava уни, маккажўхори пояси, сули уни, шоли сомони, шакарқамиш қолдиғи, буғдой кепаги)	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Streptomyces</i> spp. <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 <i>Aspergillus ficuum</i> JNSP5-06	Guimares ва б., 2007 Dilipkumar ва б., 2011 Mazutti ва б., 2007, Bender ва б., 2006, Mazutti ва б., 2010, Sguarezi ва б., 2009, Treichel ва б., 2009 Chen ва б., 2011

Инулиназа олишда қишлоқ хўжалик чиқиндилари ва ўсимлик экстрактлари яхши манба ҳисобланади. Cassava уни, маккажўхори пояси, сули уни, шоли сомони, шакарқамиш қолдиғи, буғдой кепаги, глюкоза ва сахарозалар *Aspergillus ochraceus*дан инулиназа олишда углерод манбаи сифатида фойдаланилган [Guimares ва б., 2007]. Углерод манбаи сифатида шакарқамишдан фойдаланилганда экзоинулиназанинг фаоллиги энг юқори даражада бўлган (108 бирлик). *Aspergillus ochraceus*нинг инулиназа фаоллиги реакцион муҳитга глюкоза кўшиш орқали стимулланган [Guimares ва б., 2007]. Sharma ва б. [2006] инулиназа олишда турли хил субстратлардан фойдаланишган (жавдар, арпа, банан, саримсоқ пиёз, соф инулин, буғдой, сачратки, пиёз ва картошкагул). Булар орасидан углерод манбаи сифатида саримсоқ пиёз қўлланилганда энг юқори инулиназа фаоллиги кузатилган. Бир нечта октадеканоил сахароза мураккаб эфирларининг индуктив таъсири ўрганилган [Ge ва Zhang, 2005]. Бунда сахароза мураккаб эфири замбуруғ хужайраларининг қобиғига таъсир эттирилганда хужайралар муҳит таъсирларига чидамли бўлган. Инулиназа миқдорининг ажралиб чиқиш унуми эса етти марта ортган ва унинг концентрацияси 6 g/L гача етган.

2. Инулиназа продуцентлари

Инулиназалар кўплаб микроорганизмларда ҳам учрайди. Замбуруғлар орасида бир нечта яхши таниш бўлган инулиназалар манбаларини ўз ичига олади: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Chrysosporium pannorum* ва *Penicillium purpurogenum*. Ачитқи замбуруғларлар орасида жуда яхши таниш бўлган *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyr*, *Debaryomyces centarelli* ва *Pichia polymorphalar* хисобланади. Бу ачитқилар фақат экзоинулиназалар ишлаб чиқаради. Шунингдек, жуда кўп моғорлар инулин гидролизловчи эндо ва экзоинулиназаларни ишлаб чиқаради [Sirisansaneeyakul ва б., 2007].

Бактерия, замбуруғ ва ачитқиларнинг жуда кўпчилиги инулиназа ишлаб чиқаришда фойдаланилган ва умумлаштирилган натижалар 1.2.1-жадвалда келтирилган [BONCIU ва б., 2011].

1.2.1-жадвал

Инулиназа – ҳосил қилувчи продуцентлар

Микроорганизмлар	Максимал фаолликлар	Адабиётлар
Замбуруғлар		
<i>Aspergillus niger</i>	1.75 g/L 100 U ^a /mL 52.5 IU ^a /mL 176 U/mL	Gern ва б., 2001 Ge ва Zhang, 2005 Kango, 2008 Kumar ва б., 2005
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Мавжуд эмас	Gill ва б., 2006
<i>Aspergillus awamori</i>	Мавжуд эмас	Nagem ва б., 2004
<i>Aspergillus ochraceus</i>	108 Total U	Guimares ва б., 2007
<i>Aspergillus ficuum</i>	193.6 U/gds ^b	Chen ва б., 2011
<i>Aspergillus parasiticus</i>	2.9 U/mL	Ertan ва б., 2003б
<i>Geotrichum cavidum</i>	45.65 IU/mL	Mughal ва б., 2009
<i>Rhizoctonia solani</i>	1.792 U/mL	Ertan ва б., 2003а
<i>Chrysosporium pannorum</i>	115 U/mL	Xiao ва б., 1988
Бактерия		
<i>Paenibacillus</i> spp.	2.48 g/L	Gern ва б., 2001
<i>Streptomyces</i> spp.	524 IU/L 89 U/gds	Sharma ва б., 2006 Dilipkumar ва б., 2011
<i>Bacillus</i> spp.	42.36 U/mL	Zherebtsov ва б., 2002
<i>Pseudomonas</i> spp.	Мавжуд эмас	Kim ва б., 1997
<i>Arthrobacter</i> spp.	Мавжуд эмас	Kang ва б., 1998
Ачитқилар		
<i>Pichia guilliermondii</i>	39.56 U/mL	Gao ва б., 2007

	61.5 U/mL	Chi <i>ва б.</i> , 2009
	130.38 U/mL	Yu <i>ва б.</i> , 2009
	60.1 U/mL	Gong <i>ва б.</i> , 2007
<i>Cryptococcus aureus</i>	52.37 U/mL	Gao <i>ва б.</i> , 2007
	85 U/mL	Chi <i>ва б.</i> , 2009
	436.2 U/mL	Chi <i>ва б.</i> , 2009
<i>Yarrowia lipolitica</i>	62.85 U/mL	Gao <i>ва б.</i> , 2007
	22.5 U/mL	Liu <i>ва б.</i> , 2010
<i>Debaryomyces hansenii</i>	52.53 U/mL	Gao <i>ва б.</i> , 2007
<i>Candida kefyri</i>	40 U/mL	Pessoa <i>ва Vitolo</i> , 1998
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	194.1 U/mL	Kalil <i>ва б.</i> , 2010
	127 U/mL	Kalil <i>ва б.</i> , 2001
	176 IU/mL	Santisteban <i>ва б.</i> , 2005
	208 IU/mL	Santisteban <i>ва б.</i> , 2009
	262.9 U/mg	Golunski <i>ва б.</i> , 2011
	1294 U/mL	Treichel <i>ва б.</i> , 2009
	18743 U/mL	Kushi <i>ва б.</i> , 2000
	50.2 IU/mL	Singh <i>ва Bhermi</i> , 2008
	47.1 IU/mL	Singh <i>ва б.</i> , 2006
	250 U/gds	Mazutti <i>ва б.</i> , 2007
	47.2 U/mL	Mazutti <i>ва б.</i> , 2010
	1317 U/mL	Treichel <i>ва б.</i> , 2009
	1139 U/mL	Squarezi <i>ва б.</i> , 2009

U^a, IU^a – инулиназа фаоллигининг халқаро бирлиги

gds^b – курук субстрат грами

Улар орасидан *Aspergillus* ва *Kluyveromyces* штаммлари инулиназа ишлаб чиқариш учун афзал кўрилган ва жуда кенг қўлланилган.

Ачитки замбуруғлар ҳам ўз инулиназа фаоллигини намоён этган. Масалан, *Pichia guilliermondii* 39.5 дан 130.4 бирликгача инулиназа

фаоллигини кўрсатган [Gao ва б., 2007]. *Kluyveromyces marxianus* ачитқи замбуруғи эса инулиназанинг 18473 бирлик энг юқори фаоллигини кўрсатган [Kushi ва б., 2000].

Бактериялар

Бактерия штаммлари айниқса термостабил бўлгани учун инулиназа ишлаб чиқаришда қизиқиш уйғотади. Инулиназалар биосинтезида, айниқса эндоинулиназалар олиш соҳасида бактерия штаммларидан фойдаланиш тўғрисида маълумотлар етарли эмас. *Streptomyces spp.* инулиназаларнинг яхши продуценти сифатида таъсис қилинган. Sharma ва б. [2006] субстрат сифатида саримсоқ пиёздан фойдаланиб фаоллиги 524 UI/L бўлган инулиназа олган бўлса, Dilipkumar ва б. [2011] углерод манбаи сифатида пресланган сувўтлардан фойдаланиб *Streptomyces spp.* дан максимал фаоллиги 89 U/gds бўлган инулиназа олишга эришган.

Бактерияларнинг *Bacillus* тури экзоинулиназанинг фаол продуценти ҳисобланади. Фаоллиги 42,36 U/mL бўлган инулиназа олинган ва субстрат сифатида сахароза қўлланилган [Zherebtsov ва б., 2002]. *Pseudomonas spp.* [Kim ва б., 1997] ва *Arthrobacter spp.* [Kang ва б., 1998] ларнинг инулиназалар ишлаб чиқариш қобиляти текширилган. Унга кўра улар ажратган инулиназа фаоллиги қониқарли эмас.

Замбуруғлар

Инулиназа ишлаб чиқаришда турли хил замбуруғ штаммларидан инулиназаларининг турли фаоллиги олинган. Улар орасида *Aspergillus spp.* энг яхши продуцент бўлган. Эндоинулиназа ишлаб чиқариш учун 16 та замбуруғ штаммлари ва 3 та бактерия штаммлари Gern ва б. [2001] томонидан тадқиқ қилинган. Энг яхши эндоинулиназа продуценти *Paenibacillus spp.* нинг CDB 003 кодли штамми эди. Замбуруғ штаммларидан *Aspergillus niger* DCM 2466 Gern ва б. [2001] томонидан энг яхши эндоинулиназа продуценти сифатида танланган. Ge ва Zhang [2005] *Aspergillus niger* нинг S-770 штаммидан фойдаланиб 100 U/mL максимал инулиназа фаоллигига эришган. Бунда ферментатив муҳитга

концентрацияси 6 g/L бўлган сахароза эфири озукавий субстрат сифатида кўшилган. Kango [2008] танланган *Aspergillus niger* штаммини қоқиўт илдизи дамламасида ўстириб, 96 соатдан кейин 52.5 IU/mL инулиназа фаоллигига эришган. Kumar [2005] тупроқдан ажратиб олинган замбуруғ - *Aspergillus niger*дан мухитда инулин концентрацияси 5 % бўлган ҳолда 176 U/mL инулиназанинг максимал фаоллигига эришган.

Адабиётларда *Aspergillus*нинг инулиназа ишлаб чиқариш ва тавсифлашда фойдаланилган бошқа штаммлари ҳам келтирилган: *A.fumigatus* [Gill ва б., 2006], *A. awamori* [Nagem ва б., 2004], *A.ochraseus*-108 бирлик/мл [Guimares ва б., 2007], *A.ficiuum*-193.6 бирлик/мл [Chen ва б., 2011] ва *A.parasitissus*-2.9 бирлик/мл [Ertan ва б., 2003б].

Mughal ва б. [2009] тадқиқотларида *Geotrichum candidum*нинг 8 та штаммлари тупроқ намуналаридан ажратилган ва уларда инулиназа фаоллиги текшириб кўрилган. Уларнинг фаоллиги 0.12 дан 1.38 IU/mL гача кузатилган. Метил метан сулфонат, этил метан сулфонат ва ултрабинафша нур таъсир эттириб сунъий мутагенез орқали инулиназанинг фаоллиги табиий микроорганизм ферментининг фаоллигига нисбатан 50 марта оширилган [Mughal ва б., 2009]. Тупроқдан ажратиб олинган *Rhizotonia solani*да углерод манбаи сифатида топинамбур кукунидан фойдаланиб ўстиришнинг 2-кунида инулиназанинг максимал фаоллиги 1.792 U/mL га етган [Ertan ва б., 2003а]. Тупроқдан ажратиб олинган *Chrysosporium pannorum* ҳам жуда фаол инулиназа продуценти бўлиб, унинг энг юқори фаоллиги 115 U/mL бўлган [Xiao ва б., 1988].

Ачитқи замбуруғлари

Ачитқи замбуруғлар фермент ишлаб чиқаришда асрлар давомида ишлатилиб келинган. Уларни ўстириш ва назорат қилиш бактерияларга нисбатан осонроқ. Ачитқилар орасида инулиназалар ишлаб чиқара оладиган қуйидаги *Kluuveromyces* spp., *Pichia* spp. ва *Candida* spp.лар фаоллиги юқори инулиназалар ишлаб чиқариш учун катта имкониятларга эга. Gao ва б. [2007] 400 дан ортиқ денгиз ачитқилари орасидан кўп

миқдорда инулиназа ишлаб чиқариш қобилиятига эга бўлган штаммларни скрининг қилган, танлаган. Улар орасида *Pichia guilliermondii*, *Cryptococcus aureus*, *Yarrowia lipolitica* ва *Debaryomyces hansenii* фаоллиги 40 U/mL дан кўп бўлган экзоинулиназа ажратган [Gao ва б., 2007, Chi ва б., 2009, Gong ва б., 2008, Gong ва б., 2007, Sheng ва б., 2008]. Yu ва б. [2009] *Pichia guilliermondii* хужайраларини ултрабинафша нурлари ва LiCl билан мутагенез қилиб, оптимал муҳитда инулиназанинг максимал 130.36 U/mL фаоллигига эришган. Хужайра қобиғи ишлов берилган *Yarrowia lipolitica* эса 96 соат ичида фаоллиги 22.5 U/mg бўлган инулиназа ишлаб чиқарган [Liu ва б., 2010].

Kluyveromyces spp. шубҳасиз инулиназа ишлаб чиқаришда жуда кенг фойдаланилади. Kalil [2010] максимал фаоллиги 194.1 U/mL бўлган инулиназа олган. Ион алмашувчи колонкадан фойдаланиб *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*дан фермент тозалашга таъсир этувчи омилларни ўрганган ҳолда инулиназа олган. Унинг аввалги оптималлаштириш тадқиқотида максимал инулиназа фаоллиги оптимал муҳитда 127 U/mL эди [Kalil ва б., 2001]. Santisteban ва б. [2005] *Kluyveromyces marxianus*дан инулиназа олишнинг бир нечта муҳим омиллари (аралаштириш, аэрация ва тебратиш) ни ўрганган ва энг яхши ферментация шароитлари: 1 vvm аэрация, 450 м/мин тезликда аралаштириш ҳамда парракли аралаштирувчи реакторни топган. Бунда фермент унуми 176 IU/mL бўлган. Сўнги тадқиқотида Santisteban ва б. [2009] инулиназа олишда углерод ва азот манбалари ҳамда уларнинг оксидланишини ўрганган. Бунда углерод манбаи сифатида 20 g/L сахарозадан фойдаланган ва инулиназанинг 208 IU/mL фаоллигига эришган. Golunski ва б. [2011] инулиназанинг специфик 262.9 U/mg бўлган максимал фаоллигига эришганлар. Treichel ва б. [2009] эса инулиназанинг 1294 U/mL бўлган максимал фаоллигига эришган. Уларнинг тадқиқотлари субстрат сифатида қишлоқ хўжалик чиқиндиларидан фойдаланиб *Kluyveromyces marxianus*дан инулиназа олиш, қисман тозалаш ва тавсифлашга қаратилган. Kushi ва б. [2000]

*Kluyveromyces marxianus*дан экзоинулиназани диализ ва лиофил қуритиш йўли билан тозалаб, 18743 U/mL фаолликка эришган. Singh ва Bhermi [2008] ҳамда Singh ва б. [2006] лар мос равишда 50.2 IU/mL ва 47.1 IU/mL фаолликка эришганлар. Чайқатиб туриладиган колбаларда олиб бориладиган тажрибаларда биореактордагига нисбатан кўрсатилган инулиназа унуми 6 марта кўпроқ бўлган.

Кўплаб инулиназа олиш тадқиқотларида *Kluyveromyces marxianus*дан фойдаланилган ва ачитқининг турли инулиназа фаолликларига эришилган. Mazutti ва б. [2007] шакарқамиш чиқиндисидида қаттиқ фазали бижғиш орқали инулиназанинг максимал 250 U/gds фаоллигига эришган бўлса, суюқ фазали бижғиш орқали эса фаоллиги 47.2 U/mL бўлган [Mazutti ва б., 2010]. Bender ва б. [2006] қишлоқ хўжалик чиқиндиларида қаттиқ фазали бижғиш ёрдамида фаоллиги 444.8 U/g бўлган инулиназа олган. Treichel ва б. [2009] субстрат сифатида қишлоқ хўжалик чиқиндиларидан фойдаланиб, инулиназанинг 1317 U/mL фаоллигига эришган. Шунингдек, Sguarezi ва б. [2009] ҳам қишлоқ хўжалик чиқиндиларидан фойдаланиб фаоллиги 1139 U/mL бўлган инулиназа ажратиб олган.

3. Продуцентларни ўстириш шароитлари

Қуйида ҳорижий адабиётларда келтирилган айрим маълумотларга кўра инулиназа олишда продуцентлар учун озук муҳитлари таркиби ва уларни тайёрлаш ҳамда микроорганизмларни ўстириш шароитлари:

- a) *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y- 7571 ачитқисини ўстириш учун озук манбаи сифатида фойдаланилган муҳит таркиби (г/л): сахароза 20.0; ачитқи экстракти 5.0; K_2HPO_4 5.0; NH_4Cl 1.5; KCl 1.15; $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0.65 (30 °C да ва 150 айланиш тезликда 24 соат инкубирланган) [Mazutti ва б., 2007];
- b) *Enterococcus faecalis* Probio-36 (г/л): пептон-10.0; гўшт экстракти-8.0, натрий ацетат-5.0; ачитқи экстракти-4.0; калий гидрофосфат-2.0; Tween 80-1.0; аммоний цитрат-2.0; $MnSO_4 \times H_2O$ -0.05; $MgSO_4 \times 7H_2O$ -

- 0.2; инулин кукуни-10 (37°C ҳароратда 48 соат инкубирланган, центрифугада 10,000 айланиш тезликда 20 мин 4°C га қўйилган) [Sirikhwan Tinrat ва б.];
- с) *Aspergillus niger* 20 OSM (г/л): сахароза-33.3; ачитқи экстракти-19.7; NaNO₃-3.65; K₂HPO₄-2.6; MgSO₄×7H₂O-0.15 [M. Skowronek ва J. Fiedurek, 2006];
- д) *Aspergillus niger* TISTR 3570 ва *Candida guilliermondii* TISTR 5844 (г/л): инулин-10; ачитқи экстракти-12; MgSO₄×7H₂O-2; агар-15 [Sarote Sirisansaneeyakul ва б., 2007];
- е) *Aspergillus niger*: Базал муҳит таркиби (%): инулин-4, агар-2, рН табиий.
Қияланган (косяк)муҳит таркиби (%): инулин-4, пептон-1, агар-2, рН табиий.
Суюқ ферментатив муҳит таркиби (%): буғдой кепаги-4, пептон-4, инулин-2, ачитқи экстракти-0.4, NaCl-0.5, K₂HPO₄ ×3H₂O-0.3, инокуляция ўлчами-3 (стерилизациядан аввал рН муҳити 6.5 га келтирилган. Экспертиза муҳити сифатида Чапек докс агарли муҳити. Барча фойдаланилган муҳитлар 115 °C да 30 минут стерилланган) [Denglin Luo ва б., 2011];
- ф) *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* ATCC 16045 (г/л): сахароза- [5, 10 ва 20], ачитқи экстракти-5, пептон-10, KH₂PO₄-5, NH₄Cl-1.5, KCl-1.2, MgSO₄×7H₂O-0.7 [Marcia Luciana Cazetta ва б., 2010];
- г) *Aspergillus niger* MIUG 1.15, *Rhizopus*, *Aspergillus oryzae* (%): Инулин-2, NaNO₃-0.2, KCl-0.05, MgSO₄-0.05, FeSO₄-0.001, K₃PO₄-0.1, рН муҳити 7.3 (микроорганизмлар Петри чашкаларда 4 кун 25°C да ўстирилган).
- Экув материали учун ачитқи экстракти пептон декстроза муҳитининг таркиби (%): глюкоза-2, ачитқи экстракти-2 ва пептон-1, рН 6.5.

Инулиназа ишлаб чиқариш учун ферментатив муҳит таркиби (%): инулин 2, NaNO₃ 0.2, KCl 0.05, MgSO₄ 0.05, FeSO₄ 0.001, K₂HPO₄ 0.1, pH муҳити 6.8 [Camelia BONCIU *ва б.*, 2007].

h) *Aspergillus niger* NRRL (г/л): топинмабур кукуни-10.0, пептон-3.0, K₂HPO₄-1.0, MgSO₄-0.5, KCl-0.5. Стерилизациядан аввал pH муҳити 5.5 бўлган (автоклавда 15 минут 121°C да ва 1.5 атмосфера босим берилган) [Doaa A. R. Mahmoud *ва б.*, 2011].

4. Инулиназанинг хусусиятлари

Инулиназалар (2,1-β-D-фруктан фруктаногидролаза, ЕС 3.2.1.7) инулин гидролизини катализлайди ҳамда инулиноолигосахаридлар, фруктоза ва глюкоза каби асосий маҳсулотлар ҳосил қилади.

Инулин занжир учларида глюкоза молекуласи қолдиқлари бўлган 2,1-β-D-фруктаноза молекулаларининг чизикли занжирларидан ташкил топган. У углевод захиралари сифатида ўсимликларда учрайди: топинамбур, картошкагул, сачратқи ва оз миқдорда саримсоқ пиёз ҳамда пиёзларда учрайди [Chi *ва б.*, 2011; Singh *ва Gill*, 2006; Nagem *ва б.*, 2004; Molina *ва б.*, 2005]. Инулинлар турли хил полимерланган. Шунингдек, улар хилма-хил функционал хусусиятга эга [Molina *ва б.*, 2005]. Уларнинг полимерланиш даражаси ўсимлик манбасига, ҳарорат ва ўсиш шароитларига ҳамда йиғиб олинган ҳосилни сақлаш муддатига боғлиқ [Chi *ва б.*, 2011].

Инулиназалар экзо ва эндоинулиназаларга бўлинади. Экзоинулиназа инулиннинг охириги учларидаги фруктоза қолдиқларини кўчиради. Эндоинулиназа эса инулин молекуласининг ички боғларига таъсир этади. Лекин, инвертаза фаоллигидан камроқ бўлади [Chi *ва б.*, 2009; Chi *ва б.*, 2011; Ertan *ва б.*, 2003].

Сўнги ўн йилда замбуруғ, ачитқи ва бактерияларнинг жуда кўп штамлари инулиназалар олишда фойдаланилди. Бир нечта микроб штамлари орасида *Kluyveromyces marxianus* ва *Aspergillus niger* инулиназа

олишда кенг қўлланилган ва афзал кўрилган манба ҳисобланади [Singh ва Gill, 2006; Pvaeу ва б., 1999; Chi ва б., 2009]. Инулиназалар турли каталитик хоссаларга эга (молекуляр оғирлиги, рН оптимум, ҳарорат, барқарорлик).

Инулиназаларнинг молекуляр оғирлиги

Микробиологик инулиназалар 50 кДа дан юқори молекуляр оғирликка эга эканлиги таъкидланган [Chi ва б., 2009]. Sheng ва б. [2008] *Cryptococcus aureus*дан инулиназани тозалаб олган ва тавсифлаган ҳамда уларнинг молекуляр оғирлигини 60 кДа этиб белгилаган. Gong ва б. [2008] маълумотларига кўра *Pichia guilliermondii* инулиназаларининг молекуляр оғирлиги 50 кДа, Chi ва б., [2009] эса 54 кДа этиб белгилаган. *Kluyveromyces fragilis* инулиназаларининг молекуляр оғирлиги 250 кДа эканлиги таъкидланган [Pandey ва б., 1999].

Бактерия штаммларидан олинган инулиназаларнинг молекуляр оғирлиги ачитқилардан олинган ферментнинг молекуляр оғирлигига яқин бўлади. Kang ва б. [1998] *Arthrobacter spp.* дан олинган эндоинулиназани тавсифлаган ва унинг молекуляр оғирлигини 75 кДа этиб белгилаган. Замбуруғ штаммларидан олинган инулиназа инулиназаларнинг молекуляр оғирлиги 50 кДа ва 300 кДа орасида эканлиги айтиб ўтилган: *Aspergillus ochraceus* – 79 кДа [Guimares ва б., 2007], *Penicillium spp.* – 68 кДа [Chi ва б., 2009], *F.oxysporum* – 300 кДа [Pandey ва б., 1999].

Инулиназанинг рН оптимуми ва ҳарорат фаоллиги

Замбуруғ ва ачитқилардан олинган инулиназалар фаоллигининг рН оптимумлари 4.5-6.0 диапазонда ўзгаради (1.4.1-жадвал). *Aspergillus niger*дан олинган инулиназалар рН оптимуми 4.4 эканлиги аниқланган. *Aspergillus versicolor* инулиназалари 5.5 рН оптимумга эга ва *Penicillium janczewskii* рН оптимуми 4.8-5.0 бўлган инулиназалар ишлаб чиқаради [Sharma ва б., 2006].

Бир нечта микробиологик инулиназаларнинг хоссалари

Манбалар	Молекуляр оғирлик, кДа	Оптимум рН	Оптимал харораг, °С	рН барқарорлиги	Ҳарорат барқарорлиги, °С	Адабиётлар
<i>K. marxianus</i>		3.5				Mazutti ва б., 2007
<i>K. marxianus</i>	-	4.4	60	-	-	Mazutti ва б., 2010
<i>K. marxianus</i>	-	4.75	50	-	-	Kushi, 2000
<i>K. fragilis</i>	-	-	55	-	40	Pandey ва б., 1999
<i>Yarrowia lipolitica</i>	250		55			
<i>Pichia guilliermondii</i>	-	4.5		3-7		Liu ва б., 2010
<i>Cryptococcus aureus</i>	50	6.0	60	6-7	50	Gong ва б., 2008
<i>Arthrobacter</i> spp.	60	7.5	50	4.0-6.5	60	Sheng ва б., 2008
<i>Bacillus</i> spp.	75	7.0	50	5-10.5	65	Kang ва б., 1998
<i>Streptomyces</i> spp.	-	6.0	-	6-8	30-40	Zherebtsov, 2002
<i>A. niger</i>	-	4.4	60	-	25-40	Sharma ва б., 2006
<i>A. niger</i>	70	5.0	40	-	60-70	Sharma ва б., 2006
<i>Penicillium janczewskii</i>	-	4.8-	35-45	-	-	Pandey ва б., 1999
<i>A. ochraceus</i>	79	5.0	60	-	-	Sharma ва б., 2006
<i>F. oxysporum</i>	300	4.5	60	-	60-	Guimares ва б., 2007
		5.8-	30-37	-		Pandey ва б., 1999
		6.2				

A.ochraseus ажратган инулиназалар рН оптимуми 4.5 бўлган [Guimares ва б., 2007]. Қуйида инулиназалар рН оптимумлари келтирилган: *K. marxianus* 3.5 рН оптимумда энг юқори фаолликка эга бўлган [Mazutti ва б., 2007] ва *Pichia guilliermondii*да эса 3.4 [Gao ва б., 2007].

Ачиткилардан фарқли ўлароқ бир нечта бактерия штаммлари ишлаб чиқарган инулиназаларнинг гидролиздаги рН оптимуми *Arthrobacter spp.* [Kang ва б., 1998] ва *Bacillus polymyxa* [Zherebtsov ва б., 2002, Chi ва б., 2009] каби 7.0-7.5 бўлади. Одатда тозаланган инулиназалар 50-60°C да фаоллиги оптимал бўлади. *Kluuveromyces spp.* штаммлари 50-55°C да максимал фаол бўлган инулиназалар ишлаб чиқаради [Mazutti ва б., 2010, Pandey ва б., 1999, Kushi, 2000]. Шунингдек *Pichia guilliermondii*дан ажратиб олинган инулиназалар ҳам бундан мустасно эмас [Gong ва б., 2008, Chi ва б., 2009]. *A.ochraseus* [Guimares ва б., 2007] ва *Streptomyces spp.* [Sharma ва б., 2006] 60°C да оптимал фаолликка эга бўлади ва шу ҳароратда унинг барқарорлиги жуда яхши бўлади. *F.oxysporum* [Pandey ва б., 1999], *Penicillium janczewskii* [Sharma ва б., 2006] ва *A. niger* [Pandey ва б., 1999] 30-40°C да инулиназалар ишлаб чиқаради. Демак, турли микроорганизмлар инулиназаларнинг оптимал ҳароратлари турлича бўлади.

Инулиназа фаоллигига металл ионлари ва оқсил ингибиторларнинг таъсири

Реакцион муҳитга бир нечта металл ионлари кўшилганда инулиназа фаоллигини оширади. Бошқалари эса ферментга тормозловчи таъсир этади. *Kluuveromyces marxianus* инулиназаларини Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , қуйи концентрацияли (0.001 %) натрий додецил сульфат фаоллаштиради ва аксинча Cu^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2} , Tween 20, Tween 80, полиоксиэтилен эфир -35 [Singh ва Bhermi, 2008] ва шунингдек, Ca^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , Na^{+} [Kushi, 2000] лар инактивация қилади. *Cryptococcus aureus*дан олинган инулиназа Ca^{+2} , K^{+} , Na^{+} , Zn^{+2} ва Cu^{+2} ларнинг қуйи концентрациялари томондан фаоллаштирилади ҳамда Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+} лар томонидан ингибирланади

[Sheng *va* б., 2008]. *Pichia guilliermondii* инулиназаларида ҳам ўхшаш натижалар олинган [Gong *va* б., 2008]. Бу икки ачитки штамлари денгиз сувидан ажратиб олинган. Hg^{+2} ва Ag^{+} моғорлар ва бактериялар инулиназаларининг фаоллигига ингибирловчи таъсирга эга. Реакция муҳитида юқоридаги металллар [Hg^{+2} , Ag^{+}] бўлса *Arthrobacter spp.* [Kang *va* б., 1998], *Streptomyces spp.* [Sharma *va* б., 2006] ва *Aspergillus ochraceus* [Guimares *va* б., 2007] инулиназалари ҳам ингибирланади. Субстрат сифатида юқори тузли хомашёдан фойдаланилганда инулиназа фаоллигига металл ионларининг таъсири муҳим ҳисобланади. Шунингдек, пепстатин, этилендиаминтетрасирка кислота инулиназалар фаоллигига ингибирловчи таъсирга эга [Sheng *va* б., 2008; Gong *va* б., 2008, Kang *va* б., 1998]. Ушбу тавсифланган ферментлар металл таркибли ферментлар ҳисобланади.

5. Инулиназаларнинг қўлланилиши

Инулиназалар жуда кўплаб саноат соҳаларида кенг қўлланилади: инулиндан юқори сифатли фруктоза шарбати олиш, биоэтанол, инулиноолигосахаридлар ҳамда сирка кислота, бутандиол, спиртлар ва сут кислота каби кимёвий моддалар олишда фойдаланилади [Chi *va* б., 2011; Chi *va* б., 2009; Pvaeu *va* б., 1999; Liu *va* б., 2010]. Бундан ташқари фармакология соҳаларида қўллаш мумкин.

Юқори фруктозали шарбатлар олиш

Саноатда табиий полисахаридлардан катта миқдорда фойдаланилади. Сўнги йиллардаги тадқиқотларда полисахаридларни микробиологик ферментациясидан фойдаланиб маҳсулотлар ишлаб чиқаришга қаратилмоқда. Фруктоза табиий углеводлар орасида энг юқори ширинликка эга бўлиб, кўпинча полисахаридлардан ферментатив жараён орқали ишлаб чиқарилади, технологик жараёнида 3 хил ферментлардан фойдаланилади ва маҳсулот чиқишининг максимал унуми 45 % ни ташкил

этади [Pandey ва б., 1999]. Оддий ва махсулдорлиги юқори бўлган фруктоза шарбати олиш методи инулинни ферментатив гидролиз қилишдир. Бу бир босқичли жараён бўлиб, инулиназа ферментларидан фойдаланилади ва унумдорлиги 95 % бўлган соф фруктоза олинади [Chi ва б., 2009, Rissa ва б., 2009]. Фруктоза қандли диабетда, семизликда, организмга калций сўрилишини яхшилашда, бифидобактерияларни ўсишида, болаларда темир сўрилишини ортишида ва йўғон ичак саратонини олдини олишда фойдали ҳисобланади [Chi ва б., 2009]. Бундан ташқари, фруктоза метаболизми глюкозанинг метаболизмидан фарқ қилади яъни фруктозанинг миқдори организмда инсулин томонидан назорат қиллинмайди [Rocha ва б., 2006, Gong ва б., 2007]. У озиқ-овқат саноатида, фармацевтика ва шарбат ишлаб чиқариш соҳаларида кенг фойдаланилади [Chi ва б., 2009, Rocha ва б., 2006].

Инулиноолигосахаридлар ишлаб чиқариш

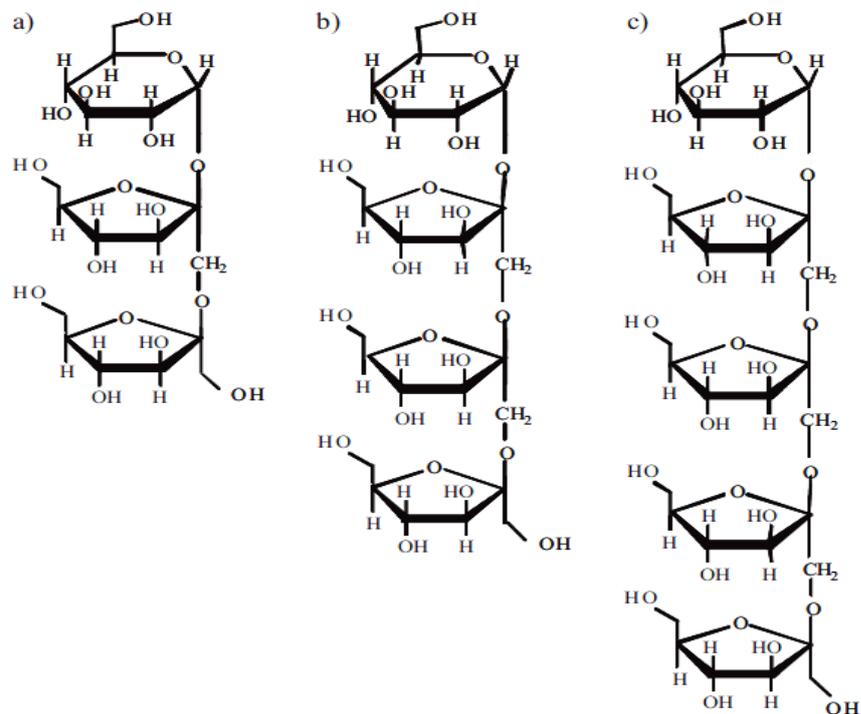
Олигосахаридлар

Олигосахаридлар - гликозид боғлари орқали боғланган 20 тагача моносахарид молекулалари қолдиқларидан иборат углеводларнинг қисқа занжири. Олигосахаридлар сувда эрувчан ва нисбатан паст ширинлиликка эга. Улар сахарозага нисбатан 0,3 дан 0,6 гача ширин. Бу молекула занжирининг узунлиги ва углевод қолдиқларига боғлиқ. Лекин одатда молекула занжирининг узунлиги ошиши билан унинг ширинлиги камайиб боради. Уларнинг паст ширинлиги озиқ-овқат композициялари, таркибий тўлдирувчи ва таъмни кучайтирувчи восита сифатида муваффақият билан фойдаланиш мумкин. Шу билан бирга олигосахаридлар озиқ-овқат махсулотларнинг музлаш ҳароратини ўзгартиради, уларни қорайиб қолишини, ўта қуриб қолишини олдини олади ва бактериологик зарарланишини камайтиради. Олигосахаридлар фаол моддаларни стабиллаштиришда, шунингдек, эрувчан озиқа клеткаларидек таъсир этади ва шу билан бир вақтда *Bifidobacterium* spp. ва *Lactobacillus* spp. каби

пробиотик микроорганизмларнинг ўсишини стимуллайди. Пробиотик микроорганизмлар ошқозон-ичак инфекцияларини олдини олишда муҳим ва ичакларда патоген бактерияларни паст рН муҳитда озиканинг ҳазм қилинишидан ҳосил бўлган кислотали метаболитлар таъсирида ўлдиради. Шунингдек, ҳазм қилишни енгиллаштиради ва иммун тизимни фаоллаштиради.

Фруктоолигосахаридлар

Фруктоолигосахаридлар (ФОС) табиий функционал олигосахаридлар, асосан ўсимлик манбалари орасида жуда муҳим углеводлардан ҳисобланади. ФОС сувда эрувчан, калориясиз, тишларда кариес келтириб чиқармайдиган ва қийин ҳазм бўладиган шакар ўрнини босувчидир. Типик олигосахаридлар каби ФОС сахарозанинг 20 % дан 60 % гача ширинлик даражасига эга. Улар одам ва ҳайвон ошқозон-ичак йўлларида ўтади ва лактобактерия ва бифидобактериялар томонидан ўзлаштирилади. Энг кўп ишлатиладиган ФОС молекуласининг таркибида асосан 1-кестоза, нистоза ва фруктофуранозил нистозалардан таркиб топган (1.5.2.1-расм). Бу олигосахаридлар сахарозадан тонналаб ферментатив йўл билан синтезлаб олинган. ФОС ишлаб чиқаришда бактерия, замбуруғ ва ачитқи замбуруғларидан ажратиб олинган ферментлардан кенг фойдаланилган: фруктозил трансфераза ва β -фруктофуранозидазалар. ФОС ишлаб чиқаришда фермент дастлаб сахарозанининг 1-кестоза қисми боғларига таъсир этади. Кейин 1-нистозагача ва ниҳоят 1-фруктофуранозил нистозагача парчалайди. ФОС ҳосил бўлиш унуми нисбатан кам, 60 % атрофида бўлади. Бундан кейин ферментнинг гидролитик фаоллиги юқори бўлмасда фруктоза ва глюкоза каби қўшимча маҳсулотлар олинади. Глюкоза фермент фаоллигини ингибирлайди. ФОС шунингдек инулиннинг ферментатив гидролизини мақсадли йўналтириш йўли билан олиш мумкин. Олинган маҳсулотнинг 75 % таркиби фруктоза занжирларидан иборат. Қолган 25 % қисми GF_n кўринишдаги шаклда бўлади.



1.5.1-расм. Фруктоолигосахариднинг кимёвий тузулиш структураси: а) 1-кестоза (GF₂ : глюкоза-фруктоза-фруктоза), б) кистоза (GF₃), с) 1-β-фруктофуранозил кистоза (GF₄). Молекуланинг фруктозил қисми сахарозанинг β-2,1 қисми орқали ўзаро боғланган.

Фруктоза

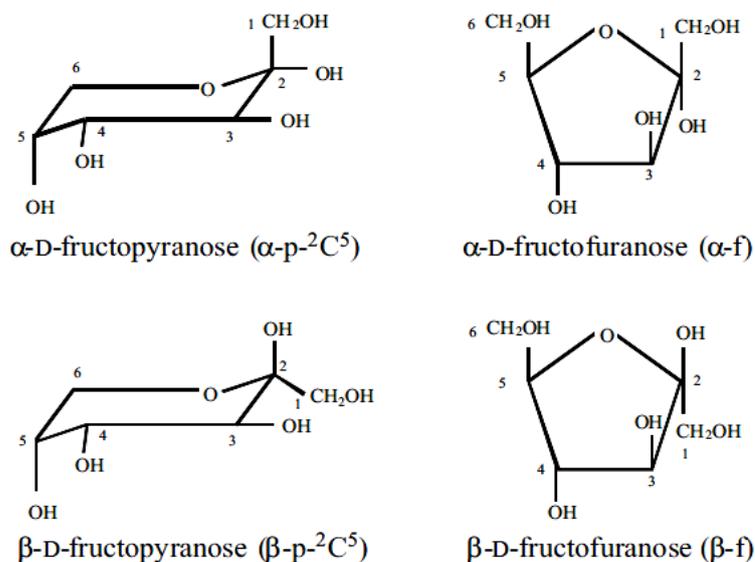
Фруктоза сахарозага нисбатан 1.8 марта ширин. Қуйида келтирилган жадвалда айрим углеводларнинг фруктозага нисбатан ширинлик даражаси, фоизларда келтирилган (1.5.1-жадвал).

1.5.1-жадвал

Ширинликлар	Нисбий ширинлик даражаси, %
фруктоза (кристал шакли)	180
α-Д-фруктопиранозанинг аномерик шакли)	
фруктоза (5-15 % сувли эритмаси)	115-125

фруктозали маккажўхори шарбати	90-130
сахароза (кристал)	100
сахароза (10 % сувли эритмаси)	100
глюкоза (кристал)	74-82
глюкоза (10 % сувли эритмаси)	65
глюкоза (50 % сувли эритмаси)	90-100
малтоза	50

Фруктоза кўплаб мевалар, асал ва сабзавотлар таркибида учрайди. Фруктозанинг кристал β -D-фруктопираноза формаси эритмада тезда турли таутомерлар: β -D-фруктопираноза, β -D-фруктофураноза, α -D-фруктопираноза, α -D-фруктофураноза ва очик занжирли кето формалари аралашмасига айланади (1.5.2-расм).



1.5.2-расм. Фруктозанинг эритмадаги таутомер формалари

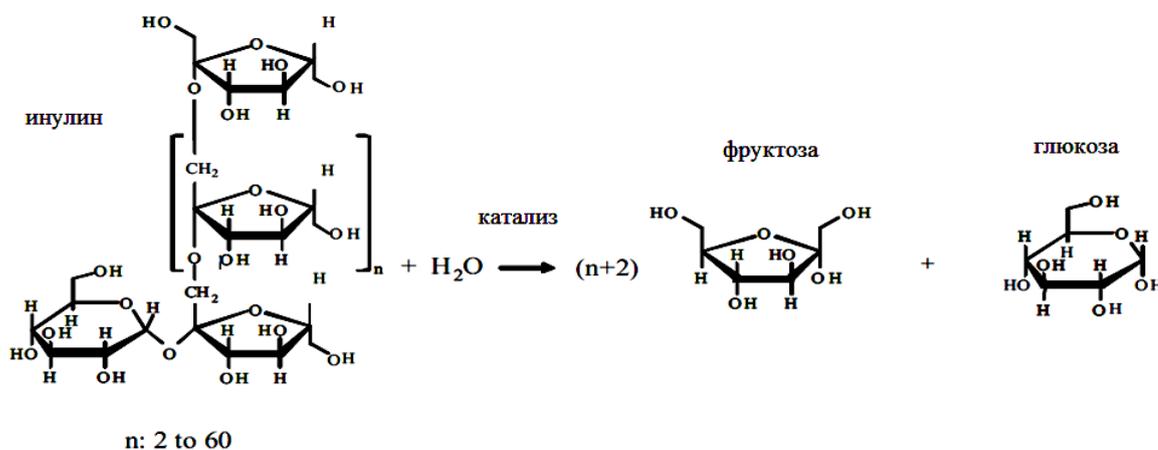
Инулиндан фруктоза олиш

Инулин ўсимликларнинг илдиз ва туганакларида, сабзавотлар таркибида учрайди. Инулиннинг асосий манбалари картошкагул, сачратқи ва топинамбур ҳисобланади (1.5.2-жадвал). Инулиннинг энг катта қисми саноатда сачратқидан олинади.

Инулиннинг ўсимликлар таркибида тарқалиши

Инулин манбалари	ω(инулин)/%
топинамбур	16-20 гача
сачратқи	15-20 гача
картошкагул	10-12 гача
порей пиёз	3-16 гача
саримсоқ пиёз	9-11 гача
такасоқол	4-10 гача
пиёз	2-10 гача

Оптимал шароитларда инулиназа ёрдамида тўлиқ инулин гидролизи охирида фруктозанинг 95 % ли фракцион массаси олинади (1.5.3-расм).



1.5.3-расм. Тўлиқ инулин гидролизи.

Эндоинулиназалар инулиноолигосахаридлар ишлаб чиқариш учун асос бўлиб ҳисобланади. Эндоинулиназалар продуценти сифатида кўплаб микроорганизмлар ҳақида маълумот берилган: *Yarrowia lipolitica*, *Cryptococcus aureus* [Gao ва б., 2007], *Arthrobacter* spp. [Kang ва б., 1998], *Pseudomonas* spp. [Chi ва б., 2009], *Paenibacillus* spp. [Gern ва б., 2001]. Инулиноолигосахаридлар озиқ-овқат саноатида кенг қўлланилади:

кандолатчилик, сут, ёгурт ва пишлоқ ишлаб чиқариш ҳамда нон, шоколад, музқаймоқ ва турли соус (қайла) лар тайёрлашда [Chi ва б., 2011]. Инулиноолигисахаридлар пребиотиклар бўлиб, уларнинг инсон саломатлигига ижобий таъсири кенг ўрганилган [Rocha ва б., 2006, Chi ва б., 2009].

Биоэтанол ишлаб чиқариш

Биокимёвий ва термокимёвий ўзгартириш технологиялари биомассани биодизел каби углерод таркибли биоёқилғилар ва бошқа шундай суюқликларга ўзгартира олади. Этанол олиш учун дастлабки ҳомашё қишлоқ хўжалик экинлари (шакар, сахароза ва б.) бўлиб, унинг газолин билан аралашмасидан фойдаланилади (5-90 % аралашма). Ҳозирги кунда лигноцеллюлоза материаллари, ошхона чиқиндилари каби ноанъанавий ҳомашёлардан биоэтанол олиш тадқиқотларнинг бош масаласи ҳисобланади. Инулинга бой ҳомашёлардан спирт ишлаб чиқариш XIX аср охирларидан буён ўрганилмоқда. Шунга қарамай ҳозирда кенг танилган. Авваллари этанол ишлаб чиқаришнинг экологик, иқтисодий, стратегик ва инфраструктуравий афзалликлари яхши англаб етилмаган.

Биоэтанол ишлаб чиқариш тадқиқотларида инулинга бой ашёвий материалларга эътибор ортди. Микробиологик экзоинулиназалар инулин молекуласи фруктоза қолдиқларини кўчира олади ва фруктоза ҳамда глюкоза ҳосил қилади. Сўнг *Saccharomyces* spp. штаммлари томонидан этанолгача бижғитилади [Chi ва б., 2011]. Бир нечта ачитқи штаммлари инулинни бир вақтда гидролиз қилиш ва бижғитиш жараёнларини амалга ошира олади. *Kluyveromyces marxianus* ва бир нечта *Saccharomyces* spp. штаммлари ҳар икки фаол инулиназа ва этанол ишлаб чиқара олади [Chi ва б., 2011, Rocha ва б., 1986, Kim ва б., 1998, Lim ва б., 2011].

6. Инулиназа ферментининг фаоллигини аниқлаш

Инулиназанинг максимал активлиги бижғишининг 96-соатидан кейин намоён бўлади. Selvakumar ва бошқалар маълумотларига кўра *Kluveromyces marxianus* (122.8 бирлик) да максимал фермент ҳосил бўлиши 72 соатдан кейин ва *Staphylococcus spp.* (107.6 бирлик) да 48 соатдан кейин юзага келади [Marcio Mazutti ва б., 2007].

Ҳужайрадан ташқарига секреция қилинадиган (экзо) инулиназа фаоллигини аниқлаш куйидаги кетма-кетликда амалга оширилади: 2 мл 0,2 % ли инулин суспензиясига 2 мл 0,2 М ли ацетат буфери (рН 4,6) ва 0,5 мл тозаланмаган культурал суюқлик (филтрланган) қўшилади ва 20 мин 50°C ҳароратга қўйилади. Сўнг ферментни нофаоллаштириш учун пробиркалар 10 мин қайнатилади. Кейин совутилиб намуна центрифуга қилинади ва динитросалицил кислота методи (DNS) ёрдамида стандарт сифатида фруктозадан фойдаланиб, ҳосил бўлган қандлар-фруктоза миқдори текширилади. Тажрибада инулиназанинг 1 бирлик фермент миқдори ҳосил бўлган 1 $\mu\text{мол мин}^{-1}$ маҳсулот миқдорига тенг эканлиги стандарт сифатида белгиланган [Hossam S.Hamdy, 2002].

7. Инулиназани ажратиш олиш ва тозалаш усуллари

Инулиназанинг юқори даражада тозаланган фермент препаратларини олиш учун унинг сувли экстракти изопропил спирт билан 1:1,5 ҳажм нисбатда 2-4°C ҳароратда аралаштирилади. Сўнг фермент 10 мин центрифугага қўйилади. Чўктирилган фермент 0,1 М ацетат буферида (рН 4,5) эритилади. Ўлчами 21,5×150 мм бўлган колонкадан ўтказилади ва шу буфер билан 5 мин га 1 мл тезликда элюцияланди.

Инулиназани тозалашда сефадекс G-25 (ферментни куйи молекулали аралашмалардан тозалаш ва ўлчамлари бир-бирига яқин оқсил молекулаларини ажратиш олиш учун) қўлланилади. Кейин сефадекс G-100 колонкали гел-филтрациядан ўтказилади. Ажратиш олинган оқсил Лоури методи бўйича аниқланади. Инулиназанинг фаоллиги Селиванов

реакцияси бўйича резорцинли метод ёрдамида аниқланади. Субстрат сифатида инулин (Spofa, Прага) дан фойдаланилган [Рутковская Т.Р ва б., 2007].

Инулиназани чўктириш учун этанол ва ацетоннинг 50-80 % диапазондаги турли концентрацияларидан фойдаланилади. Чўктириш -4°C харорат ва pH 4,0 муҳитда 1,5 соат давомида олиб борилади. Максимал фермент ажралиб чиқиши ацетоннинг 65 % концентрациясида кузатилди.

Бу эритманинг пастроқ концентрация (50 %) ларида инулиназаларнинг юқори фаоллиги (13 бирлик/мг гача) сақланади, бироқ фермент ҳосил бўлиши пасаяди. Шунингдек, *Aspergillus awamori* культурасидан инулиназани чўктириш учун ацетоннинг оптимал концентрацияси 65 % бўлади. Бунда фермент ажралиб чиқиши ва тозалик самарадорлиги максимал бўлади.

Aspergillus awamori инулиназаларини тозалаш жараёнида турли концентрацияли этанолнинг таъсирини ўргандик. Этанол ёрдамида ферментни чўктириш учун юқори концентрацияли спирт-75 % талаб қилинади. Бунда тозалик самарадорлиги максимал бўлиб, фермент ажралиб чиқиши 81 % ни ташкил қилади. Солиштирма фаоллиги эса бу кўрсаткичга нисбатан 7 % кам бўлади.

Эритма муҳитида pH 4,0 га тенг бўлганда инулиназани чўкмага тушиши кузатилади. Бу водород ионларининг концентрацияси *Aspergillus awamori* инулиназаларининг изоэлектрик нуқтасига яқин бўлиши мумкин. Маълумки, деярли барча глобуляр оқсилларнинг эритмадаги pH кўрсаткичи уларнинг изоэлектрик нуқтасига яқин бўлади. Эрувчанлиги эса паст.

Saccharomyces cerevisiae инулиназалари учун энг яхши чўктирувчи изопропанолнинг ҳажмий 1:3,5 нисбатдаги аралашмаси ҳисобланади. Бунда фермент ажралиб чиқиши тозалик даражаси 2,21 да 96,7 % бўлади. Ферментнинг энг юқори солиштирма фаоллигига (9,54 бирлик/мг)

изопропанолнинг концентрация нисбати 1:4 бўлганда эришилади. Бунда фермент ажралиб чиқиши 86,4 га етади.

Максимал инулиназалар ажралиб чиқишида ацетоннинг 1 ҳажм эритмасига 3 ҳажм нисбатдаги экстрактдан фойдаланиб, тозалик даражаси 1,14 бўлган 86,9 % натижага эришилади [Ковалева Т.А ва б., 2008].

1- боб бўйича хулоса

1. Бактерия, замбуруғ ва ачитқиларнинг кўпчилиги эндо ва экзоинулиназалар хосил қилади. Бунда махсус шароитлар яратиш зарурдир. Бактерия ва замбуруғлар инулиназаларини уларни токсинлари билан ифлосланиш даражаси катталиги сабабли, уларни озик-овқат саноатида қўллаш таъқиқланган. Ачитқи замбуруғларга келса, уларни фақат эндоинулиназалари ажратиб олинган, экзоинулиназалари эса ажратиб олиниб, қисман тозаланган ва баъзи хусусиятлари ўрганилган.
2. Инулиназа индуцибель фермент бўлганлиги сабабли у хосил бўлиши учун фруктоза, турли фруктоза тутувчи олиго- ва полисахаридлар (кестоза, нистоза, инулин) ёки уларни ўз таркибида тутган ўсимлик материаллари (жавдар, арпа, банан, саримсоқ пиёз, пиёз, буғдой, сачратқи, картошкагул, қоқи ўт, сарсабил илдизлари, топинамбур) ва кишлоқ-хўжалик чиқиндилари қўлланилиши мумкин (Cassava уни, маккажўхори пояси, сули уни, шоли сомони, шакарқамиш қолдиғи, буғдой кепаги).
3. Турли манбалардан ажратиб олинган инулиназалар бир биридан молекуляр оғирлиги (50-250 кДа), фаоллиги (263 бирлик/мг), рН-оптимуми (3,5-7,5), температура оптимуми (40-60 °С), метал ионлари ва оқсил табиатли ингибиторлари таъсири бўйича фарқланади.
4. Адабиётдаги маълумотларга кўра инулиназаларни мейёрий кўрсаткичлари турли бирликларда келтирилганлиги сабабли тўлиқ таҳлил қилиш қийин.
5. Эндо-инулиназаларни ажратиб олиш технологияси мураккаблиги сабабли, технологик жихатдан самарадор ва тан нархи арзон бўлган экзо-инулиназани ачитқи замбуруғлардан ажратиб олиш мақсадга мувофиқдир.

2-боб. МАТЕРИАЛЛАР ВА МЕТОДЛАР

Ушбу тадқиқот объекти сифатида Файз-барака навли топинамбур (*Helianthus tuberosus L.*) туганаклари, *Saccharomyces cerevisiae* ва *Saccharomyces carlsbergensis* ачитқи штаммларидан фойдаланилди.

Асбоб ва жиҳозлар: магнитли аралаштиргич MM5 (Россия), рН-метр HI 3220 (HANNA, Руминия), ултратовушли дезинтегратор – 8510 (BRANSON, Мексика), центрифуга К 23 (MLW, Германия), Горяев камераси (Модель 851, Россия), спектрофотометр (Perkin Elmer, АҚШ), электрофорез ускунаси (Cole-Parmer, АҚШ), ўзгармас ток манбаси ускунаси Эльф-4 (ДНК-технология, Россия), лиофил курутгич К 70 (MLW, Германия), аналитик тарози (ЗЛГ, Россия), техник тарози (Керн, Германия), сув ҳаммомли термостат, термостат.

Реагентлар: инулин (топинамбур кукуни), этанол, сирка кислота, бура (х.ч. “Реахим”, Россия), пептон, пиво суслоси, дист. сув, ачитқи экстракти, $MgSO_4 \times 7H_2O$, NH_4Cl (х.ч. “Реахим”, Россия), KCl (х.ч. “Реахим”, Россия), K_2HPO_4 (х.ч. “Реахим”, Россия), ацетат буфер тайёрлаш учун CH_3COONa (х.ч. “Реахим”, Россия), сефакрил С-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), Трис- HCl (х.ч. “Реахим”, Россия), натрий додецилсульфат (х.ч. “Реахим”, Россия), глицин (Bio-Rad, АҚШ), кумасси G-250 (Ferak, Германия), бромфенол кўки (Sigma, АҚШ), электрофорезда маркерлар сифатида фосфоридаза В (97.4 кДа), БСА (68 кДа), тухум албумини (45 кДа) ва карбоксиангидраза (29 кДа) лардан иборат оксиллар аралашмаси (Sigma, АҚШ).

1. Ачиткиларни даврий тартибда ўстириш

Ачиткиларни даврий тартибда ўстириш жараёни 27°C ҳароратда ҳажми 500 мл Эрленмейер колбаларида 200 мл махсус озуқа муҳитларда олиб борилади. Қуйида фойдаланилган озуқа муҳит таркиблари келтирилган:

1. **Мухит №1 (г/л):** инулин – 10, пептон – 10, ачитки экстракти – 5, K_2HPO_4 – 5, NH_4Cl – 5, KCl – 1.15, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.65, дист. сув [Sarote Sirisansaneeyakul ва б., 2007; Marcia Luciana Cazetta ва б., 2010].
2. **Мухит №2 (г/л):** 2% ли агар эритмаси (2 г агар + 98 г дист. сув), пиво суслоси (агар эритмаси ва сусло 1:1 нисбатда аралаштириб, агар тамоман эритилади ва пробирка ёки колбаларга қуйилади).
3. **Мухит №3.** Пиво суслоси, оптик зичлиги 8 б.

2. Микроорганизмлар ҳужайрасини бевосита санаш

Горяев камерасида йирик микроб ҳужайраларини – ачиткиларни, бир ҳужайрали сув ўтлари, споралар, замбуруғлар, айрим бактерияларни санаш мумкин. Горяевнинг ҳисоблаш камераси қалин буюм ойнаси бўлиб, тўртта чуқур чизик билан кўндаланг жойлашган учта майдончага бўлинган. Ўртадаги майдонча кўндаланг чизик билан иккига бўлинган. Ҳар қайси ярми тўрсимон бўлинган. Ён томондаги майдончалар ўртадагидан 0,1 мм баландроқ (камера чуқурлиги) бўлиб, унинг устига қоплагич ойна зич ёпилади.

Горяев камерасининг тўри 225 та йирик квадратга бўлинган (15 та каторнинг ҳар каторида 15 тадан квадрат бор). Йирик квадратнинг майдони $1/25 \text{ мм}^2$ га тенг бўлиб, ҳар қайсисининг майдони $1/400 \text{ мм}^2$ бўлган 16 та майда квадратга бўлинган. Камеранинг чуқурлиги 0,1 мм га тенг. Кичик (майда) квадратнинг ҳажми $1/4000 \text{ мм}^3$ ёки $1/4000000$ мл, катта квадратники $16/4000=1/250 \text{ мм}^3$ ёки $1/250000$ мл га тенг. Катта квадратларнинг бир қисми вертикал, горизонтал бўлинган ёки бўлинмаган бўлади.

Қуюқ субстратлардаги ачиткиларни санаш учун аввал улар сувга аралаштирилади (суюлтирилади). Бунинг учун ўлчов колбасидаги 100 мл сувга ҳужайралар концентрациясига қараб, 2, 4 ёки 10 мл ачитки суспензияси қўшилади. Нобуд бўлган ачитки ҳужайраларини бўйаш учун

20-30 мл метилен кўки (1:5000 нисбатда олинган) ёки унинг 1:40 концентрацияли эритмасидан 1-2 мл қўшилади.

Камера ва махсус силлиқланган қоплагич ойнани яхшилаб ювиб куритилади. Ойна юзасидаги тўрлар юзасига тайёрланган культура аралашмасидан кичик томчи томизиб, қоплагич ойна билан ёпилади. Ойна тагидаги суюқлик катаклар бўйлаб бир текис тарқалиши, пуфакчалар ҳосил бўлмаслиги керак. Суюқликнинг ҳажми камеранинг ҳисобланадиган ҳажмига мос келиши учун то Нютон ҳалқалари деб аталадиган ҳалқалар пайдо бўлгунча қоплагич ойна камеранинг ён майдончасига ишқаланаверади. Қоплагич ойнани олдин ишқалаб, кейин пипеткада камерани микроорганизмлар суспензияси билан тўлдириш ҳам мумкин. Хужайралар чўкиши ва бир текисда (бир сатҳда) кўриниши учун камера тўлдирилгандан 3-5 минутдан кейин ҳисоблаш бошланади. Микроорганизмларни ҳаракатчан формаларини катакларга туширишдан олдин уларни иситиб ёки суспензияга 0,5 % формалин қўшиб нобуд қилинади.

Камерани микроскопнинг буюм столчасига жойлаштириб қўйиб, олдин $\times 8$, кейин $\times 40$ объективда кўрилади. Катта квадратнинг ичидаги хужайралар ҳам, чекка чизигидаги, лекин кўпроқ қисми муайян квадрат ичида бўлган хужайралар ҳам – ҳаммаси ҳисобга олинади. Яримдан кўпи бошқа квадратда бўлган хужайралар ҳисобга олинмайди. Агар хужайралар чегара чизик билан тенг иккига кесилиб турган бўлса, квадратнинг иккита ёнма-ён (бир-бирига яқин) томонидаги, масалан, пастки ва чап томонидаги хужайралар ҳисобга олинади.

Ҳар бир томчида 10 та катта квадратдаги хужайраларни санаш тавсия этилади. 1 мл даги хужайралар сони қуйидаги формулага кўра ҳисобланади:

$$X = \Sigma \times 25 \times 10^4$$

Бу ерда: Σ - саналган хужайраларнинг ўртача сони.

Жуда қуюқ суспензияларда хужайраларни санаш қийин, шунинг учун уларни сув қўшиб суюлтириш керакки, битта йирик квадратдаги хужайралар сони 16 тадан ошмаслиги керак. 1 мл даги хужайралар сонини ҳисоблашда суюлтиришни ҳисобга олиш лозим [Ҳакимова Ш.И., 2005; Нетрусов, 2005].

3. Ачитқилар ўстирилаётган культуранинг микробиологик тозалик даражасини назорат қилиш

Инулиназа биосинтези учун ўстирилаётган продуцентлар ўстирилаётган культуранинг микробиологик тозалиги жуда муҳим омил ҳисобланди. Культurada бегона колония хужайралари ёки микробнинг бўлиши продуцент хужайраларининг ўсишига ва фермент биосинтезига салбий таъсир қилиши мумкин. Муҳитдаги озуқа моддаларни микроблар томонидан парчаланиши ва муҳитда метаболитларнинг кўпайиши бунга сабаб бўлади. Ўстирилаётган фаол инулиназа продуцентларининг культурасидан стерил шароитларда (стерил буюмлар, олов олдида, ҳаво ҳаракати бўлмаган ҳолда) намуна олиниб, стерил буюм ойнасига суртма тайёрланади ва қуриган суртмага бўяш учун 1-2 томчи бўёқ (масалан, метил кўки бўёғи) томизилади. 2-3 минутдан кейин бўёқ ювиб ташланади ва қуриб бўялган қисмига 1-2 томчи иммерсион мой томизилади. Тайёр препарат микроскопнинг $\times 90$ объективида кўрилади. Микроскоп остида кўрилганда, бўялган хужайралар шакли, ўлчами ва ранги бир-бирига яқин ёки бир хил бўлса культура тоза деб ҳисобланди [Нетрусов, 2005].

4. Ачитқи инулиназаларини ажратиб олиш ва тозалаш

Ачитқи биомассаси культурал суюқликдан 4°C да центрифуга (6000 айл/мин, 10 мин) қилиб ажартиб олинди. Гомогенат 4°C гача совутилди ва фермент препаратини тозалашга ўтказилди.

Фермент гомогенати изопропил спирт билан 1:1,5 ҳажм нисбатда аралаштирилади ва бир кун давомида 4°C ҳароратга қўйилди. Кейин

центрифугага 4°C ҳароратда 6000 г тезлик ва 50 минутга қўйилади. Супернатант инулиназа фермент препаратини олиш учун бошланғич материал сифатида фойдаланилди.

Инулиназани ажратиб олиш ва тозалаш қўйидаги кетма-кетлик асосида олиб борилади: изопропил спирт ёрдамида чўктириш, гелъ-филътрация, диализ ва лиофил қуритиш.

1. Фермент оксилларини чўктириш.

4°C ҳароратли 100 мл ачитқи экстракти 4 ҳароратли 150 мл изопропил спирти билан аралаштирилади ва 4°C ҳароратга қўйилди [Рутковская Т.Р. и др., 2010]. Кейин экстракт 4°C ҳароратда центрифуга қилинди. Бунда керакли фермент оксиллари чўкмага тушиб, ортиқча қисмлар супернатантда қолди. Олинган чўкма - оксил дистилланган сувда эритилиб, диализ қилинди. Кейин диализат ферментнинг фаол оксил қисмларини ажратиб олиш учун сефакрил С-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) дан ўтказилди.

2. Олинган диализатни гелъ-филътрацияси усулида тозалаш сефакрил С-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) билан тўлдирилган ўлчамли 1,6 × 80 см бўлган колонкада ўтказилади. Сефакрил колонка дастлаб 0,05 М аммоний ацетат буфер (рН 4,5) билан ювиб тайёрланади. Оксил фракцияларини элюция тезлиги 30мл/соатни ташкил этади. Ҳар бир ажратилган алоҳида фракциянинг (8 мл) оксил миқдори Лоури методи бўйича аниқланади. Максимал инулиназа фаоллигига эга бўлган фракциялар бирлаштирилиб, 4°C да дистилланган сувга қарши диализга қўйилади.

3. Диализат лиофил қуритилади.

5. Оксилларни ПААГ да электрофорези

Электрофорез натрий додецилсульфат иштирокида Леммли методи бўйича полиакриламид гели (ПААГ) да олиб борилди. Вертикал электрофорез (Cole-Parmer, АҚШ) ускунасида, қўлланма [Практическая

химия белка, 1989] бўйича 1 мм қалинликдаги пластиналарда ўтказилди. 12 % концентрацияли акриламид гелидан фойдаланилди. ПААГ 1,5 М Трис-НСI (рН 8,34) ва 10 % натрий додецилсульфатлардан иборат бўлди. Акриламидларнинг полимерланиши учун персульфат аммоний ва Н, Н, Н, Н-тетраметилетилендиамин қўлланилди. Электрод буфери 0,19 М глицин ва 0,1 % натрий додецилсульфатлардан таркиб топган ва Трис билан буферни рН 8,34га келтирилди. Намуналарни (250 мкг/мкл) гелга қўйишдан аввал улар қуйидаги таркибли буферда эритилди: сув-3,84 мл, 0,5 М Трис-НСL рН 6,8-1 мл, глицерин-0,8 мл, ЭДТА-0,16 мл, 10 % натрий додецилсульфат-1,6 мл, 0,4 мл меркаптоэтанол ва 0,05 % бромфенол кўки-0,2 мл иборат аралашмага қўшиб 100⁰С ҳароратда 1,5 мин давомида қайнатилди. Гельни фиксацияси аввал 5 % формальдегид ва 25%ли этанолда 1 соат давомида, кейин икки марта 10 % этанолда 1 соат давомида олиб борилди. Оксилларни бўйаш 0,1% кумасси СВВ R-250 ва 3,5% хлор кислотаси тутган эритмасида 60⁰С да 20 минут давомида олиб борилди. Бўйалган гел кейин сув билан ювилди. Маркерлар сифатида фосфоридаза В (97.4 кДа), БСА (68 кДа), тухум албумини (45 кДа) ва карбоксиангидраза (29 кДа) лардан иборат оксиллар аралашмасидан фойдаланилди. Электроферез жараёни бошида 30 минут давомида ток кучланиши ўзгармас ток манбаси ускунаси Эльф-4 (ДНК-технология, Россия) ёрдамида 30 Вольтда олиб борилди, кейин ток кучланиши 75-80 Вольтгача кўтарилди ва 3 соат давомида олиб борилди.

6. Инулиназа ферментини фаоллигини аниқлаш

Инулиназанинг гидролитик фаоллиги икки босқичда аниқланди. Биринчи босқичда 3 мл 0,01 М ацетат буфери (рН 5,0) ва 1 мл топинамбур соки (10% инулин) аралаштирилди, аралашма 10 мин хона ҳароратига қўйилди. Кейин 1 мл фермент тутган эритма қўшилди ва аралашма 30 °С ҳароратда 15 мин давомида реакция олиб борилди. Аралашма сув ҳаммонида 100⁰С да 5 мин давомида қайнатиш орқали реакция

тўхтатилди. Ферментнинг фаоллигини аниқлашда солиштирма намуна учун олинган фермент эритмалари 100°C да 5 мин давомида сув ҳаммомида қайнатилди.

Иккинчи босқичда реакция аралашмада ҳосил бўлган фруктоза миқдори рН-метрик метод ёрдамида аниқланди. Инулиназанинг гидролитик фаоллик бирлиги 1 минутда мкг ларда ҳосил бўлган фруктоза миқдорига тенг деб қабул қилинди.

7. Фруктоза миқдорини аниқлаш

Фруктозани аниқлаш асосан натрийтетраборат тузи - бура ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$) ни сув-спирт ва сувли эритмаларда моносахаридларни борат ионлари билан ўзаро комплекс ҳосил қилувчи аналитик реакцияларни ўтказишдан иборат. Аналитик сигнални ўлчаш-эритмани рН кўрсаткичини аниқлаш ҳисобланади. рН-метрик усулнинг афзаллиги бир нечта амалий ҳаракат ва реактивлар сонини бирмунча қисқартиради.

Методикани амалга ошириш. Термостатланган ячейкага 20 мл 0,01 М ли бура эритмаси солинди ва дастлабки рН₀ кўрсаткичи ўлчанади. Топинамбур шарбати тажриба ўтказишдан аввал концентрланган NaOH эритмаси билан рН 6,8-7,0 гача нейтралланди. 20 мл 0,01 М ли бура эритмасига 5 мл нейтралланган топинамбур шарбати қўшилди. Кейин уни рН_х кўрсаткичи ўлчанди ҳамда қуйидаги формула ёрдамида ΔрН фарқи аниқланди:

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_0 - \text{pH}_x.$$

Натижаларнинг даражаланган графигини тузиш учун 5 та 50 мл ли колбаларга пипетка ёрдамида фруктозанинг 0,5; 1,5; 2,5; 3,0; 4,0 % ли эталон эритмалари солинди.

Ячейкага 20 мл 0,01 М бура эритмаси солинади ва дастлабки рН₀ кўрсаткичи ўлчанди. 20 мл 0,01 м ли бура эритмасига 5 мл фруктоза эритмаси қуйилди. Кейин намуналарнинг рН_х кўрсаткичлари ўлчанади. рН-метрик сигнал фарқлари аниқланди $\Delta\text{pH} = \text{pH}_0 - \text{pH}_x$.

Фруктоза бўйича даражаланган боғлиқлик графигини тузиш учун ўртача квадратлар методидан фойдаланилди ва фруктозанинг ҳар хил концентрацияларидан турли потенциал калибрланган боғлиқлиги тузилди.

8. Инулиназа ферменти миқдорини аниқлаш

Реактивлар:

1. 0,1 М NaOH да тайёрланган Na₂CO₃ нинг 2% эритмаси;
2. 1% ли натрий цитрат эритмасида тайёрланган CuSO₄ нинг 0,5% ли эритмаси;
3. 1 мл №2 реактив 50 мл №1 реактив билан аралаштирилди; Аралашма бевосита ишлатишдан олдин тайёрланди.
4. Фолин реактиви.

Ишнинг бориши: Тадқиқ этиладиган, 10-100 мкг оксил тутган эритма дистилланган сув билан 4 мл гача етказилади. 2 мл №3 реактив билан аралаштирилиб хона ҳароратида 10 дақиқага қолдирилди. Сўнг 0,2 мл Фолин реактиви қўшилади, аралаштирилди ва 30-40 дақиқадан сўнг мос келувчи филтрни қўллаган ҳолда ФЭК да 750 нм да оптик зичлиги ўрганилди (Lowry O., 1954).

9. Инулиназанинг физик-кимёвий кўрсаткичларини аниқлаш

Фермент фаоллик кўрсатадиган муҳитни оптимал ҳароратини аниқлаш

Инулиназа ферментининг реакцион муҳитдаги оптимал ҳароратини аниқлаш жараёни рН 5,0 ва 15 мин давомида олиб борилди. Тадқиқотлар 20 °С дан 60 °С гача бўлган ҳарорат диапазонида олиб борилди. Дастлаб 10 мл ҳажмли пробиркалар олиб, уларнинг ҳар бирига 1 мл дан инулин эритмаси (10 %) ва 3 мл дан натрий ацетат буфери (рН 5,0) қуйиб, 10 мин 30 °С ҳароратга қуйилди. Кейин ферментли реакция олиб бориш учун ҳар бир ферментли намуна сифатида олинган пробиркаларга фаол инулиназа эритмаси ва солиштирма намуна сифатида олинган пробиркаларга

инактивацияланган инулиназа эритмаларидан 1 мл дан қўшилди. Сўнг намуналар алоҳида ҳолда 20 °С, 30 °С, 40 °С, 50 °С, 60 °С ҳароратларда 15 мин давомида реакцияга қўйилди. Белгиланган вақт тугагач реакцияни тўхтатиш учун намуналар 100 °С да 5 мин қайнатилди. Сўнг ҳосил бўлган фруктозанинг миқдорига кўра инулиназа ферментининг фаоллиги рН-метрик усул ёрдамида текширилди. Солиштира намуна сифатида олинган, инактивацияланган намуна 100 °С ҳароратда 5 мин давомида қўлланилди. Энг юқори инулиназа фаоллигини намоён этган намуна инулиназа ферментининг оптимал таъсир кўрсатиш муҳитининг ҳарорати деб ҳисобланади.

Фермент таъсир этадиган муҳитнинг оптимал рН кўрсаткичини аниқлаш

Инулиназанинг реакцион муҳитдаги оптимал рН кўрсаткичини аниқлаш тажрибалари 30 °С ҳароратда ва 15 мин давомида олиб борилди. Тадқиқотлар рН кўрсаткичи 3,0 дан 6,0 гача бўлган диапазонда олиб борилди. Дастлаб 10 мл ҳажмли пробиркалар олиб, уларнинг ҳар бирига 1 мл дан инулин эритмаси (10 %) ва 3 мл дан рН кўрсаткичлари турли хил: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 бўлган натрий ацетат буфери қўйилди. Кейин ферментли реакция олиб бориш учун ҳар бир ферментли намуна сифатида олинган пробиркаларга фаол инулиназа эритмаси ва солиштира намуна сифатида олинган пробиркаларга инактивацияланган инулиназа эритмаларидан 1 мл дан қўшилди. Сўнг 10 мин 30 °С ҳароратда реакция олиб борилди. Белгиланган реакция вақти тугагач реакцияни тўхтатиш учун намуналар 100 °С да 5 мин қайнатилди. Сўнг совутилиб ҳосил бўлган фруктозанинг миқдорига кўра инулиназа ферментининг фаоллиги рН-метрик усул ёрдамида текширилди. Солиштира намуна сифатида олинган, инактивацияланган намуна 100 °С ҳароратда 5 мин давомида қўлланилди. Энг юқори инулиназа фаоллигини намоён этган намуна инулиназанинг реакцион муҳитдаги оптимал рН кўрсаткичи деб ҳисобланади.

Инулиназа ферментининг барқарорлигини аниқлаш

Инулиназа ферментининг барқарорлигини аниқлаш тажрибалари 30 °С, 40 °С ва 50 °С ҳароратда алоҳида-алоҳида олиб борилди. Фермент эритмалари текшириш учун танланган ҳароратда 10 мин дан 60 мин гача бўлган диапазонда тажрибалар олиб борилди. Дастлаб 10 мл ҳажмли пробиркаларнинг ҳар бирига 1 мл субстрат эритмаси ва 3 мл натрий ацетат буфери (рН 5,0) қуйиб, намуналар алоҳида 10, 20, 30, 40, 50, 60 мин вақт давомида кўрсатилган ҳароратда ушлаб турилди ва белгиланган вақт якунланиши биланоқ унга 1 мл 5 % инулин эритмаси қуйилди. Кейин 30 °С ҳароратда 15 мин давомида реакция олиб борилди. Сўнг реакцияни тўхтатиш учун намуналар 5 мин қайнатилди. Сўнг ҳосил бўлган фруктозанинг миқдорига кўра инулиназа ферментининг фаоллиги рН-метрик усул ёрдамида текширилди. Солиштира намуна учун олинган пробиркага 1 мл инулиназа фермент эритмаси қуйиб, ферментни инактивация қилиш учун 5 мин қайнатилди. Инулиназа фаоллигини ўрганилган вақт давомида аниқлаб, инулиназа ферментининг фаоллиги камайиши бўйича барқарорлиги фоизларда аниқланди.

Ферментнинг бошланғич оптимал концентрациясини аниқлаш

Ферментнинг бошланғич концентрациясини аниқлаш тажрибалари инулиназа ферментининг 0.0125, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.300, 0.400, 0.500, 0.600 мг/мл концентрацияли эритмаларида олиб борилди ва 3 мл дан натрий ацетат буфери (рН 5,0) қуйиб, инкубация қилинди. Дастлаб 10 мл ҳажмли пробиркалар олиб, уларнинг ҳар бирига 1 мл дан инулин ва 3 мл дан натрий ацетат буфери (рН 5,0), 10 мин 30 °С ҳароратга қуйилди. Сўнг тадқиқот учун олинган пробиркаларга текширилаётган ҳар хил концентрацияли фермент эритмалари қуйилди. Кейин 30 °С ҳароратда 15 мин давомида реакция олиб борилди. Ферментатив реакция якунида реакцияни тўхтатиш учун намуналар 100°С да 5 мин қайнатилди. Совутилиб ҳосил бўлган фруктозанинг миқдорига кўра инулиназа ферментининг фаоллиги текширилди. Солиштира намуна учун олинган

пробиркага 1 мл инулиназа фермент эритмаси қуйиб, ферментни инактивация қилиш учун 5 мин қайнатилди. Энг юқори инулиназа фаоллигини намоён этган намуна инулиназа ферментининг бошланғич оптимал концентрациясини билдиради.

Субстратнинг бошланғич оптимал концентрациясини аниқлаш

Субстратнинг бошланғич концентрациясини аниқлаш тажрибалари инулин эритмаси (10 %) нинг 0.025 - 2.000 мг/мл диапазондаги турли концентрацияли эритмаларида олиб борилди. Дастлаб пробиркаларнинг ҳар бирига 3 мл дан натрий ацетат буфери (рН 5,0) ва 1 мл дан 0.025, 0.050, 0.125, 0.250, 0.500, 1.000, 2.000 мг/мл концентрацияли инулин эритмаси қуйиб чиқилди. Кейин ҳар бир ферментли намуна сифатида олинган пробиркаларга фаол инулиназа эритмаси ва солиштира намуна сифатида олинган пробиркаларга инактивацияланган инулиназа эритмаларидан 1 мл дан қўшилди. Реакция 30 °С ҳароратда 15 мин давомида олиб борилди. Сўнг реакцияни тўхтатиш учун намуналар 100 °С да 5 мин қайнатилди. Ҳосил бўлган фруктозанинг миқдорига кўра инулиназа ферментининг фаоллиги текширилди. Солиштира намуна учун олинган ферментни инактивация қилиш учун 5 мин қайнатилди. Энг юқори инулиназа фаоллик кўрсатган намуна субстратнинг бошланғич оптимал концентрациясини билдиради.

10. Экспериментал олинган натижаларнинг статистик таҳлили

Экспериментал олинган натижаларнинг статистик таҳлили Лакин усули бўйича ўтказилди [Лакин, 1990]. Стъюдент критерийи қуйидаги формула асосида аниқланди:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{M_1^2 - M_2^2}}$$

бу ерда:

t – Стъюдент критерийи,

$M (M_1, M_2)$ – тажриба намунаси ва солиштирма намуна вариантларининг ўртача арифметик сони,

$m (m_1, m_2)$ – тажриба намунаси ва солиштирма намуна вариантларининг ўртача арифметик фарқи.

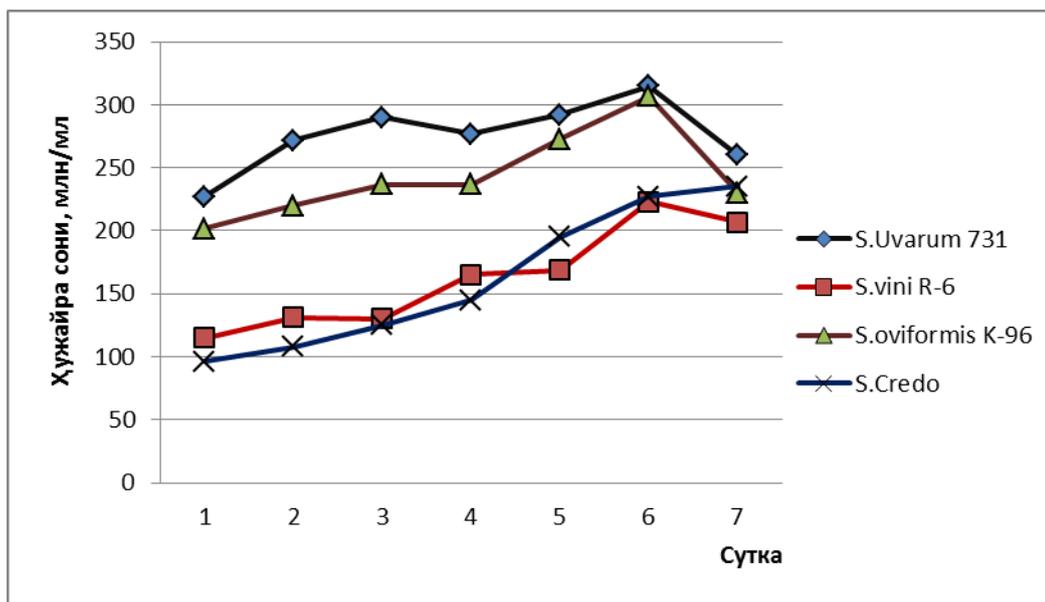
2-боб бўйича хулоса

1. Ачиткиларни даврий равишда ўстириш учун қуйидаги таркибли муҳит (г/л): инулин – 10, пептон – 10, ачитқи экстракти – 5, K_2HPO_4 – 5, NH_4Cl – 5, KCl – 1.15, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.65, дист.сув ва 27 °C хароратда 7 кун давомида ўстириш шароитлари танланди;
2. Бижғиш жараёнини назорат қилиш мақсадида муҳитдаги ачитқи хужайралари сони аниқланади;
3. Культуранинг микробиологик тозалик даражасини назорат қилиш мақсадида хужайраларни бўйаш ва микроскоп остида назорат қилиш учун қўлланилди.
4. Инулиназанинг гидролитик фаоллигини аниқлаш методикалари ачитқидан ажратиб олиган инулиназанинг асосий физик-кимёвий кўрсаткичлари инулиназани 10 % инулин парчалаб фруктоза ҳосил қилиш қобилияти билан аниқланди ва ҳосил бўлган фруктоза миқдори фермент фаоллигини белгилади;
5. Ачитқи инулиназасини ажратиб олиш ва тозалаш шароитлари танланди;
6. Экспериментал олинган натижаларни ўртача кўрсаткичидан фарқи фоизда Стъюдент коэффиценти бўйича аниқланди.

3-боб. НАТИЖАЛАР ТАҲЛИЛИ

1. Инулиназа ҳосил қилувчи ачитқи замбуруғларини скрининг қилиш

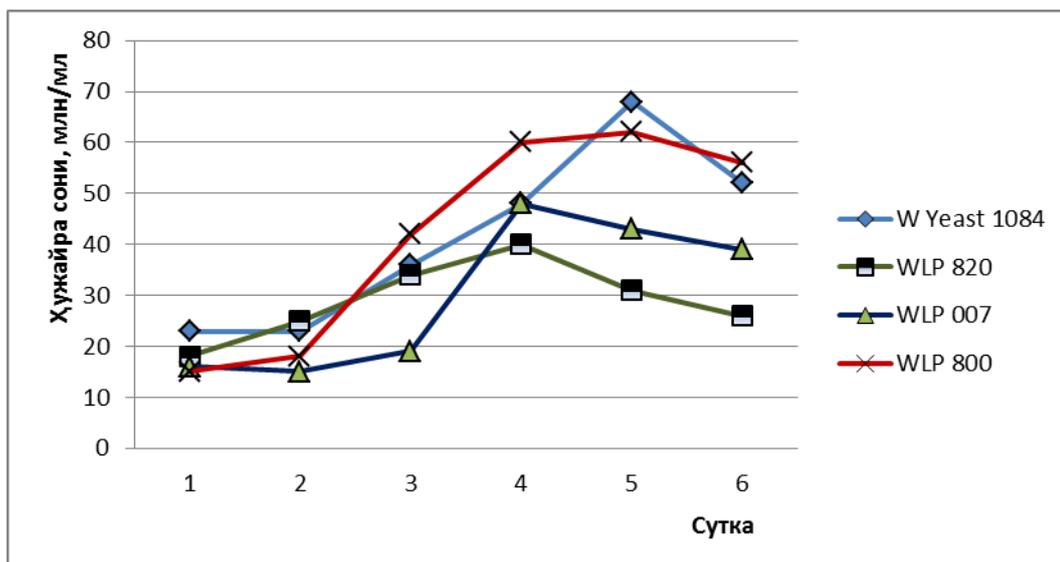
Инулиназа биосинтези ачитқилар ўсишига, озуқа муҳитлар таркибига, хужайранинг физиологик ҳолатига ва ўстириш шароитларига боғлиқ. Тадқиқотларда ачитқи замбуруғлар скрининги 500 мл ҳажмли Эрленмейер колбасида 200 мл озуқа муҳитида даврий равишда 27°C ҳароратда 7 кун давомида олиб борилди. Дастлаб ачитқилар пиво суслосида (8 б) 1 сутка давомида бижғитилди. Кейин махсус озуқа №1 муҳитга кўчириб ўтказилди. Инулиназанинг фаол продуцентини танлаб олиш учун 16 та *Saccharomyces cerevisiae* ва *Saccharomyces carlsbergensis* турига мансуб, саноатда муваффақиятли қўлланилган ачитқи штаммлари танланди. Продуцентлар скринингининг биринчи босқичида қуйидаги ачитқи замбуруғлари №1 муҳитда 7 кун давомида 27°C ҳароратда даврий тартибда ўстирилди: *Saccharomyces uvarum* 731, *Saccharomyces oenoferm Credo*, *Saccharomyces oenoferm rouge*, *Saccharomyces vini* R-6, *Saccharomyces oviformis* K-96, *Saccharomyces cerevisiae* 717, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula pilmanae* U-33, *Saccharomyces cerevisiae* L-3. Ачитқилар ўстирилаётган муҳит визуал бижғиш, хужайра сони, инулиназа фаоллиги каби мезонлар бўйича назорат қилинди. Натижалар 3.1.1-расмда келтирилган. Расмда кўриниб турибдики, ачитқилар ўсиш динамикасининг 6-кунида максимал биомасса йиғди ва хужайра сони 315 млн/мл (*Saccharomyces uvarum* 731) ва 300 млн/мл (*Saccharomyces oenoferm Credo*) ташкил қилди.



3.1.1-расм. Бирламчи скринингда ўсиш динамикасидаги ҳужайралар сони

Изоҳ: I-мавжудлиги $P < 0,05$ да назорат вариантыдан ишончли фарқ қилишини билдиради.

Продуцентлар скринингининг иккинчи босқичида эса қуйидаги ачитқи замбуруғлари ҳам №1 муҳитда 7 кун давомида 27°C ҳароратда даврий тартибда ўстирилди: *Saccharomyces cerevisiae* W Yeast 1084, *Saccharomyces cerevisiae* WLP 009, *Saccharomyces Carlsbergensis* WLP 820, *Saccharomyces Carlsbergensis* W Yeast 2308, *Saccharomyces cerevisiae* WLP 007, *Saccharomyces Carlsbergensis* WLP 800, *Saccharomyces Carlsbergensis* 830. Бу ачитқилар ҳам бижғиш жараёнининг 6-кунида максимал биомасса



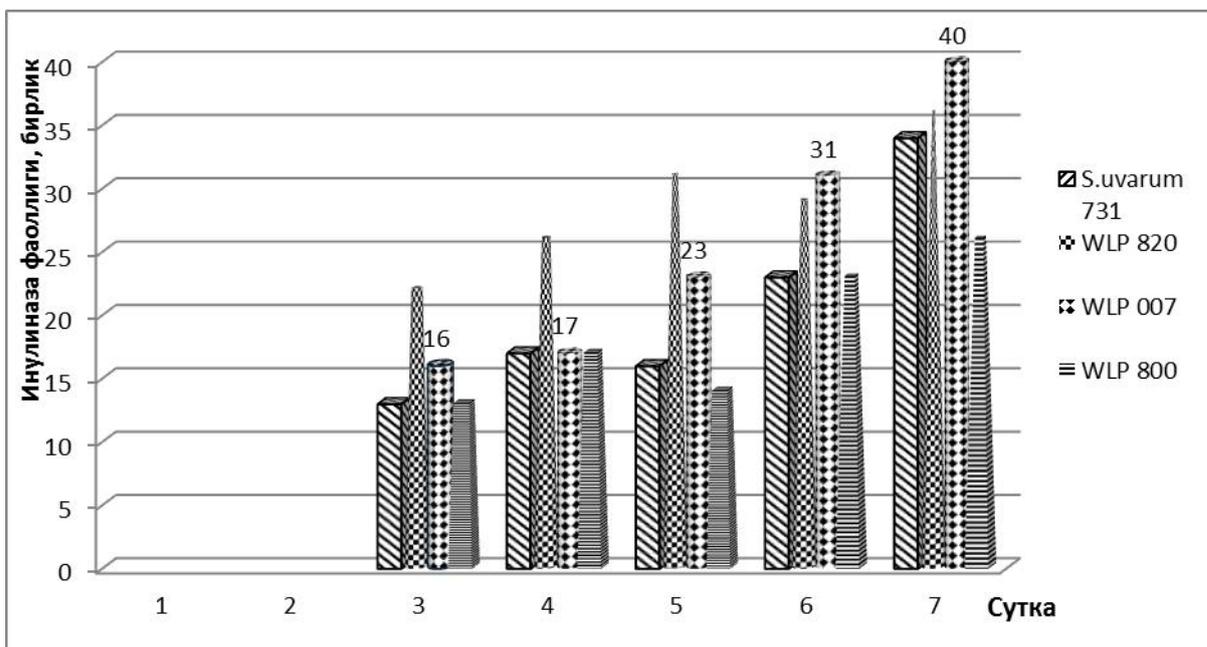
3.1.2-расм. Иккиламчи скринингда ўсиш динамикасидаги хужайралар сони

Изох: I-мавжудлиги $P < 0,05$ да назорат вариантдан ишончли фарқ қилишини билдиради.

Йиғилди ва хужайра сони 68 млн/мл (*Saccharomyces cerevisiae* W Yeast 1084) ва 60 млн/мл (*Saccharomyces cerevisiae* WLP 800) ташкил қилди. Олинган натижалар графиги 3.1.2-расмда кўрсатилган.

Ачитқи замбуруғлари орасидан *Saccharomyces cerevisiae* WLP 007 7-суткада ўзининг энг юқори инулиназа фаоллигини намоён қилди. Ачитқиларни ўсиш динамикасидаги инулиназа фаоллигини аниқлаш натижалари 3.1.3-расмда келтирилган. *Saccharomyces uvarum* 731, *Saccharomyces Carlsbergensis* WLP 820, *Saccharomyces Carlsbergensis* WLP 800 лар эса мос равишда 34, 36 ва 26 бирлик даражада инулиназа фаоллигини намоён қилдилар. Қолган ачитқилар паст фаоллик кўрсатди.

Кейинчалик инулиназа фаоллигини пасайиши барчасида тезда кузатилди. Бу метаболитлар йиғилиши билан боғлиқ бўлиб, ачитқиларни ўсишига тўсқинлик қилиши билан тушунтириш мумкин.



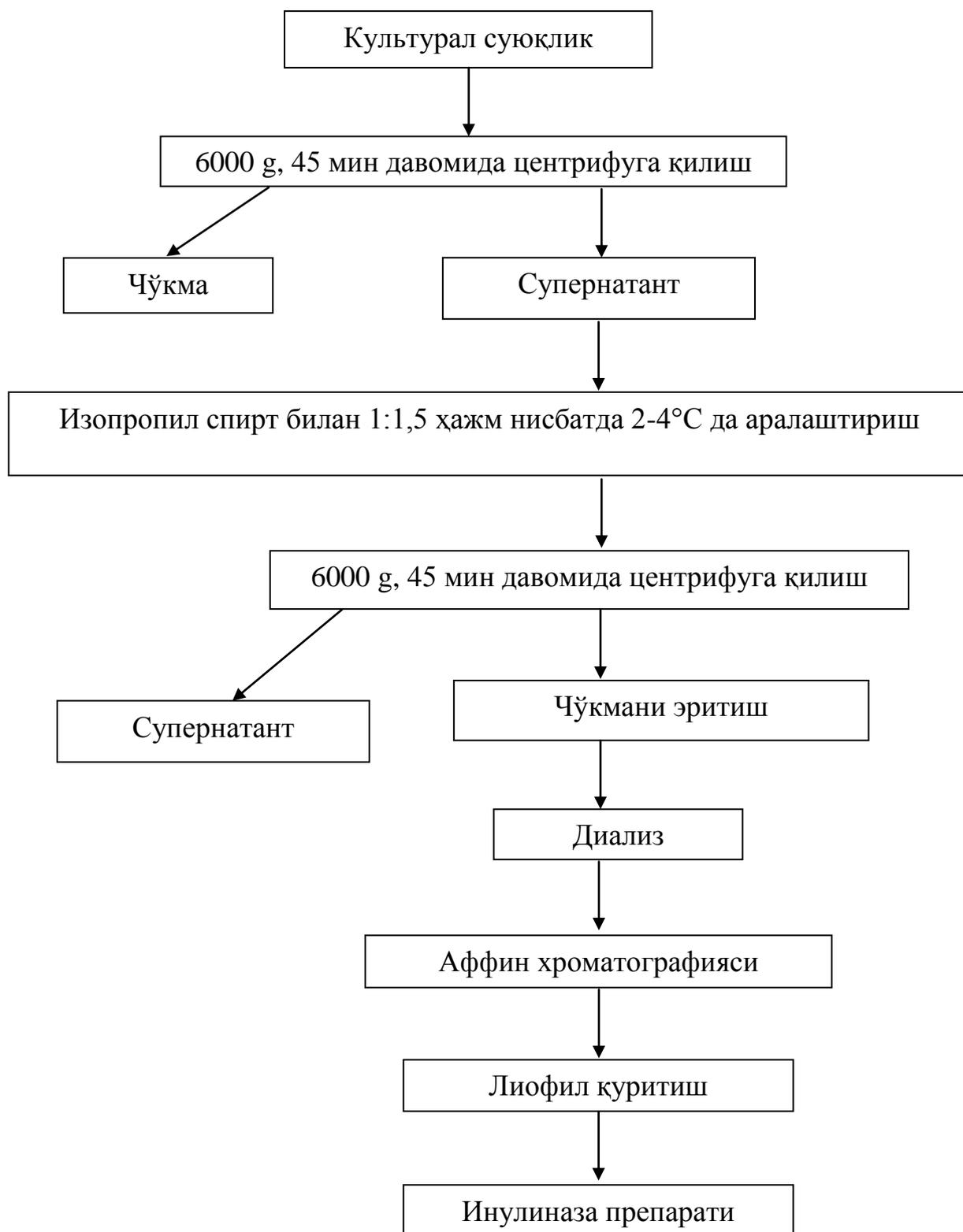
3.1.3-расм. Ачитқиларнинг ўсиш динамикасида инулиназанинг фаоллиги

Изох: I-мавжудлиги $P < 0,05$ да назорат вариантдан ишончли фарқ қилишини билдиради.

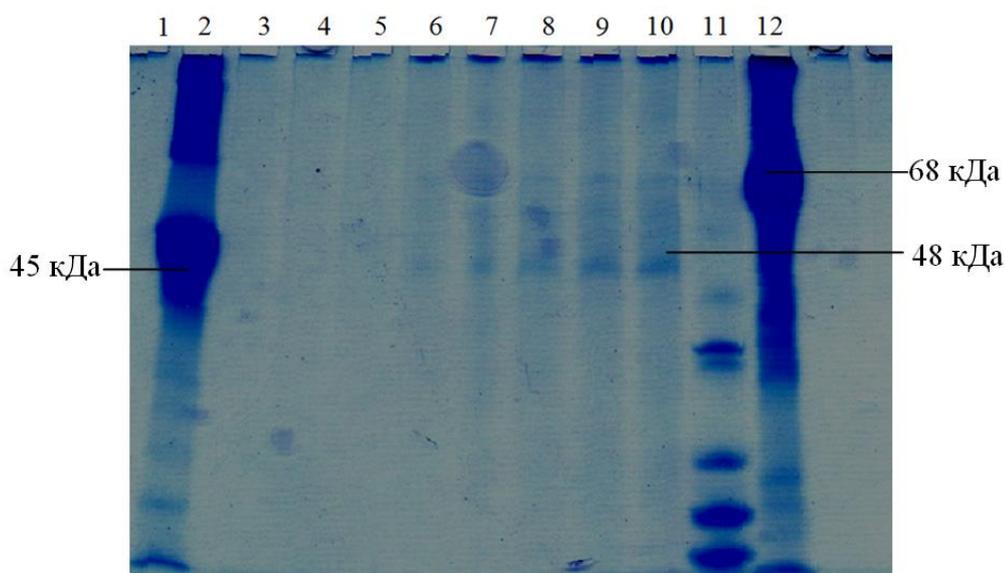
Saccharomyces cerevisiae WLP 007 ачитқиси юқорида келтирилган оптимал шароитларда ўстирилиб, ундан инулиназа ферментини ажратиб олиш учун қўлланилди.

2. Инулиназа ферментини ажратиб олиш ва тозалаш

Ферментни ажратиб олиш ва тозалаш жараёни қуйидаги схема бўйича олиб борилди (схема 1).

Инулиназани ажратиб олиш ва тозалаш

Культурал суюкликдан 300 мл биомассадан 4°C да центрифуга (6000 айл/мин, 15 мин) қилиб ажартиб олинди. Адабиётлардан маълумки, инулиназани изопропил спирти ёрдамида чўктириш мумкин [Рутковская Т.Р. и др, 2010]. Шу сабабли, ферментни тозалашнинг биринчи босқичида фермент препаратларини олиш учун культурал суюкликдаги оксилларни изопропил спирт билан 1:1,5 хажм нисбатда 2-4°C ҳароратда аралаштирилди, давомида 4°C да тиндириб қўйилди ва 4 соатдан сўнг центрифугаланди (6000 айл/мин, 45 мин). Олинган чўкма дистилланган сувда эритилиб, дистилланган сувга қарши 4°C ҳароратда диализ қилинди ва лиофил қуритилди. Олинган оксил фракцияси 99,00 мг ташкил этди. Оксил фракциясининг тозаланганлик даражаси электрофорез усулида аниқланди (3.2.1-расм).

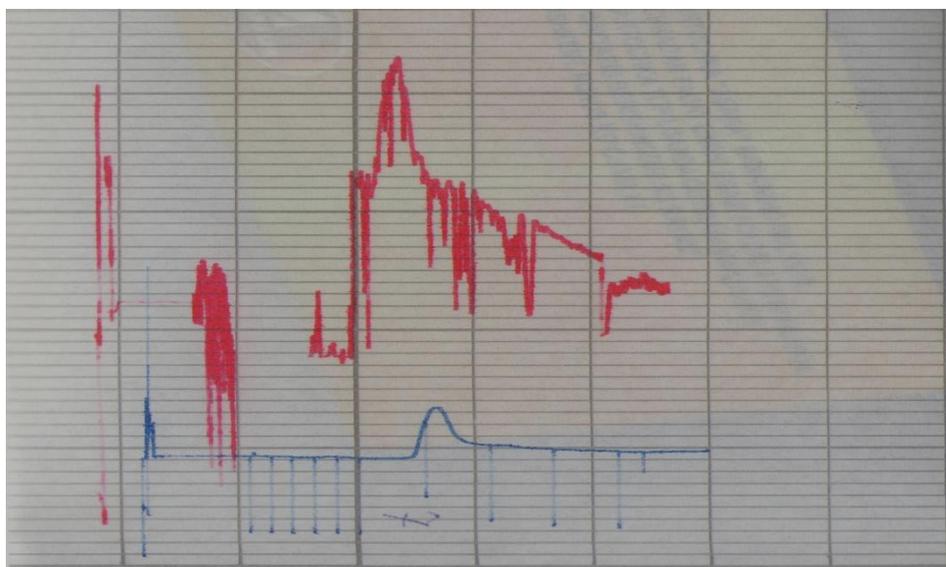


3.2.1-расм. Изопропил спирти билан чўктирилган фракция оксилларини электрофореграммаси

Изох: 1-бўш; 2-овальбумин 5,0 мкл; 3-изопропил спирти 5,0 мкл; 4-тадқиқ қилинаётган намуна 1,0 мкл; 5-тадқиқ қилинаётган намуна 1,25 мкл; 6-тадқиқ қилинаётган намуна инулиназа 2,5 мкл; 7-тадқиқ қилинаётган намуна 5,0 мкл; 8-тадқиқ қилинаётган намуна 7,5 мкл; 9-тадқиқ қилинаётган намуна 10,0 мкл; 10-тадқиқ қилинаётган намуна 12,5 мкл; 11-маркерлар аралашмаси: фосфоридаза В (97.4 кДа), БСА (68 кДа), овальбумин (45 кДа) ва карбоксиангидраза (29 кДа); 12-БСА 5,0 мкл. Барча оксилларнинг бошланғич концентрацияси 25 мг/мл дани ташкил этган.

Электрофорез 1,5 М Трис-НСl (рН 8,8) ва 10 % натрий додецил сульфатлардан иборат мухит буфери ва электрод буфери 0,02 М Трис-НСl, 0,19 М глицин ва 0,1 % натрий додецил сульфатлардан таркиб топган шароитда 12% ПААГда олиб борилди. Натижалар 3.2.1-расмда келтирилган. Расмдан кўриниб турибдики, 10-чи электрофорез йўлидаги фракция 45 дан 68кДа гача бўлган 4 оксил субфракциядан ташкил топган.

Кейинги босқичда ферментни қуйи молекулали аралашмалардан тозалаш ва ўлчамлари бир-бирига яқин оксил молекулаларини ажратиш мақсадида гель-филтрация усули қўлланилди. Бунда сефакрил S-200 билан тўлдирилган 1,6×80 см ўлчамдаги колонка қўлланилди. 5 мл (13,12 мг) изопропанол билан чўктириб, қайта дистилланган сувда эритилган диализат колонкага ташланди. Элюция 0,05 М аммоний ацетат буфери (рН 4,5) билан 30 мл/соат тезлигида 25°C ҳароратда олиб борилди. 8мл дан фракция олиниб автоматик равишда 595 нм тўлқин узунлигида спектрофотометр (СФ) да фракциялар аниқланди. Элюция профили қуйидаги 3.2.2-расмда келтирилган.

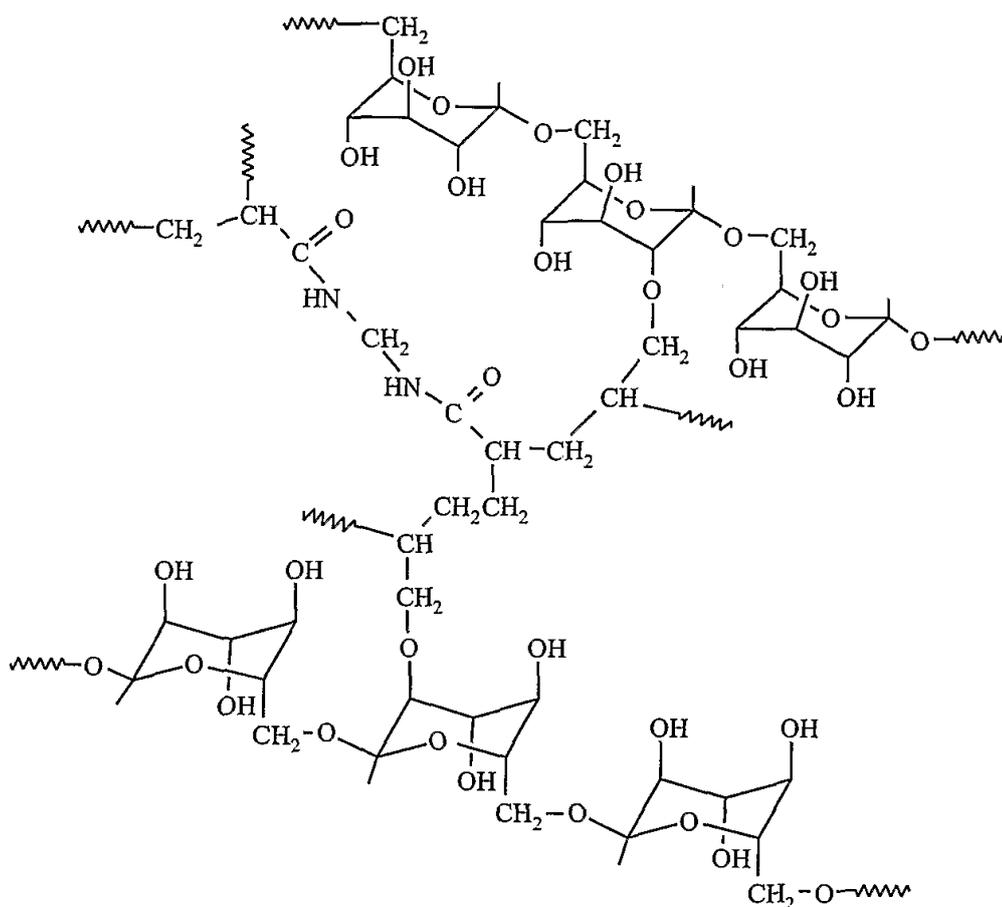


3.2.2-расм. Элюция профили

Элюция жараёнида фаол оксил колонкадан чиқмади, у сефакрил S-200га иммобилизацияланиб қолди. Иммобилланган ферментни делюция қилиш мақсадида 0,1 М натрий хлорид билан элюция қилинди. Натижада 7

ва 8 пробиркаларда оксил борлигини СФ натижалари кўрсатди. 16 мл фаол фракцияда инулиназа фаоллиги (206 бирлик/мл) аниқланди.

Адабиётларга кўра, фермент иммобилланиш сабаби шундаки, қўлланилган гель сефакрил S-200 – бу бир бири билан кимёвий боғланган декстрандан ташкил топган (Sean Matthew et al, 2006). Ташувчи структураси қуйида келтирилган (3.2.3-расм):



3.2.3-расм. Сефакрил молекуласининг структуравий тузулиши

Маълумки, инулиназа углеводга (инулинга) специфик бўлган фермент, шунинг учун ҳам углеводлардан ташкил топган ташувчи юза гуруҳлари инулиназа билан аффин боғланиш даражаси юқори деган фараз жуда юқори. Шу сабабли ҳам тозалашнинг бу босқичи аффин хроматографияси деб номланса мақсадга мувофиқ бўлар эди.

Инулиназани тозалаш бўйича қилинган тадқиқот натижалари қуйидаги жадвалда умумлаштирилган (3.2.1-жадвал).

3.2.1-жадвал

Ачитқи инулиназаларини тозалаш

№	Тозалаш босқичлари	Умумий оқсил, мг	Ферментнинг умумий фаоллиги, бирлик	Солиштирама фаоллик, бирлик/мг	Тозалик даражаси, марта
1.	Культурал суюқлик	938,0	8000	8,53	1
2.	Изопропанол билан чўктириш	210,0	3010	14,3	1,7
3.	Аффин хроматографияси, сефакрил S-200	5,1	2500	490,1	57,4

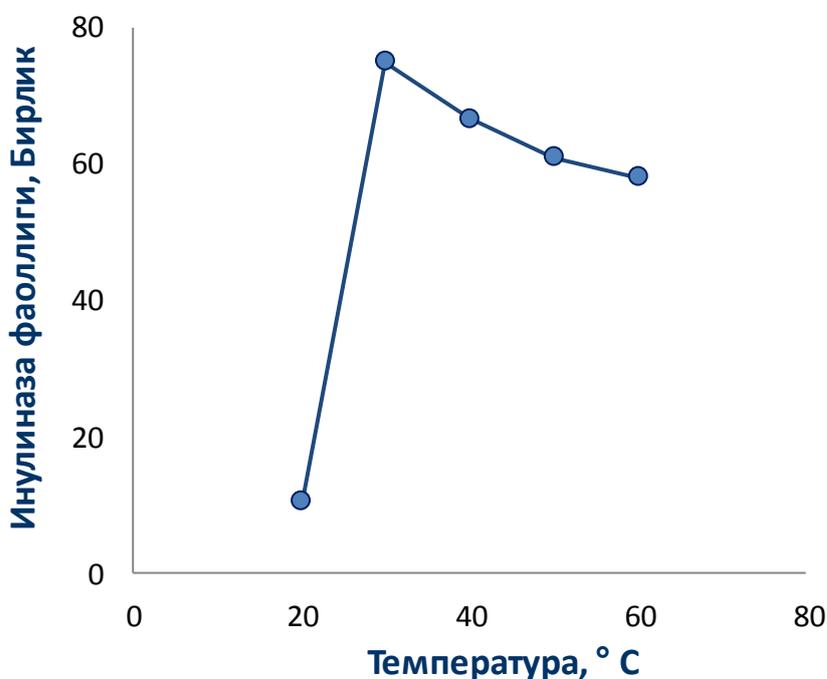
Жадвалдан куришиб турибдики, 1 мг тозаланган ферментни солиштирама фаоллиги 490 Бирликни ва тозалик даражаси 57,4 ни ташкил қилди.

3. Ачитқи инулиназасининг хусусиятлари

Фермент фаоллик кўрсатадиган муҳитнинг оптимал ҳарорати

Инулиназа ферментининг реакцион муҳитдаги оптимал ҳароратини аниқлаш жараёни рН 5,0 муҳитда ва 15 мин давомида олиб борилди. Тажрибалар 20 °С дан 60 °С гача бўлган ҳарорат диапазонида ўтказилди. Дастлаб 12та 10 мл ҳажмли пробиркалар олиб, уларнинг ҳар бирига 1 мл дан инулин эритмаси (10 %) ва 3 мл дан натрий ацетат буфери (рН 5,0) қўйиб, тадқиқот олиб борилаётган ҳароратида 10 мин ушланди. Кейин ферментли намуна сифатида олинган пробиркаларнинг ҳар бирига фаол инулиназа эритмаси ва солиштирама намуна сифатида олинган пробиркаларга инактивацияланган инулиназа эритмаларидан 1 мл дан қўшилди. Сўнг намуналар алоҳида ҳолда 20°С, 30°С, 40°С, 50°С, 60°С

хароратларда 15 мин давомида реакцияга қўйилди. Реакцияни тўхтатиш учун намуналар 100 °С да 5 мин қайнатилди. Сўнг совутилиб инулиназа ферментининг фаоллиги рН-метрик усул ёрдамида текширилди. Натижалар 3.3.1-расмда келтирилган.



3.3.1-расм. Инулиназанинг оптимал муҳит ҳарорати натижаларининг графиги

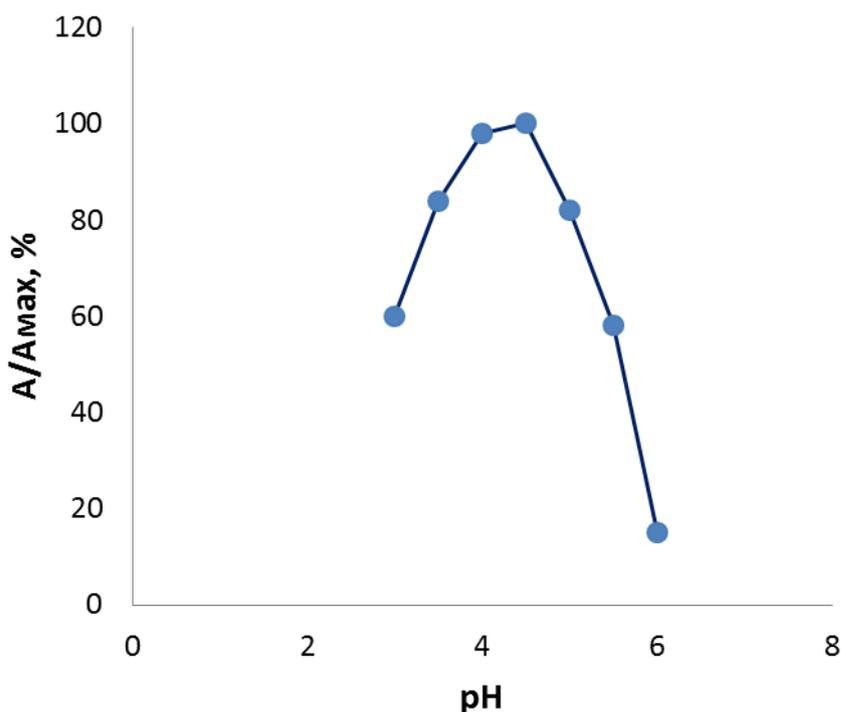
Изоҳ: I-мавжудлиги $P < 0,05$ да назорат вариантдан ишончли фарқ қилишини билдиради.

Расмдан кўриш мумкинки, инулиназанинг фаоллик кўрсатиш оптимал муҳит ҳарорати 30 °С ни ташкил қилди.

Фермент таъсир этадиган муҳитнинг оптимал рН кўрсаткичи.

Инулиназанинг реакция муҳитдаги оптимал рН кўрсаткичини аниқлаш тажрибалари 30°C ҳароратда ва 15 мин давомида олиб борилди. Тадқиқотлар рН кўрсаткичи 3,0 дан 6,0 гача бўлган диапазонда олиб борилди. Дастлаб 14 та 10 мл ҳажмли пробиркалар олиб, уларнинг ҳар бирига 1 мл дан инулин эритмаси (10 %) ва 3 мл дан рН кўрсаткичлари турли хил: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 бўлган натрий ацетат буфери қўйилди. Кейин реакция муҳитлар 30°C ҳароратда 10 мин давомида

преинкубацияланди ва ферментли реакция олиб бориш учун ҳар бир ферментли намуна сифатида олинган пробиркаларга фаол инулиназа эритмаси ва солиштира намуна сифатида олинган пробиркаларга инактивацияланган инулиназа эритмаларидан 1 мл дан қўшилди. Сўнг 30°C ҳароратда 15 мин давомида реакция олиб борилди. Белгиланган реакция вақти тугагач реакцияни тўхтатиш учун намуналар 100°C да 5 мин қайнатилди. Сўнг совутилиб, ҳосил бўлган фруктозанинг миқдорига кўра инулиназа ферментининг фаоллиги рН-метрик усул ёрдамида текширилди. Солиштира намуна сифатида олинган, инактивацияланган намуна 100°C ҳароратда 5 мин давомида қўлланилди. Энг юқори инулиназа фаоллигини намоён этган намуна инулиназанинг реакцион муҳитдаги оптимал рН кўрсаткичи деб ҳисобланади. Натижалар 3.3.2-расмда келтирилган.

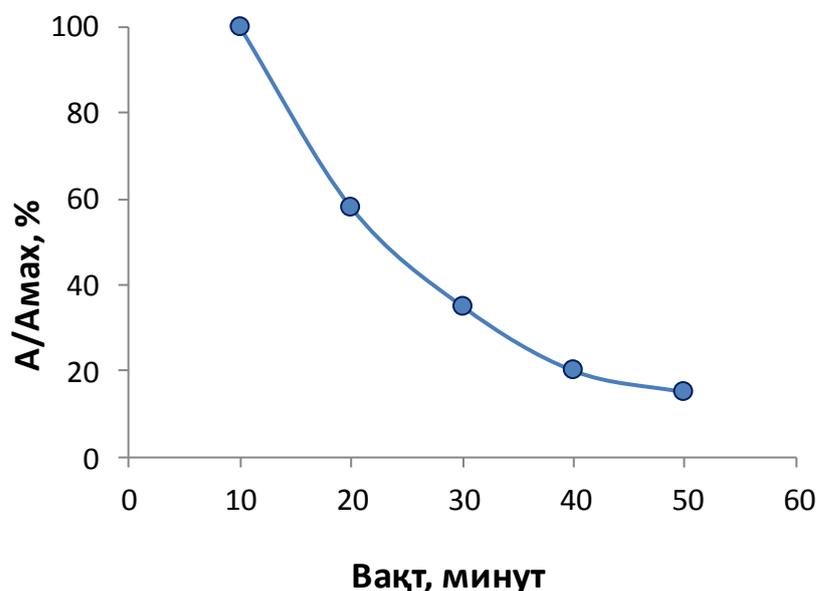


3.3.2-расм. Муҳит рН кўрсаткичини инулиназага таъсири

Изоҳ: I-мавжудлиги $P < 0,05$ да назорат вариантдан ишончли фарқ қилишини билдиради.

Инулиназа ферментининг барқарорлиги. Инулиназа ферментининг барқарорлигини аниқлаш тажрибалари 30 °C ва 50 °C ҳароратда алоҳида-алоҳида олиб борилди. Натижалар 3.3.3-расмда келтирилган. Фермент

эритмалари текшириш учун танланган ҳароратда 10 мин дан 60 мин гача бўлган диапазонда тажрибалар олиб борилди. Дастлаб 10та 10 мл ҳажмли пробиркаларнинг ҳар бирига 1 мл фермент эритмаси ва 3 мл натрий ацетат буфери (рН 5,0) қуйиб, намуналар алоҳида 10, 20, 30, 40, 50, 60 мин вақт давомида кўрсатилган ҳароратда тадқиқот қилинаётган ҳароратларда (30°C ва 50°C) ва вақт доирасида (10 дан 60 инутгача) ушлаб турилди ва белгиланган вақт якунланиши биланоқ унга 1 мл 10 % инулин эритмаси қуйилди. Кейин 30 °C ҳароратда 15 мин давомида реакция олиб борилди ва реакцияни тўхтатиш учун намуналар 5 мин давомида қайнатилди. Сўнг ҳосил бўлган фруктозанинг миқдорига кўра инулиназа ферментининг фаоллиги рН-метрик усул ёрдамида текширилади. Солиштирма намуна сифатида 5 мин давомида қайнатилган инулиназа ферменти қўлланилди. Инулиназа фаоллиги буйича ферментининг барқарорлиги фоизларда аниқланди.



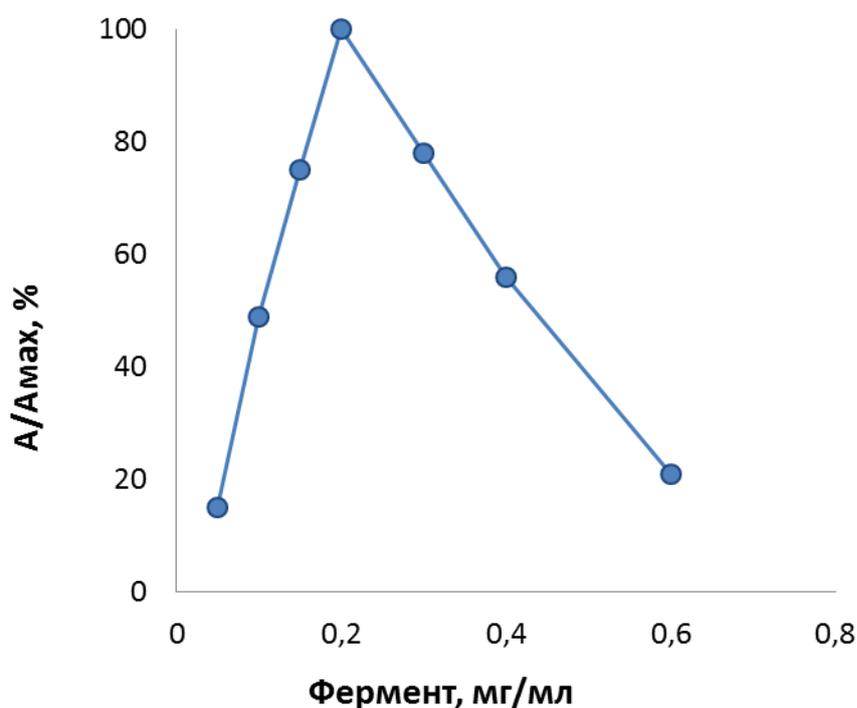
3.3.3-расм. Инулиназани барқарорлиги

Изох: I-мавжудлиги $P < 0,05$ да назорат вариантыдан ишончли фарқ қилишини билдиради.

Расмдан кўриниб турибдики, ферментнинг барқарорлиги -10 минут, унинг фаоллигининг 100% 10 минут давомида сақланди. Фермент 25

минутдан кейин 50% фаоллигини ўйкотади ва 50 минутдан сўнг 80% фаоллигини ўйкотади.

Ферментнинг бошланғич оптимал концентрацияси. Ферментнинг бошланғич концентрациясини аниқлаш тажрибалари инулиназа ферментининг 0.0125, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.300, 0.400, 0.500, 0.600 мг/мл концентрацияли эритмаларида олиб борилди. Натижалар 3.3.4-расмда келтирилган.



3.3.4-расм. Ферментнинг бошланғич оптимал концентрацияси

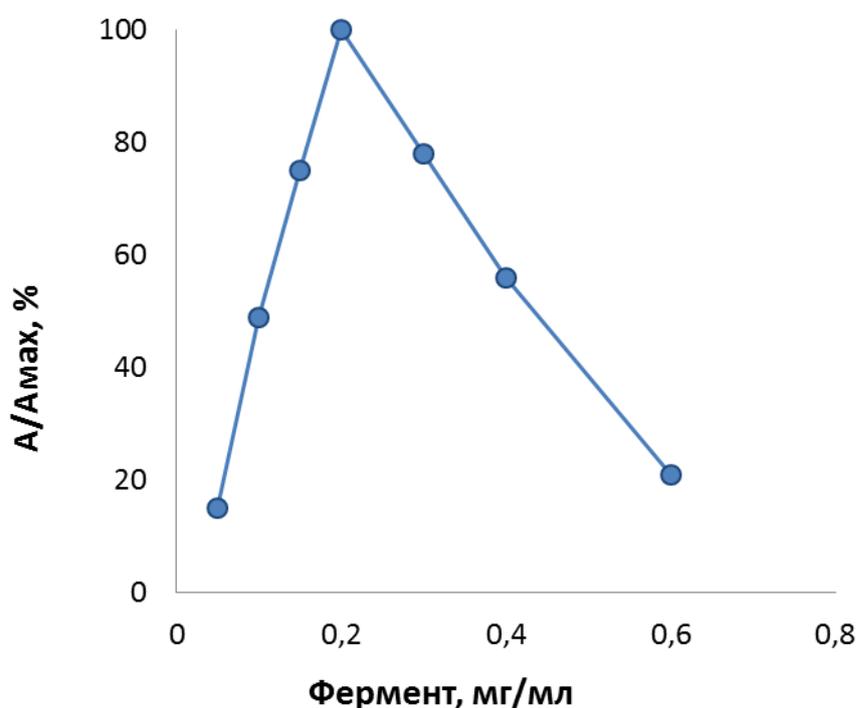
Изоҳ: I-мавжудлиги $P < 0,05$ да назорат вариантдан ишончли фарқ қилишини билдиради.

Тажриба намуналар учун олинган пробиркаларга ҳар бирига 1 мл инулин эритмаси (10 %) ва 3 мл натрий ацетат буфери (рН 5,0) солинди ва 30 °С ҳароратда 10 минут давомида инкубацияланди. Кейин уларга 1 мл инулиназа ферментининг 0.0125, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.300, 0.400, 0.500, 0.600 мг/мл концентрацияли эритмаларидан солинди ва 30 °С ҳароратда 30 мин давомида реакция олиб борилди. Солиштирма намуна сифатида 5 мин давомида қайнатилган инулиназа ферменти қўлланилди.

Реакцияни тўхтатиш учун намуналар 5 мин қайнатилади. Сўнг ҳосил бўлган фруктозанинг миқдорига кўра инулиназа ферментининг фаоллиги текшириб кўрилади. Инулиназа фаоллиги бўйича олинган натижаларга кўра ферментнинг бошланғич оптимал концентрацияси 0,06 мг/мл ни ташкил қилди.

Субстратнинг бошланғич оптимал концентрацияси.

Субстратнинг бошланғич концентрациясини аниқлаш тажрибалари инулин эритмасининг 0.025 - 2.000 мг/мл диапазондаги турли концентрацияли эритмаларида олиб борилади. Натижалар 3.3.5-расмда келтирилган.



3.3.5-расм. Субстратнинг бошланғич оптимал концентрацияси

Изоҳ: I-мавжудлиги $P < 0,05$ да назорат вариантдан ишончли фарқ қилишини билдиради.

Солиштирма намуна сифатида 5 мин давомида қайнатилган инулиназа ферменти кўлланилди. Тажриба намуналар учун пробиркаларнинг ҳар бирига 3 мл дан натрий ацетат буфери (рН 5,0) ва 1 мл 0.125% дан 10% гача бўлган инулин эритмалари қуйиб чиқилди ва 30°C 10 минут давомида инкубацияланди. Кейин намуналарнинг ҳар бирига 1 мл дан инулиназа ферменти эритмаси қуйилди ва 30°C ҳароратда 15 мин

давомида реакция олиб борилди. Сўнг реакцияни тўхтатиш учун намуналар 5 мин қайнатилди. Сўнг ҳосил бўлган фруктозанинг миқдорига кўра инулиназа ферментининг фаоллиги текшириб кўрилди. Инулиназа фаоллиги бўйича олинган натижаларга кўра субстратнинг бошланғич оптимал концентрацияси 1% ни ташкил қилди.

Қуйида табиий инулиназанинг асосий хусусиятлари 3.3.1-жадвалда келтирилган.

3.3.1-жадвал

Инулиназанинг асосий характеристикалари

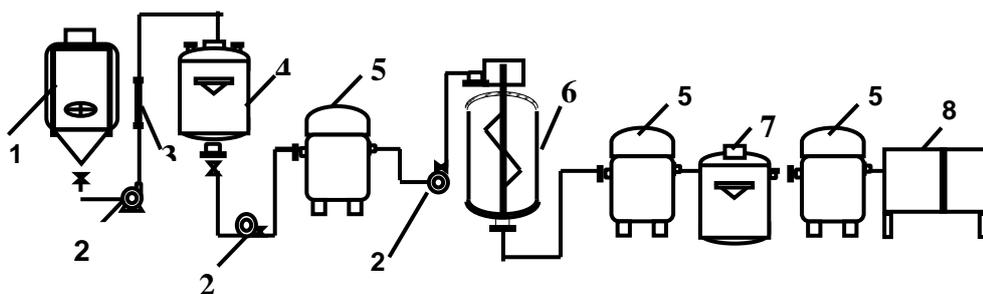
№	Характеристикалари	Кўрсаткичлар
1.	Ферментнинг ҳарорат оптимуми	30 ⁰ С
2.	Субстратнинг оптимал концентрацияси	1,0%
3.	Ферментнинг оптимал концентрацияси	25 мкг/мл
4.	Ферментнинг барқарорлиги	15 мин
5.	Ферментнинг таъсир вақти	60 мин

Шундай қилиб, табиий инулиназанинг ҳарорат оптимуми 30⁰С, субстратнинг (инулин) оптимал концентрацияси –1%, фермент оптимал концентрацияси –25мкг/мл ва ферментнинг барқарорлиги -15 минутни ташкил этди.

4. Фермент препаратини ишлаб чиқариш учун таклиф этилган биотехнология

Олинган натижалар асосида инулиназа ферментини ачитқи замбуруғидан ажратиб олиш технологияси ишлаб чиқилди ва у қуйидаги босқичларни ўз ичига олади: дастлаб резервуарда (1) махсус озика муҳит тайёрланади ва стерилланади, кейин у насос (2) ва ротаметр (3) ёрдамида ферментерга (4) юборилади. У ерда бижғиш жараён олиб борилади ва у тугатилгандан сўнг фермент тутган културал суюқликни ачитқи биомассасидан ажратиб олиш учун муҳит сепаратордан (5) утказилинади. Сўнг муҳитдаги ферментни чўктириш учун културал муҳит ва изопропанол резервуарга (6) ўтказилади ва араштирилади. Кейинги босқичда аралашмадан сепаратор ёрдамида фермент ажратиб олинади ва дистилланган сувда эритилиб аффин хроматография (7) босқичида тозаланади. Элюция қилиб олинган фермент сўнг махсус қуриштиш ускунасида (8) қуриштилади.

4.1-расм. Инулиназа ферменти препаратини олиш технологияси



Изоҳ: 1- озика муҳит учун резервуар; 2- насос; 3- ротаметр; 4- ферментер; 5- сепаратор; 6- ферментни изопропанол ёрдамида чўктириш учун резервуар; 7- аффин хроматография учун колонка; 8- қуриштиш.

3-боб бўйича хулоса

1. Ачиткилар орасидан инулиназа гидролизлаш фаоллигига эга бўлган продуцентларини скрининг қилиш натижасида *Saccharomyces cerevisiae* WLP 007 энг юқори инулиназа гидролизлаш фаоллигини номоён қилди (8,53 Бирлик/мг).
2. *Saccharomyces* ачитки замбуруғи культурал суюқлигидан экзоиннулиназа ажратиб олинди ва изопропил спирти билан чўктириш ва аффин хроматография усулини қўллаш орқали 57 марта тозаланди ва тозаланган ферментни фаоллиги 490 Бирлик/мг ни ташкил қилди.
3. *Saccharomyces cerevisiae* ачитки замбуруғидан ажратиб олинган ферментнинг ҳарорат оптимуми 30⁰С, субстрат инулиннинг оптимал концентрацияси –1%, фермент оптимал концентрацияси –25мкг/мл ва ферментнинг барқарорлиги -15 мин.
4. Ачитқининг барқарорлиги паст бўлганлиги сабабли, уни озиқ-овқат саноатида қўллаш учун иммобиллаш мақсадга мувофиқ бўлади.

ХУЛОСА

Истиқболли ва экологик қулай, таркибида полисахарид-инулин бўлган фруктоза манбалари ўсимлик хом-ашёлари ҳисобланади. Инулин тутувчи манбалардан истиқболли субстратлар ва микроорганизмлар орасидан инулиназанинг фаол продуцентларини танлаш, инулиназа ҳосил бўлишининг босқичлари ва унинг хоссаларини ўрганиш, фруктоза шарбатлари ва турли озиқ-овқат маҳсулотлари олиш биотехнологиясини яратиш каби муаммолар долзарблиги сабабли мазкур иш бажарилган.

Инулиназа индуцибель фермент бўлганлиги сабабли у ҳосил бўлиши учун фруктоза, турли фруктоза тутувчи олиго- ва полисахаридлар (кестоза, нистоза, инулин) ёки уларни ўз таркибида тутган ўсимлик материаллари (жавдар, арпа, банан, саримсоқ пиёз, пиёз, буғдой, сачратқи, картошкагул, қоқи ўт, сарсабил илдизлари, топинамбур) ва қишлоқ-хўжалик чиқиндилари қўлланилиши мумкин (Cassava уни, маккажўхори пояси, сули уни, шоли сомони, шакарқамиш қолдиғи, буғдой кепаги).

Бактерия, замбуруғ ва ачитқиларнинг кўпчилиги эндо ва экзо инулиназалар ҳосил қилиши учун махсус шароитлар яратиш зарурлиги аниқланган. Бактерия ва замбуруғлар инулиназаларини уларни токсинлари билан ифлосланиш даражаси катталиги сабабли, уларни озиқ-овқат саноатида қўллаш таъқиқланган. Ачитқи замбуруғларга келса, уларни фақат эндоинулиназалари ажратиб олинган, экзоинулиназалари эса ажратиб олиниб, қисман тозаланган ва баъзи хусусиятлари ўрганилган. Турли манбалардан ажратиб олинган инулиназалар бир биридан молекуляр оғирлиги (50-250 кДа), фаоллиги (263 бирлик/мг), рН-оптимуми (3,5-7,5), температура оптимуми (40-60 °С), метал ионлари ва оксил табиатли ингибиторлари таъсири бўйича фарқланади.

Адабиётдаги маълумотларга кўра инулиназаларни меъёрий кўрсаткичлари турли бирликларда келтирилганлиги сабабли тўлиқ таҳлил қилиш қийинлиги, эндо-инулиназаларни ажратиб олиш технологияси

мураккаблиги сабабли, технологик жихатдан самарадор ва тан нархи арзон бўлган экзо-инулиназани ачитқи замбуруғлардан ажратиб олиш мақсадга мувофиқдир.

Ачитқилар орасидан инулиназа гидролизлаш фаоллигига эга бўлган продуцентларини скрининг қилиш натижасида *Saccharomyces cerevisiae* WLP 007 энг юқори инулиназа гидролизлаш фаоллигини номоён қилди (8,53 Бирлик/мг). *Saccharomyces* ачитқи замбуруғи культурал суюқлигидан экзоиннулиназа ажратиб олинди ва изопропил спирти билан чўктириш ва гелфильтрация усулини қўллаш орқали 57 марта тозаланди ва тозаланган ферментни фаоллиги 490 Бирлик/мг ни ташкил қилди.

Saccharomyces cerevisiae ачитқи замбуруғидан ажратиб олинган ферментнинг ҳарорат оптимуми 30⁰С, субстрат инулиннинг оптимал концентрацияси –1%, фермент оптимал концентрацияси –25мкг/мл ва ферментнинг барқарорлиги -15 мин. Ачитқининг барқарорлиги паст бўлганлиги сабабли, уни озиқ-овқат саноатида қўллаш учун иммобиллаш мақсадга мувофиқ бўлади.

Олинган натижалар функционал шарбатлар, биоэтанол ва озиқ-овқат маҳсулотлари сифатини оширишга қаратилган технологиялар яратишда ва мавжуд бўлган технологияларни такомиллаштиришда қўллаш мумкин.

Фойдаланилган адабиётлар рўйхати

Дарслик ва ўқув қўлланмалар:

1. Джаникулова У.Б. Биотехнология получения фруктозного сиропа из топинамбура: канд. био. наук. ... дис. автореф. – Ташкент: ТХТИ, 2008. – 25 с.
2. Ҳақимова Ш. И. Озиқ-овқат микробиологияси. – Тошкент: Тош КТИ, 2005. – 304б.
3. Практикум по микробиологии. Под ред. А.И. Нетрусова. М.:АСАДЕМА. 2005.

Илмий журналдаги мақолалар:

4. Bekers M., Grube M. Inulin syrup from dried Jerusalem artichoke // LU Raksti. 2008. –V.21. –№315. –P.116-121.
5. Bender J.P., Mazutti M.A., Oliveira D., Luccio M., Treichel H. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using solid state fermentation // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2006. –V.129-132. –P. 951-958.
6. Camelia Neagu (BONCIU)., Gabriela Bahrim. Inulinases - A versatile tool for Biotechnology // Innovative Romanian Food Biotechnology. 2011. –V. 9. –P.1-11.
7. Chi Z.M., Zhang T., Cao T.S., Liu X.Y., Cui W., Zhao C.H. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses // Bioresource Technology. 2011. -V.102. –P.4295-4303.
8. Danilcenko H. *et. al.* Quality of Jerusalem artichoke tubers in relation to storage conditions // Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 2008. –V.36. –№2. – P.23-27.
9. Ertan F., Aktac T., Kaboglu C., Ekinci F., Bakar E. Determination of optimum cultivation conditions on the production of inulinase from

- Rhizoctonia solani* // Pakistan Journal of Biological Sciences. 2003a. –V.6. – №16. –P.1386-1388.
- 10.Ertan F., Ekinçi F., Aktac T. Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride* // Pakistan Journal of Biological Sciences. 2003b. –V.6. –№ 15. –P.1332-1335.
- 11.Gao L., Chi Z., Sheng J., Wang L., Li J., Gong F. Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes // Microbial Ecology. 2007. –V.54. –P.722-729.
- 12.Ge X.Y., Zhang W.G. Effects of octadecanoylsucrose derivatives on the production of inulinase by *Aspergillus niger* SL-09 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. –V.21. –P.1633-1638.
- 13.Gern R.M.M., Furlan S.A., Ninow J.L., Jonas R. Screening for microorganisms that produce only endo-inulinase // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. –V.55. –P.632-635.
- 14.Golunski S., Astolfi V., Carniel N., Oliveira D., Luccio M., Mazutti M.A., Treichel H. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus* // Separation and Purification Technology. 2011. – V.78. –P.261-265.
- 15.Gill P.K., Manhas R.K., Singh P. Comparative analysis of thermostability of extracellular inulinase activity from *Aspergillus fumigates* with commercially available (Novozyme) inulinase // Bioresource Technology. 2006. –V.97, – P.355-358.
- 16.Gong F., Sheng J., Chi Z., Li J. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2007. –V.34. –P.179-185.
- 17.Gong F., Zhang T., Chi Z., Sheng J., Li J., Wang X. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase // Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2008. –V.13. –P.533-539.

18. Guerrero A.E.C., Olvera J.L., Garibay M.G., Ruiz L.G. Inulinase hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from aguamiel (*Agave* sap) and pulque // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006. –V.22. –P.115-117.
19. Guimaraes L.H.S., Terenzi H.F., Polizeli M.L., Jorge J.A. Production and characterization of a thermostable extracellular β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon sources // Enzyme and Microbial Technology. 2007. –V.42. –P.52-57.
20. Kalil S.J., Silveira S.T., Filho F.M., Rodrigues M.I. Evaluation of different parameters for the purification of inulinase using an ion exchange fixed bed // Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2010. –V.15. –P.676-679.
21. Kalil S.J., Suzan R., Maugeri F., Rodrigues M.I. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2001. –V.94. –P.257-264.
22. Kang S.I., Chang Y.J., Oh S.J., Kim S.I. Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. // Biotechnology Letters. 1998. –V.20. –№10. –P.983-986.
23. Kango N. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger* // Journal of Food Engineering. 2008. –V.85. –P.473-478.
24. Kim D.H., Choi Y.J., Song S.K., Yun J.W. Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp. // Biotechnology Letters. 1997. –V.19.–№4. –P.369-371.
25. Kim Y.H., Nam S.W., Chung B.H. Simultaneous saccharification of inulin and ethanol fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting inulinase, Biotechnol. Bioprocess. 1998. –V.3. –P.55-60.
26. Kumar G.P., Kunamneni A., Prabhakar T., Ellaiah P. Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. –V.21. –P.1359-1361.

27. Kushi R.T., Monti R., Contiero J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus* // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2000. –V.25. –P.63-69.
28. Danyo Maia Lima, Pedro Fernandes, Diego Sampaio Nascimento, Rita de Cassia L. Figueiredo Ribeiro and Sandra Aparecida de Assis. Fructose Syrup: A Biotechnology Asset // Food Technol. Biotechnol. 2011. –V.49. –№4. –P.424-434.
29. Lim S.H., Ryu J.M., Lee H., Jeon J.H., Sok D.E., Choi E.S. Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis // Bioresource Technology. 2011. –V.102. –P.2109-2111.
30. Liu X.Y., Chi Z., Liu G.L., Wang F., Madzak C., Chi Z.M. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surfaceengineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase // Metabolic Engineering. 2010. –V.12. –P.469-476.
31. Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. –V.193. –№1. –P.265-275.
32. Marcia Luciana Cazetta., Rubens Monti., Jonas Contiero. Effects of culture conditions on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus* // Brazilian archives of biology and technology. 2010. –V.53. –№3. –P.701-707.
33. Marcin Skowronek., Jan Fiedurek. Purification and properties of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* 20 OSM // Food Technol. Biotechnol. 2006. –V.44. –№1. –P.53–58.
34. Mazutti M., Ceni G., Luccio M., Treichel H. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations // Bioprocess Biosyst. Eng. 2007. –V.30. –P.297-304.

35. Mazutti M.A., Skrowonski A., Boni G., Zobot G.L., Silva M.F., Oliveira D., Luccio M., Filho F.M., Rodrigues M.I., Treichel H. Partial characterization of inulinases obtained by submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates: a comparative study // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. –V.160. –P.682-693.
36. Molina D.L., Martinez M.D.N., Melgarejo F.R., Hiner A.N.P., Chazarra S., Lopez J.N.R. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.) // *Phytochemistry.* 2005. –V.66. –P.1476-1484.
37. Mughal M.S., Ali S., Ashiq M., Talish A.S. Kinetics of an extracellular exo-inulinase production from a 5-fluorocytosine resistant mutant of *Geotrichum candidum* using twofactorial design // *Bioresource Technology.* 2009. –V.100. –P.3657-3662.
38. Nagem R.A.P., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya K.N., Neustroev K.N., Polikarpov I. Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition, *J.Mol.Biol.* 2004. –V.344. –P.471-480.
39. Pandey A., Soccol C.R., Selvakumar P., Soccol V.T., Krieger N., Fontana J.D. Recent developments in microbial inulinases // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 1999. –V.81. –P.35-52.
40. Rocha J.R., Catana R., Ferreira B.S., Cabral J.M.S., Fernandes P. Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis // *Food Chemistry.* 2006. –V.95. –P.77-82.
41. Santisteban B.O.Y.S., Converti A., Filho F.M. Effects of carbon and nitrogen sources and oxygenation on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009. –V.152. –P.249-261.
42. Santisteban B.O.Y.S., Filho F.M. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* // *Enzyme and Microbial Technology.* 2005. –V.36. –P.717-724.

- 43.Sarote Sirisansaneeyakul., Nisakorn Worawuthiyanan., Wirat Vanichsiratana., Penjit Srinophakun., Yusuf Chisti. Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii* // World J Microbiol Biotechnol. 2007. –V.23. –P.543-552.
- 44.Sean Matthew Desmond, Michael Harrold, Kevin Hennessy, Aldrich Lau. Products and methods for reducing dye artifacts // US Patent 012325, 2006.
- 45.Squarezi, C., Longo C., Ceni G., Boni G., Silva M.F., Luccio M., Mazutti M.A., Maugeri F., Rodrigues M.I., Treichel H. Inulinase production by agro-industrial residues: optimization of pretreatment of substrates and production medium, Food Bioprocess Technology. 2009. –V.2. –P.409-414.
- 46.Sharma A.D., Kainth S., Gill P.K. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. // Journal of Food Engineering. 2006. –V.77. –P.486-491.
- 47.Sheng J., Chi Z., Gong F., Li J. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase // Appl. Biochem. Biotechnol. 2008. –V.144. –P.111-121.
- 48.Singh P., Gill P.K. Production of inulinases: recent advances // Food Technol. Biotechnol. 2006. –V.44. –№2. –P.151-162.
- 49.Singh R.S., Bhermi H.K. Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root tubers of *Asparagus officinalis* // Bioresource Technology. 2008. –V.99. –P.7418-7423.
- 50.Singh R.S., Dhaliwal R., Puri M. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus* // Process Biochemistry. 2006. –V.41. –P.1703-1707.
- 51.Singh Ram.S., Singh Rupinder.S. Production of Fructooligosaccharides from inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential // Food Technol. Biotechnol. 2010. –V.48. –№4. –P.435-450.
- 52.Treichel H., Mazutti M.A., Filho F.M., Rodrigues M.I. Technical viability of the production, partial purification and characterization of inulinase using

- pre-treated agroindustrial residues // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2009. –V.32. – P.425-433.
53. Treichel H., Mazutti M.A., Mauger F., Rodrigues M.I. Use of a sequential strategy of experimental design to optimize the inulinase production in a batch bioreactor // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009. –V.36. –P.895-900.
54. Yu X., Guo N., Chi Z., Gong F., Sheng J., Chi Z. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis // *Biochemical Engineering Journal.* 2009. –V.43. –P.266-271.
55. Zherebtsov N.A., Shelamova S.A., Abramova I.N. Biosynthesis of inulinases by *Bacillus* bacteria // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2002. –V.38. –№6. –P.634-638.
56. А. Дарбре. Практическая химия белка // - М.: Мир. 1989. -623с.
57. Рутковская Т.Р., Шуваева Г.П., Корнеева О.С. Инулиназа дрожжей *Sacharomyces cerevisiae* ВГШ-2. Препаративное получение и некоторые физико-химические свойства // *Фундаментальные исследования.* 2010. –№ 10. –С.17-24.
58. Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Сапрыкина Н.И. Исследование условий применения ряда органических растворителей для очистки инулиназ из различных источников // *Успехи современного естествознания.* 2008. –№9. –С.1-5.
59. Шуваева Г.П., Рутковская Т.Р., Корнеева О.С. Исследование физико-химических свойств инулиназы *Sacharomyces cerevisiae* ВГШ-2 // *Вопросы современной науки и практики.* 2010. –№ 10-12 (31). –С.60-64.
60. Зокирова М.С., Ахмедова З.Р., Додаев Қ.О. Топинамбур туганагини қайта ишлаш ва консервалаш саноаида фойдаланиш йўналишлари. УзМУ хабарлари. 2012. –№4. –С.54-58.
61. Зокирова М.С., Ахмедова З.Р., Додаев Қ.О. Топинамбур инулинининг ферментатив конверсияси даражасининг сифат миқдорий кўрсаткичларини тадқиқ этиш. УзМУ хабарлари. 2012. –№4. –С.59-61.