

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ СОҒЛИҚНИ САҚЛАШ ВАЗИРЛИГИ

ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ

Қўлёзма ҳуқуқида



ЭШМУРАТОВ ЖАҲОНГИР ШОДИМУРОТОВИЧ

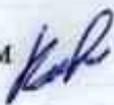
“ α -амилазанинг юқори фаолликка эга продуцентларини
Bacillus авлодига мансуб бактериялардан танлаб олиш”

Ихтисослик: 5A522902 Иммунобиологик ва микробиологик препаратлар
технологияси мутахассислиги

Магистрлик даражасини олиш учун

Диссертация

Илмий раҳбар: б.ф.н., катта илмий ходим



Нормуродова Қ.Т.

Оппонент: б.ф.н. доцент

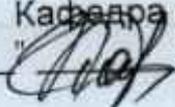


Мақсудова А.Н.



ТОШКЕНТ-2012

"ТАСДИҚЛАЙМАН"

Кафедра мудири
"  2012 йМАГИСТРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСINI ЁЗИШ
БЎЙИЧА ТОПШИРИҚЛАРТошкент Фармацевтика институти ректорининг 2011 й "19" февраль 22-
сон буйруғи билан тасдиқланган _____Биотехнология кафедраси бўйича
3- асослашнинг юқори формасига эъ

магистрлик диссертациясининг номи

кродуцентий марсиел ва ситит авлодида микробБактериология тоғлиб ама мавзудаги магистрлик диссертацияси
Илмийраҳбар Б.Ф.Н. Катта илмий ходим
Нормурадова Ч.Н. бошчилигида
(илмий раҳбарнинг исми-фамилияси, лавозими, илмий даражаси ва илмий унвони)
Иммуратов Мотосимур томонидан
(тингловчининг исми-фамилияси)туғалланган ҳолда 201__ й " __ " __
да __________ кафедрасига дастлабки ҳимоя учун тақдим
этилади.Тадқиқот
ишида Илмий адабётлардан фойдаланилди

_____ фойдаланила

ди
Фармацевтика соҳаси, тиббиёт соҳаси бўйича чоп этилган адабиётлардан,
замонавий усул ва услублардан ва ҳ.к.)Ишда _____
_____ берилишикўзда тутилади
Ишда қуйидаги масалалар баён этилади:

1-
506 Ақбейтлер шарқи ва тарғиблари.

(НОМИ)

2-
506 Фюзиқболлар ва уларнинг методикаси

(НОМИ)

3-
506 Кешиклар ва уларнинг муноқиялари

(НОМИ)

(сана, ой, йил)

Илмий
раҳбар Нормурадов Ш. М. Қиқа

(исми, фамилияси, илмий даражаси ва унвони)

Магистрант 2011й "19" февралда топшириқни қабул қилди

МУНДАРИЖА

Кириш.....	4
1-БОБ. АДАБИЁТЛАР ТАҲЛИЛИ.....	11
1.1. Микроб α -амилаза продуцентлари ҳақида умумий тушунча ва уларнинг тарқалиши.....	11
1.2. Амилолитик ферментларнинг таъсир қилиш механизмлари ва уларнинг таркибий қисми.....	15
1.3. Амилолитик ферментларнинг саноатда қўлланилиши.....	19
АСОСИЙ ҚИСМ	
2-БОБ. ТАЖРИБАЛАР ВА УЛАРНИНГ МЕТОДИКАСИ.....	27
2.1. Объектни текшириш ва ўстириш усуллари.....	27
2.2. Фермент фаоллигини аниқлаш.....	28
3-БОБ. НАТИЖАЛАР ВА УЛАРНИНГ МУҲОКАМАСИ.....	30
3.1. Маҳаллий микроорганизмлар штаммлари орасидан фаол амилолитик фермент продуцентларини танлаб олиш.....	30
3.2. Фаол α -амилаза биосинтезига ташқи омилларнинг таъсирини ўрганиш.....	35
3.3. α -амилазакомплекс фермент препаратининг олиниши.....	46
Хулоса.....	60
Фойдаланилган адабиётлар рўйхати.....	61

Қысқартырилган сўзлар изохи

КС-культурасуюклиги

ФК-ферментлар классификацияси

ИАХ – ион алмашинув хроматографияси

ПААГ – полиакриламид гели

ГФ - гельфилтрация

Кириш

Бугунги кунда кўпчилик озиқ-овқат саноати ишлаб чиқаришларида, углеводлар (глюкоза, мальтоза, изомальтоза), глюкоза-фруктозали сироплар ва олигосахарид-декстринлар олиш мақсадида, крахмални гидролитик парчалаш усулларини такомиллаштириш жуда ҳам муҳим ҳисобланади. Юқори фаолликка эга крахмал парчаловчи ферментлар, яъни α -амилаза продуцентларидан фермент препаратларини технологик ва самарали олиш, барқарорлаштириш усулларини аратиш борасида ўтказилаётган фундаментал тадқиқотлар Ўзбекистон Республикаси иқтисодиётининг устувор йўналишлари, шунингдек жаҳон фанининг истиқболли йўналишлари ривожига мувофиқ келиши лозим [1].

Республикамиз мустақилликка эришгандан буён ватанимиз иқтисодиёти ва ижтимоий ҳаётда қатор ислохотлар ўтказилмоқда ва улар ўзининг мевасини бермоқда. Мамлакатимиз иқтисодиётини янги босқичга кўтаришнинг самарали йўлларида бири микроорганизмлар иштирокида биологик фаол моддалар олиш ва уларни саноатнинг турли тармоқларида қўллашдир. Шу муносабат билан сўнги 10-15 йил ичида республикамизда қатор янги штаммлар ажратилиб ва улар асосида олинган турли хил микроб фермент препаратлари сифатли ҳамда самарали маҳсулотлар ишлаб чиқарувчи корхоналарда синовдан ўтказилмоқда.

Иқтисодий зарур ҳисобланган донли экинлардан:– бугдой, шоли, маккажўхори ҳамда картошка илдиз-мевасининг асосий таркибий қисми бўлиб крахмал ҳисобланади. Йирик масштабларда крахмални қайта ишлаш саноати, яъни мальтодекстрин, модификациялашган крахмал ёки глюкоза-фруктоза сиропининг ишлаб-чиқарилиши мисолида крахмалнинг кислотали гидролиз усулидан ферментатив усулга ўтилиши иқтисодий ва экологик самаралироқ эканлиги ўтган асрда вужудга келди. Ҳозирги вақтда дунё миқёсида ишлаб чиқариладиган ферментларнинг 30% ни ушбу крахмал парчаловчи ферментларнинг улуши ташкил этади. Ундан ташқари крахмал парчаловчи ферментлар яна бир қанча саноат миқёсларида, масалан, кир ювиш воситаларида, ёки нон маҳсулотлари тайёрлашда, чиқиндиларни йўқотиш мақсадида кенг қўлланилади. Грачева (1987), Квеситадзе

(1990), Глемжи (1995), Pandey (2000), Wellington Cristina Almeida do Nascimento (2003), Безбородов (2010) кабиларнинг олган натижаридан ҳам амилитик ферментларнинг саноат миқёсида қўлланилиб, тонналаб маҳсулотларни тежашлигини гувоҳи бўлиш мумкин.

Мамлакатимиз Президенти Ислон Каримовнинг 2010 йил 27 январдаги **“МАМЛАКАТИМИЗНИ МОДЕРНИЗАЦИЯ ҚИЛИШ ВА КУЧЛИ ФУҚАРОЛИК ЖАМИЯТИ БАРПО ЭТИШ- УСТУВОР МАҚСАДИМИЗДИР”** деб номланган Ўзбекистон Республикаси Олий мажлиси қонунчилик палатаси ва Сенатининг қўшма мажлисидаги маърузасида таъкидлаганидек 2009-2012 йилларга қўлжалланган Инқирозга қарши чоралар дастурини, унда кўзда тутилган иқтисодий-иқтисодий соҳанинг изчил ривожланишини, мамлакатда барқарорликни таъминлаш бўйича комплекс чора-тадбирларни амалга ошириш масалаларига алоҳида эътибор бериш керак (26- бет). Барчамиз бир оддий ҳақиқатни қатъий ва аниқ англаб олишимиз керак- бундан буён Ўзбекистон Экологик ҳаракати янги сифат босқичига кўтарилади, юксак депутатлик минбаридан туриб атроф-муҳитни муҳофаза қилиш масалаларини ўртага қўйиш ва назорат қилиш, инсонни ва мамлакат аҳолисини экологиянинг хавфли ҳамда тажовузкор ўзгаришларидан ҳимоя қилиш учун улкан имкониятларни қўлга киритади¹, (29- бет). Маърузада айтилган ушбу сўзлар биологлар, айниқса микро- ва биотехнологлар соҳаларида фундаментал ва амалий тадқиқотлар билан шуғулланаётган ҳар бир инсон учун дастуриламал бўлиши керак, чунки янги маҳсулотлар ишлаб чиқаришда самарали усулларни ишлаб чиқиш экологияни ҳимоя қилишга ёрдам беради.

Мустақиллик йилларининг дастлабки кунлариданоқ ёшларнинг билим ва ҳунар ўрганишларига энг муҳим, биринчи галдаги долзарб масала сифатида қаралди. Айниқса, “Таълим тўғрисида”ги қонун ва “Кадрлар тайёрлаш миллий дастури” қабул қилинган, бу борадаги ишларда ижобий натижаларга эришиб келинмоқда. “Кадрлар тайёрлаш миллий дастури” асосида амалга оширилаётган таълим соҳасидаги ислохотларнинг барча босқичларининг вазифалари муваффақиятли ҳал қилиниб келинмоқда.

Ўзбекистон Республикаси «Кадрлар тайёрлаш миллий дастури» [3] ва «Таълим тўғрисида»ги қонунда [4] жаҳон андозаларига жавоб бера оладиган мутахассислар тайёрлаш, шунингдек таълимнинг барча соҳаларини ислоҳ қилишни асосий вазифа қилиб белгилайди.

Бактериялар ҳам замбуруғлар билан бир қаторда ферментларнинг продуценти сифатида фермент саноатида ўзининг катта маъқеига ва аҳамиятига эга. Бу 1-дан: бактериал культураларнинг ўсиб-ривожланиши замбуруғларга нисбатан анча тезлиги билан тушунтирилса; 2-дан эса кўпгина бактериал ферментлар муҳитнинг рН ҳамда ҳарорат ўзгаришига турғун бўлишидир.

Ҳозирги вақтда бактериал амилазалар (ФК-3.2.1.) кўпроқ саноатнинг спирт, пиво ва кондитер маҳсулотларини ишлаб чиқариш соҳаларида, тўқимачилик ва тоғоз саноатида крахмални углеводларгача парчалаш мақсадида қўлланилади. Тоза ҳолда ажратиб олинган бактериал амилазалар эса тиббиёт, фармацевтика, озиқ-овқат ҳамда илмий изланишларда ҳам кенг қўлланилади. Крахмални мавжуд бўлган кимёвий гидролиз қилиш усулларида ферментатив усули бир қатор афзалликларга эга. Бу жараёнда иштирок этувчилар орасида бактерия ва микромицетлардан олинган ферментлар муҳим ўринни эгаллайди. Лекин α -амилазаларни ишлаб чиқаришда бир қатор муаммолар ўз ечимини топганича йўқ. Юқори фаолликка эга α -амилаза продуцентлари фермент препаратларини технологик ва самарали олиш, барқарорлаштириш усуллари яратиш жуда ҳам зарурдир.

Шунинг учун, саноатда биологик фаол моддаларга бўлган талаб ортиб бормоқда ва микроорганизмлардан фермент препаратларини ишлаб чиқариш, уларнинг потенциал манбалари сифатида фойдаланиш уларнинг долзарб жанлигидан далолат беради. Саноатнинг турли тармоқларида α -амилаза ферментини қўлланилиши ҳам Республикамизда асосий ўринлардан бирини эгаллайди. Турли технологик жараёнларда микроб амилазасини қўллаш, республикамиздаги ишлаб чиқариш шароитларида амалга ошириш, фермент ишлаб чиқаришнинг маҳаллий технологияларини яратишни талаб этади ҳамда валютани тежайди ва ишлаб чиқаришнинг иқтисодий самарадорлигини оширади.

Шунга қарамасдан, Ўзбекистонда фаол, α -амилазанинг юқори фаолликка эга продуцентлари ва улардан олинадиган юқори даражадаги тоза ферментларни ишлаб чиқариш йўлга қўйилмаган ва маҳаллий саноатнинг уларга бўлган талаби қоридан импорт қилиш йўли билан қондирилмоқда. Бунинг учун мамлакатимизда фермент саноатини ривожлантириш, юқори фаол фермент продуцентлари - микроорганизмлар штамmlарини ажратиш, уларнинг хусусиятларини ўрганиш, фаол фермент препаратларини олишнинг янги технологияларини яратиш ва уларни амалиётда қўллашдир.

Bacillus авлодига мансуб бактериялардан микроб амилазаларини синтез қилиш жараёнларини ўрганишнинг муҳим томони шундаки, бу фермент сифатли спирт маҳсулоти олишда дастлабки ишлов беришда қўлланиладиган энг муҳим ферментлардан бири ҳисобланади. Унинг бу хусусияти саноат, қишлоқ хўжалиги, тиббиёт, биотехнология ва бошқа тармоқларда кенг қўллаш имкониятларини очиб беради. Таъкидлаш жоизки, амилаза препарати илмий тадқиқотларда, тиббиётда ва фармацевтикада кенг қўлланилади, шунинг учун ҳам ҳозирги вақтда тоза препаратларга бўлган талаб янада ортмоқда.

Тадқиқотнинг ўрганилганлик даражаси микроб ферментлари орасида α -амилаза ферменти кўпроқ ўрганилган, шунга қарамасдан ушбу ферментнинг фаол продуцентларини ишлаш ва улардан фермент препаратларини алоҳида ажратиш ҳамда тозалаш нисбатан кам ўрганилган бўлиб, ҳозирги вақтда ушбу ишлаб чиқаришга тадбиқ этиш тўлиқ йўлга қўйилмаган. Бу амилазани махсус мақсадлар учун янада тозароқ ажратиб олиш, кенгроқ қўлланилиш истикболларини очади. Амилаза ферменти крахмални ферментатив парчалайдиган ноёб ферментлардан ҳисобланганлиги учун уни синтез қилиш ва амалиётда қўллаш мақсадида 50-60 йиллардан бошлаб жаҳон бўйича анча илмий изланишлар олиб борилган. Крахмални парчаловчи микроб ферментлари бўйича жуда кўп патентлар, ажтиролар, дарслик ва илмий мақолалар жамланган. Бу йўналишда жаҳон олимларидан Грачева, Мишустин, Шлегель, Мосолов, Прист, Павлова, Квеситадзе, Глемжи, Pandey, Иерусалимский, Wellington Cristina Almeida do Nascimento, Жеребцов, Алиханян, Безбородов, илмий ишлар олиб борган. Ватанимиз

Ўзбекистонда ҳам амилаolitik ферментларни синтез қилиш ва уни амалиётда қўллаш борасида жуда катта ишлар қилинган ва ҳозирда ҳам бир қанча ишлар олиб боришмоқда, бу борада ЎзР ФА Микробиология, Ўзбекистон Миллий Университети олимларидан Холмуродов А.Ғ., Рахимов М.М., Давронов Қ.Д., Ахмедова З.Р., Махсумханов А.А., Нурматов Ш.Х., Нормуродова Қ.Т.ларнинг хизматларини алоҳида таъкидлаш керак.

Шу муносабат билан бу йўналишда истиқболли объектлардан бири *Bacillus* авлодига мансуб бактериялардир.

Тадқиқотнинг объекти: *Bacillus* авлодига мансуб бактериялардан фаол ва маҳсулдор амилаза ферментини ажратиш олиш.

Тадқиқот мақсади. α -Амилазанинг юқори фаолликка эга продуцентларини *Bacillus* авлодига мансуб бактериялардан скрининг қилиш.

Тадқиқот вазифалари:

1. *Bacillus* авлодига мансуб бактериялар орасидан α -амилазасининг фаол продуцентларини қидириш ва танлаб олиш;
2. Ажратиш олинган фаол α -амилаза биосинтезига ташқи омилларнинг таъсирини ўрганиш.

Кутиладиган натижа: амалиётда крахмал парчаловчи фаол амилаза фермент продуценти танлаб олинади ва ишлаб чиқариш қархоналарига тавсия этилади.

Тадқиқотнинг методлари: Бактериал микроорганизмлардан крахмал парчаловчи амилаза ферменти продуцентларини танлаб олиш аналитик ва биохимик ва биокимёвий усуллари билан қилинади.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги: α -Амилазанинг юқори фаолликка эга продуцентлари *Bacillus* авлодига мансуб бактериялардан скрининг қилинди ва танлаб олинди. Ажратиш олинган фаол α -амилаза биосинтезига ташқи омилларнинг таъсири ўрганилди.

Тадқиқотнинг амалий аҳамияти: Крахмалли маҳсулотларни парчалаб турли қил озуқа маҳсулотлари олинади, ўзига хос бўлган гидролизлаш хусусияти уни биотехнология ва тиббиётда қўллаш имкониятларини очади. Бундан ташқари

сифатли ва самарали спирт ишлаб чиқаришда, қандолатчиликда эса конфетлар учун патекалар олишда ферментатив ишлов беришда иш унумдорлигини оширади. Ишлаб чиқариш шароитида α -амилазанинг ҳам комплекс фермент препарати, ҳам тозаланган фермент препаратлари ишлатилади. Асосан суюқ ферментатив препаратлар саноатнинг ишлаб чиқариш шароитларида қўлланилади. Бугунги кунда амилolitik фермент препаратларидан Даниянинг "Термомил" ферменти энг фаол фермент препаратларидан бири ҳисобланади ва дунё бўйича етакчилик қилади.

Диссертация иши кириш, адабиётлар таҳлили, асосий қисм, хулосалар ва фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат.

1.1. Микроб α -амилаза продуцентлари ҳақида умумий тушунча ва уларнинг тарқалиши

Маълумки, инсонлар қадим замонларда биологик катализаторларни бижгиш жараёнлари қаторида фойдаланиб келишган, биологик катализнинг илмий тушунчаси ва вазифаси эса ферментларнинг кенг кўламда шллатилишидан далолат беради. Шунингдек, асосан амилolitik ферментлар шллок хўжалиги, енгил ва кимёвий саноати, амалий тиббиёт ва ҳақозаларда шллатилади (Галич И.П., 1987).

Амилolitik ферментлар ферментлар комплекси табиатига кўра энг кенг тарқалган ферментлардан бўлиб, ҳайвон, тубан ва юксак ўсимликлар ҳужайра ва ўқималарида, ҳамда микроорганизмларда учрайди. Улар жуда катта гуруҳларни шлшил этиб, нафақат крахмалга гидролитик таъсир қилувчи, балки крахмал шлловчи поли- ва олигосахаридлар, полимер субстратларнинг структураларига ҳам таъсир қилади. Амилазанинг 3 та энг машхур турлари мавжуд: альфа-амилаза (КФ-3.2.1.1; эндо -1.4 - α - D - глюкоан глюкогидролаза), бетта (КФ-3.2.1.2; 1.4 - α - D - глюкоан мальтогидролаза) ва глюкоамилазалар (КФ-3.2.1.3; экзо -1.4 - α - D - глюкоан глюкоаногидролаза) [45-50].

Микроб амилазаларининг энг кўп тарқалган продуцентлари қуйидагилар: *Aspergillus* sp., *As. niger.*, *As. oryzae.*, *As. flavus.*, *Bacillus* sp., *Bs. Subtilis.*, *Bs. amyloliquefaciens.*, *Bs. Licheniformis.*, *Bs. megaterium.*, *Bs. Stearothermophilis.*, ва бошқалар.

Микроорганизмларда амилаза ва глюкоамилазалар нисбатан кенг ёритиб берилган. Бетта амилазалар эса асосан ўсимликларда учрайди, шунингдек бир неча лексинмик гуруҳлари микроорганизмлардан ҳам ажратилган (Pandey, 2000).

α -Амилаза асосан замбуруғ ва бактериал микроорганизмларда тарқалган. Бактериялар орасида қуйидаги продуцент сифатида ажралиб туради: *Bacillus subtilis* (Helow et al., 1996), *Bacillus licheniformis* (Tonkova et al., 1994), *Bacillus*

polymyxa (Fogarty., 1990), *Bacillus amyloliquefaciens* (Milner et al., 1997), *Bacillus flavothermus* (Kelly et al., 1997) ва бошқалар.

Микроскопик замбуруғлар орасида биосинтезига мойиллиги асосан *Aspergillus* авлодигамансуб замбуруғларда ва камроқ миқдорда *Rhizopus* ҳам киради. Қора аспергиллар қаторини *A. Niger* ташкил этиб, озуқа муҳит ичига экилганда нафақат амилаза, балки глюкоамилаза ва трансглюкозилазалар синтез қилади. Бошқа продуцентлар орасида кислотастабил амилазаларни Америка коллекцион культураларида мавжуд бўлган *Phaecilomyces varioti* TPR-200 лар ҳам эжори фаолликни намаён қилади. α -Амилаза ушбу культуралардан ажратилган бўлиб, ферментнинг оптимум рН муҳити 4.0-4.5 ни ташкил этса, стабиллиги эса рН 3.5 дан 9.0 гача бўлади. Бундай ферментлар асосан истиқболли энзимотерапияда шокозон суюқлигининг кислоталиги ошган шароитларда қўлланилади [32-38].

Унчалик катта бўлмаган амалий қизиқиш бактерия ва замбуруғлар орасида бўлиб, α -амилазанинг 4 та типи кенг ишлатилади: булар α -амилаза *Bacillus subtilis* оптимум таъсир этиш рН муҳити 6.0, *A. oryzae* оптимум таъсир этиш рН муҳити 4.7, термофиль бактериял α -амилазалар ва кислотастабил қора аспергилли α -амилазалардир. α -Амилазанинг охирги икки формаси – термостабиль бўлиб, 70-90 °С да ишлайди ва кислотали шароитда рН муҳити 2.5-3.0 да фаоллигини йўқотмаган тарзда крахмални парчалаш хусусиятига эга, шунингдек бошқа фермент препаратлари, маълум амилаза ферментлари худди шундай шароитда ўзининг каталитик хусусиятларини йўқотади [40-44].

Тажриба натижаларига асосан 3 турдаги микроорганизмларнинг (бактериялар, замбуруғлар, ачитқилар) биомасса ҳосил қилишининг ўсиш тезликлари текширилган. Микроб популяцияларининг зичлик поғоналари текширилган, тавсиф саналари, уларнинг баҳоси ва бошқа параметрлари, яъни культурани экиш ҳажми, ўсиш тезлигининг нисбатлари, абсолют куруқ модданинг биомасса концентрацияси, ферментацияланиш давомийлиги, ферментация хусусияти, биомасса синтезининг тезлик константалари каби параметрлар ўрганилган [24-31].

Олиб борилган тадқиқот натижаларига кўра микробларнинг ўрганилганлик даражасимикроорганизмлардан ажратиб олинadиган ферментлари орасида амилolitik ферментлар, яъни α -амилаза ферменти кўпроқ ўрганилган ва саноатда энг кўп ишлатилади, шунга қарамасдан амилolitik ферментнинг фаол продуцентларини скрининг натижасида танлаб олиш, ишлаш ва улардан фермент препаратларини алоҳида ажратиш ҳамда тозалаш нисбатан кам ўрганилган. Шунинг учун ҳам ҳозирги вақтда ушбу ишлаб чиқаришга тадбиқ этиш тўлиқ йўлга қўйилмаган. Бу амилазани махсус мақсадлар учун янада тозарoқ ажратиб олиш, кенгроқ қўлланилиш истиқболларини очади ва бу борада кенгроқ илмий изланишларни талаб этади. Амилаза ферменти крахмални ферментатив тарчалайдиган ноёб ферментлардан ҳисобланганлиги учун уни синтез қилиш ва амалиётда қўллаш мақсадида 50-60 йиллардан бошлаб жаҳон бўйича анча илмий изланишлар олиб борилган. Крахмални тарчаловчи микроб ферментлари бўйича жуда кўп патентлар, ихтиролар, дарслик ва илмий мақолалар жамланган. Бу бўналишда Дания, Украина ва Япония давлатлари олимлари ва компаниялари етакчилик қилади, жумладан Pandey, Грачева, Мишустин, Шлегель, Мосолов, Прист, Павлова, Квеситадзе, Глемжи, Иерусалимский, Wellingtona Cristina Almeida do Nascimento, Жеребцов, Алиханян, Безбородовларни бунга мисол тариқасида фахр билан кўрсатиш мумкин [5-12]. Ватанимиз Ўзбекистонда ҳам амилolitik ферментларни синтез қилиш ва уни амалиётда қўллаш борасида ЎзР ФА Микробиология, Ўзбекистон Миллий Университети олимларининг хизматларини алоҳида тақсинга сазовор.

Шундай қилиб, ишлаб чиқаришни ошириш ва сифатини яхшилаш микробиологик ҳамда битехнологик кўринишдаги ишлаб чиқаришларда кўтарилиш микробпопуляция зичлиги орқали ва уларни тхҗри экиш орқали амалга оширилади.

1.2. Микроб амилазаларнинг таъсир қилиш механизмлари ва уларнинг таркибий қисми

Қишлоқ хўжалик маҳсулотларининг асосий қисмини крахмал ташкил этади. Бундай субстратларга маккажўхори, буғдой, гуруч, картошкалар киради ва улар қишлоқ хўжалиги қуруқ массасининг 60 % дан 75 % ни гидролизланувчи крахмал ташкил этади.

α -Амилаза 1.4- α -D эндо глюкозид боғларини чизикли занжирдаги амилоза бирликларига парчалайди (Квеситадзе, 1984).

Бактериялар крахмални шакарланиш ва катта бўлақларга бўладиган α -амилазани синтезлайди. Шакарланиш ва бўлақлаш амилазалар крахмални парчалаш механизмлари билан бир-биридан фарқ қилади [13-16].

Маълумки, крахмал α -D-глюкозадан ташкил топган биополимер бўлиб, полимерланган формадаги йирик макромолекулалардан ташкил топган. Крахмал ўсимлик организмида эримайдиган гранулалар кўринишида (буғдой, гуруч, арпа), крахмалга бой уруғларда, картошкада бўлади. Крахмал иккита полимердан - амилоза ва амилопектиндан ташкил топган. Бундай полимерларнинг 70 % ни амилопектин, 30 % ни эса амилоза ташкил этади. Амилоза молекуласида глюкоза қолдиқлари глюкозид боғларининг 1.4 атомлари билан ўзаро боғланган. Амилопектин молекуласида глюкоза қолдиқларинафақат глюкозид боғларининг 1.4 боғларини, хатто 1.6 атомлари билан ҳам боғланган[45].

Ўртача бўлинувчи занжир узунлиги 20-25 та глюкозид боғларидан ташкил топган. Амилопектиннинг молекуляр массаси 10^8 гача, бу макромолекула табиати жиҳатидан юқори молекулярликка эгадир.

Крахмал гранулалари овалсимон, сферик ёки нотўғри шакланган формада, ўлчами 1дан 100 мМгача бўлади. Гранулалар Н-боғлари билан турғунлашган бўлиб, бу нурланиш аниқ бўлмаган сув миқдорини ҳосил қилади.

Анъанавий крахмал гидролизи учун кислота ишлатилади, натижада ислотали гидролиз декстрин ва глюкозагача парчалаб олинади. Ферментатив гидролизнинг

ўзига хос қонун-қоидалари мавжуд. Масалан, ферментларнинг махсус специфик таъсири шакарли, қандли сиропни ўзига хос таъмли хусусиятига кўра ишлаб чиқарилади. Ҳақиқатан ҳам крахмални ферментатив деградациялаш кўпроқ глюкозали сироплар ишлаб чиқариш учун ишлатилади [16-21]. Крахмални ферментатив деградациялашда қуйидаги ферментлар иштирок этади (1-расм).

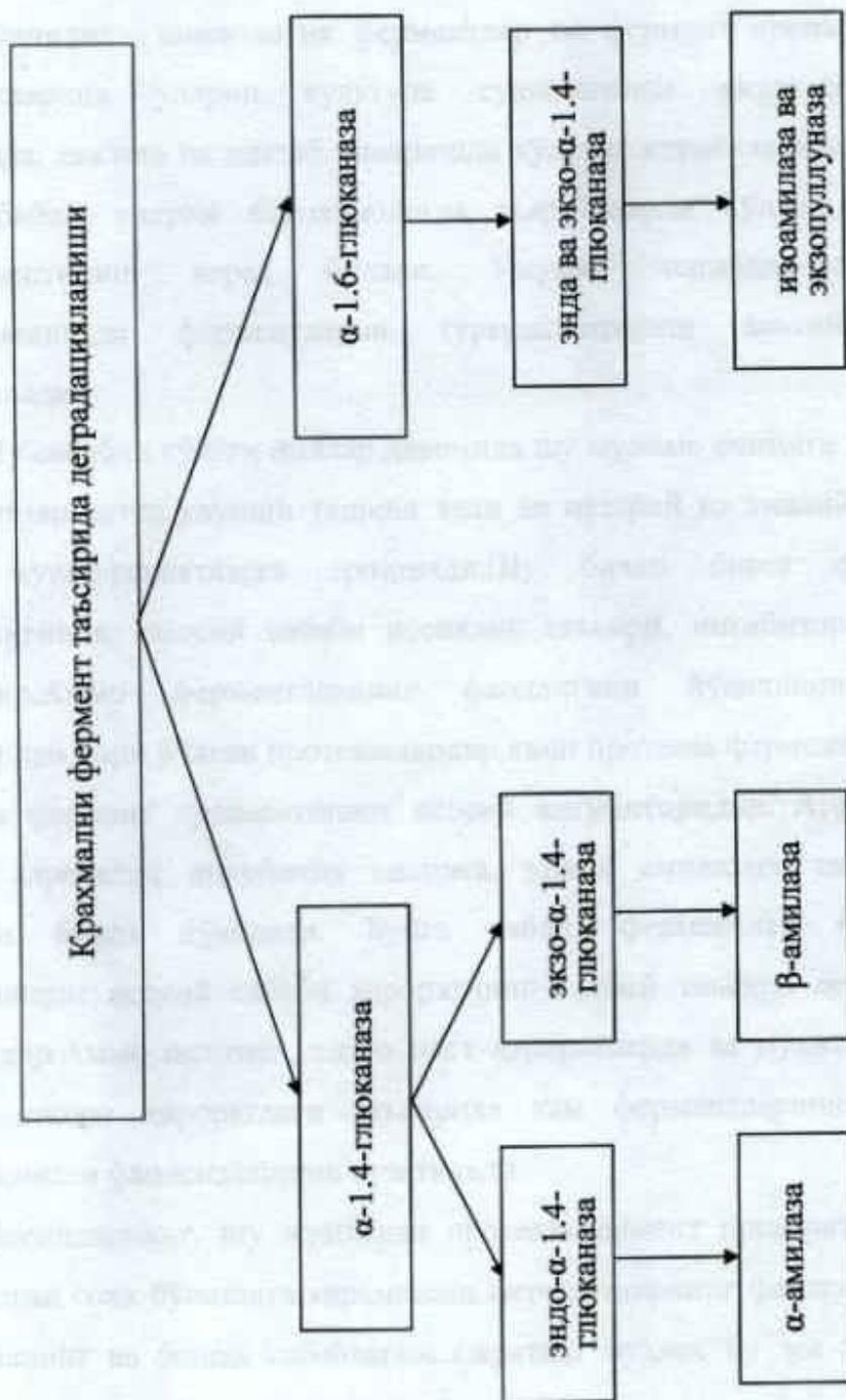
Крахмални кислотали ва ферментатив гидролизлаш – озиқ-овқат кичик қархоналарида, крахмал сақловчи маҳсулотларни қайта ишлашда техник ишлов бериш жуда муҳим ҳисобланади.

Бинобарин, крахмални гидролизлаш хусусиятини танлаш маҳсулот ишлаб чиқаришда намаён бўлади. Крахмалли маҳсулотлар билан ишлайдиган заводларда патикалар олишда, озиқ-овқат ва кристалл глюкозаларнинг асосий гидролиз хусусияти кислотали ва кам миқдорда ферментатив ёки комбинирланган, кислота-ферментатив таъсир этади.

Пива ва сифатли спирт ишлаб чиқаришда крахмални ферментатив гидролизга учратиб олинади. Бундай танлов озиқ-овқат маҳсулотларини технологиянинг махсус хусусиятлари билан боғлиқ бўлиб, қандолат маҳсулотлари учун патикалар олишда глюкозалар физик-кимёвий жараёнларда муҳим роль ўйнайди.

Маълумки кислотали гидролиз крахмални глюкозагача қийин шароитда (юқори H^+ ионларининг концентрацияси, юқори ҳарорат) олиб борилса, ферментатив гидролиз эса енгил шароитда кечади (Жеребцов, 1995). Крахмални модификациялаш одатда водород хлорид ёки сульфат кислотадан фойдаланиб ишлаб чиқарилади.

1-расм. Крахмални дeгpадацияланишида иштирок этадиган ферментлар.



Ҳозирги вақтда крахмални деградациялашда қуйидаги ферментлардан фойдаланилади:

α -Амилаза - крахмални гидролизлашда крахмал сақловчи субстратлардан озиқ-овқат этил спиртини олиш учун қандли сироп ва пиво ишлаб чиқаришда ишлатилади.

Кўпчилик амилolitik ферментлар ва фермент препаратлари ўз фаолликларини уларни культура суюқлигидан ажратиб олишда, тозалашда, сақлаш ва ишлаб чиқаришда қўллаш жараёнларида йўқотади. Шу сабабли уларни биотехнологик жараёнларда қўллашдан олдин турғунлаштириш керак бўлади. Умуман олганда ферментлар муҳандислигида ферментларни турғунлаштириш асосий муаммо ҳисобланади.

Шу сабабли сўнгги йиллар давомида шу муаммо ечимига қаратилган тадқиқотлар катта улушни ташкил этди ва назарий ва амалий жихатдан қатор муваффақиятларга эришилди. Шу билан бирга ферментлар турғунлигининг асосий сабаби иссиқлик таъсири, ингибиторлар ва рН муҳитдир. Аммо ферментларнинг фаоллигини йўқолишига асосий омиллардан бири бўлган протеазалардир, яъни протеаза фермент препарати амилаза фермент препаратининг асосий ингибиторидир. Агар протеаза юқори ҳароратда инкубация қилинса, унинг амилазага таъсир этиш жараёни бироз йўқолади. Бунга сабаб, ферментлар фаоллигини йўқотишнинг асосий сабаби ҳароратнинг салбий таъсири деган хулоса ўринлидир. Аммо оптимал, ҳатто паст ҳароратларда ва муҳитнинг қисқа вақтли юқори ҳароратдаги таъсирида ҳам ферментларнинг протеаза натижасидаги фаолсизланиши кузатилади.

Оқсилларнинг, шу жумладан протеазафермент препаратлари яхши ўрганилган соҳа бўлишига қарамасдан ферментларнинг фаолсизланишида протеазанинг ва бошқа сабабларни ажратиш муҳим. Бу эса амилolitik

ферментларнинг маҳсулотларни нормал даражада гидролизлашига салбий таъсир курсатади.

Демак биринчи навбатда маҳсулотларга амилолитик ишлов беришда аввал протеолитик ферментлар омилини тўғри баҳолаш зарур. Бошқа томондан ферментларни протеазага қарши ҳимоя қилиш муаммоси назарий ва экспериментал тадқиқотлар ўтказишни талаб қилади. Бунда протеолитик омил аҳамиятини тўғри баҳолаш билан бирга ферментларни ажратиш, тозалаш, сақлаш ва қўллаш жараёнларида ҳимоя қилиш чораларини топиш керак.

Маълумки амилаза сақловчи фермент препаратлари амалиётда кенг қўлланилади. У амилаза, амилопектин ва бошқалардаги глюкозид боғларни гидролизлайди. Шу сабабли фермент фаоллигининг пасайишини олдини олиш мақсадида ферментлар табиий ингибитори бўлган протеазадан ва қушимча моддалар, яъни оксиллардан тозаланади, ишлаб чиқаришга тавсия этилади. Шундагина амилолитик ферментларнинг таъсир этиш жараёни ва гидролизлаши осон ва тез, ҳамда самарали бўлади.

1.3. Амилолитик ферментларнинг саноатда қўлланилиши

Бугунги кунда саноатда биологик фаол моддаларга, биологик катализаторларга бўлган талаб кундан кунга ортиб бормоқда. Бу микроорганизмлардан фермент препаратларини ажратиш, тоза ҳолда ишлаб чиқариш, уларнинг потенциал манбалари сифатида фойдаланиш даркорлигидан далолат беради. Саноатнинг турли хил тармоқларида α -амилаза ферментини ишлатилиши Республикамизда юқори ўринлардан бирини эгаллайди. Турли технологик жараёнларда микроблардан ажратиб олинган амилаза ферментларини қўллаш, уларни мамлакатимиздаги ишлаб чиқариш шароитларида амалга ошириш ва фойдаланиш фермент ишлаб чиқаришнинг маҳаллий янги замонавий технологияларини яратишни талаб этади. Бу ўз навбатида миллий валютамизни тежайди ва ишлаб чиқаришнинг иқтисодий самарадорлигини юқори савияга оширади.

Ҳозирги вақтда бактериал амилазалар (ФК-3.2.1.1.) кўпроқ саноатнинг спирт, пиво ва кондитер маҳсулотларини ишлаб чиқариш соҳаларида, тўқимачилик ва қоғоз саноатида крахмални углеводларгача парчалаш мақсадида қўлланилади. Тоза ҳолда ажратиб олинган бактериал амилазалар эса тиббиёт, фармацевтика, озиқ-овқат ҳамда илмий изланишларда ҳам кенг қўлланилади. Крахмални мавжуд бўлган кимёвий гидролиз қилиш усулларида ферментатив усули бир қатор афзалликларга эга. Бу жараёнда иштирок этувчилар орасида бактерия ва микромицетлардан олинадиган ферментлар муҳим ўринни эгаллайди. Лекин α -амилазаларни ишлаб чиқаришда бир қатор муаммолар ўз ечимини топганича йўқ. Юқори фаолликка эга α -амилаза продуцентлари фермент препаратларини технологик ва самарали олиш, барқарорлаштириш усуллари яратиш жуда ҳам зарурдир.

Техник ва тозаланган фермент препаратлари озиқ-овқат, енгил саноат, кимёвий ва микробиологиянинг турли тармоқларида қўлланилади,

шу билан бирга кишлок хўжалигида махсулотлар ҳажмини кўтаради, уларнинг сифатини оширади ва ассортиментини кенгайтиради, камёб махсулотларни тежайди, ишлаб чиқариш самарадорлигини яхшилашда ишлатилади.

Сўнги йилларда иммобилизацияланган ферментларни кўп маротаба ишлатиш ва стабилизациялаш усуллари ишлаб чиқилган. Бу энзимология муҳандислигининг янги йўналишини яратади. Келгусида бу йўналиш юқори сифатли тозаланган ферментларни олиш ва уларни қўллашнинг энг муҳим кўрсаткичларидан бири ҳисобланади.

Гидролитик микроб ферментлари, яъни липаза, α -амилаза, β -амилаза, целлюлоза, β -галактозидаза асосан ёғларни, крахмалларни, целлюлоза ва лактозалар ўрнини босувчи сифатида ишлатилади. Амилазалар, целлюлозалар, гемицеллюлозалар, пектиназалар ва протеазалар таблеткалар ишлаб чиқаришда уларнинг тезлигини ошириш мақсадида ишлатилиши мумкин.

Aspergillus sp. ва *Basillus* sp. мансуб бактерия ва замбуруғлар амилolitik ферментларнинг энг фаол продуцентлари ҳисобланади, яъни бактериялар ҳам замбуруғлар билан бир қаторда ферментларнинг продуценти сифатида фермент саноатида ўзининг катта мавқеига эга. Бактериал культураларнинг ўсиб-ривожланиши замбуруғларга нисбатан анча тез, кўпгина бактериал ферментлар муҳитнинг рН ҳамда ҳарорат ўзгаришига турғун бўлади.

Ҳозирги вақтда крахмал парчаловчи бактериал амилазалар бир қанча саноат миқёсларида, спирт, пиво ва кондитер махсулотларини ишлаб чиқариш соҳаларида, тўқимачилик ва қоғоз саноатида крахмални углеводларгача парчалаш мақсадида, кир ювиш воситаларида, нон махсулотлари тайёрлашда, чиқиндиларни йўқотиш мақсадида кенг қўлланилади. Грачева (1987), Квеситадзе (1990), Глемжи (1995), Pandey (2000), Wellington Cristina Almeida do Nascimento (2003), Безбородов (2010)

кабиларнинг олган натижаридан ҳам амилolitik ферментларнинг саноат миқёсида қўлланилиб, тонналаб маҳсулотларни тежашлигини гувоҳи бўлиш мумкин. Шу билан бирга, хом-ашёларнинг кенг қўлланилиши ва ҳар бир маҳсулотларни қайта ишлашда фермент препаратларини танлаш чуқур талаб этилади.

Тоза ҳолда ажратиб олинган бактериал амилазалар эса тиббиёт, фармацевтика, озиқ-овқат ҳамда илмий изланишларда ҳам кенг қўлланилади. Шунга қарамасдан α -амилазаларни ишлаб чиқаришда бир қатор муаммолар ўз ечимини топганича йўқ. Юқори фаолликка эга α -амилаза продуцентлари фермент препаратларини технологик ва самарали олиш, барқарорлаштириш усулларини яратиш жуда ҳам зарурдир.

Пиво ишлаб чиқаришда 30-50% арпа солодини олишда амилolitik фермент препаратлари бўливчи ва шакарланиш даражасигача парчалайди (оптимал шароитда замбуруғ амилазаси 50 °С, рН муҳити 4.5-5.5, бактериал эса 70-90 °С, рН муҳити 6.0-7.0).

Нон маҳсулотлари тайёрлашда ҳам замбуруғ ва бактериал амилазалар ишлатилади ва улар уннинг тез етилишини, клейстрланишини, нон сифатини оширади.

Тўқимачилик саноатида амилolitik фермент препаратлари билан ишлов беришда фермент препаратларидан ташқари қисман протеолитик фермент препаратлари ҳам ишлатилади, яъни қоғоз сифатини яхшилаш, мато пишиқлигини ва зичлигини оширишда кенг қўлларилади. Амилolitik ферментлар крахмални парчалашда иш унумини 7-10 мартага оширади, кимёвий ишлов берилганга қараганда.

Қишлоқ хўжалигида фермент препаратлари чорвачиликда, паррандачиликда, ем-хашак ишлаб чиқаришда ишлатилади. Бузоқларнинг ем-хашакларига ферментатив ишлов берилса, уларнинг ўсиши тезлашади, оғирлиги тез ортади, сут миқдори кўпаяди, товукларнинг тухум қўйиш сифати ортади, маккажўхоридан сифатли селослар олинади ва ҳакозалар.

Тиббиёт ва клиникаларнинг баъзи бир жараёнларида ҳам амилза фермент препарати ишлатилади. Каттонва бошқалар 1999 йилда тиббиётда ишлатиладиган микробларнинг 13 тасини аниқлаган, яъни зардоб эволюциясида амилазалар иштирокида олиб борилган. Лепп ва бошқалар эса суюқ-стабил реагент сақлаган альфа амилазалар янги кимёвий анализатор сифатида қўлланилган. Суюқ-стабил реагентлар клиник кимё системаида Бекс томонидан 1999йили ва Гирри томонидан 1990 йили юқори олигосахаридларни парчалаш жараёнларида амилазаларни қўллаш борасида илмий ишлар олиб боришган. Ушбу усул нисбатан самарали, шу билан бирга сезгирлиги ҳам юқори ҳисобланади. Бошва ферментлар орасида бетта амилазава люкоамилазалар хитозан ишлатишда гибрид мембраналар тайёрлашда фойдаланилган.

Австралияда таркибида протеаза, амилаза, целлюлоза, липаза, бацилус субтилис споралари сақлаган янги “активизим” фермент препарати синовдан ўтказилди. Уни гўшт-корхоналарида тозаловчи сифатида ишлатиб кўришди ва синовдан муваффақиятли ўтди.

Шунинг учун, саноатда биологик фаол моддаларга бўлган талаб ортиб бормоқда ва микроорганизмлардан фермент ишлаб чиқариш, уларнинг потенциал манбалари сифатида фойдаланиш уларнинг долзарб эканлигидан далолат беради.

Бугунги кунда энг сифатли фермент препаратлари Даниянинг “Ново-нордикс” фирмасининг субтилини, термабил фермент препаратлари етакчилик қилса, Украинанинг “Даниско” фирмасининг кўплаб фермент препаратлари кондитер ва сифатли спирт ишлаб чиқаришди қўлланилади. Ушбу фирмаларнинг фермент препаратлари ўзининг юқори сифати ва юқори ҳароратга чидамлилиги билан ҳам ажралиб туради. Шунинг учун ҳам спирт ишлаб чиқаришда аввал 40-50 °С да ишлайдиган фермент билан ишлов берилса, иккичи босқичда 80-90 °С да ишлайдиган глюкоамилазалар

билан ишлов берилади. Амилолитик ферментлар саноатда энг кўп ишлатиладиган фермент препаратлари гуруҳига киради.

Амилолитик фермент препаратлари (альфа, бетта, глюкоамилазалар) ферментларнинг энг катта гидролиза (КФ 3.2.1.1) синфига киради, яъни ушбу ферментлар сувли шароитда ўз фаолиятини намаён этади, ҳамда хом – ашёгани тезда деградацияга учратади. Ҳозирги пайтда крахмалли хом ашё гидролизида, шунингдек, саноатнинг турли тармоқларида кенг қўлланилади. А-амилаза амилоза, амилопектин, мальто-олигосахаридлардаги гликозид боғларини гидролизлайди. Амилазанинг иммобилизацияланган шакллари уларни ишлаб чиқариш бир неча мартаба ишлатиш имкониятини беради ва глюкоза олишдаги самарадорлиги юқори эканлигидан далолат беради.

Амилазаларни ажратиш, тозалаш, сақлаш ва ишлатиш жараёнларида уларнинг фаоллик даражасининг пасайиши борасида кўплаб тадқиқотлар олиб борилган. Шунингдек, уларни модификациялаш ва иммобилизациялаш йўли билан барқарорлаштиришга турли ёндашувлар таклиф қилинган. Шу билан бирга, уларнинг активсизланиши ва беқарорлашувининг асосий сабаби тўлиқ аниқланмаган. Бу асосан ҳарорат омилига боғлиқ бўлиши мумкин, деган фикрлар мавжуд. Дарҳақиқат, уларнинг юқори ҳароратга чидамлилиги паст, мусбат ҳароратларда уларнинг инактивацияланиши совуқда сақланганда, оператив шароитларда (масалан, крахмал гидролизланишида)гига қараганда анча юқори, улар пастеризациялаш ҳароратида ва ундан юқорида фойдаланишга яроқсиз бўлиб қолади (крахмални гидролизлаш бўйича технологик жараёнларга микробактериал ҳимоя сифатида шундай талаб қўйилади). Ҳақиқий биотехнологик жараёнларда тозаланиш даражаси нисбатан юқори бўлмаган амилаза препаратларидан фойдаланиши туфайли улар таркибида жуда кўплаб бошқа қўшимчалар, шу жумладан ҳамроҳ протеазалар мавжуд.

Маълумотларга қараганда, нордон протеазалар *Asp. awamori* дан кўплаб амилаза шакллари ҳосил бўлишида иштирок этади ва унинг чекланган гидролизланишига олиб келади, амалда бу уларнинг умумий активлигини ўзгартиради ва маълум даражада сақлаш учун барқарорлигини ва иссиққа бардошлилигини оширади. Шунинг учун мазкур ишнинг дастлабки босқичида препаратларда мавжуд нордон протеазаларнинг амилаза бекарорлашувидаги ролини аниқлаш даркор бўлади.

Амилолитик ферменлар асосан кўплаб микроорганизмлар, шу жумладан замбуруғлардан *As. niger*, *As. awamori*, *As. oryzae*, бактериялардан *Bacillus subtilis*, *B. lichiniformis* лардан синтезланади. Тадқиқот ишимизда қўлланиладиган штаммнинг (Ўзбекистон Республикаси ФА Микробиология институти коллекциясидан) ўзига ҳос хусусияти унда ҳам ундаги амилолитик ферментлар миқдорининг юқорилиги бўлиб, бу ўз таркибига кўра мураккаб субстратларга ферментатив ишлов беришда, масалан, озиқ-овқат саноатида қўлланилиши учун муайян афзалликларга эга. Шу билан бирга, бу фермент препаратлари уни культурал суюқликдан умумэтироф этилган методика бўйича олганда етарлича барқарор бўлса-да, сақлашда барқарорликни анча йўқотади, шунингдек крахмални гидролизлашда препаратлар амилолитик фаоллиги тезроқ пасаяди, яъни бундай препарат оператив барқарорлик бўйича (реакцияларни ўтказганда) технологик талабларга тўлиқ жавоб бермайди.

Хулоса қилиб айтадиган бўлсак, фермент препаратларининг муҳим вазифалари товаккалсиз иш самарасини оширади, қишлоқ хўжалигининг турли тармоқларида ва ишлаб чиқаришда кенг фойдаланилади. Кўпчилик фермент ва фермент препаратлари ўз фаоллигини уларни олишда, сақлаш ва қўллаш жараёнида йўқотганлиги сабабли уларни биотехнологик жараёнларда қўллашдан олдин оптимал турғунлиги аниқ бўлиши керак бўлади. Умуман олганда ферментлар муҳандислигида

ферментларфаоллигини турғунлаштириш асосий муаммо ҳисобланиб, амилаolitik фермент препаратлари ҳам техник, ҳам юқори сифатли тоза ҳолда олинганларига талаб катта бўлади. Саноатнинг турли тармоқларида α -амилаза ферментини қўлланилиши Мамлакатимизда ҳам юқори ўринлардан бирини эгаллайди. Турли технологик жараёнларда микроб амилазасини қўллаш, республикаимиздаги саноат тармоқларининг ишлаб чиқариш шароитларида амалга ошириш, фермент ишлаб чиқариш миллий валютазмини тежайди ва ишлаб чиқаришнинг иқтисодий самарадорлигини оширади.

ТАЖРИБАЛАР ВА УЛАРНИНГ МЕТОДИКАСИ

2.1. Объектни текшириш ва ўстириш усуллари.

Ишни олиб боришда *Bacillus* авлодига мансуб 8 бактериал штаммлардан фойдаланилди. Олинган бактериал культуралар пептонли агар косякларига экиб ўстирилди ва 4 °С ҳароратда сақланиб, янги косякларга вақти-вақти билан кўчирилди.

Бактериялар 250 мл стандарт колбаларда 50 млдан пептон, бугдой уни ва ҳар хил минерал тузлардан ташкил топган оптимал озуқа муҳитида ўстирилди. Бошланғич рН муҳити 6.5, ҳарорат 32 °С, ўстириш вақти эса 60-72 соатни ташкил этади.

Крахмални гидролизлашига юқори фаол продуцентларни ажратиш учун петри чашкасига 1% ли яхши клейстерланган крахмал кўйилди. Бактериал колониянинг атрофи клейстр гидролизига кўра рангсиз зона ҳосил қилади. Петри чашкасига йод эритмаси томизилганда озуқа муҳит кўк рангга бўялади. Гидролиз декстринларгача давом этган бўлса рангсиз зона кизил-кўнғир тусга бўялади ёки крахмал тўлиқ парчаланган бўлса сарик ва рангсиз тус олади.

2.2. Фермент фаоллигини аниқлаш.

60 ёки 72 соатли культуранинг ўсиш даври тугагандан кейин озуқа муҳити фильтр қоғози орқали хона хароратида филтрланади ва филтрланган культура суюқлигидаги (КС) α -амилаза фаоллиги аниқланади.

Фермент фаоллигини аниқлаш усули амилolitik фермент комплексининг крахмални декстринларнинг ҳар хил массаларигача парчаланиши асосида олиб борилади. Амилolitik фаоллик крахмални декстринларнинг ҳар хил массаларигача гидролизлаш хусусияти билан характерланади ва 1 грамм препаратда ферментларнинг бирлигини билдиради.

Бир бирлик α -амилаза фаоллиги ферментнинг оптимал шароитда (30 °C), pH муҳити 6.5 да 10 дақиқа мобайнида 1 гр эрувчан крахмални декстринларнинг ҳар хил массаларигача гидролизлаш хусусияти билан характерланади.

Концентрация оқсили Лоуриусули бўйича аниқланади [48].

ТАДҚИҚОТ НАТИЖАЛАРИ ВА УЛАРНИНГ МУҲОКАМАСИ

3.1. Маҳаллий микроорганизмлар штаммлари орасидан фаол амилолитик фермент продуцентларини танлаб олиш

Ривожланаётган микробиологик саноатларда юқори фаол продуцент микроорганизмлар штаммларини олиш ва улардан ишлаб чиқаришда фойдаланиш муҳим шароитлардан бири ҳисобланади. Ҳал этувчи омиллар эса ишлаб чиқаришларда муваффақиятли янги штаммларни яратиш ишлари микроорганизмларни, уларнинг ферментатив системаларини, шунингдек фаол продуцентлардан экологик зиён бўлмайдиган, маҳаллий микроорганизмлар штаммларини ҳар томонлама ўрганишни тақоза этади.

Маълумки фаол амилаза асосан микроб бактерия ва замбуруғ культураларидан секретцияланади, шунинг учун фермент ишлаб чиқариш жараёнларида фаол штамми танлаб олиш муҳим факторлардан бири ҳисобланади (Квеситадзе Г.И., 1984, Глемжа А.А., 1995, Жеребцов Н.А., 1995).

Тадқиқотларимизнинг илк боскичида Ўзбекистон Республикаси Фанлар академияси Микробиология институти "Микроорганизмлар ноёб коллекцияси" лабораториясида мавжуд бўлган бактериал штаммлардан α -амилаза фаоллиги бўйича *Bacillus* авлоди мансуб 8 та бактерия штаммларидан амилолитик фаолликларнинг сифат кўрсаткичлари, яъни крахмалга мойиллик даражалари аниқланди.

Танлаб олинган бактериал штаммларнинг культурал хоссалари ва сифат кўрсаткичларин ўрганиш учун бактериал штаммлар колонияларининг шакли, ўлчами, крахмал бўйича гидролиз зона ўлчами, колония ранги, юза кўриниши ва бошқа параметрлари бўйича ҳам ўрганилди (1-жадвал).

2% ли крахмалли каттиқ агарли озуқа мухитида баъзи бир бактерияларнинг амилolitik хусусиятларини скрининг қилиш.

№	Продуцентлар	Ажратиб олинган манбалар	Йод билан бўялиши	Гидролиз зонаси, мм
1	Bacillus subtilis – 18	Тупроқ	++	14,6
2	Bacillus subtilis – 22	Тупроқ	+	14,1
3	Bacillus subtilis – 7A	Картошка тугунаги	+++	33,3
4	Bacillus subtilis – 82	Бугдой ризосфераси	+	12,4
5	Bacillus subtilis – 84	Пахта ризосфераси	++++	38,3
6	Bacillus subtilis – 11	Пахта барги	++	15,6
7	Bacillus subtilis – 12	Руда кони	+	13,5
8	Bacillus cereus – 51	Саноат чиқиндиси	+	8,7

Олинган натижалар шуни кўрсатдики, дерли барча культуралар амилolitik фаолликни намоён қилди, лекин булар орасида ҳам маҳаллий штаммлар ўзларининг ҳақиқий амилаза продуцентлари эканлигини исботлади. Бунда крахмалли қаттиқ агарли озуқа муҳитига экилди ва танлаб олинган маҳаллий штаммлар *Bacillus subtilis* – 7A (33.3 мм) ва *Bacillus subtilis* – 84 (38.3 мм) штаммлари йод билан бўялиши ҳамда гидролиз зонаси, мм кўрсаткичида юқори фаолликни кўрсатди, лекин энг катта фаолликни *Bacillus subtilis* – 84 штамми кўрсатди ва кейинги тажрибаларни олиб бориш учун юқорида танлаб олинган штаммлар орасида амилаза фаоллиги бўйича скрининг қаба параметрлар ўрганилди.

Амилolitik ферментлар ферментлар комплекси табиатига кўра энг кенг тарқалган ферментлардан бўлиб, ҳайвон, тубан ва юксак ўсимликлар ҳужайра ва тўқималарида, ҳамда микроорганизмларда учрайди. Улар жуда катта гуруҳларни ташкил этиб, нафақат крахмалга гидролитик таъсир қилувчи, балки крахмал сақловчи поли- ва олигосахаридлар, полимер субстратларнинг структураларига ҳам таъсир қилади. Шунинг учун ушбу ферментни фаол микроорганизмдан танлаб олишда, яъни навбатдаги босқичларда бизнинг изланишларимиз *Bacillus* авлодларига мансуб бактериал штаммлардан α -амилаза фаоллиги бўйича *Bacillus* авлоди мансуб 8 та бактерия штаммларидан амилolitik фаолликлари бўйича скрининг ўтказилди.

Танлаб олинган штаммларни фермент фаоллиги бўйича скрининг ўтказиш учун аввал маълум бўлган крахмалли озуқа муҳитида экиб, уларнинг ҳар биридаги амилаза фаоллиги аниқланади.

Фаол α -амилаза ферменти синтези учун танлаб олинган штаммига оптимал озуқа муҳит яратиш мақсадида картошка крахмали, соя ва жўхори уни, углеводлар ва минерал тузларнинг таркиби ва миқдори бўйича Скрининг натижасида фаол штаммлар - *Bacillus subtilis* 7A (40 ед./мл) ва *Bacillus subtilis* 84 (60 ед./мл) танлаб олинди (1-жадвал).

1-жадвал.

α -Амилаза фаоллиги бўйича *Bacillus* авлодига мансуб бактериял
штаммлар скринги

№	Штаммлар номи	Манба	α -амилаза фаоллиги, бир./мл
1	<i>Bacillus subtilis</i> – 18	БИМК-В-428	4,6
2	<i>Bacillus subtilis</i> – 22	БИМК -В-75	4,1
3	<i>Bacillus subtilis</i> – 7А	Картошка тугунаги	43,3
4	<i>Bacillus subtilis</i> – 82	Бугдой ризосфераси	йўқ
5	<i>Bacillus subtilis</i> – 84	Тошкен вилояти	58,3
6	<i>Bacillus subtilis</i> – 11	Пахта барги	5,6
7	<i>Bacillus subtilis</i> – 12	Руда кони	3,5
8	<i>Bacillus cereus</i> – 51	Саноат чиқиндиси	3,7

Жадвалдан кўриниб турибдики, фаол штаммлар орасида маҳаллий штаммлардан *Bacillus subtilis* 7A ва *Bacillus subtilis* 84 штаммлар юқори амилаза фаоллигини намоён этди. α -Амилаза фаоллиги бўйича энг юқори натижани *Bacillus subtilis* 84 штамми намоён қилгани учун ушбу штамм кейинги изланишлар учун танлаб олинди.

Бунда, Тошкент вилояти далаларидаги пахта ризосферасидан ажратиб олинган маҳаллий *Bacillus subtilis* – 84 штамми *Bacillus subtilis* – 7A маҳаллий штаммидан α -амилаза фаоллиги бўйича юқори натижани кўрсатиб, фаллик 58.3 бир./мл ни кўрсатди. Шунинг учун фаоллиги юқори бўлган олинган маҳаллий *Bacillus subtilis* – 84 штамми кейинги босқичларда унинг ўсиш ва ривожланиш динамикаси, сифат кўрсаткичлари, физик-кимёвий омилларга мойиллиги каби параметрлари ўрганилди.

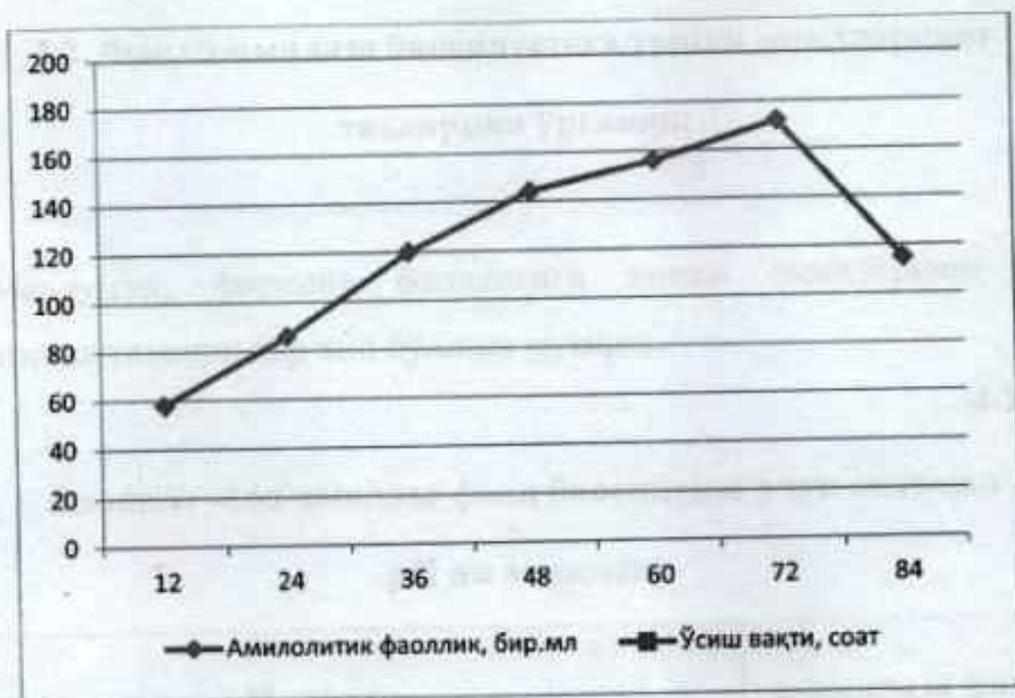
Фаол α -амилаза ферменти синтези учун танлаб олинган штаммга оптимал озука муҳит яратиш мақсадида картошка крахмали, соя ва жўхори уни, углеводлар ва минерал тузларнинг таркиби ва микдори бўйича фарқланувчи озука муҳити танланди. Танлаб олинган озука муҳит таркибидеяптон, картошка крахмали, буғдой уни, таркиби микдори бўйича фарқланувчи минерал тузлардан ташкил топган бўлиб, ушбу озука муҳитида *B. subtilis* 84 штамми α -амилаза фаоллиги 140 ед./мл ни ташкил этган бўлса, *B. subtilis* 7A эса 120 ед./мл ни кўрсатди (3-жадвал).

Демак, α -амилаза ферментининг фаоллиги бўйича *Bacillus* авлодига мансуб штаммлар селекцияси ўтказилди ҳамда фаол α -амилаза ферментининг синтези учун оптимал озука муҳит танлаб олинди, ҳамда кейинги босқичда танлаб олинган *B. subtilis* 84 штамми α -амилаза фаоллигига ташқи омиллардан рН ва ҳароратнинг таъсири, биосинтез жараёнлари ўрганилади.

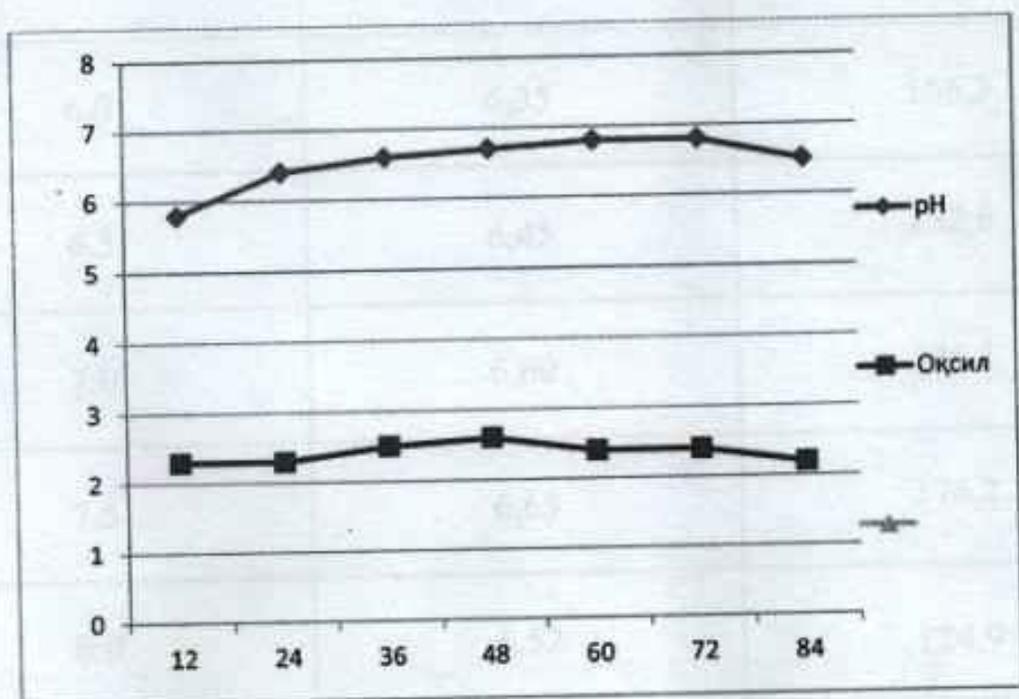
B.subtilis -84 α -амилаза фаол биосинтези учун оптимал
озука мухитини аниқлаш

Озука мухити гр/л	pH	α -амилаза фаоллиги, бир.мл
Пептон-3	6.5	140
Картошка крахмали-5		
Бугдой уни-3		
KCl -0.5		
MgSO ₄ - 0,5		
(NH ₄) ₂ HPO ₄ .0.5		
CaCO ₃ -0,1		

Лаборатория шароитида *B.subtilis* 84 штамми α -амилаза биосинтезинг ўсиш ва ривожланиш динамикаси pH, оксил, милаза фаолликлари ўрганилди (2-3 - расм). Олинган нажаларга кўра *B.subtilis* 84 штамми α -амилаза фаоллигини 72 соатда энг юқори кўрсаткични намаён этди. Бунда амилаза фаоллиги 140 бир./млни ташкил этди.



3- расм. *B. subtilis* 84 штамми α -амилаза биосинтезининг ўсиш ва ривожланиш динамикаси.



3-расм. *B. subtilis* 84 штамми α -амилаза биосинтези pH ва оқсил миқдорининг ўсиш ва ривожланиш динамикаси.

3.2. Фаол α -амилаза биосинтезига ташқи омилларнинг таъсирини ўрганиш

Маълумки, фермент фаоллигига ташқи омилларнинг рН ва хароратнинг таъсири ҳар хил бўлиши мумкин.

4-Жадвал.

B.subtilis -84 α -амилаза фаол биосинтези учун оптимал рН ни аниқлаш

рНмухити		α -амилаза фаоллиги, бир./мл
Бошланғич	60 соатданкейин	
5.0	5,98	140,7
6.0	6,35	156,3
6.5	6,45	152,6
7.0	6,60	146,1
7.5	6,65	176,2
8.0	6.52	124,9
8.5	7.61	110,2

Демак, *B.subtilis* -84 α -амилаза фаол биосинтези учун оптимал рН ни муҳити аниқланганда энг юқори фаолликни рН муҳити 7.5да амилаза фаоллиги 176.2 бир./мл ни ташкил этди.

Кейинги тажрибамизда *B.subtilis* -84 α -амилаза фаол биосинтези фаоллигига ҳароратнинг таъсири ўрганилди.

5-Жадвал.

***B.subtilis* -84 α -амилаза фаол биосинтези учун оптимал ҳароратни аниқлаш**

Ҳарорат	α -амилаза фаоллиги, бир./мл
28 °C	98,5
30 °C	126,6
32 °C	138,2
37 °C	122,4
40 °C	108,2
42 °C	84,9

Демак, 32°С ҳароратда амилаза фаоллиги юқори кўрсаткични намаён этди.

3.3. *B. subtilis* -84 штамми α -амилаза комплекс фермент препаратининг олиниши

Мамлакатимиз ривожини ва иқтисодиётини замонавий фан ва инновацион технологиялар асосида янги босқичга кўтаришнинг энг самарали йўлларида бири микроорганизмлар иштирокида биологик фаол моддалар олиш ва уларни саноатнинг турли тармоқларида қўллашдир. Шунинг учун ҳам кейинги 10-15 йил ичида республикада қатор янги штаммлар ажратилиб, улар асосида олинган импорт ўрнини босувчи турли хил микроб фермент препаратлари сифатли ҳамда самарали маҳсулотлар ишлаб чиқарувчи корхоналарда синовдан ўтказилмоқда.

Иқтисодий жиҳатдан зарур бўлган донли экинлардан:– бугдой, шоли, маккажўхори ҳамда картошка илдиз-меvasининг асосий таркибий қисми крахмал ҳисобланади. Ҳозирги вақтда дунё миқёсида ишлаб чиқариладиган ферментларнинг 30% ни ушбу крахмал парчаловчи амилолитик ферментлар ташкил этади.

B.subtilis -84 штаммининг α -амилаза комплекс фермент препаратини $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ тузининг хар хил концентрацияларида чўктириш

Концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, %	Умумий оксил	Амилолитик фаоллик			
		Умумий бирлик	Оксилга нис.фаоллик	Тозалик даражаси	Фаоллик бўйича чиқим, %
КС 100мл	250	17600	70.4	1	100
20%	25	-	-	-	-
40%	26	295	12.9	5.4	2.6
60%	82	1175	14.3	4.9	66
80%	66	950	14.4	4.8	7.5

Жадвалдан кўриниб турибдики, *B.subtilis* -84 штамми КС ни $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ тузи билан чўктирилганда юқори натижа 60 %ли чўкмада намаён бўлди. Бунда фаоллик бўйича чиқим 66 %ни ташкил этди.

Хулоса

1. α -Амилазанинг юқори фаолликка эга продуцентларини *Bacillus* авлодига мансуб бактериялардан скрининг қилинди.
2. *Bacillus* авлодига мансуб бактериялар орасидан α -амилазасининг фаол продуцентлари α -амилаза фаоллиги бўйичаташлаб олинди.
3. Ажратиб олинган фаол α -амилаза биосинтезини продуцентнинг ўсиш ва ривожланиш динамикасида рН муҳитининг таъсири ўрганилди.
4. α -Амилаза биосинтезини продуцентнинг ўсиш ва ривожланиш динамикасида ҳароратга нисбатан таъсири ўрганилди.
5. α -амилаза комплекс ферментпрепаратининг олиниш регламенти ишлаб чиқилди.

Фойдаланилган адабиётлар рўйхати

1. Каримов И.А. Ўзбекистон XXI аср бўсағасида: - Т.: Ўзбекистон . 1998. Т.6. Б. 29-244.
2. Каримов И.А. Асосий вазифамиз- ватанамиз тараққиёти ва халқимиз фаровонлигини янада юксалтиришди / -Т.: Ўзбекистон, 2010. -80 б.
3. Ўзбекистон Республикасининг “Таълим тўғрисида”ги Қонуни / Баркамол авлод- Ўзбекистон тараққиётининг пойдевори. –Т.: Шарк нашриёт- матбаа концерни, 1997. 20-29 б.
4. Ўзбекистон Республикасининг “Кадрлар тайёрлаш миллий дастури” / Баркамол авлод- Ўзбекистон тараққиётининг пойдевори. –Т.: Шарк нашриёт- матбаа концерни, 1997. 31-61 б.
5. Алиханян С.И. Селекция промышленных микроорганизмов. –М.: Наука, 1968. – С. 369.
6. Бальсис А.Б., Баратова Л.А., Бахматова И.В., Глемжа А.А., ЯнулайтенеК.К. // Биохимия. – Москва, 1985. - № 6 (50). – С. 928-935.
7. Галич И.П. Амилазы микроорганизмов. - Киев: Наукова думка, 1987. – С. 190.
8. Глемжа А.А., Люджюс Л.Л., Петрова Л.И. Микробные ферменты в народном хозяйстве.- Вильнюс: Мокслас, 1985. – С. 188.
9. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. М.: Агропромиздат, 1987. – С. 335.
10. Гребешова Р.Н., Сальседо-Торрес Л.Э., Идальго М.А. Сериновая протеаза *Bacillus subtilis* R // Прикл. биохимия и микробиология. – Москва, 1999. - № 2 (35), - С. 150-154.
11. Жеребцов Н.А., Корнеева О.С., Тертычная Т.Н. О механизме каталитического действия карбогидраз // Прикл. биохимия и микробиология. Москва, 1999. - № 2 (35). – С.123-132.

12. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. – Тбилиси: Мецниереба, 1984. – С. 55.
13. Квеситадзе Г.И. Ферменты микроорганизмов, живущие в экстремальных условиях. - Москва: Наука, 1990. – С. 30-32.
14. Кислухина О.В. Микробиологическая промышленность. 1971. Т.3. - С. 3-8.
15. Кичакова Н.А., Павлова И.Н., Захарова И.Я. Очистка и идентификация амилолитических ферментов *Bacilluslicheniformis* // Прикл. биохимия и микробиология. Москва, 1998. - № 5 (34). - С. 503 - 507.
16. Ключникова Л.В., Блинкова И.Ю. Ферментные технологии-будущее масложировой промышленности // Масло-жировая промышленность, 2006. - №4. - С. 30-31.
17. Колтукова Н.В., Бондарчук А.А., Коваленко Э.А., Гетьман Е.И. Некоторые физико-химические свойства амилолитического комплекса *Bacillusmesentericus* // Прикл. Биохим. и микробиология. Москва, 1990. - № 1 (26). - С.50-54.
18. Коршунов В.В., Логинова Л.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. Москва, 1988. - №1 (24). - С. 81-86.
19. А.А.Махсумханов., К.Т.Нормуродова., Б.Х.Алимова., О.М.Пулатова., Ш.Х.Нурматов., З.Р.Ахмедова. Влияние H_2O_2 на стабильность препаратов α -амилазы и протеазы *Bacillus subtilis-150* // VII Международный Симпозиум по «Химия природных соединений». – Ташкент, 2007. - С. 272.
20. Мосолов В.В. Белки ингибиторы протеаз и α -амилаз у растений // Прикл. биохимия и микробиология. Москва, 1995. - № 1 (31). - С. 5-10.
21. Мусаев Д.Ш. Секретируемая альфа-амилаза базидиомицетных дрожжей *Filobasidium capsuligenum*. Выделение, очистка и характеристика фермента: Дис. канд. биол. наук. - Ташкент, 1993. – С. 29-32.

22. Нормуродова К.Т. Изучение условий биосинтеза и получения α -амилазы *Bacillus subtilis*-150 // Узбекский биологический журнал, 2006. Т. 1-2. - С. 6-11.
23. Нормуродова К.Т., Нурматов Ш.Х., Алимова Б.Х., Пулатова О.М., Ахмедова З.Р., Махсумханов А.А. Выделение и характеристика высокоактивной α -амилазы *Bacillus subtilis*-150 // Химия природных соединений. - Ташкент, 2007. № 4, - С. 374-376.
24. Нурматов Ш.Х. Выделение, очистка, характеристика и применение α -амилазы *Bacillus subtilis*. Дис. канд. биол. наук. - Ташкент, 2001. - С. 14-15.
25. Нурматов Ш.Х., Ахмедова З.Р., Рахимов Д.А. Выделение, очистка и характеристика α -амилазы *Bacillus subtilis*-7A // Химия Природных Соединений. - Ташкент, 2001. - №4. - С. 309-312.
26. Павлова И.Н., Кичакова Н.А., Захарова И.Я. // Методы получения, анализа и применения ферментов. Всесоюз. конф.: Тез. докл. -Рига, 1990. - С. 34.
27. Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов. - Москва: Мир, 1987. - С. 117.
28. Работнова И.Л., Иванов И.И. Рост и развитие микробных культур // Успехи микробиологии.- Москва: Наука, 1971. - №7. - С. 67-108.
29. Римарева Л.В., Оверченко М.Б. Использование протеолитического препарата из *Aspergillus oryzae* в спиртовом брожении // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2005. -№4. - С. 12-14.
30. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Серба Е.М., Трифонова В.В. Сравнительная характеристика микробных протеаз по степени гидролиза белковых субстратов // Прикл. биохимия и микробиология.- Москва, 1997. - № 1 (33). - С. 43-48.
31. Ташмухамедова Ш.С., Хасанов Х.Т., Рахимов М.М., Ташмухамедов М.С., Салихов Ш.И. Влияние удаления протеолитических ферментов

- на очистку амилазы // Прикл. биохимия и микробиология.- Москва, 1995. - № 3 (31). - С. 272-274.
32. Турдикулова Ш.У. Биферментный иммуноанализ с применением липосом.: Автореф. Дис. канд. биолог. наук.- Ташкент, 2001. -С. 19.
33. Фролова Г.М., Сильченко А.С., Пивкин М.В., В.В. Михалков // Прикл. биохимия и микробиология. - Москва, 2002. - № 2 (38). - С. 155-160.
34. Шкуматов В.М., Рудой А.Л., Овсянко С.Л., Фролова Н.С., Царенков В.М., Петров П.Т., Босенко А.М. Химические проблемы создания новых материалов и технологий // Сборник статей к 20-летию НИИФХП БГУ / НИИ физико-химические проблемы.- Минск. 1998. - С. 56-59.
35. Цурикова Н.В., Нефедова Л.И., Костылева Е.В., Звенигородский В.И., Ясиновский В.Г., Воейкова Т.А., Синицын П.А. Получение активного штамма – продуцента термостабильной амилазы // Прикл. биохимия и микробиология.- Москва, 2002. - № 5 (38). - С. 502-508.
36. Яшеня Н.С., Сапунова Л.И. Синтез α -амилазы и глюкоизомеразы бактериями *Arthrobacter species* // Микробиология и биотехнология на рубеже 21 столетия: Материалы международной конференции.- Минск, 2000. - С. 140-141.
37. Adams, M.W.W.; Kelly, R.M. Finding and using thermophilic enzymes. *Trends Biotechnol.*, 1998. 16: 329-332.
38. Chessa J.P., Feller G., Gerday C. // *Can. J. Microbiol.* 1999. v. 45. №6. p. 452-457.
39. Choi J.H., Lee S.Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli* // *Appl. Microbiol. And Biotechnol.*-2004,-64, №5. p. 625-635.
40. Donaghy Y., McKay A. // *J. Appl. Bacteriology.* 1993. v. 74, p. 662-666.
41. Driessen A.J.M., Fekkes P. and van der Wolk J.P. The Sec system. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1, 216-222 (1998).

42. Farezvidal M.E., Fernandezvivas A., Gonzales F., Arias L.M. Properties and significance of an alpha-amylase produced by *Myxococcus coraloides*-D.J. *Appl. Bacteriol.*, 1995, v.78, p. 14-19.
43. Fogarty W.M., Kelly C.T. // *Microbial Enzymes and Biotechnology* / Eds Fogarty W.M., Kelly C.T. L.: Elsevier Science Publishers, 1990. 2nd edn. p. 71-132.
44. Grzybowska B, Szweda P, Synowiecki J. Cloning of the thermostable alpha-amylase gene from *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli*: isolation and some properties of the enzyme. *Mol. Biotechnol.* **2004**, 26(2):101-10.
45. Ke T, Ma XD, Mao PH, Jin X, Chen SJ, Li Y, Ma LX, He GY. A mutant alpha-amylase with only part of the catalytic domain and its structural implication. *Biotechnol Lett.* **2007**, 29 (1):117-22.
46. Kim M.S., Park J.T., Kim Y.W., Lee H.S., Nyawira R., Shin H.S., Park Ch.S., Yoo S.H., Kim Y.R., Moon T.W., Park K.H. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, p. 3933–3940.
47. Kishore Das., Robin Doley., Ashis Kumar Mukherjee. Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the traditional fermented food of India. *Biochnol. Appl. Biochem.* **2004**. 40. 291-298.
48. Lowry O.H., Rosenbrough N.G., Farr A.L., Randal F.J. *Biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265.
49. Marc J.E.C. van der Maarel^{a,b,d,*}, Bart van der Veen^{a,d}, Joost C.M. Uitdehaag^{c,d}, Hans Leemhuis^a, L. Dilkhuisen^{a,d}. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.*, 2002, v. 94, p. 137-155.
50. Nigam P. and Singh D., *Enzyme and Microbiol Technol.*, 1995, 17: 770-778.

“ α -Амилазанинг юкори фаолликка эга продуцентларини *Bacillus* авлодига мансуб бактериялардан танлаб олиш” мавзусида магистрлик даражасини олиш учун 5A522902-иммунобиологик ва микробиологик препаратлар технологияси мутахассислиги бўйича даъвогар Эшмуратов Жаҳонгирга расмий оппонент томонидан