

O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY VA O‘RTA MAXSUS TA’LIM
VAZIRLIGI

MIRZO ULUG‘BEK NOMIDAGI O‘ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI

TURDIYEV OTABEK DILMURODOVICH

**MITSELIAL ZAMBURUG‘LARNING XITINAZA FERMENTI
PRODUTSENTLARINI ANIQLASH VA O‘RGANISH**

5140100- biologiya ta’lim yo‘nalishi

BITIRUV MALAKAVIY ISHI

Ilmiy rahbar:
dots.v.b.G.M.Muhammadjonova
b.f.d.,prof. Z.R.Ahmedova

TOSHKENT-2015

MUNDARIJA

KIRISH	Bet 3
I BOB. ADABIYOTLAR SHARHI	5
1.1. Xitin va xitozan aminopolisaxaridlarining olish usullari va hom-ashyo manbai.	5
1.2. Xitinolitik fermentlar klassifikatsiyasi.....	9
1.3. Xitinolitik fermentlarini amaliy ahamiyatlari va ulardan o'simliklarni himoya qilishdagi o'rni.....	13
II BOB. MATERIAL VA METODLAR	18
2.1. Tadqiqot obyektlari va ularni o'stirish usullari.....	18
2.2. Xitinaza, xitozanaza va boshqa faolliklar.....	18
III BOB. OLINGAN NATIJALAR TAHLILI.....	21
3.1. <i>Fusarium Penicillium</i> va <i>Endofitlar</i> avlodlari zamburug'larini xitinaza va xitozanaza faolligi bo'yicha skriningi.....	21
3.2. Ajratib olingan xitinaza va xitozanazaning eng faol produsentlariga ozuqa muhitning pH ko'rsatkichi hamda oqsil miqdrini aniqlash.....	24
3.3. Ajratib olingan zamburug'larda xitinaza va xitozanaza faolliklarining dinamikasini o'rganish.....	30
XULOSA	32
FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR RO'YXATI	33

KIRISH

Mavzuning dolzarbligi: Hozirgi davrda o'simliklarning o'sish va rivojlanishini tezlashtirish, fiziologik holatini ijobiy tomonga o'zgartiruvchi biologik faol moddalar (kimyoviy, mikroblar va o'simliklardan tayyorlangan) dunyo bo'yicha 5 mingdan ortiq turlari aniqlangan bo'lib, shulardan 100 ga yaqinidan keng miqyosda foydalanilmoqda. Jahon bozorida bu moddalarning tabiatga zararli kimyoviy vositalar qo'llashni kamaytirishdagi muhim ahamiyati o'rganilib, kundan kunga bu biologik faol moddalarni keng miqyosda qo'llashda yangi yo'nalishlar belgilanayotganligini namoyon etmoqda.

Biologik faol moddalar hozirda ishlab chiqarilayotgan va ishlatilayotgan kimyoviy moddalarning o'ndan bir qismiga to'g'ri kelgan holda ishlab chiqarish sur'ati va foydalanishi bo'yicha tabiatni muhofaza etishdagi ahamiyati jihatidan etakchi o'rinlarga ko'tarilayotganligi kuzatilmoqda.

Xitinaza fermenti hosil qiluvchi zamburug'lar qishloq xo'jaligida juda katta ahamiyatga egadir. Xozirda respublikamizda keng tarqalgan zararkunandalar, jumladan tut parvonasi, termitlar, paxta ko'sak qurti, koloroda qo'ng'zi kabi hasharotlarga qarshi kurashda ushbu fermentlarni o'rganish o'ta zarur va dolzarb vazifalardan biridir.

Tadqiqot ishining maqsadi: *Endofitlar*, *Fusarium* va *Penicillium* avlodiga mansub zamburug'lar orasidan eng faolini tanlash va xitinaza fermenti hosil bo'lish jarayonlarini o'rganish.

Tadqiqot ishining vazifalari: 1. Miselial zamburug'lar *Endofitlar*, *Fusarium* va *Penicillium* avlodlariga mansub shtammlaridan skrining orqali eng faollarini tanlash.

2. Tanlab olingan eng faol produtsentlarni ferment hosil qilish uchun optimal sharoitlarni tanlash.

3. Oqsil miqdori, pH, xitinaza va xitozanaza faolliklarni aniqlash va tahlil qilish.

Bitiruv malakaviy ishining strukturasi: Bitiruv malakaviy ishi kirish, adabiyotlar sharhi, materiallar va ish uslublari, tadqiqot natijalari va ularning muhokamasi, xulosalar va foydalanilgan adabiyotlar ro'yhatidan iborat bo'lib, jami 36 sahifani tashkil etadi. Ishni yoritish uchun 14 ta rasm va 1 jadvaldan foydalanilgan. Foydalanilgan adabiyotlar 25 ta.

I BOB. ADABIYOTLAR SHARHI

1.1.Xitin va xitozan aminopolisaxaridlarining olish usullari va homashyo manbai. Xitin tabiatda keng tarqalgan biopolimerlardan biri bo'lib, zahirasi bo'yicha faqat sellulozadan keyingi o'rinda turadi. Xitin 1811 - yilda zamburug'lar tarkibini o'rganish bo'yicha tadqiqot qilish vaqtida aniqlandi va fungin nomi bilan ataldi. 1823 yili nemis olimi A.Oder hashorotlar ustki qanotidan analogik biopolimerni ajratib oldi va uni xitin deb atadi va faqat 1931 yilga kelib bu ikki bog'lanish o'xshash deb topildi. Xitin tabiiy biopolimer hisoblanadi va uning biosintezi, modifikatsiya va degradatsiyasi fermentativ o'zgarishlar bilan bog'liq. Ularni o'rganish – muhim ilmiy yo'nalish bo'lib, buni tasdiqi har yili Yevropa va Rossiyada o'tkaziladigan xitin jamiyatining konferensiya va simpoziumlari misol qilib ko'rsatish mumkin. Xitin modifikatsiyasi bilan bog'liq ilk tekshiruvlar akademik Pavl Shorigin boshligida Rossiyada o'tkazildi. 1930 - 1970 yillar mobaynida Qora dengizda sovet olimlari tomonidan bir necha tadqiqot ishlari o'tkazildi. Birinchi marotaba xitindan olingan preparatlar (radioprotektorlar – nurlanishdan himoya qiluvchi dori vositalari) 1960 yildayoq tayyorlangan edi. Bugun xitin va uning unumlaridan foydalanish sferasi chegara bilmaydi, ular suvni tozalovchi suyuq kristall va folikulyant, hamda sorbent va konservant sifatida, qog'oz ishlab chiqarish va o'simliklarni zararkunandalardan himoya qilish maqsadida qishloq xo'jaligida ishlatiladi. Ayniqsa, bu tabiiy biopolimerdan tibbiyot va farmakologiyada foydalanish keng avj oldi. Hozirda immunitet korreksiyasida qatnashuvchi xitin va uning unumlarining immunokompetent hujayralar tomonidan sitokinlar sintezini faollashtiruvchi xususiyatlari faol o'rganilmoqda. Xitin va xitozan pastmolekulyar unumlari immunomodellovchi va o'smaga qarshi xususiyatlari aniqlangan. Xitinaza orqali olingan xitin oligosaxaridlari hozirda biologik faol ozuqaviy qo'shimcha sifatida ishlatilmoqda. Ular bundan tashqari ichak mikroflorasini tiklash va organizmda toksinlar bilan bog'lanib, chiqazib yuborish xususiyatiga ham ega. Xitinolitik fermentlar turli

bosqichdagi polimerizatsiyaga ega oligosaxaridlarni olish uchun qulay uskuna hisoblanadi (Unverzagt C, Kunz H., 1990).

Dengiz mikroorganizmlari noodatiy xususiyatlarga ega fermentlar manbai hisoblanadi, ulardan biotexnologiyada yangi biologik faol neoglikokonyugatlar olishda foydalaniladi.

Xitin – tabiatda keng tarqalgan, N-atsitil-D-glukozamin qoldiqlari (70-90%) va D-glukozamin (10-30%) β (1→4) glikozid bog‘lari bilan bog‘langan dan tashkil topgan, chiziqli kation geteropolisaxarid. Xitin va uning deatsitillangan shakli – xitozandan (β -(1,4)-2-amino-2-dezoksi-D-glikopolisaxarid) oziq –ovqat, kosmetika, ishlab chiqarish sanoatida, tibbiyot va qishloq ho‘jaligida foydalanilmoqda (Collinge S., Kragh K., 1993).

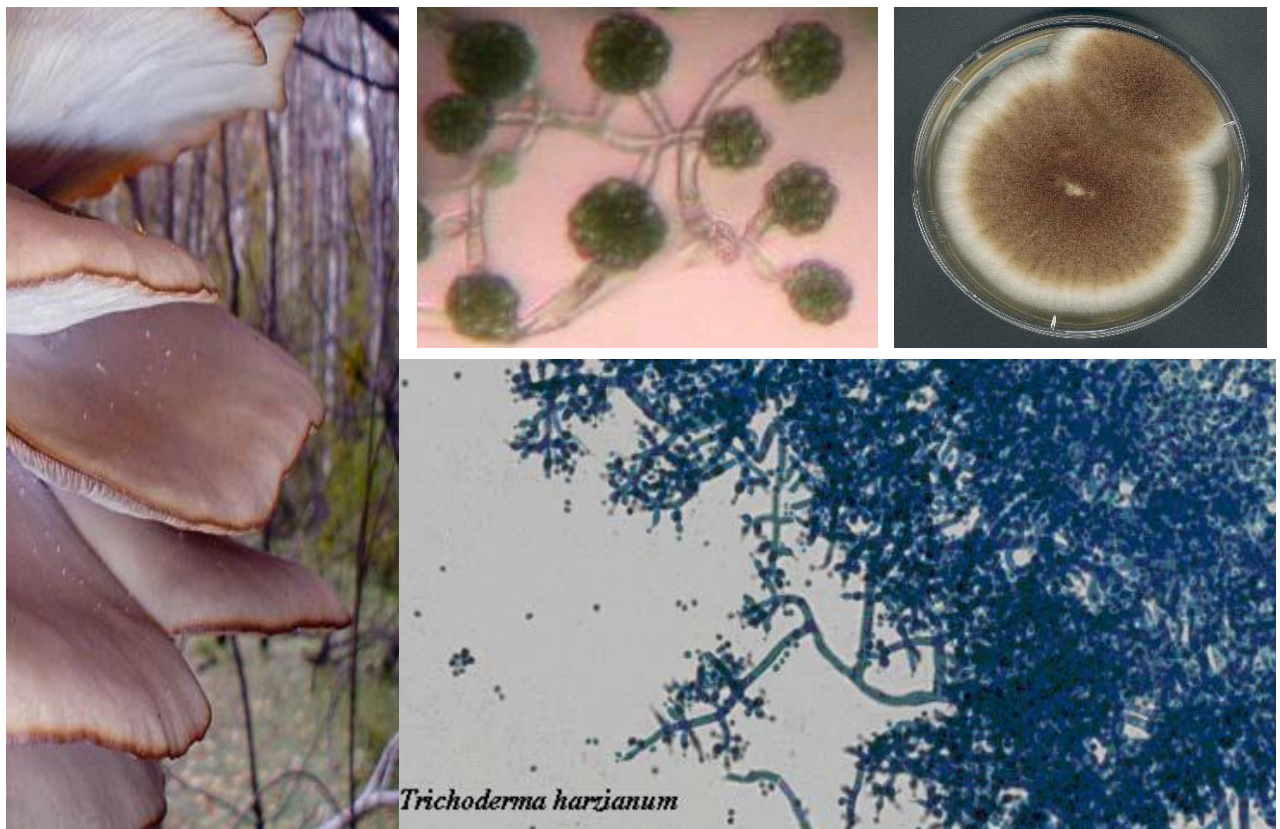
Xitinning degradatsiyasi xitinolitik kompleks fermentlari tomonidan amalga oshiriladi, bu fermentlarga xitinaza (KF 3.2.1.14), N-atsitil- β -glukozaminidaza (KF 3.2.1.52) va xitozanaza (KF 3.2.1.132) kiradi. Bu fermentlar ikki yoki undan ortiq uglevod qoldiqlari orasidagi glikozidli bog‘larni uzuvchi O-glikozid gidrolaza fermentlari guruhiga kiradi. Glikozilgidrolazalarning klassifikatsiyasiga ko‘ra xitinolitik fermentlar 18,19 va 20- oilalariga kiradi (Bielka H., 1984).

XITIN VA XITIZANNING TABIIY MANBALARI



1 - rasm. Qisqichbaqasimonlar

Mitselial zamburug‘lar ustida tadqiqot olib borgan olimlarning fikriga ko‘ra xitinolitik fermentlarning sintezlanishiga xitin moddasi induktor sifatida ta‘sir etadi. Xitinli muhitda *Paecilomyces lilacinus* F-2ning xitinolitik ferment sintezlanishi aniqlangan bo‘lib, bu jarayonda muhitda 0,5% xitinning bo‘lishi jarayonning optimal borishiga olib keladi. Zamburug‘ o‘stirilgan muhitda 0,5% xitozan moddasining bo‘lishi xitizanazalarning jadal sinteziga olib keladi. *Paecilomyces lilacinus*da xitinaza va xitozanazalarning miqdori xitinli muhitda mos ravishda 0,496 birlik/ml va 0,344 birlik/ml ni tashkil qilgan. Xitozanaza tutgan muhitda esa ularning miqdori 0,230 birlik/ml va 0,479 birlik/ml ni tashkil etgan (Ильбаков А.А., 2004).

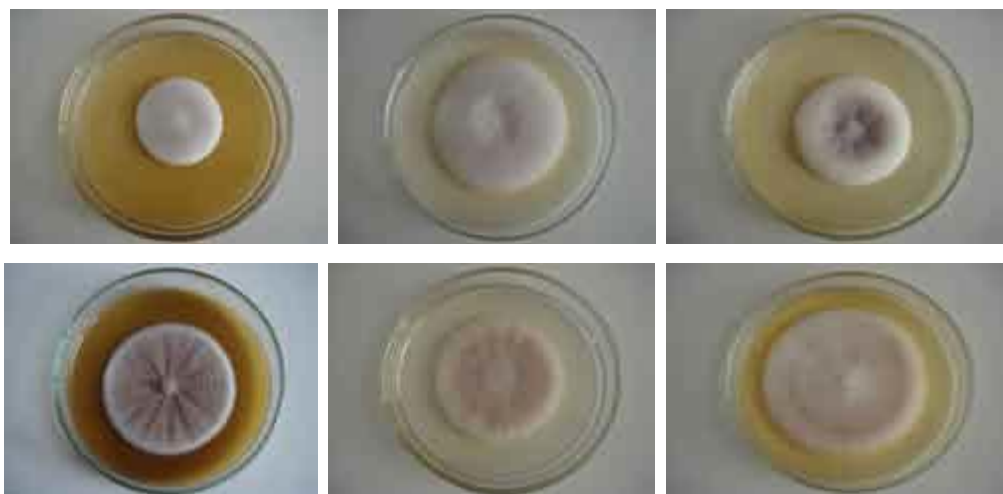


2 - rasm. Zamburug‘lar

Xitinolitik fermentlar xitin tutuvchi chiqindilarning konversiyasida ya‘ni yuqori biologik faollikka ega bo‘lgan xitooligosaxaridlarning olinishida ishlatiladi. Xitinolitik fermentlar turli taksonomik birliklarga mansub bo‘lgan mikroorganizmlardan sintezlanadi. Xitinolitik fermentlarning istiqbolli prodeutsentlariga hujayra tashqi xitinazalar ishlab chiqaruvchi metselial

zamburug‘lar kiradi. Bunday zamburug‘lar tomonidan sintezlangan xitinolitik fermentlar ko‘p xildagi molekulyar tuzilishli, turli fizik-kimyoviy va katalitik xususiyatga ega bo‘ladi. 15 avlodga mansub 113 turdagi mitselial zamburug‘ shtamlari o‘rganilganda, *Paecilomyces marquandii* va *Paecilomyces lilacinus* F-2 shtamlari qolgan shtamlarga nisbatan ko‘p miqdorda xitinolitik fermentlar ishlab chiqarishi bilan ajralib turgan.

Paecilomyces marquandii va *Paecilomyces lilacinus* F-2 shtammlarini yorug‘lik mikroskopida (600 marta kattalashtirilgan holatda) o‘rganilganda ularning mitseliy tuzilishi o‘zaro o‘xshash ekanligi aniqlangan. Zamburug‘ sporalari oval yoki ellipssimon tuzilishli (Ильбаков А.А., 2004).



3- rasm *P. marquandii* (A) va *P. lilacinus* F-2 (B) susla agar (1), Chapek (2), Raystrika (3) muhitidagi kaloniyalari

Bacillus polymyxa, *Bacillus subtilis* va *Bacillus spp* fitopatogen zamburug‘larni hujayra devorini lizis qiluvchi gidrolitik fermentlar sintez qilish xususiyatiga ega ekanliklarini va bu fermentlarni hujayradan tashqariga chiqarishlarini ko‘rsatilgan. *Bacillus polymyxa* bakteriyasining maxsus shtammi *Rhizoctonia solani* zamburug‘ini hujayra qobig‘ida ko‘p miqdorda uchraydigan xitin va ksilanlarni parchalovchi ekzoxitinaza va atsetil-glyukoaminaza fermentlarini sintez qilishi aniqlangan. *Bacillus spp* ham bu zamburug‘ni o‘rishini to‘xtatib qo‘ysada, *Bacillus polymyxadan* farqli o‘laroq bu shtamm endoxitinaza fermenti sintez qilishi kuzatilgan. *Bacillus pumilus* va *Bacillus srr*

bakteriyalarining boshqa shtammlari sellyulaza va gemisellyulaza (ksilanaza va mannaza) fermentlarini sintez qilishlari va bu fermentlar *Aphanomyces cochleoides* va *Pythium ultimum* zamburugʻlarini hujayra devorini parchalovchi sellyulaza, galaktomannaza fermentlari hamda mannoproteinlar sintez qilishlari aniqlangan (Журавлева, Н.В. 2004).

Toshbaqaning yoysimon kosasi oʻzida xitin bilan birga mineral moddalar (asosan kalsiy fosfat va kalsiy karbonat) ni, shunigsek, oqsillarni, melanitsa va boshqa pigmentlarni tutgan boʻladi. Toshbaqa kosasining oqsillari turli xitinolitik fermentlar ishlab chiqaruvchi produtsentlarning ferment sintezi darjasiga koʻp tomonlama taʼsir qilishi maʼlum. Masalan, *Serratia marcescens* bakteriyasi tomonidan xitinazaning biosintezlanishini oʻrganish uchun deproteinlangan yuqori sifat koʻrsatkichiga ega xitin ishlatiladi (Flatch J. 1992).

Fitopatogen zamburugʻlarni hayotini toʻxtatishni asosiy mexanizmi, antagonist kulturalar gidrolitik fermentlar, antibiotiklar, toksinlar va sideroforlar sintez qilishlari bilan bogʻliq. Sitrusli oʻsimliklarni endofiti – *Bacillus pomillus* bakteriyasidan endoglyukanaza fermentini sintezi uchun javobgar boʻlgan ege A genini ajratib olishga erishgan. Bu genning mahsuloti in vitro sharoitida sellyulozani gidroliz qilgan. Bu ferment pH 5,0-8,6 gacha va harorat 25-600 oraligʻida boʻlganda, oʻzini faolligini 85% gacha saqlagan (Hirano S. 1996)

Gidrolitik fermentlar sintez qiluvchi mikroorganizmlarning antagonistik xususiyati, fermentlarni toʻgʻridan-toʻgʻri taʼsiri yoki ularni boshqa, ikkilamchi metabolitlar, masalan, antibiotiklar bilan hamkorlikda namoyon boʻladigan taʼsiri bilan bogʻliq.

1.2. Xitinolitik fermentlar klassifikatsiyasi. Fermentlarning fizik-ximiyaviy xususiyatlari ularning oqsil tabiatiga bogʻliq. Shu sababli yuqori temperatura va muhit oʻzgarishlari oqsillarni denaturasiyaga uchratgani singari, fermentlarning ham aktivligini yoʻqotadi. Fermentlarni toza holatda ajratib olish ancha murakkab. Hozirgi vaqtda mikroorganizmlardan 80, oʻsimlik va hayvon toʻqimalaridan 150

dan ortiq fermentlar toza kristall holda ajratib olingan. Fermentlar turli biologik suyuqliklar, qon, sut, ovqat hazm qilish shiralarining hujayra protoplazmasi, uning struktura elementlari tarkibida adsorбилangan holatda bo'ladi. Fermentlarni ajratib olish uchun hujayra qobig'ini buzish, to'qimani gomogenizatsiya qilish, turli tuz eritmalari va organik erituvchilar yordamida ekstraksiya qilish kerak. Fermentlarni ajratib olish ishlari $^{\circ}\text{C}$ atrofida (sovuq xonalarda), agar organik erituvchilar ishlatilsa, 0 dan past ($1 - 2 - 5^{\circ}\text{C}$ da) temperaturalarda olib borilishi kerak. Aks holda ferment aktivligini yo'qotib qo'yadi.

Hozirgi vaqtda mingdan ortiq fermentlar ma'lum bo'lib ular nomlanganda substratlarning oxiriga -aza suffiksi qushiladi (Dyuklo taklifi buyicha, 1883). Masalan, arginaza argininning gidrolizini katalizlaydi, saxaraza - saxarozaning, fosfataza - fosfo- efir bog'larni va boshqalar.

Boshqa usulda - katalizlanuvchi reaksiya nomiga -aza suffiksi qo'shiladi. Masalan: degidrogenaza vodorodning ajralib chiqish reaksiyasini, gidrolaza - gidroliz reaksiyasini, transferaza kimyoviy guruhlarini o'tkazish reaksiyalarini katalizlaydi. Yuqorida keltirilganlarga qaramasdan ba'zi fermentlar o'zlarining trivial nomlarini saqlab qolganlar: tripsin, pepsin, katalaza, ularning nomi katalizlanuvchi reaksiya turiga, shuningdek substratning nomiga tug'ri kelmaydi. 1961-yilda V xalqaro biokimyogarlar kongressida fermentlarning tasnifi va nomenklaturasini qabul qilingan va uning asosiga quyidagi tomayillar quyilgan:

fermentning nomi o'z ichiga olishi kerak:

- substrat nomini
- koferment nomini
- katalizlanuvchi reaksiya turini

Masalan, ushbu nomenklatura bo'yicha LDG quyidagicha nomlanadi: L-laktat-NAD-oksidoreduktaza. Bu nomda birdaniga 3 xususiyat o'z aksini topgan:

substrat laktat (sut kislota);

koferment NAD;

reaksiya turi - substrat va vodorod akseptori (NAD) o'rtasida oksidlanish va qaytarilish reaksiyasi. Xar bir fermentga barcha fermentlar ruyxatida alohida nomer (shifr) berilgan. Masalan, laktatdegidrogenaza 1.1.1.27 shifriga ega. Birinchi raqam sinfning nomerini, ikkinchi - sinfchaning, uchinchi - kenja sinfning, turtinchi - kursatilgan guruhda egallagan o'rnini ko'rsatadi.

Umumqabul qilingan "Fermentlar nomenklaturasiga" binoan xitinolitik fermentlarning ikki turi mavjud: endoxitinaza (KF 3.2.1.14) va N-atsitil- β -glukozaminidaza (KF 3,2,1,30). Birinchisi polimerlar zanjirining tasodofiy joylaridan parchalaydi, ikkinchisi N-atsitilglukozamin qoldiqlari oxiri xitobiozni yoki yanayam yuqoriroq anologi tiklanmaydigan oxirini gidrolizlaydi. "Xitinaza" termini endotip faolikka ega fermentlarga nisbatan ishlatadi. Adabiyotlarda yana xitobiozga hujum qiluvchi xitobiaza nomi ham uchraydi (ko'p holatlarda N-atsitilglukozaminidaza sinonimi sifatida keladi) (Bielka H., 1984).

Xitinolitik fermentlar xalq ho'jaligining turli jabhalarida keng qo'llaniladi. Ular xitinsaqlovchi chiqindilarni konservalash, hamda yuqori biologik faolikka ega xitin va xitozan oligosaxaridlarini ajratib olishda ishlatiladi. Xitin oligosaxaridlari immunostimulovchi, o'smaga qarshi, antimikrob va yallig'lanishga qarshi faolikka ega ekanligi haqida ma'lumotlar mavjud (Fukamizo T., 1985).

Xitinolitik fermentlar turli organizmlar tomonidan ishlab chiqariladi, shular jumlasiga mikroorganizmlar (viruslar, aktinomitsinlar, bakteriya va zamburug'lar), o'simlik va hayvonlar (umurtqasizlar, bo'g'imoyoqlilar).

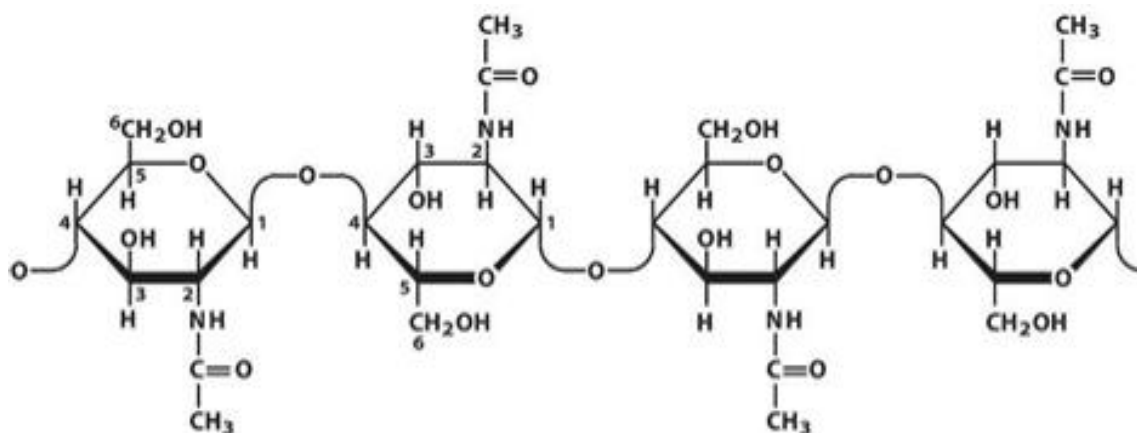
Xitinaza mahsulotalari asosida o'simliklarni fitopatogen zamburug' va hashorotlardan himoya qiluvchi biopreparatlar hosil qilinadi.

Bundan tashqari, xitinolitik fermentlar biotexnologiyaning nazariy hamda amaliy vazifalarini hal etishda ham qo'llaniladi. Masalan, biokimyoviy, genetik va molekulyar-biologik tadqiqotlarda achitqi va mitselial zamburug' hujayralarini fermentativ protoplastlanishida ishlatiladi. Shuningdek, xitinolitik fermentlarning rak hujayralari lizisini indutsirash xususiyati ma'lum bo'ldi. Bu esa o'z navbatida bu fermentlardan rak kasalligiga qarshi preperat ishlab chiqish mumkinligini bildiradi

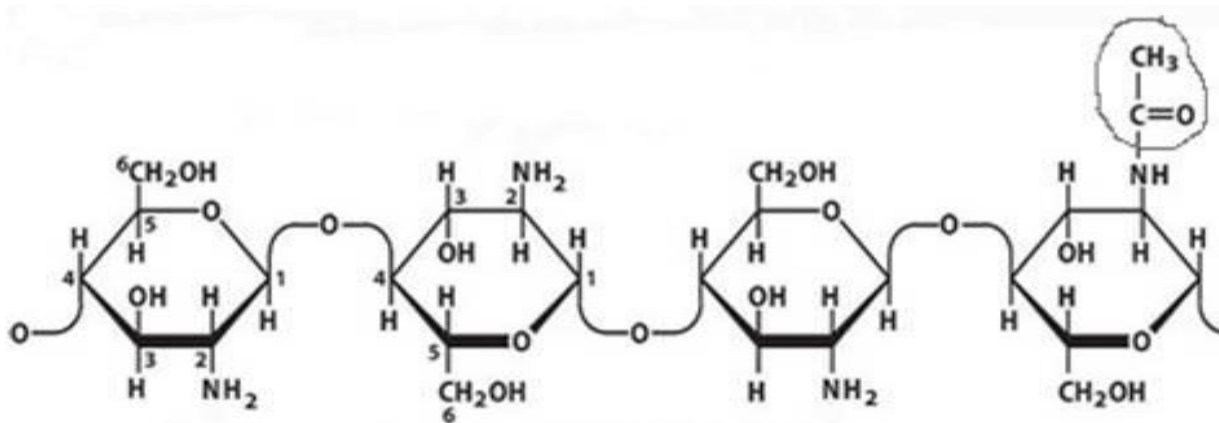
Xitinazalarni zamburug' hujayra qobig'idagi va boshqa ob'yektlardagi xitin moddasining miqdoriy va sifat analizida biokimyoviy reagent sifatida qo'llash mumkin. Xitinolitik fermentlar tirik organizmlarda anchayin keng tarqalgan. Kelib chiqishiga bog'liq holda bu fermentlar turli biologik fuksiyaga, har xil struktura tuzilishiga va qator biokimyoviy xossalarga ega bo'ladi. Mikroorganizmlarning xitinazalari bugungi kunga kelib anchayin yuqori darajada o'rganilgan. Xitinazalarni utilizatsiyalashga bir qator bakteriyalar (*Streptomyces*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Cytophaga*) va mikroskopik zamburug'lar (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* va boshqalar) qodir (Davies G., 1995).

Aktinomitset zamburug'larda olib borilgan skrining ishlariga binoan ushbu zamburug'lar orasidan xitinolitik fermentlarning produtsenti hisoblangan *Streptomyces griseus*ning *streptomycini* varianti ma'qul deb topildi. Bu bakteriyadan ajratib olingan xitinaza fermentlari kompleksi xitinni kristall hamda kolloid shaklini ham gidrolizlash xususiyatiga ega (Collinge S., Kragh K. 1993).

Trichoderma harzianum, tomonidan ishlab chiqariladigan noodatiy xitinaza KF 3.2.1.14 va KF 3.2.1.30 fermentlaridan farq qiladi. Xitinolitik kompleksga xitozanaza fermenti ham kiradi, glukozamin qoldiqlari orasidagi bog'larini gidrolizlaydi va N-atsitilglukozamina hosil bo'ladi (Henrissat B., 1993).



Xitin molekulası tuzilishi



Xitozan molekulasi tuzilishi

Quyida keltirilgan formulalarda xitin va xitozanning molekulyar tuzilishlaridagi farqlanish jihatlari keltirilgan.

1.3. Xitinolitik fermentlarini amaliy ahamiyatlari va ulardan oʻsimliklarni himoya qilishdagi oʻrni. Har yili butun dunyo boʻyicha bakterial, zamburugʻ yoki virus tabiatli patogenlar tomonidan ketirib chiqaradigan qishloq xoʻjaligi oʻsimliklarning turli kasalliklari natijasida hosillarining nobud boʻlishi 540 mln t ga yetadi. Vaholanki, oʻsimliklarni anʼanaviy kimyoviy himoya qilish usuli koʻp hollarda samarasiz boʻlishi mumkin, oxirgi 25 yil ichida oʻsimliklarni mikrobiologik yoʻl orqali himoya qilish usuli – xitinolitik ferment ajratib chiqaruvchi *Bacillus thuringiensis* asosida olingan preparatlardan foydalanish keng tarqaldi. Xitinaza genini oʻsimlik hujayrasiga oʻta olishi ularni oʻz insektisidini tashuvchisi boʻlishiga olib keldi va bu sohada bilinarli yutuqlarga erishildi. Dunyo bozorlarida sotish uchun moʻljallangan yangi “insektisid” maʼdaniy oʻsimliklar navlari paydo boʻldi. Bu kabi ishlar boshqa istiqbolda manfaatli loyihalarning ochilishiga olib keldi, masalan odam va hayvonlarga havf soluvchi chivin, soʻna va boshqa hashorotlarni yoʻq qiluvchi oʻsimliklarni yetishtirish. Bunga bezgak tashuvchi chivin lichinkalarini yoʻq qiluvchi toksin ajratadigan transgen suvoʻtlari misol boʻla oladi (Lorito M., 1996).

Oʻsimliklarga xitin qobigʻini buzuvchi xitinaza fermenti genini koʻchirib oʻtkazish, ularni zamburugʻli kasalliklarga qarshi deyarli chidamli boʻlishiga olib

keladi va natijada o'simlik hujayralari virusli, bakterial va zamburug'li infeksiyalar ta'siriga javoban turli vazifalarni bajaruvchi ko'plab molekulalarni ishlab chiqaradi. Zararlangan o'simlik sharoitida patogen tomonidan ishlab chiqariladigan oqsillar PR-oqsillar (pathogenesis- related protienis) deb ataladi, ular orasida antifugal ta'sirga ega xitinaza va xitozanaza ham mavjud. Tajribida ko'rsatilishicha arpa koleoptil hujayralariga xitinaza fermentini in vitro mikroinyeksiya qilish gaustori zamburug'i *Erysiphe graminis* hujayra devorining gidrolizini faolashtiradi va shu yo'l orqali patogenning o'sishini to'xtatadi. Doktor Toyoda o'z hodimlari bilan *Fusarium oxysporum* hujayra devoridagi polimerlar kimyoviy tarkibi borasida tadqiqot o'tkazdi. Qattiq fazali 13 C-ЯМР spektroskopiya yordamida zamburug', xitin va ma'lum darajadagi N-atsitil xitozanlarning hujayra devoridagi komponentlarining ta'sir doiralari o'rganildi.

Fusarium oxysporum hujayra devorida atsitillanganlik darajasi 25-30 % oralig'ida bo'lgan xitozan borligi ehtimoli mavjud. Bunday natija infraqizil spektroskopiya orqali hujayra devorlarining fraksiyalaridan olindi. Hujayra devorlarining tarkibi borasidagi keyingi ma'lumotlar xitinazlar va xitozanazlar yordamida olingan edi. *Striptomyces griseus*ning xitinazi 25-35% li N-atsitillangan xitozanini gidrolizlaydi, natijada tarkibida glukozamin va N-atsitilglukozaminlarni tutuvchi bir nechta geterooligosaxaridlarni hosil qildi. Shunga qaramasdan *Fusarium oxysporum* hujayra devorlarini ushbu ferment bilan gidroliz qilinganda geterooligosaxaridlar olinmaydi. Zamburug' hujayra devorlarida N-atsitillangan uglevod qoldiqlari to'p-to'p bo'lib joylashgan bo'lsa, ayni damda sintetik qisman N-atsitillangan xitozanlarda ular bir tekis taqsimlangan bo'lib chiqdi (А.В.Ильина, В.П.Варламов, 2002).

Zamburug' hujayra devorini *Bacillus pumilus* xitozanazasi bilan gidroliz qilish uchun asosiy mahsulot glukozamin, N-atsetilglukozamin va bir qancha geterooligosaxaridlar bo'lib, ularning qayta tiklanuvchi dumi tarkibida N-atsetilglukozamin bor. Ushbu natijalar yordamida *Fusarium oxysporum* hujayra devori xitinsaqlovchi komponentlarining kimyoviy tarkibi aniqlandi, hamda uni

yanada samaraliroq girdolizlash strategiyasi ishlab chiqilgan edi. Ma'lum bo'ldiki, xitozanaza *Fusarium oxysporum* hujayra devorini samarali degradatsiyalash uchun xitinazaga qaraganda muhim ekan, lekin zamburug' hujayra devorini to'liq degradatsiyalash uchun xitinaza ham kerak bo'lar ekan. Yaponiyaning Kinki universitetida doktor Toyoda va uning hamkasblari bakterial xitinazlar va xitozanazlar genlarini o'zaro bog'lash ustida olib borayotgan tajribalaridan maqsad xitinazli va xitozanazli faolikka ega bo'lgan gibrid oqsil olishdir. Bunday oqsil zamburug' hujayra devorini gidroliz qilish uchun ko'proq samaraliroq bo'lardi. Bunday oqsil genini o'simlik tanasiga joylashtirish orqali yangi, zamburug' kasalliklariga qarshi kuchli himoyaga ega bo'lgan transgen o'simliklar yaratish imkonini beradi. So'ngi bir necha o'n yillik mobaynida kimyoviy sintetik insektisidlar zararkunanda hashorotlar miqdorini tartibga solib turishning kuchli vositasi edi. Ammo bu insektisidlarni qo'layverish ekotizimning buzilishi va iste'mol zanjirining turli darajada ifloslanishi kabi jiddiy muammolarni keltirib chiqardi, shuning uchun zararkunanda hashorotlarga qarshi kurashning havfsizroq strategiyasini ishlab chiqish zarur edi (Toyoda H., 1991).

Zararkunanda hashorotlarni yo'q qilish jarayonida endoxitinaza va ekzo-N-atsitil glukozaminidazalar birga ishlatilmoqda. Qirish jarayonida xitinaza bilan gidrolizlash usuli chegaralovchi omil bo'lmoqda. Xitinaza biosintezi o'sish garmoni yordamida tartibga solinmoqda. Ushbu ferment hashorotning rivojlanishi uchun unga noqulay vaqtda sintezlansa, zaharli ta'sir ko'rsatishi ehtimoli mavjud. Qattiq fazali ^{13}C -ЯMP spektroskopiyasi yordamida *Manduca sexta* qurtining terisi hamda undan ajratib olingan xitinning zararlanmaganligi o'rganilgan edi. Hashorot qobig'ining spektrlari o'rganilayotgan xitin spektrlariga o'xshashligi *Manduca sexta* qobi'gining ayni N-atsitillangan xitinga to'liq mos kelishini ko'rsatadi. Bu zamburug' hujayra devoridagi xitin komponentlaridan farq qiladi. Bu qobiq ichidagi xitinda xitozan to'dalari deyarli mavjud emas. Bu o'z tasdig'ini hashorotlar qobig'ini xitinaza bilan to'liq gidrolizlash faktida topdi. Erishilgan

barcha natijalar shuni ko'rsatadiki, zararkunanda hashorotlarga qarshi foydalanish usuli ko'proq samara beruvchi usuldir (Zhuravleva N., 2001).

Mitseliyal zamburug'lar hujayra devorining asosiy bog'lari polisaxaridlar hisoblanadi va vazifalariga ko'ra bu biopolimerlar 2 guruhga bo'linadi. Bular – struktura komponentlari (1) va ular orasidagi bo'shliqni to'ldiruvchi komponentlar.

Birinchi guruh polisaxaridlari β -(1→3), β -(1→4) va β (1→6) bog'lariga ega poliaminosaxaridlar (xitin, xitozan) va glukanlar tashkil etadi. 1 guruh polisaxaridlari morfogenez jarayonlarini nazorat qiladi va osmotik bosim, mitseliyning gidrofobligi va xatto lipid qavatining vazifalarini regulatsiyasida ham qatnashadi (Yuen C.T., 1994).

Zamburug' hujayra devori struktura polisaxaridlarini o'rganish ularni tibbiyotda yuqori samaradorli jarohlarni tuzatuvchi va antirak(o'smaga qarshi) faollikka ega preparat sifatida qo'llash mumkinligiga olib keldi. Yuqori zamburug'larda, shu jumladan askomitsetlarda ham poliaminosaxaridlar xitin β -(1→3)-glukan bilan kovalent bog'lar orqali bog'lanib, kislotalar va ishqorda erimaydigan kompleks hosil qiladi. Bu kompleks zamburug'lar hujayrasida asosiy tayanch vazifasini bajaradi, uning morfologiyasini aniqlab beradi. Xitin-glukan kompleksini hosil bo'lish sharoitlarini o'rganish muhim ahamiyat ega, boisi xitin-glukon kompleksidan faol sorbent, flokulyant va immobilizatsiyalangan fermentlarni tashuvchi sifatida foydalaniladi. Shuning uchun ushbu ishlarni o'tkazishdan maqsad o'stirish muhitini, ma'daniylashtirish sharoitlari xitin-glukan kompleksining hosil bo'lishi va tarkibiga ta'sirini o'rganish iborat.

Yog'ochni parchalovchi, yog'och sifatini buzuvchi hamda mog'or zamburug'larining salbiy ta'siridan saqlash dolzarb masalaligicha qolmoqda. Yuqoridagi zamburug'larga qarshi kurashda kimyoviy usul yetakchilik qilmoqda. Biotsitlarning ta'sir samaradorligiga baho berish sezilarli darajada qiyin, chunki zamburug'ga qarshi qo'llangan vositaning zamburug'larni nobud qilishi nafaqat vositaning fungitsid faolligiga balki uning yog'ochlik qismiga singib ketishiga va u yerda saqlanib turishiga ham bog'liq. Odatda tadqiqot jarayonida yog'ochlikning

aniq degradatsiyalanishi hisobgan olinadi. Holbuki, tabiiy sharoitda chrish jarayoni bosqichma-bosqich borib, yog‘ochlik mustahkamligining yo‘qolishi uzoq muddatda ro‘y beradi. Yog‘ochlik biozararlanishning birinchi bosqichida yog‘och mahsulotlarning yoki qurilish konstruksiyasining ustki tomoni zamburug‘ mitseliysi bilan qoplanadi. Shu sababdan ham yog‘ochlikni biologik himoya qilishning asosiy vazifasi zamburug‘ mitseliysining o‘shini ingibirlash hisoblanadi (Unverzagt C.,1990).

I bob bo‘yicha xulosalar: Xitin tabiatda keng tarqalgan biopolimerlardan biri bo‘lib, zahirasi bo‘yicha faqat sellulozadan keyingi o‘rinda turadi. Xitin 1811 - yilda zamburug‘lar tarkibini o‘rganish bo‘yicha tadqiqot qilish vaqtida aniqlandi. Xitin modifikatsiyasi bilan bog‘liq ilk tekshiruvlar akademik Pavl Shorigin boshligida Rossiyada o‘tkazildi. Birinchi marotaba xitindan olingan preparatlar (radioprotektorlar – nurlanishdan himoya qiluvchi dori vositalari) 1960 yilda tayyorlangan. Mitselial zamburug‘lar ustida tadqiqot olib borgan olimlarning fikriga ko‘ra xitinolitik fermentlarning sintezlanishiga xitin moddasi induktor sifatida ta’sir etadi. Umumqabul qilingan “Fermentlar nomenklaturasiga” binoan xitinolitik fermentlarning ikki turi mavjud: endoxitinaza (KF 3.2.1.14) va N-atsitil- β –glukozaminidaza (KF 3,2,1,30). Xitinaza mahsulotalari asosida o‘simliklarni fitopatogen zamburug‘ va hashorotlardan himoya qiluvchi biopreparatlar hosil qilinadi.

II BOB. TADQIQOT MATERIALLARI VA METODLARI

2.1. Tadqiqot ob'yektlari va ularni o'stirish usullari.

Tadqiqot ob'yekti. Tadqiqot ob'yekti sifatida xitinaza va xitozanaza fermentlarini sintezlovchi quyidagi zamburug'lar xizmat qildi: *Fuzarium*, *Penicillium* va *Endofitlar*. Skrining jarayoni O'zR FA "Mikrobiologiya" institutida olib borildi va zamburug' shtammlari ayni shu laboratoriyada saqlanadi.

Substratlar. Ferment produtsentlarini o'stirish uchun qishloq xo'jaligi, selluloza ishlab chiqarish va dengiz mahsulotlari chiqindilari substrat sifatida qattik (agarli) va suyuq (agarsiz) ozuqa muhitdarda tarkiblariga solindi.

Ozuqa muhitlari. Zamburug' kulturalarini o'stirish uchun o'zida o'simlik qoldiqlari va ishlab chiqarish qoldiqlari (dengiz mahsulotlari, xitin va selluloza ishlab chiqarish) tutgan suyuq ozuqa muhitlaridan foydalanildi. Produtsentlarning chuqur va yuzaki o'stirish usullari modifikatsiyalangan Chapek-Doks ozuqa muhitida olib borildi. Uglevod manbai sifatida faqatgina selluloza 50 % ishlatildi. Yuqoridagi o'simlik chiqindilari bilan birga quyidagi tarkibga ega bo'lgan mineral tuzlar ozuqa muhitiga qo'shildi: sellyuloza 20 g, K_2HPO_4 - 1,0 g, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5 g, $NaNO_3$ - 3,0 g, KCl - 0,5 g, $FeSO_4 \times 7H_2O$ - 0,01 g, xitin – 20 g, dengiz mahsulotlari 50 %. Yuqoridagi moddalar 1 litr distillangan suvda eritildi.

Zamburug'larni o'stirish. Kulturalarni o'stirish Erlenmeyer kolbalarida (1 l hajmli) 200-300 ml ozuqa muhit tutgan holda 28-32 °C haroratda pH ko'rstkichi produtsentga bogliq holda 5,6-6,0 va prosutsentning oqsillar sintez qilishi va maksimal miqdorda to'planishiga, fermentativ faolligiga bog'liq holda yumaloq chayqatkichlarda 250 ayl/min tezlikda 6 sutka davomida o'stirildi.

2.2. Xitinaza, xitozanaza va boshqa faolliklar. Hujayra tashqaridagi xitinazlar faolligi kolloidli xitinlarni gidrolizlash paytida hosil bo'ladigan qayta tiklovchi qandlarning miqdori bilan aniqlanar edi. Reaksiya qorishmasi 1ml eritmada (kultura suyuqligida) 1ml 0.5 % li kolloidli xitin pH-5,0 teng 0.1 atsetat buferi

saqlagan. 40 darajali va pH 5,0 li koloidli xitin bilan 60 min davomida gidroliz qilish natijasida hosil bo'lgan moddalar miqdori 1mg N-atsitil-D-glukozaminga mos deb hisoblanib, faollik birligi sifatida qabul qilingan edi. N-atsitil-D-glukozamin miqdori tarkibi 0,4 mg gacha ushbu suyuqlik bo'lgan kalibrlangan qorishmani standart o'lchov orqali aniqlanar edi. Xitinazning faoligini ham xuddi shu uslub bilan ya'ni 0,5% eritilgan xitozanni substrat sifatida qo'llash orqali o'lchanadi. Ferment faolligini 60 min davomida 40°C li va pH 5,0 li ferment qorishma bilan inkubatsiyalash natijasida hosil bo'lgan D-glukozaminni mg/ml da ifodalanadi (Rodrigues-Kabana, Gadoy, Shelvay 1983).

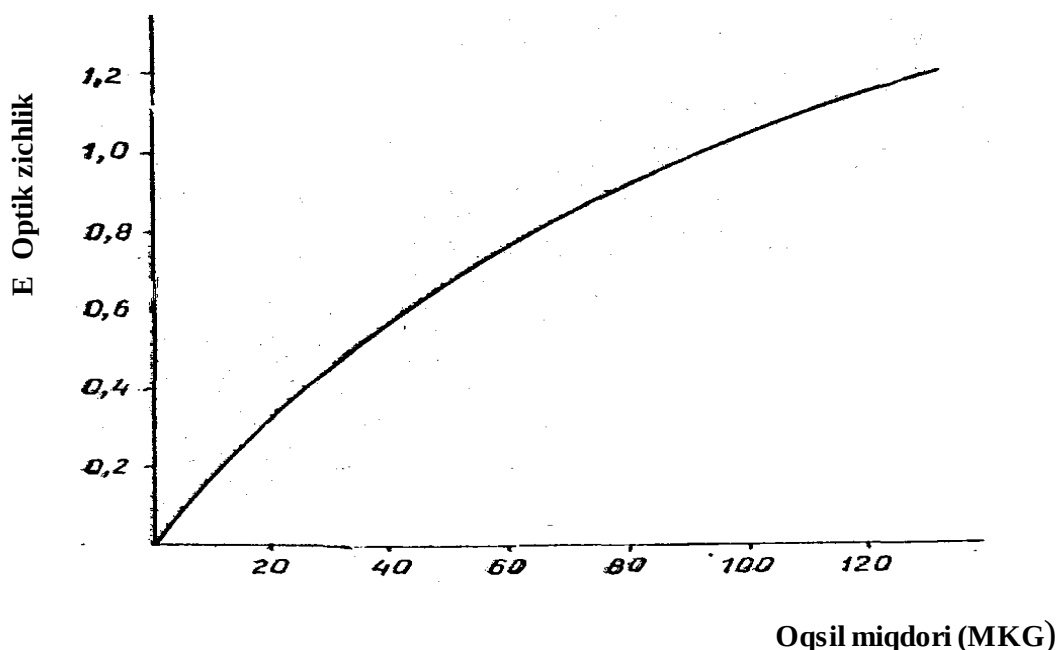
Kolloid xitin mahalli qisqichbaqadan tayyorlanadi. Xitozan qorishmasi quyidagicha olinadi : dezatsillashtirish darajasi 80,5 % va molekular massasi 495 kDa bo'lgan 1 g qisqichbaqa xitozanini 0,1 M 100ml uksus kislotasiga 1 soat davomida eritiladi; undan so'ng xitozan eritmasini sig'imi 200ml bo'lgan o'lchovli konussimon kolbaga toki uning hajmi 0,1 M atsetat buferli pH 5,0 ga teng bo'lgunga qadar quyiladi. Xitozan eritmasining ko'rsatkichini pH (5,0) o'rnatish uchun 1M natriy gidroksid qo'llaniladi. Fermentlar faolligini ifodalash uchun oqsilni birlik/ml va birlik/mg o'lchovlari bilan belgilanadi.

Oqsil miqdorini aniqlash uslublari: O'stirish vaqti tugagandan so'ng kolbadagi suyuqliklarni qog'oz filtirda filtirlab, kultural hujayradan ajratdik. Filtrlangan suyuqlik kelgusi ishlarimiz uchun o'rganish obyekti bo'lib hizmat qiladi. Filtr yuzasida qolgan zamburug' hujayralarini hona sharoitida quritib, biomassa chiqimi, ya'ni miqdorini aniqlash uchun analitik tarozida tortdik.

Malumki zamburug' kulturalari har qanday toza ozuqa muhitida o'stirilganida u tomonidan hosil bo'lgan turli metabolitlar (oqsil, fermentlar, ikkilamchi metabolitlar va boshqalar) albatta o'stirish muhitining pH ko'rsatkichiga ta'sir etib, uni kislotali yoki ishqoriy tomonga o'zgaradi. Shuning uchun biz pH o'zgarish darajasini ham kuzatdik.

Kulturalar o'sishi davomida hosil bo'lgan oqsil miqdorini Louri metodi bo'yicha aniqladik. Oqsil miqdorini aniqlash uchun filtirlangan kultural suyuqlikdan

foydalanib, qoramol zardobi albumini asosida tuzilgan kalibrovka chizig'iga qarab aniqladik. Reaksiyon suyuqlikning nur yutish qobiliyatini FEK yordamida 750 nm to'qin uzunligida aniqladik.



4 - rasm. Louri usulida oqsil miqdorini aniqlash usuli kalibrlovchi egri chiziq

Analiz uchun 0,4 ml filtrat 2 ml C – reaktivdan solib, 20 daqiqa davomida hona temperaturasida ushladik. So'ngra 0,2 ml dan folin reaktividan solib, 30 daqiqa davomida 37 °C-li suv hammomiga joylashtirdik. Probirkalarni sovutib, 10 daqiqadan so'ng FEK-da aminokislotalarning rang intensivlik darajasini o'lchadik (Lowry .O.H., 1951).

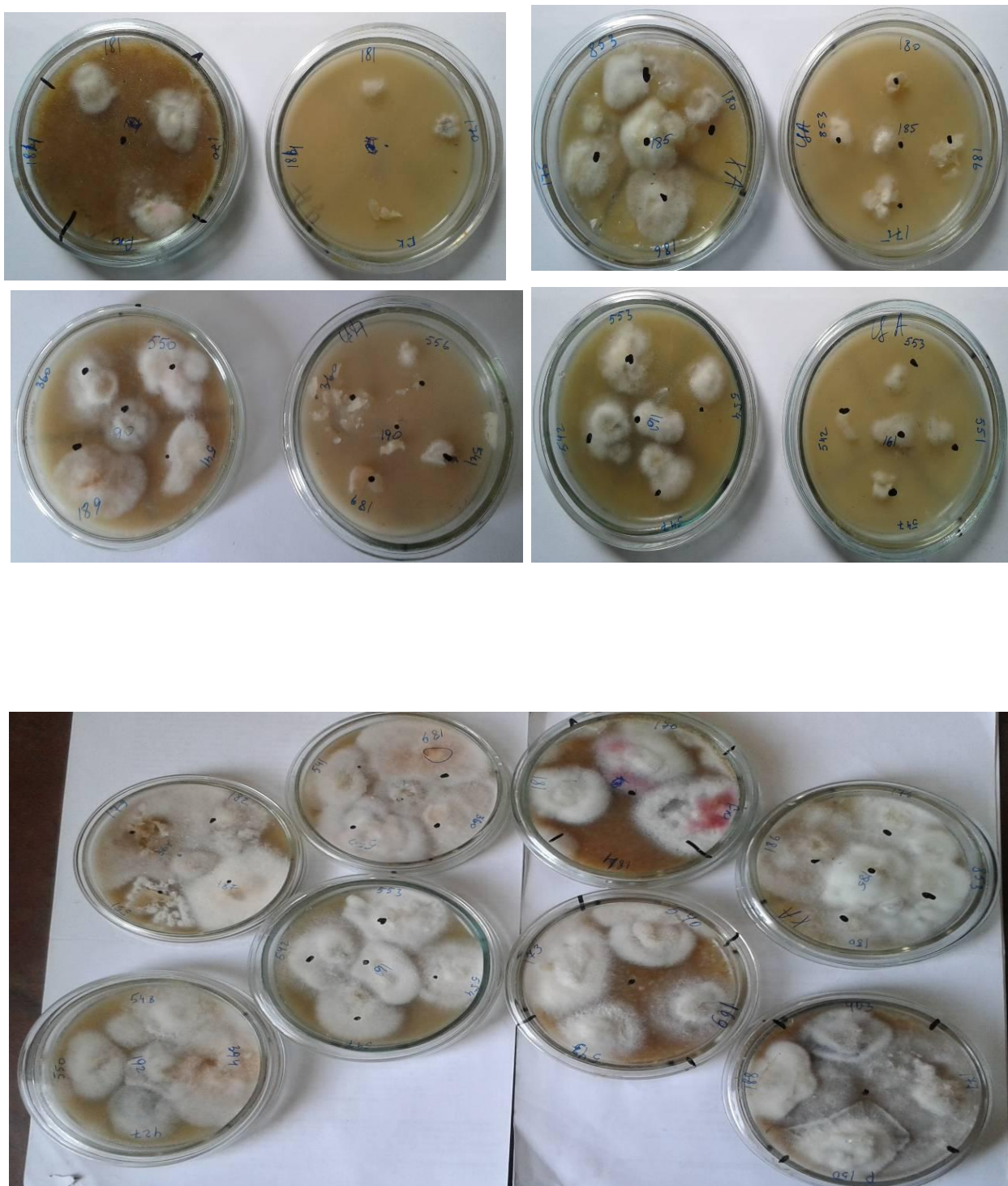
Muhitning pH ko'rsatkichini laboratoriya LPU-340 potensiometri yordamida, KCl, ko'mirli va simobli elektrodni filtratga botirish usuli bo'yicha aniqladik.

II bob bo'yicha xulosalar: Ushbu bob BMI ni to'laqonli bajarish uchun zarur bo'lgan material va uslublarni o'z ichiga olgan,. Tadqiqot ob'yekti sifatida xitinaza va xitozanaza fermentlarini sintezlovchi quyidagi zamburug'lar xizmat qildi: *Fuzarium*, *Penicillium* va *Endofitlar*. Kultural suyuqlik tarkibidagi oqsil miqdori pH ko'rsatkichlari aniqlash uslublari keltirilgan.

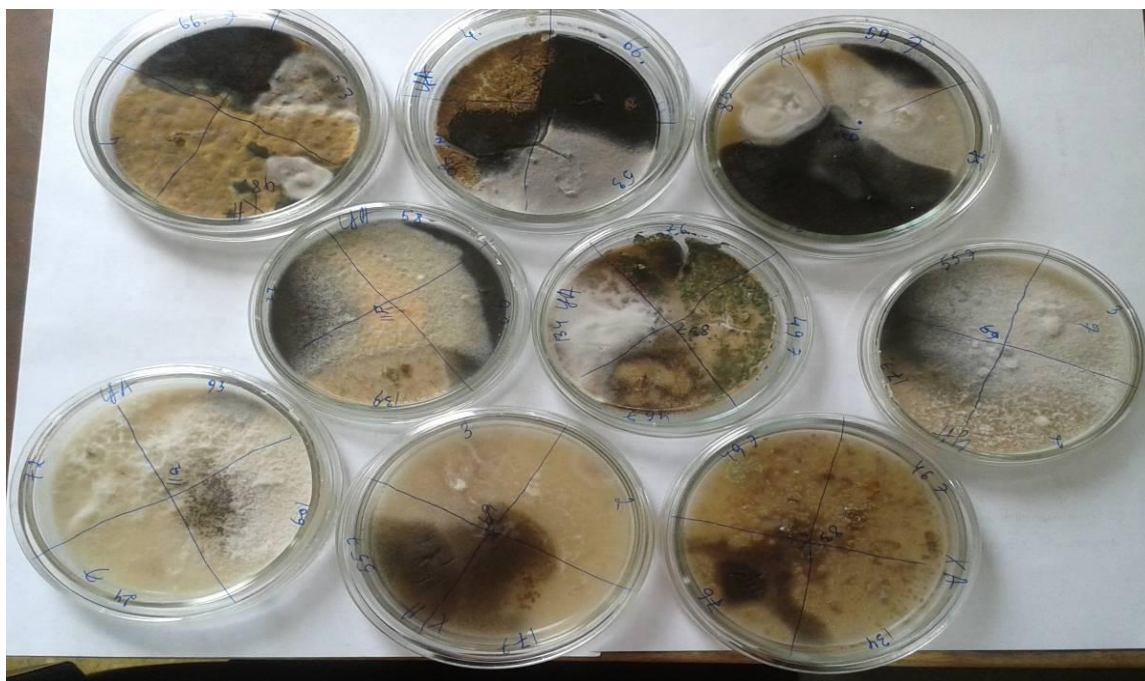
III BOB. OLINGAN NATIJALAR VA ULARNING TAHLILI

3.1. *Fusarium* *Penicillium* va *Endofitlar* avlodlari zamburug`larini xitinaza va xitozanaza faolligi bo`yicha skriningi. Xitinolitik fermentlar xitin tutuvchi chiqindilarning konversiyasida ya'ni yuqori biologik faollikka ega bo'lgan xitologosaxaridlarning olinishida ishlatiladi. Xitinolitik fermentlar turli taksonomik birliklarga mansub bo'lgan mikroorganizmlardan sintezlanadi. Xitinolitik fermentlarning istiqbolli prodeutsentlariga hujayra tashqi xitinazalar ishlab chiqaruvchi metselial zamburug`lar kiradi. Bunday zamburug`lar tomonidan sintezlangan xitinolitik fermentlar ko'p xildagi molekulyar tuzilishli, turli fizik-kimyoviy va katalitik xususiyatga ega bo'ladi. 173 ta miselial zamburug shtammlaridan *Fuzarium* avlodiga mansub shtammlardan 42 ta, *Endofitlar* tarkibiga kiruvchi zamburug shtammlaridan 80 ta va *Penicillium* avlodiga mansub zamburug shtammlaridan 51 ta shtammlar olindi va chapeka-agar yarim suniy ozuqa myxiti tarkibiga sellyuloza 20 g, K_2HPO_4 - 1,0 g, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5 g, $NaNO_3$ - 3,0 g, KCl - 0,5 g, $FeSO_4 \times 7H_2O$ - 0,01 xitin saqllovchi substrat, yani dengiz meduzasi xitini va ipak kurti kapalagidan ajratib olingan xitozanli ozuqa myxitlariga Petri likobchalariga (agarli) yuzaki ekish orqali ekilib ularni o'sishi tekshirildi. Bunda, ozuqa muxiti tarkibiga yagona uglerod manbai sifatida xitin va xitozan saxaroza o'rniga ishlatildi. Faol o'sgan va qattiq ozuqa muxitda xitin va xitozanni gidrolizlash uchun zona xosil qilgan zamuburuglar termostatda 3-12 kun mobaynida kuzatilib, ular orasidan eng faollari ajratib olindi.

Xitin va xitozanli ozuqa muxitlariga inokulyasiya qiling zamburug`larning vaqt davomida (12 kun) tez o'sishlari va zona xosil qilishlari bo'yicha o'tkazilgan tajribalar, ya'ni skrining natijasida *Fuzarium* avlodiga mansub shtammlardan (42 ta dan) – 6 tasi tanlab olindi.

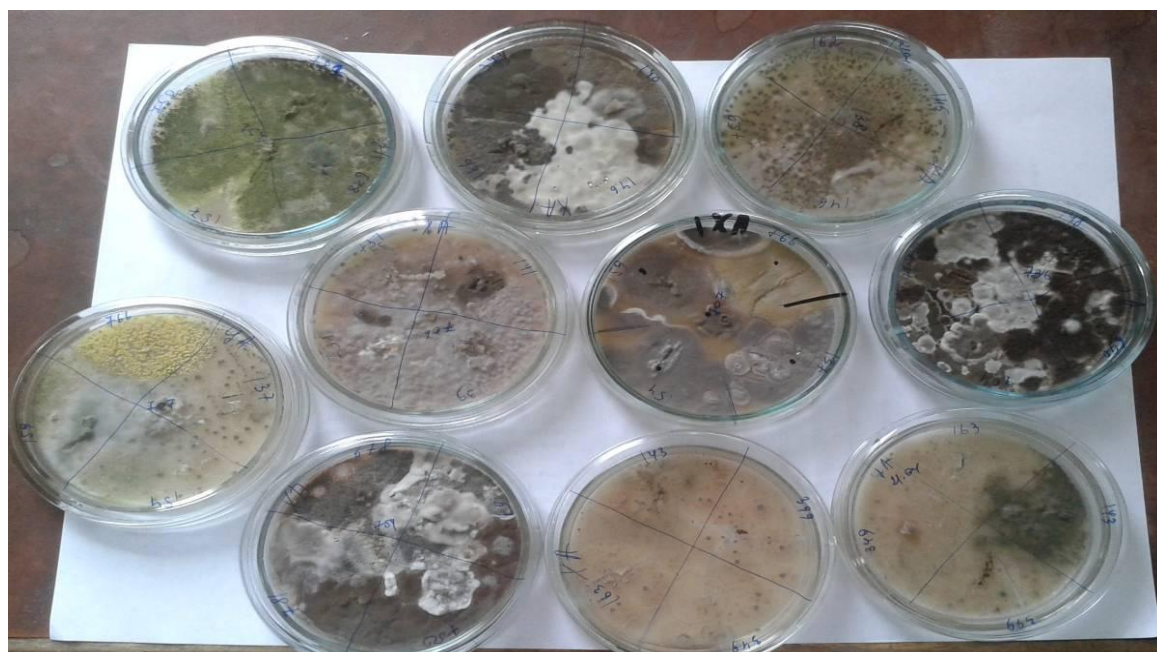


5 – rasm. *Fuzarium avlodiga mansub zamburg*‘ shtamlarining skriningi



6 - rasm *Endofitlar* avlodiga mansub zamburg‘ shtamlarining skriningi.

Endofitlar tarkibiga kiruvchi zamburug shtammlarini skrining orkali eng faol produsentlari, ozuqa muxitlarida hosil qilgan zonasiga karab (80 tadan) – 6 ta tanlanib olindi.



7 - rasm. *Penicillium* avlodiga mansub zamburg‘ shtamlarining skriningi.

Penicillium tarkibiga kiruvchi zamburug shtammlarini skrining orqali eng faol produsentlari ozuqa muxitlarida xosil qilgan zonasiga qarab (51 tadan) 5 tasi tanlab olindi. Ushbu zamburug'lar tajribalarimizning keyingi bosqichida suyuq xitin tarkibli ozuqa muxitlarida ekilib, kultural suyuqlik tarkibiga ajratadigan xitinaza va xitozanaza fermentlarini hosil qilish qobiliyatlarini aniqlash uchun belgilab olindi.

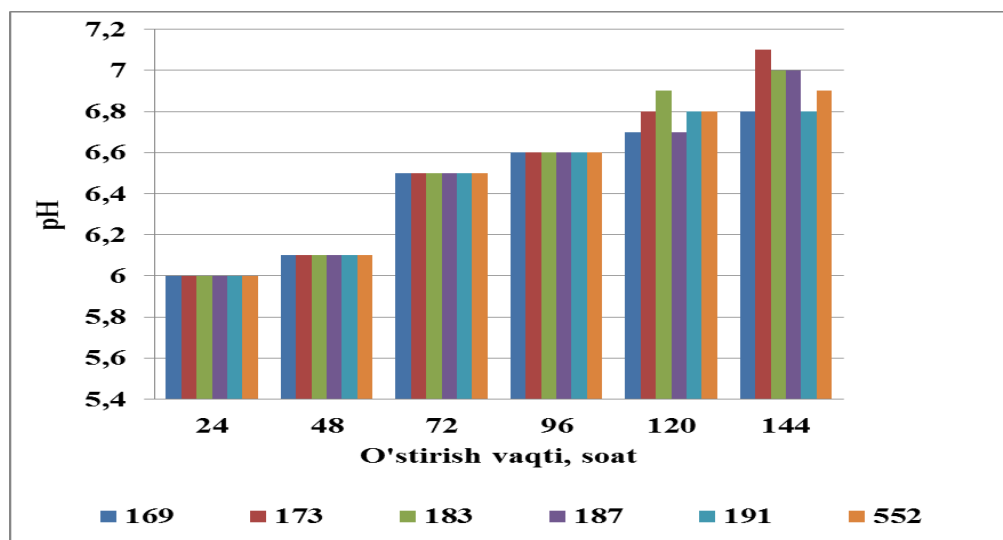
3.2. Ajratib olingan xitinaza va xitozanazaning eng faol produsentlariga ozuqa muhitning pH ko'rsatkichi hamda oqsil miqdrini aniqlash. Ferment hosil qiluvchi zamburug' hayoti, aktiv o'sish va rivojlanish faoliyatlarini boshqarish uchun tanlangan ozuqa muhitlarida, kulturalarning rivojlanishi va biosinteziga ta'sir qiluvchi eng muhim omillar haqidagi fikrlari bir-birlaridan farqlanadi. Ma'lumki, ferment hosil bo'lishi ozuqa muhiti tarkibiga, o'stirish sharoitlariga, temperatura, aeratsiya, muhit pH-darajasi va fizik - kimyoviy ta'sirlar o'stirish faoliyatiga va boshqaruviga bog'liqdir.

Skrining natijasida 173 ta miselial zamburug' shtammlaridan *Fuzarium* avlodiga mansub shtammlardan (42 ta dan) – 6 ta, *Endofitlar* tarkibiga kiruvchi zamburug' shtammlaridan (80 tadan) – 6 ta va *Penicillium* avlodiga mansub zamburug' shtammlaridan (51 tadan) – 5 ta tanlab olindi. Tanlab olingan zamburug'lar chuqur ekish usulidan foydalangan holda Erlenmeyer kolbalarida 200-300 ml, sellyuloza 20 g, K_2HPO_4 - 1,0 g, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,5 g, $NaNO_3$ - 3,0 g, KCl - 0,5 g, $FeSO_4 \times 7H_2O$ - 0,01 g kolloid xitin ozuqa muhitlarida 28-32 °C haroratda pH ko'rsatkichi produtsentga bogliq holda 5,6-6,0 ga yetkazildi va produsentning oqsillar sintez qilishi va maksimal miqdorda to'planishiga, fermentativ bog'liq holda yumaloq chayqatkichlarda 250 ayl/min tezlikda 6 sutka davomida o'stirildi.

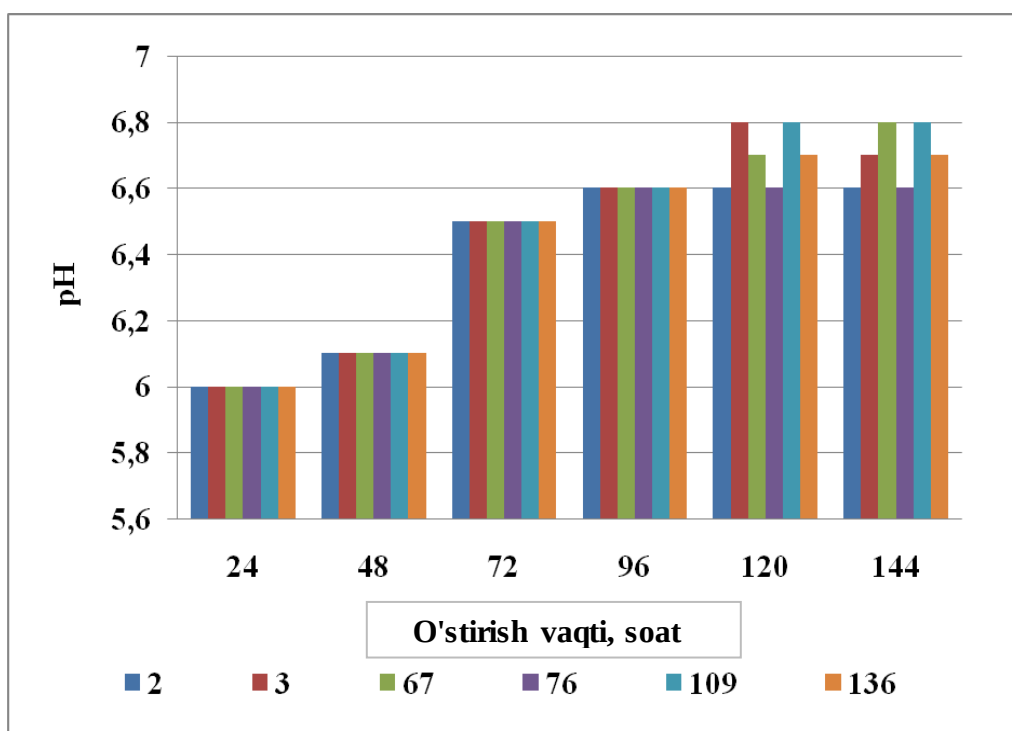


8 - rasm. Mitselial zamburug`larining suyuq ozuqa muhitlari o`stirilgan inokulyati

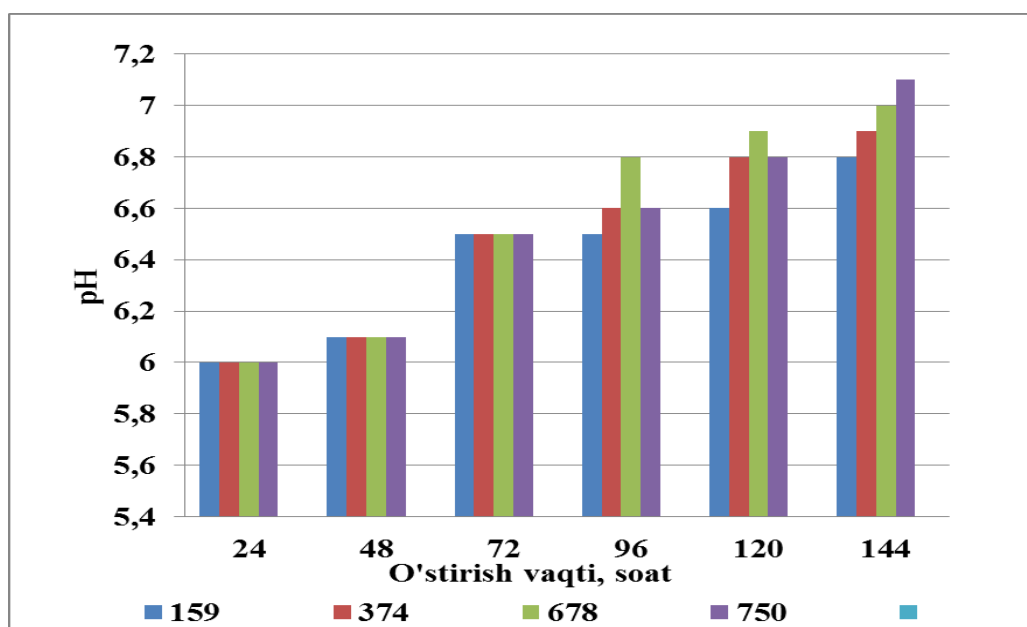
Biologik faol moddalarni olish o`stirish sharoitini optimizatsiyalashning birinchi bosqichi hisoblanadi. Natijada esa produtsentning biosintetik faolligi oshadi. Shuning uchun ham birinchi navbatda kulturaning o`sinh va rivojlanish parametrlarini o`rganish zarur. Shu bilan birga maqsadga muvofiq sintezlangan mahsulotning biosintezini o`rganish yuqoridagi jaraonlar bilan qay darajada aks aloqada bo`lishini o`rganish imkonini beradi. Yuqoridagilarni hisobga olgan holda o`stirish jarayonida har 24 soatda pH ko`rsatkichini laboratoriya LPU-340 potensimetri yordamida, KCl, ko`mirli va simobli elektrodlarni filtratga botirish usuli bo'yicha aniqladik.



9 - rasm. *Fuzarim* avlodi zamburug` shtammlarini 144 soat davomida pH ko`rsatkichining o`zgarishi (n=6; M±m)



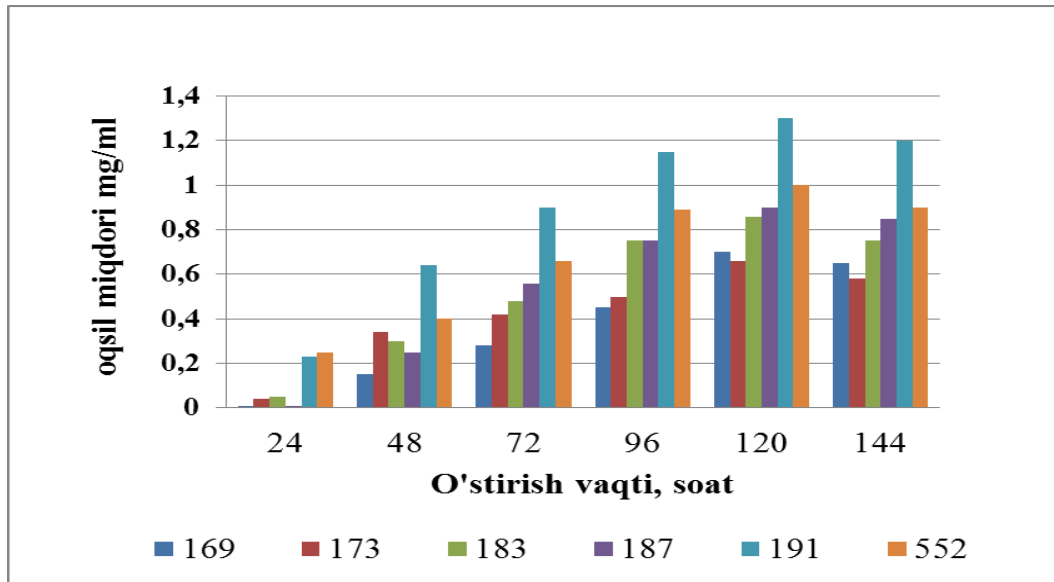
10 - rasm. *Endofit* avlodi zamburug` shtammlarini 144 soat davomida pH ko'rsatkichining o'zgarishi (n=6; $M \pm m$)



11 - rasm. *Penicillium* avlodi zamburug shtammlarining 144 soat davomida pH ko'rsatkichining o'zgarishi (n=6; $M \pm m$)

Muhitning pH darajasini o'rganish natijasida zamburug'ning o'sish dinamikasi 24 – 144 soat davomida pH-darajasining neytral oblastdan kislotali tarafga, ya'ni pH-6 dan pH-7.1 gacha ko'tarilishini kuzatdik.

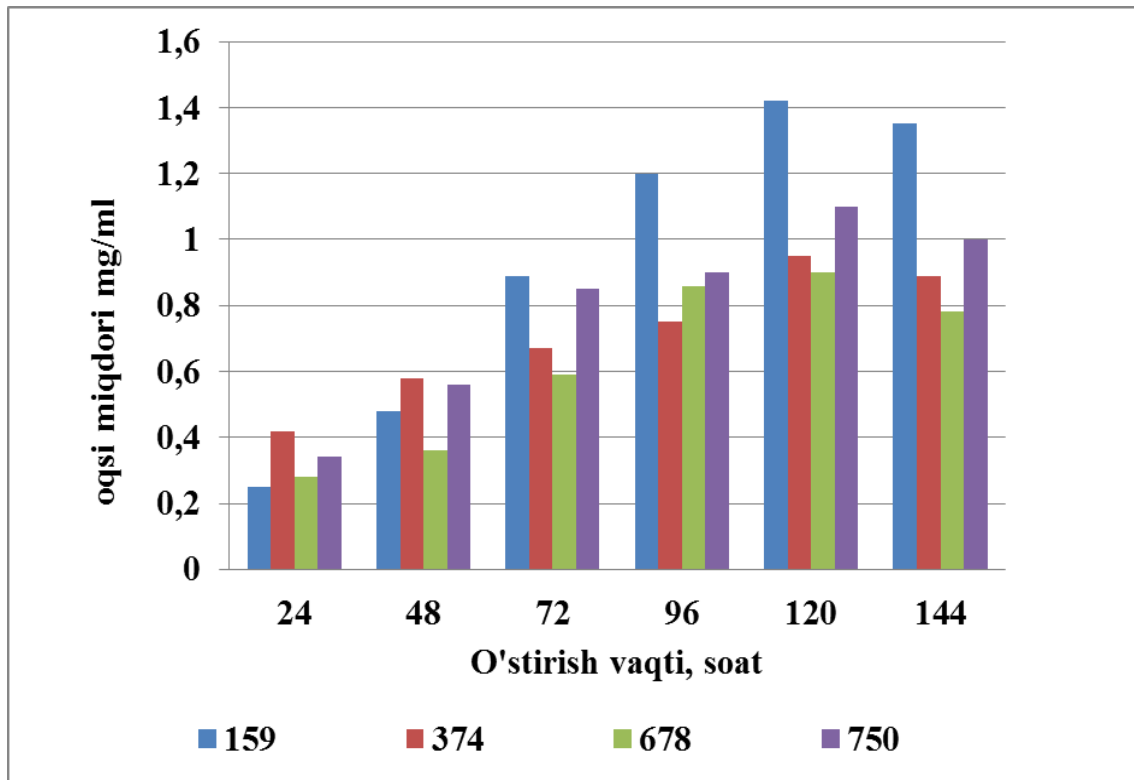
Zamburug' shtammlarining o'sish mobaynida oqsil miqdorining o'zgarishi



12 - rasm. *Fuzarim* avlodi zamburug' shtammlarini 144 soat davomida oqsil miqdorining o'zgarishi (n=6; M±m)

Fuzarim avlodi zamburug' shtammlarining oqsil miqdorini aniqlash tajribasida eng ko'p oqsil hosil bo'lish miqdori zamburug'lar vakillarining o'sish vaqtiga bog'lik bo'lib, 24-144 soat kuzatish mobaynida № 191 shtami (*F. moniliformi*) shtamm barcha shtamlardan faol ravishda oqsil to'plashi, ayniqsa o'stirishning 48 soatidan boshlab 120 soatigacha uning ortib borishi (0,6 mg/ml dan 1,3 mg/ml gacha, 144 soatda esa nisbatan kamayishi kuzatildi, № 552 shtamm ham qolganlardan faolroq bo'lib, o'stirishning 96-120 soatlarida oqsil miqdori 0,9 mg/ml dan ortib, 120 soatda 1,0 mg/ml darajaga etdi. Zamburug' shtammlarining o'sish vaqtiga nisbatan oqsil to'plash jarayonlari 72 soatdan boshlab, 120-144 soatlarida maksimal miqdorga etdi. Demak, ushbu zamburug' shtammlari xitinli

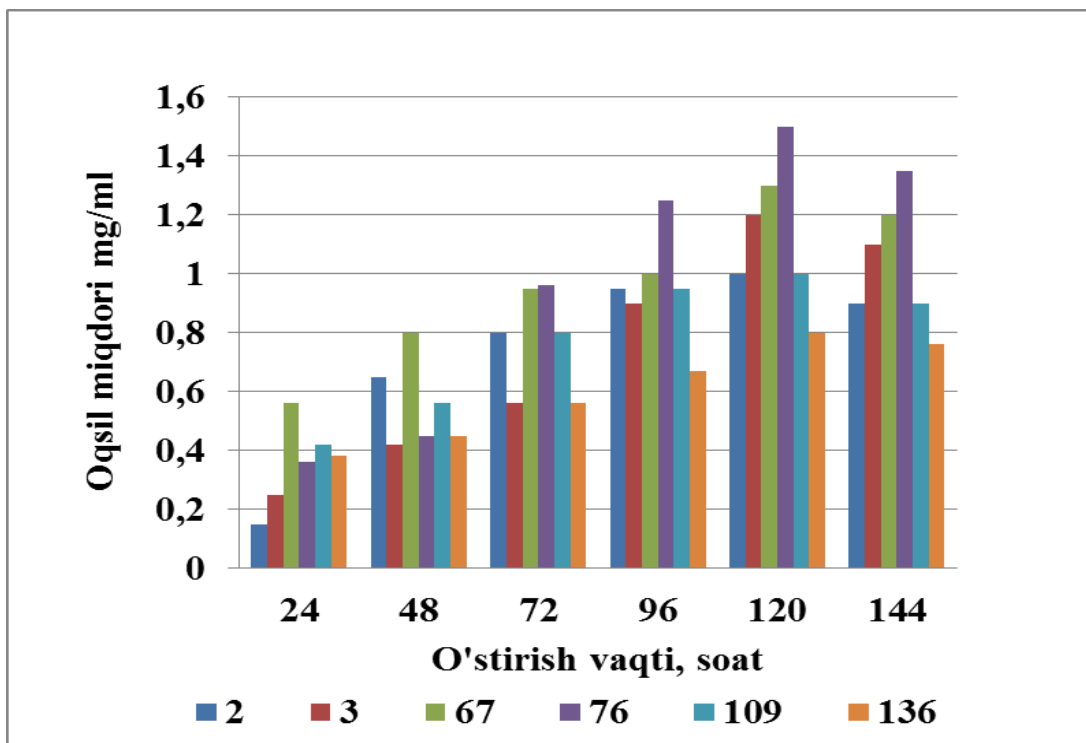
ozuqa muxitlarida o'sib, rivojlanib oqsil to'plash xususiyatlariga ega ekanlar. Zamburuglarning 24-144 soat davomida oqsil to'plash qobiliyatlari quyidagicha taksimlandi: 191>552>187>183>169>173



13 - rasm. *Penicillium* avlodi zamburug shtammlarining 144 soat davomida oqsil miqdorining o'zgarishi (n=6; M±m)

Xitin tarkibli ozuqa muhitlarida *Penicillium* zamburug' shtamlarining oqsil to'plash faolliklari shtammlar orasida quyidagi ko'rsatkichga ega bo'ldi 159>750>374>678. *Penicillium* avlodi zamburug' shtammlarining oqsil miqdorini aniqlash tajribasida eng ko'p oqsil hosil bo'lish miqdori zamburug'lar vakillarining o'sish vaqtiga bog'lik bo'lib, 24-144 soat kuzatish mobaynida № 159 shtami (*P.Pupurogenum*) shtamm barcha shtamlardan faol ravishda oqsil to'plashi, ayniqsa o'stirshning 72 soatidan boshlab 120 soatigacha uning ortib borishi (0,95 mg/ml dan 1,4 mg/ml gacha, 144 soatda esa nisbatan kamayishi kuzatildi, № 750 shtamm xam qolganlardan faolroq bo'lib, o'stirishning 72 - 96 soatlarida oqsil

miqdori 0,8 mg/ml dan ortib, 120 soatda 1,1 mg/ml darajaga etdi. Zamburug' shtammlarining o'sish vaqtiga nisbatan oqsil to'plash jarayonlari 72 soatdan boshlab, 120 soatlarida maksimal miqdorga etdi.



14-rasm. *Endofit* avlodi zamburug shtammlarining 144 soat davomida oqsil miqdorining o'zgarishi (n=6; M±m)

Xitin tarkibli ozuqa muxitlarida *Endofit* zamburug' shtammlarining oqsil to'plash faolliklari shtammlar orasida quyidagi ko'rsatkichga ega bo'ldi:

76 > 67 > 3 > 109 > 2 > 136. Demak, *Endofit* shtammlari orasidan № 76 shtamm (*Alternaria* sp) ozuqa muxitlarida o'stirishning 120 soatida eng ko'p miqdorda, ya'ni 1,5 mg/ml miqdorda kultural suyuqlik tarkibiga oqsil sintez qildi.

Yuqorida natijalar asosida xulosa qiladigan bo'lsak o'stirishning dastlabki bosqichlaridan birida, aniqrog'i logarifmik o'sish bosqichida (48-120 soat) kultural suyuqlikda oqsillar miqdorining oshishi (12, 13, 14 rasmlar) xitin gidrolizi

natijasida hosil bo'lgan mahsulotlarning utilizatsiyasini tezlashtiradi. Bunda *Fuzarium* avlodi shtammlaridan № 191 shtamm (*F. moniliformi*) 120 soatda 1,3 mg/ml oqsil hosil qilgan. *Penicillium* avlodi shtamlaridan № 159 shtamm (*P. Pupurogenum*) 1,4 mg/ml oqsil hosil qilgan. *Endofit* avlodi shtamlaridan № 76 shtami (*Alternariya* sp) 1,5 mg/ml oqsil hosil qildi.

3.3. Ajratib olingan zamburug'larda xitinaza va xitozanaza faolliklarining dinamikasini o'rganish. Zamburug' shtammlarining ozuqa muhitda o'sish davomida har 24 soatda kultural suyuqlikda hosil bo'lgan xitinaza va xitozanaza fermentlari faolliklar tekshirib borildi. Kuzatishlar natijasida zamburug'lar o'sishining 72-120 soatlar oralig'ida biomassaning intensiv to'planishi kuzatildi. Aynan shu davrda xitinazalarning faol biosintezi boshlanadi. Shu bilan birga organik modda (xitin) miqdorining kamayishi kuzatiladi. Muhitda fermentning to'planishi, xitin moddasining gidrolizlanishi natijasida parchalangan moddaning hosil bo'lishi va ularning produtsent tomonidan utilizatsiyasining bir vaqtda borishini ta'kidlab o'tish lozim. Har lahzada bu jarayonlar orasida ma'lum darajada muvozanat bo'ladi, kultural suyuqlikda parchalangan uglevodlarning hamda oqsillar miqdorining oshishi xitin gidrolizi natijasida hosil bo'lgan mahsulotlarning utilizatsiyasini tezlashtiradi.

Olib borilgan kuzatuvlar natijasida *Fuzarium* avlodi shtammlari orasidan №191 shtami (*F. moniliformi*) boshqa shtamlardan faolligi yuqori bo'lib 72 -120 soatda 0,43 birlik/ml xitinaza, 1,34 birlik/ml xitozanaza, *Penicillium* avlodi shtamlaridan №159 shtami (*P. Pupurogenum*) 0,13 birlik/ml xitinaza, 0,1 birlik/ml xitozanaza, *Endofit* avlodi shtamlaridan №76 shtami (*Alternariya* sp) 0,17 birlik/ml xitinaza, 0,12 birlik/ml xitozanaza hosil qilishi aniqlandi

1 - jadval

**Tanlangan mitselial zamburug`larining 144 soat davomida hosil bo`lgan
xitinaza va xitozanaza faolliklari (n=6; M±m)**

Shtammlar №	Xitinaza birlik/ml	Xitozanaza Birlik/ml
<i>Fuzarium</i> avlodi shtammlari		
№ 169	0,09±0,001	0,05±0,001
№ 173	0,07±0,001	0,04±0,001
№ 183	0,13±0,02	0,07±0,001
№ 187	0,24±0,03	1,13±0,02
№ 191	0,43±0,04	1,34±0,03
№ 552	0,26±0,03	1,26±0,01
<i>Endofitlar</i> avlodi shtammlari		
№ 2	0,09±0,001	0,06±0,001
№ 3	0,05±0,001	0,03±0,001
№ 67	0,08±0,001	0,025±0,03
№ 76	0,17±0,02	0,12±0,02
№ 109	0,03±0,001	0,02±0,001
№ 136	0,06±0,001	0,04±0,001
<i>Penicillium</i> avlodi shtammlari		
№ 159	0,13±0,02	0,1±0,02
№ 374	0,07±0,001	0,05±0,001
№ 678	0,1±0,02	0,03±0,001
№ 750	0,07±0,001	0,05±0,001

XULOSA

1. Skrining natijasida 173 ta miselial zamburug‘ shtammlaridan *Fuzarium* avlodiga mansub shtamlardan (42 ta dan) – 6 ta, Endofitlar tarkibiga kiruvchi zamburug‘ shtammlaridan (80 tadan) – 6 ta va *Penicillium* avlodiga mansub zamburug‘ shtammlaridan (51 tadan) – 5 ta tanlab olindi.

2. Zamburug‘ shtammlarining o‘rish dinamikasida 24 – 144 soatda ozuqa muxitning Ph ko‘rsatkichi 6 dan 7,1 ko‘tarilganligi, oqsil miqdori esa 120 soatda maksimal miqdorda *Fuzarium* avlodi shtammlaridan №191 shtami (*F. moniliformi*) 1,3 mg/ml, *Penicillium* avlodi shtammlaridan №159 shtamm (*P. Pupurogenum*) 1,4 mg/ml , *Endofit* avlodi shtammlaridan №76 shtamm (*Alternariya* sp) 1,5 mg/ml oqsil hosil bo‘ldi.

3. Olib borilgan kuzatuvlar natijasida *Fuzarium* avlodi shtamlari orasidan №191 shtamm (*F. moniliformi*) boshqa shtamlardan faolligi yuqori bo‘lib 72 -120 soatda 0,43 birlik/ml xitinaza, 1,34 birlik/ml xitozanaza, *Penicillium* avlodi shtamlaridan №159 shtamm (*P. Pupurogenum*) 0,13 birlik/ml xitinaza, 0,1 birlik/ml xitozanaza, *Endofit* avlodi shtammlaridan №76 shtamm (*Alternariya* sp) 0,17 birlik/ml xitinaza, 0,12 birlik/ml xitozanaza hosil qilishi aniqlandi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR RO‘YXATI

Kitoblar:

1. Журавлева Н.В. Хитинолитические ферменты: источники, характеристика и применение в биотехнологии / Н.В. Журавлева, П.А. Лукьянов. Вестник ДВО РАН. - 2004. - № 3. - С. 83.
2. Ильина, А.В. Варламов В.П. Энзимология синтеза и деградации хитина и хитозана // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под. ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. М.: Наука, 2002. - С. 79-90.
3. Шубаков А.А., Кучерявых П.С. Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т.40,№5. – С.517-519.
4. Bezouska K., Yuen C.T., O'Brien J., Childs R.A., Chai W., Lawson A.M., Drbal K., Fiserova A., Pospisil M., Feizi T. Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity // Nature.1994. Vol. 372, N 6502.P. 150—157.
5. Bielka H., Dixon H., Karlson P., Webb E. Enzyme nomenclature. N. Y.: Academic Press, 1984. 350 p.
6. Collinge S., Kragh K., Nikkelsen J., Rausmussen U., Vad K. Plant chitanases // Plant J. 1993. Vol. 3,N 3. P. 31—40.
7. Davies G., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // Structure. 1995. Vol. 3, N 12. P. 853—859.
8. Davis B., Eveleigh D. Chitosanases: occurrence, production and immobilization // Chitin, chitosan and related enzymes / Ed. Zikakis J.P. Orlando: Academic Press, 1984. P. 161—179.
9. Flatch J., Pilet P.E., Jolles P. What's new in chitinase research? // Experientia. 1992. Vol. 48, N 2. P. 701—716.
10. Fukamizo T. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application // Curr. Protein Peptide Sci. 2000.Vol. 1, N 1.P. 105—24.

11. Fukamizo T., Kramer K. Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid // *Insect Biochem.* 1985. Vol. 15, N 1. P. 141—145.
12. Henrissat B., Bairoch A. New families in the classification for glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // *Biochem. J.* 1993. Vol. 293, N 11. P. 781—788.
13. Hirano S. Chitin biotechnology applications // *Biotechnol. Annu. Rev.* 1996. Vol. 2, N 1. P. 237—258.
14. Koga D. Comparative biochemistry of insect and plant chitinases // *Chitin Enzymology* / Ed.
15. Koga D., Mitsutomi M., Kono M., Matsumiya M. Biochemistry of chitinase // *Chitin and Chitinases* / Eds Jolles P., Muzzarelli R.A.A. Ancona: Atec. Grottammare, 1999. P. 111—123.
16. Lorito M., Woo S., Donzelli B., Scala F. Synergistic, antifungal interactions of chitinolytic enzymes from fungi, bacteria and plants // *Chitin Enzymology* / Ed. Muzzarelli R.A.A. Ancona: Atec. Grottammare, 1996. Vol. 2. P. 157—164.
17. Lowry O.H., Rosenbrough N.C., Farr A.L., Randal F., *J. Biol. Chem.*, 1951, v 193, p. 265
18. Sandorf P.A. Chitosan: commercial uses and potential applications // *Chitin and Chitosan* / Eds Skjak-Braek G., Anthonsen T., Sandorf P.A. L.: Elsevier, 1989. P. 51—69.
19. Sasaki C., Yokoyama A., Itoh Y., Hashimoto M., Watanabe T., Fukamizo T. Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes // *J. Biochem.* 2002. Vol. 131, N 1. P. 557—564.
20. Schlumbaum A., Mauch F., Vogeli K., Boller T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth // *Nature.* 1986. Vol. 324, N 11. P. 365—367.
21. Toyoda H., Matsuda Y., Yamaga T., Ikeda S., Morita M., Tamai T., Ouchi S. Suppression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile cells // *Plant Cell Rep.* 1991. Vol. 10, N 2. P. 217—220.

22. Unverzagt C., Kunz H., Paulson J.C. High-efficiency synthesis of sialyloligosaccharides and sialoglycopeptides // J. Am. Chem. Soc. 1990. Vol. 112, N 34.P. 9309—9310.
23. Usui T., Hayashi Y., Nanjo F., Sakai K., Ishido Y. Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis* // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 923, N 1.P. 302—309.
24. Zhuravleva N., Luk'yanov P., Pivkin M. N-acetyl- β -D-hexoseaminidase with transglycosylation activity from marine fungus *Phoma glomerata* // Advance in Chitin Science / Eds Varum K.M., Domrad A., Smidstrod O. Trondheim, Norway: Tappyr Uttrykk, 2003. Vol. 6.P. 308—309.

Konferensiya materiallari:

25. Zhuravleva N., Pivkin M., Hwan J., Luk'yanov P. Complex chitinolytic system of marine fungi // Proc. 3rd Intern. Symp. Chitin Enzymology. Ancona, Italy, 6—10 May, 2001. P. 94.