

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС
ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ
П.Б.АЗИЗОВ НОМИДАГИ БИОЛОГИЯ-ТУПРОҚШУНОСЛИК ФАКУЛЬТЕТИ

“МИКРОБИОЛОГИЯ ВА БИОТЕХНОЛОГИЯ” КАФЕДРАСИ

ХИДИРОВ ЗОКИР БОТИРОВИЧ

МАЛАКАВИЙ БИТИРУВ ИШИ

5420100 -биология

мавзу:

**Бижғиш жараёнида баъзи ачитқи
ферментларнинг фаоллигини кузатиш**

Кафедрада кўриб чиқилди
ва химояга руҳсат этилди
Кафедра мудири
проф. М.М. Рахимов

Илмий раҳбар:
т.ф.н., доц. Д. Т. Мирзарахметова

31 май 2007 йил

Тошкент-2012

МУНДАРИЖА

	КИРИШ	3
1	АДАБИЕТЛАР ШАРХИ	4
1.1	Ачитқини культивациялаш усуллари.....	4
1.2	Инвертаза ферментини фаоллигини бижғиш жараёнларда кузатиш.....	
1.3	Ачитқи ўсишига баъзи омиллар таъсири.....	
	ТАЖРИБА ҚИСМ	
2	Тадқиқотларда қўлланилган услуб ва ашёлар.....	
2.1	Ачитқини культивациялаш.....	
2.2	Инвертазанинг фаоллигини бижғиш жараёнида аниқлаш усули.....	
2.3	Глюкозани миқдорини аниқлаш.....	
2.4	Оқсил миқдорини аниқлаш.....	
3	ШАХСИЙ ТАДҚИҚОТЛАР НАТИЖАСИ ВА ТАЛҚИНИ	
3.1	Ачитқи бижғиш жараёнини олиб бориш.....	
3.2	Инвертаза ферментнинг бижғиш жараёнда кузатиш.....	
	ХУЛОСАЛАР	14
	АДАБИЁТЛАР РУЙХАТИ	15
	ИЛОВАЛАР	17

КИРИШ

Инвертаза саноат аҳамиятига молик ферментлардан биридир. Инвертаза саноатда, яъни қандолат маҳсулотлар, мураббо ва сунъий асал ишлаб чиқаришда, шакарни кристаллизациялаш-дан химоя қилиш учун қўлланилади.

Хозирги пайтгача ачитки фермент препарати мувафакқият билан фойдаланилмоқда. Ажратиб олиш усуллари технологик эмаслиги учун, соф ферментнинг нархи жуда қиммат бўлиб, озиқ-овқат технологиясида ишлатишда муаммо бўлиб турибди. Шунинг учун биотехнологлар хар хил арзон фермент ажратиб олиш манбалари ва усуллари устида изланиш олиб бормоқдалар.

Адабиётлардаги маълумотларга кўра, *Ркацители-б* ачитқисини чекланган шароитда узлуксиз усулда культивациялаш жараёнида инвертазани юқори миқдорда синтезланиши кузатилади. Бу маълумотлар озиқ-овқат саноатида ишлатиладиган инвертаза препаратларини олишга асос бўлиши мумкин.

Узум шарбати ачитки учун қимматбаҳо озиқа муҳити ҳисобланади. Бироқ бу фермент ажралиб чиқиш процесси бошқа бир арзонроқ бўлган суъний муҳитларда ўрганилмаган. Шунинг учун бу ишда қуйидаги вазифалар қўйилди:

- *Ркацители-б* ачитқисини ярим узлуксиз жараёнда ўстириш;
- Культивациялашни узум шарбатида (бошланғич босқич) ва ярим узлуксиз жараёни суъний муҳит ёрдамида (1 босқич) олиб бориш;
- Инвертаза ферменти фаоллигини ачитки ўсиш жараёнида ўрганиш;
- Муҳитда шакарлар миқдорини аниқлаш;
- Олинган натижаларни таҳлил қилиш.

1. АДАБИЁТЛАР ШАРХИ

1.1. Ачитқини культивациялаш усуллари

Saccharomyces cerevisiae нинг олтига турли штамлари 24 соат давомида углерод ва азот миқдори етишмайдиган шароитда фермент ажратиш қобилияти ўрганилди. Ачитқиларни очлантириши анаэробик шароитда углерод ёки азотсиз муҳитларда олиб борилиб, очлантириш жараёни тугагандан сўнг (24 соат) глюкоза кўшилди ва натижада ҳосил бўлган этанол миқдорига қараб улар ўлчанди. Натижалар шуни кўрсатдики, азотли очлантиришда ачитқиларнинг ферментатив қобилияти штамнинг турига қараб, 70-95% гача пасайиши кузатилган бўлса, углеродли очлантириш жараёнида барча штамлар тўлалигича ферментатив қобилиятини йўқотган. Углерод билан очлантиришда АТФ миқдори хужайраларда 0,1µ М/г ни ташкил қилган бўлса, бу кўрсаткич азотли очлантиришда 6,0µ М/г ни ташкил қилган. Шуни таъкидлаш лозимки, лимитация жараёнида муҳитга оз миқдордаги глюкозанинг кўшилиши (0,1г/л) ачитқиларда ферментатив қобилиятнинг тикланишига етарли бўлган (Elisabeth Thomsson at all, 2003).

Узлукли ва ярим узлуксиз культивирлаш усуллари билан 278,8 mM глюкоза ва хром уч тузлари ($K_2Cr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) шароитда ачитқиларнинг озуқа муҳитида ўсиши ўрганилган. Ярим узлуксиз культивирлашда субстрат кўшиш миқдори ўзгартирилмаган. Ачитқининг ўсиш даражаси ва фаоллиги, шунингдек, рН ва кислород сарфи 30°C ҳароратда оптик зичлиғни ўлчаш билан on-line мониторинг орқали ўрганган. Биопроцесснинг охириги босқичларида ачитқи биомассасидаги протеин миқдори биурет реакцияси орқали аниқланган. Умумий ва органик бириккан хром тузларнинг миқдори ЭТА-ААС орқали ўрганилган. Турли культивирлаш жараёнларида углероднинг тузлари умумий оксил миқдорига таъсир қилган. Узлукли жараёнида умумий оксил миқдори қуруқ ачитқи биомассасининг 25,7% ини ташкил қилган бўлса, ярим узлуксиз жараёнида бу кўрсаткич 16,9% эканлиги кўрсатилган. Тажриба натижасида шу аниқландики, хром тузларини органик боғланиши орқали биотрансформацияси узлукли ва ярим узлуксиз жараёнлар орқали культивация процессида кузатилган (Batic M at all, 2000).

Saccharomyces cerevisiae узлукли ва ярим узлуксиз муҳитида ўстирилди ва кўйидагилар ўрганилди. рН4,0-6,0, эриган кислород (0-5,0 мг) ва сахароза миқдори глюкоза концентратияси 0,5 г/л дан юқори бўлганда инвертазининг секрецияси специфик фаоллиги камайган. Тадқиқот натижасида шу аниқ бўлдики, *Saccharomyces cerevisiae* нинг оптимал температураси 30°C, рН-5,0, эриган кислород 3,3 мг/л (Vitolo M at all, 1995).

Маълумки, давомий пиво ферментациясида иммобилланган хужайралар биореактор ичида узоқ вақт давомида сақланади ва бу ферментацияда иммобилланган хужайранинг фермент ишлаб чиқиш ва унинг физиологик ҳолати катта аҳамиятга эга. Специфик глюкоза сарфи ва хужайра ичидаги оксидланиш-қайтарилиш реакциялари давомий культивация жараёнида хужайра физиологиясида ўзгаришларни юзага келтиради. Гепотезаларга мувофиқ давомий ферментацияда пиво ачитқиси хужайраларининг физиологияси унинг сақлаш давомийлигига (aging) боғлиқ (Branyik T at all, 2004).

Мазкур ишда глюкоза лимитланган аэроб шароитда хемостат ва продуктостат культивациясининг ўзаро фарқлари *Saccharomyces cerevisiae* ачитқиларида ўрганилди (Lei F at all, 2004). Бунда уч хил экспрементлар ўтказилди:

1. Хемостатда суолтириш даражаси ўзгартириб турилди;
2. Продуктостат этанол миқдори ўзгартирилди;
3. Акселеропродуктостат.

Озиқа муҳитида Брестан концентратиясининг *Saccharomyces cerevisiae*нинг давомий культивация жараёнида оксил, фосфор, умумий РНК, пируват карбоксилаза, изоцитрат лиаза фаолликларини камайишга олиб келган. Лекин RD мутант штаммида торалоза миқдори ошгани кузатилган бўлган цитохром аа3, цитохром с ва b миқдорлари камайдигани аниқланган (Razmovski R at all, 2002).

Saccharomyces cerevisiae нинг углевод билан лимитланган муҳитда синхронли ўсиши етарли ўрганилган бўлиб, асосий мақсадлар метаболитик йўллари аниқлаш орқали субстрат миқдорини манипуляциялаб, этанол миқдорини паст концентрацияда ушлаб туришга қаратилган. Шу мақсадда адаптив ва маҳкамланган (fixed) бошқарувчилар тадқиқ қилинган, маҳкамланган бошқарувчиларга қараганда адаптив ўз афзалликларини турли хужайра цикл процесларини аниқлаш билан кўрсатди (Moller H. at all, 1997) .

Saccharomyces cerevisiae нинг давомий ферментация озика муҳитидаги глюкоза концентрацияси ва биомасса миқдорининг ўсиш даражасига таъсири ўрганилган. Муҳитда глюкоза концентрациясининг ошиши биомасса миқдорини камайишига олиб келганлиги кузатилиб, хужайранинг оксил ва фосфор миқдорига катта таъсир кўрсатган. Шунга қарамай глюкоза концентрациясининг кўтарилиши *Saccharomyces cerevisiae* нинг ферментатив қобилятини оширган бўлса, суюлтириш даражасининг ошиши ферменторда хужайралар концентрациясини оширган. Энг муваффақиятли суюлтириш даражаси 0,20/соат эканлиги кузатилган. Суюлтириш даражаси тадқиқ қилинаётган микроорганизм тури ва культивация шароитига (муҳит таркиби, рН, ҳарорат ва аэрация) боғлиқлиги ва биомасса миқдори суюлтириш даражасини ошириш даражасида камайиши кузатилган (Pejin D. at all, 1993) .

1.2. Инвертаза ферментини фаоллигини бижғиш жараёнларда кузатиш

Saccharomyces cerevisiae нинг ёввойи штамларидан инвертаза ферментининг ажралиши ва бунда 5 та кўп миқдорда инвертаза ферментини ажратадиган ачитки штамларининг кенетикаси ўрганилган. *Saccharomyces cerevisiae* нинг GCA-II штамми бошқаларига қараганда инвертаза ферменти кўп миқдорда секреция қилиши кузатилган ва мазкур штамнинг Q_p ва $Y_{p/s}$ параметрлари қолган штамларига нисбатан тежамли. Шунингдек, мазкур тажрибада сув ости култура шароитида сахароза концентрацияси, фермент синтезлаш тезлиги, мушлит рН нинг таъсирлари ўрганилди. Натижаларга кўра, сахарозанинг оптимал концентрацияси 3' (w/v) , бўлса мочевианинг 0,2 (w/v) бўлган, қолган муҳитнинг оптимал рН6,0 деб топилган. Фермент миқдорининг ошиши муҳит оптимизациялаштирилгандан сўнг, олишга эришилган ва 47,9% ни ташкил қилган (Ikram-ul-Naq at all, 2005).

Маълумки, *Saccharomyces cerevisiae*-136 штамми мальтоза ва сахарозали муҳитда инвертаза ферментини ажратади ва бу жараён глюкозали муҳитда фақатгина глюкозанинг умумий концентрацияси 1% кам бўлган ҳолатдагина амалга ошади. Акс ҳолда, фермент ҳосил бўлиш жараёни репрессияланади. Глюкозанинг таъсир қилиш анализлари шуни кўрсатдики, РНК ингибирланишидан олдин гексоза ДНК дан инвертаза транскрипция жараёнида қатнашади ва бу вақтда инвертаза мессенжерининг трансляцияси ингибирланган бўлади. Бунда гексоза инвертаза ативлигига катаболит репрессори сифатида таъсир қилмайди. Глюкозанинг инвертаза трансляциясидаги катаболитик репрессори қайтмас ингибирланиш бўлиб, ферментнинг ажралиб чиқиш миқдори глюкозанинг таъсир қилиш вақтига ва унинг доимийлигига боғлиқдир ва кўпинча бу транскрипция ва трансляция жараёнларига тўғри келади. Бу эса тРНК миқдорининг деградацияси билан тушунтирилади. Катаболитик репрессия фермент секрецияси ва унинг каталитик ативлигига таъсир қилмайди (Elorza MV at all, 1977)

Saccharomyces cerevisiae ачитқиларида инвертаза экспрессиясининг бошқарилиши глюкоза ва фруктоза каби моносахаридларнинг бўлишига боғлиқдир. *Saccharomyces cerevisiae* ёввойи штамми CEN.PK 113-7D да инвертаза фермент экспрессияси миқдорий ўрганиш бўлиб, турли углеродларнинг ҳар хил концентрациялаида узлукли культивациялаш шароитида олиб борилган. Инвертаза экспрессия учун 0,5 g/l глюкоза ва 2g/l фруктоза миқдорлари дерепрессор омил эканлиги аниқланди (Herwig C. at all, 2001).

Синхронланган муҳитда *Saccharomyces cerevisiae* CBS-8066 штаммининг хужайра ташқи инвертазасини ажратиши куртак ҳосил бўлишига боғлиқ циклик характерга эга бўлди. Инвертаза фаоллиги куртакнинг ривожланиш даврида кўтарилди ва куртак етилиши ва хужайранинг ажралиш босқичида фаоллиги кузатилмаган. Шунга қарамай суюқ муҳитга ажратилган инвертаза миқдори куртакланиш циклида ўзгармаган. Асинхроник давомий культивацияда инвертазанинг ишлаб чиқарили ва локализацияда мушжим натижалар кузтилди. Умумий инвертаза ишлаб чиқиш миқдори асинхроник шароитда синхроник шароитда секрецияланган фермент миқдоридан 2-3 марта кўп бўлган. Шунингдек, хужайра ичидаги глюкоза-6-фосфат ва қолган глюкоза концентрациялари синхронли хемостат шароитдаги культивацияда асинхронли хемостатдагига нисбатан сезиларли даражада юқори бўлган. Юқоридаги икки шароитда олиб борилган тадқиқотларда *Saccharomyces cerevisiae* озика муҳитга 40% инвертаза ажратган ва бу *Saccharomyces cerevisiae* нинг бор йўғи 5% и холосдир (Rouwenhorst RJ at all, 1991).

1.3. Ачитқи ўсишига баъзи омиллар таъсири

Глюкоза миқдори 1% ёки ундан юқори бўлган репрессив шароитда харорат юқори даражага кўтарилганда *Saccharomyces cerevisiae* шу ачитқиларда хужайра ташқарисига секреция қилинувчи инвертаза миқдори сезиларли даражада ошган. Мазкур секреция учун оксил синтези талаб қилинсада, мустақил РНК ҳосил бўлиши кузатилмаган. Тўпланган РНК миқдори муҳитдаги глюкоза миқдорига пропорционал равишда қайта трансляцияланган ва бу эса инвертаза глюкоза бўлган. Бунда мавжуд бўлмаган муҳитда ҳам давомий синтезланади. Лекин репрессив шароитда секреция юз бермасдан олдин парчаланаяди (Mormeneo S at all, 1982).

Фурфурол ачитқи метаболизми учун эффе́тив ингибитор ҳисобланиб, мазкур ишда фурфурол *Saccharomyces cerevisiae* CBS-8066 штаммининг физиологиясига таъсири давомий культивация муҳитида аэроб шароитда олиб борилди. Тажриба давомида фурфуролнинг озика муҳитидаги концентрацияси 8,3 г/л дан бошлаб турли суюлтириш шароитларида олиб борилди. Фурфурол миқдорининг ошиши муҳитда глицерин миқдорини камайишига олиб келган (Horvath I.S. at al, 2001).

Saccharomyces cerevisiae ачитқиси аэроб хемостат шароитда углерод, азот ва иккиланган миқдордаги лимитирланган углерод ва азот шароитида ачитқининг ўсиш ва метаболизми ўрганилган. Глюкоза концентрацияси констант ҳолда ушланганда аммоний концентрацияси турли тадқиқотлар давомида ҳар хил суюлтирилган ҳолда амалга оширилди. Тажриба давомида шу аниқландики, озика муҳитига қўшилган максимал миқдорда C/N миқдорлари хужайра томонидан ўзлаштирилган бўлиб, у биомассага оз таъсир кўрсатган. Аммоний тузлари миқдори камайтирилганда биомасса ҳосил бўлиши кузатилган ва бу қисман глюкозанинг катаболитик сарфланишини оширган. Глюкозанинг хужайра талаб қиладиган минимал талаб даражасидан оширилиши ачитқи хужайраларида нафас олишини тезлаштирган, N миқдорининг камайтирилиш эса максимал нафас олиш қобилятини сусайтириши аниқланган (Larsson C. at al, 1993) .

Адабиётлардаги маълумотларни ўрганиб чиқилган ҳолда, *Saccharomyces cerevisiae* *Ркацители-6* ачитқисини чекланган шароитда узлуксиз усулда культивациялаш жараёнида инвертазани юқори миқдорда синтезланиши кузатилган. Шунинг учун, бу озик-овқат саноатида ишлатиладиган инвертаза препаратларини олишга асос бўлиши мумкин.

Узум шарбати ачитқи учун қимматбаҳо озика муҳити ҳисобланади. Бироқ бу фермент ажралиб чиқиш процесси бошқа бир арзонроқ бўлган суъний муҳитларда ўрганилмаган. Шунинг учун бу ишда қуйидаги вазифалар қўйилди:

- *Ркацители-6* ачитқисини ярим узлуксиз жараёнда ўстириш;

- Культивациялашни узум шарбатида (бошланғич босқич) ва ярим узлуксиз жараёни суъний муҳит ёрдамида (1 босқич) олиб бориш;
- Инвертаза ферменти фаоллигини ачитқи ўсиш жараёнида ўрганиш;
- Муҳитда шакарлар миқдорини аниқлаш;
- Олинган натижаларни таҳлил қилиш.

2. ТАДҚИҚОТЛАРДА ҚЎЛЛАНИЛГАН УСЛУБ ВА АШЁЛАР

Ашёлар: Бу ишда *Saccharomyces cerevisiae* ачитқисининг Ркацители-6 расасидан фойдаланилди.

Асбоблар: Тадқиқот жараёнида ЦЛР-1 У42 центрифугаси, ФЭК-56 ва ультратермостат (МТА KUTESZ) асбобларидан фойдаланилди.

Реагентлар: Этанол, сирка кислота, натрий ацетати, қўш асосли калий фосфат, глюкоза, сахароза ва ачитқи ўстириш мухити учун қўлланилган реагентлар (“Реахим”). Фермент фаоллигини аниқлашда субстрат сифатида сахарозадан фойдаланилди (х.ч., “Реахим”).

Фойдаланилган мухитлар:

1-мухит: Баян ширей узум навидан олинган узум шарбати (Ташкент, 2006):

2-мухит: Мочевина-10 гр, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ -10г, KH_2PO_4 -1г, K_2HPO_4 -1г, NaCl -0,1г, MgSO_4 -0,5г, глюкоза-10г/л, микроэлементлар эритмаси-1мл. Микроэлементлар эритмани таркиби (1 литр сувда): H_3BO_3 -1,25г, CuSO_4 -0,1г, KJ -0,25г, MnSO_4 -1г, FeCl_3 -0,5г, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ -0,5г, ZnSO_4 -1г.

2.1. Ачитқини культивациялаш усули

Культивациялаш 1 литр озиқа мухитда 5-12 сутка давомида 26, 22, 6⁰С да олиб борилди.

2.2. Инвертазанинг фаоллигини ачитқи культивациялаш даврида аниқлаш

Культивация даврида инвертаза активлигини қўйидаги аралашмада олиб борилди:

а) 20 мл центрифугаланган (6000 об/мин, 10 мин) культивация суюқлиги рН 4.7 гача Na_2CO_3 билан етказилган ҳолатда;

б) рН 4 бўлган 10 мл 0,1М ацетат буфери;

в) 10мл 10%ли янги тайёрланган сахароза эритмаси.

Инкубация 37⁰С температурада 2 соат давомида олиб борилади. Инкубациядан сўнг ўрганилаётган ва солиштирма аралашмасида инверт шакарлар миқдорлари фарқланади. Солиштирма аралашмани инактивация қилиш мақсадида 1 соат давомида (с обратным холодильником) қайнатилади. Инкубацион аралашмалардаги инвертланган шакарлар миқдори Бертран усули бўйича аниқланди. Инвертазанинг актив бирлиги деб 1мкМ сахароза 1л ўрганилаётган аралашмада (вино) 1мин давомида парчаланишига айтилади. Берилган шароитда инвертаза активлиги қўйидаги формула билан ҳисобланади:

$$A = \frac{\frac{a}{c} - \frac{b}{c_1} \times 1000 \times 0,95}{120 \times 0,3423} \text{ ш.б.}$$

бунда:

A – инвертаза активлиги;

c- ўрганилаётган аралашмадан титрлашга олинган суюқлик миқдори, мл. да;

c₁- солиштирма аралашмадан титрлашга олинган суюқлик миқдори, мл. да;

a– титрлашга олинган ўрганилаётган аралашмадаги инверт шакарлар миқдори, мг;

b– титрлашга олинган солиштирма аралашмадаги инверт шакарлар миқдори, мг;

120-инкубация вақти, дақиқада;

0,3423-мкМ сахароза;

1000- 1литр винога ўтказиш коэффциенти;

0,95- инвертланган шакарларни сахарозага ўтказиш коэффциенти.

Эслатма: Бертран усули бўйича ўрганилинаётган аралашма ҳажми ундаги инвертланган шакарлар миқдорига боғлиқ.

2.3. Бертран усули ёрдамида глюкозани миқдорини аниқлаш

Реактивлар:

1. Феллинг суюқлиги. Бевосита ишланишидан олдин қўйидаги икки суюқликни бир хил миқдорда қўшишдан тайерланади.

А) мис сульфат эритмаси. 40г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1л дистилланган сувда эритилади.

Б) сигнет тузи эритмаси. 1л дистилланган сувда 200г сигнет тузи ёки 150г NaOH эритилади

2. Темир сульфат эритмаси. 1л дистилланган сувда 50г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ва 200г H_2SO_4 ($\rho=1.84$) эритилади. Эритилган эритма KMnO_4 ни қайтармаслиги керак. Шунинг учун тайёрланган эритма (FeSO_4 оксидлаш учун тўғридан-тўғри иштирок этади) кучсиз ёришгунча калий перманганат эритмаси оз-оздан томчилатиб солинади. Темир сульфат ўрнига темир аммоний квасцидан ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times 24\text{H}_2\text{O}$) фойдаланиш мумкин. Бунда эритма тайерлаш учун 1л ўлчамли колбага дистилланган сувга 86г темир аммоний квасци ва 108 мл сульфат кислота ($\rho=1.84$) эритилади.

3. 0.1н калий перманганат эритмаси. Бу эритманинг 1мл 6.36 мг мисга жавоб беради.

Аниқлаш усули. 200-250мл ҳажмли колбага 20мл дан аниқланувчи суюқлик, CuSO_4 , ва сегнет тузи эритмалари солинади ва тезда қайнагунча истилади. Аралашма 3 мин қайнатилади. Кейин қайнаш тўхтатилади ва бир неча секунд кутилади, CuO чўкмага тушгунча. Ажралган тиниқ иссиқ суюқлик сувли ёки вакуумли насос ёрдамида филтратрубка орқали Бунзен колбасига ўтказилади. Филтрат етарли даражада интенсив кўк рангда бўлиши керак. Филтратнинг оч ҳаворанг рангда бўлиши имкон қуйиб бўлмайдиган даражада шакар тутишини билдиради (100мг дан ортиқ), бу эса нотўғри натижаларга олиб келади.

Филтирланган бутун суюқликдан ҳосил бўлган чўкма иссиқ сув билан ювилади (хар бир ювилишда колба бир неча секундга қуйиб қўйилади чўкма тушиши учун), кейин яна бир марта шу филтрдан филтирланади, бунда чўкмани филтрга туширмаслик керак. Биринчи чайилишда сув филтрдан тўлиқ ўтмагунча, кейингилари қўйилмайди. Чайиб бўлгандан сўнг вакуумли насос ўчирилади ва филтрат олиниб, Бунзен колбаси яхшилаб чайиб ташланади ва яна филтрат ўрнатилиб қуйилади. Колбадаги мис оксиди чўкмасига оз-оздан темир сульфат эритмаси бир неча миллилитр (жами 20 мл) то мис оксиди эригунча солинади. Тиниқ яшилроқ суюқлик филтрдан ўтказилади.

Бунзен колбасига йиғилган суюқликни 0,1Н калий перманганат эритмаси билан тиниқ яшил ранг йўқолиб кучсиз, лекин чидамли пушти рангдаги суюқлик пайдо бўлгунча титрланади.

Ҳисоблаш. Титрлаш вақтида сарфланган калий перманганат миқдорини аниқлаш учун уни мис титри бўйича қўпайтирамиз. Агар калий перманганат эритмаси аниқ 0,1Н бўлса, унда миснинг титри 0,00636 бўлади ва титрлашга кетган **b** мл шу эритмага чўккан мис оксиди **x** бўлади:

$$X = 6,36 \text{ b} \text{ мг.}$$

Жадвалдан (илова 1) кетган мис миқдори топилади. Бу эса инвертланган шакар миқдорини аниқлаб беради.

2.4. Оксил миқдорини аниқлаш. Лоури усули.

Реактивлар:

1. 0,1Мли NaOH дан тайёрланган 2%ли Na_2CO_3 .

2. Натрий цитратда тайёрланган CuSO_4

3. 1мл №2- реактив билан 50мл №1- реактив аралашмаси тайерланади.

4. Фолин реактиви.

Аниқлаш усули: 10-100мкг оқсилдан ташкил топган тадқиқ қилинаётган эритмани дистилланган сув билан 4 мл гача етказилади, 2 мл №3- реактив билан аралаштирилиб хона ҳароратида 10 дақиқа давомида қолдирилади. Сўнг 0,2мл Фолин реактиви қўшилиб 30-40 дақиқадан сўнг ФЭК ёрдамида 750 нм остида оптик зичлиги аниқланади.

Бука қон зардоби альбумини ёрдамида калибровка чизиғи (Илова 3) келтирилган.

3. ТАДҚИҚОТ НАТИЖАЛАРИ ВА УЛАРНИНГ ТАЛҚИНИ

3.1. Ачитқи бижғиш жараёнини олиб бориш

Бизга маълумки, вино тайёрлашда ачитқилардан фойдаланилади. Узум шарбати ачитилиб вино олинади. Адабиётлардаги маълумотларга кўра, ачитқилар чекланган шароитда узлуксиз усулда культивациялаш жараёнида турли ферментлар (инвертаза) экзо холатда юқори миқдорда синтезланиши кузатилади (Абдуразакова, 1990).

Шунинг учун инвертаза ферментининг фаоллик температураси чегараланган шароитларда кузатишни мақсад қилиб қўйдик.

Бу ишда инвертаза ферментларининг активлиги бижғиш жараёнида кузатилди, нега деса бу ферментлар озик овқат саноатида кенг миқёсида ишлатилади.

Ишда *Saccharomyces cerevisiae* ачитқисининг Ркацители 6 расадан фойдаландик.

Мазкур ишда Ркацители 6 нинг танланишига сабаб:

- а) У яхши ўрганилган ачитқи бўлганлиги учун,
- б) Ишлаб чиқаришда кенг миқёсда қўлланлаётгани учун,
- в) Бижғиш жараёнида биореактор деворларини ифлосламай, чўкма холатига тушушидир.

Озиқа муҳит сифатида баян ширей навли узум шарбатидан фойдаланилди. Бизга маълумки, *Saccharomyces cerevisiae* нинг табиий озиқа муҳити узум шарбати бўлиб, ачитқи унда жуда яхши ўсади. Лекин узум шарбатининг таннархи ферментлар олиш учун қимматлиги учун синтетик озиқа муҳитидан фойдаландик. Бунда биз узум шарбатини икки баробар дистилланган сув билан суюлтирдик. Нега деса глюкозанинг кўп миқдори катаболик репрессияга олиб келиши мумкин. Узум шарбати оқ вино олиш технологияси бўйича бижғитилди.

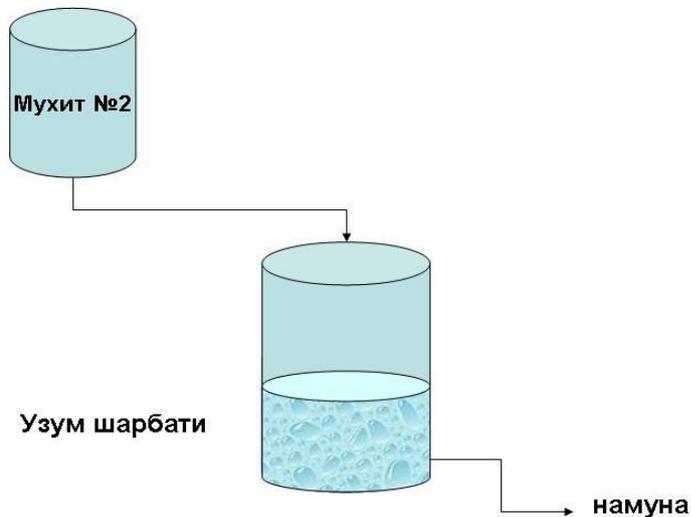
Мазкур ишнинг ярим узлуксиз шароитда олиб борилишига сабаб, муҳитда даврий равишда ферментларнинг ажралиб туришидир. Бунда муҳитга доимий равишда озиқа муҳитлари (2-муҳит) қўшиб борилганлиги учун оддий узлукли жараёндан (колбадан) фарқланди. Олиб борилган бижғиш жараёнининг схемаси 1 расмда келтирилган.

Ярим узлуксиз бижғиш жараёнида озиқа муҳитига ажралиб чиққан инвертаза ферментининг фаоллиги ва муҳитдаги шакар миқдори аниқлаб борилди.

Культивация 16 сутка 3 литрли озиқа муҳитда (биореактор хажми 5л) олиб борилди. Бижғиш жараёнини биринчи босқичи 5 кун давомида 26⁰С олиб борилди ва ундан кейин шароитлар ўзгартирилган ҳолда ўтказилди. Бунда шароитлар фақатгина ҳарорат билан эмас: 26⁰С, 14⁰С ва 4⁰С; бижғиш жараёнини олиб бориш билан ҳам фарқ қилди. Бунда бижғиш жараёни қўйидаги критериялар бўйича кузатиб борилди:

- кўпчиш жадаллиги,
- биомасса миқдори, умумий инвертаза фаоллиги,
- муҳитдаги инверт шакарлар миқдори.

Ярим узлуксиз бижғиш жараёни



1 – расм. Ярим узлуксиз бижғиш жараён.

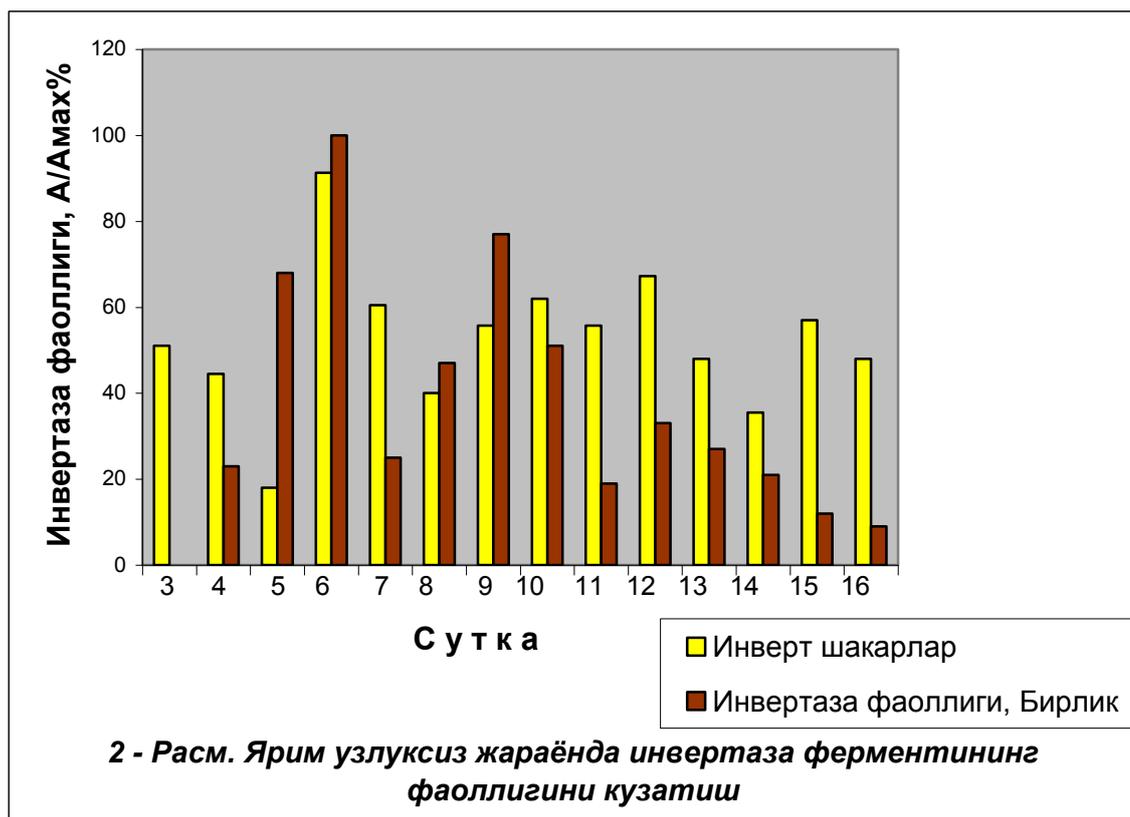
3.2. Инвертаза ферментнинг бижғиш жараёнда кузатиш

Бижғиш жараён уч босқичда олиб борилди.

Биринчи босқичда (узум шарбатида) максимал фермент фаоллиги 5-суткада 4,7 Бирликгача кўтарилди. Шакарлар миқдори 5-суткада 18 грамм (100 мл суюқликда) ташкил топди. Натижалар 2 расмда келтирилган.

Иккинчи босқичда 2-мухит бижғиш жараёнга 2 мухит уланди ва оқиш тезлиги ўрнатилди (20 мл/соат). Ачитқи стационар фазага ўтганда (6-сутка) шакарлар миқдори 91,25 грамм (100 мл суюқликда) ташкил топди, бижғиш жараёни 2 сутка давомида 14⁰С да олиб борилди. Фермент фаоллиги 2 мухит қўшилгандан сўнг 2,2 Бирликка кўтарилди. Шакарлар миқдори 6-суткада 91,25 г (100 мл суюқликда) ташкил топди.

Учинчи босқичда (7 сутка) 2-мухит оқиш тезлиги 10 мл/соат ташкил топди. Бунда шакарлар миқдори 56 граммни (100 мл суюқликда) ташкил топди, бижғиш жараёни 9 суткагача 14⁰С да олиб борилди. Фермент фаоллиги 5,3 гача кўтарилди ва кейинги 10-16 суткаларда фермент фаоллиги сусайиб борди.



Олинган натижалар фақатгина бижгиш жараёнини контроллаш ва такоммиллаштириш эмас, балки ачиткилар экзо ферментлари, масалан, инвертаза ферменти, олишда қўлланилиши мумкин. Олинган ачитки экзо ферментларини тан нархи арзонроқ бўлиб ва экологик тоза бўлганлигини ҳисобга олиб, уларни озиқ-овқат саноатида қўллаш мумкин.

ХУЛОСАЛАР

- *Ркацители-6* ачиткиси ярим узлуксиз жараёнда суний мухит кўшилган холда ўстирилди;
- Ачитқи ўсиш жараёнида инвертаза ферментини фаоллиги кузатилди ва бунда унинг максимал натижаси 6,9 Бирликни ташкил қилди;
- Ачитқи ўсиш жараёнида шакарлар миқдори аниқланди ва бунда инверт шакарлар кўпайган вақтда инвертаза фаоллиги катта кўрсаткичларга эга бўлди;
- Ачитқининг эркин холдаги инвертазасини олиш учун бижғиш жараёнини ярим узлуксиз бижғиш жараёнида суний мухит кўшилган холда 14⁰С да ва оқиш тезлиги 20 мл/соат бўлган шароитда олиб бориш тавсия этилади;

АДАБИЕТЛАР РУЙХАТИ

1. Elisabeth Thomsson, Christer Larsson, Eva Albers, Annika Nilsson, Carl Johan Franzen and Lena Gustafsson. Carbon Starvation Can Induce Energy Deprivation and Loss of Fermentative Capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology. 2003, Vol. 69, No. 6 p. 3251-3257.
2. Batic M, Raspor P. SLO. Pflugers Arch. 2000; 439(3 Suppl): R73-5
3. Ikram-ul-Haq, Mirza Ahsen Baig, Sikander Ali. Effect of cultivation conditions on invertase production by hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* isolates. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. Volume 21,
4. Абдуразакова С.Х. Совершенствование технологии бродильных производств на основе стимулирования биокаталитических процессов. Ташкент:Фан. 1990. 140с.
5. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М., Абдуразакова С.Х., Ахмедова З.Р. Ферментативная конверсия субстратов инвертазы в вводно-органической среде. Прикладная биохимия и микробиология (Россия). 2006. №2. с.167-170.
6. Lowry O.M., Rosenbryl N.J., Farr A.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol.Chem.1954. V.193. p.265-275.
7. Elorza MV, Villanueva JR, Sentandreu R. The mechanism of catabolite inhibition of invertase by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta. 1977 475(1):103-12.
8. Herwig C, Doerries C, Marison I, von Stockar U. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Laboratory of Chemical and Biochemical Engineering, Swiss Federal Institute of Technology (EPFL), CH-1015 Lausanne, Switzerland. Biotechnol Bioeng. 2001.76(3):247-58.
9. Mormeneo S, Sentandreu R. Regulation of invertase synthesis by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. 1982.52(1):14-8.
10. Rouwenhorst R.J, van der Baan AA, Scheffers WA, Van Dijken JP. Production and localization of beta-fructosidase in asynchronous and synchronous chemostat cultures of yeasts. Appl Environ Microbiol. 1991. 57(2):557-62.
11. Vitolo M, Duranti MA, Pellegrim MB. Effect of pH, aeration and sucrose feeding on the invertase activity of intact *S. cerevisiae* cells grown in sugarcane blackstrap molasses. J Ind Microbiol. 1995. 15(2):75-9.
12. Branyik T, Vicente AA, Kuncova G, Podrazky O, Dostalek P, Teixeira JA. Centro de Engenharia Biologica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal. Biotechnol Prog. 2004. 20(6):1733-40
13. Lei F, Olsson L, Jorgensen SB. Dynamic effects related to steady-state multiplicity in continuous *Saccharomyces cerevisiae* cultivations. Biotechnol Bioeng. 2004. 88(7):838-48.

14. Razmovski R, Pucarevic M. Effect of Brestan on *Saccharomyces cerevisiae* during continuous cultivation. *Folia Microbiol (Praha)*. 2002. 47(5):507-10.
15. Horvath IS, Taherzadeh MJ, Niklasson C, Liden G. Effects of furfural on anaerobic continuous cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 2001. 75(5):540-9.
16. Moller H, Jorgensen SB. Continuous cultivation start-up control--an experimental investigation *J Biotechnol*. 1997. 53(1):55-66.
17. Pejin D, Razmovski R. Continuous cultivation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at different dilution rates and glucose concentrations in nutrient media. Faculty of Technology, Novi Sad, Yugoslavia. *Folia Microbiol (Praha)*. 1993. 38(2):141-6
18. Larsson C, von Stockar U, Marison I, Gustafsson L. Growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat cultures under carbon-, nitrogen-, or carbon- and nitrogen-limiting conditions. Department of Chemical Engineering, Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne. *J Bacteriol*. 1993. 175(15):4809-16.

Илова 1

Мис микдорини инвертланган шакарлар микдорига айлантириш таблицаси.

Мис мг	Инвертланган шакарлар, мг						
10	4,8	39	19,3	68	34,7	96	50,3
11	5,3	40	19,8	69	35,3	97	50,9
12	5,8	41	20,3	70	35,8	98	51,5
13	6,3	42	20,9	71	36,4	99	52,1
14	6,8	43	21,4	72	36,9	100	52,7
15	7,3	44	21,9	73	37,5	101	53,2
16	7,7	45	22,4	74	38,0	102	53,8
17	8,2	46	22,9	75	38,5	103	54,4
18	8,7	47	23,5	76	39,1	104	55,0
19	9,2	48	24,0	77	39,6	105	55,5
20	9,7	49	24,5	78	40,2	106	56,1
21	10,2	50	25,1	79	40,7	107	56,7
22	10,7	51	25,6	80	41,3	108	57,3
23	11,2	52	26,1	81	41,9	109	57,8
24	11,7	53	26,7	82	42,4	110	58,4
25	12,2	54	27,2	83	43,0	111	59,0
26	12,8	55	27,8	84	43,5	112	59,6
27	13,3	56	28,3	85	44,1	113	60,2
28	13,8	57	28,8	86	44,7	114	60,8
29	14,3	58	29,3	87	45,2	115	61,4
30	14,8	59	29,8	88	45,8	116	62,0
31	15,3	60	30,4	89	46,3	117	62,6
32	15,8	61	30,9	90	46,9	118	63,2

33	16,3	62	31,4	91	47,5	119	63,8
34	16,8	63	32,0	92	48,1	120	64,4
35	17,3	64	32,5	93	48,7	121	65,1
36	17,8	65	33,1	94	49,2	122	65,7
37	18,3	66	33,6	95	49,8	123	66,3
Мис мг	Инвертланган шакарлар, мг						
124	66,9	154	85,5	184	105,1	214	125,6
125	67,6	155	86,1	185	105,8	215	126,3
126	68,1	156	86,7	186	106,4	216	127,0
127	68,7	157	87,3	187	107,1	217	127,7
128	69,3	158	88,0	188	107,8	218	128,4
129	69,9	159	88,6	189	108,4	219	129,1
130	70,5	160	89,3	190	109,1	220	129,8
131	71,1	161	89,9	191	109,8	221	130,5
132	71,7	162	90,6	192	110,5	222	131,2
133	72,3	163	91,2	193	111,2	223	131,9
134	73,0	164	91,9	194	111,8	224	132,6
135	73,6	165	92,5	195	112,5	225	133,4
136	74,2	166	93,2	196	113,2	226	134,1
137	74,8	167	93,8	197	113,8	227	134,8
138	75,4	168	94,5	198	114,5	228	135,5
139	76,0	169	95,1	199	115,2	229	136,2
140	76,7	170	95,8	200	115,9	230	139,9
141	77,3	171	96,4	201	116,6		
142	77,9	172	97,0	202	117,3		
143	78,6	173	97,7	203	118,0		
144	79,2	174	98,3	204	118,7		
145	79,8	175	99,0	205	119,3		
146	80,5	176	99,7	206	120,0		
147	81,1	177	100,3	207	120,7		
148	81,7	178	101,0	208	121,4		
149	82,3	179	101,7	209	122,1		
150	83,0	180	102,4	210	122,8		
151	83,6	181	103,1	211	123,5		
152	84,2	182	103,8	212	124,2		
153	84,8	183	104,4	213	124,9		