

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ
ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ**

**МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ
БИОЛОГИЯ ТУПРОҚШУНОСЛИК ФАКУЛТЕТИ**

НОРҚУЛОВ ФАЙЗУЛЛА РАХМАТЖОН ЎҒЛИ

**ФЕРМЕНТНИ ЦЕЛЛЮЛОЗА ТУТУВЧИ ТАШУВЧИГА
ИММОБИЛЛАШ**

БИТИРУВ МАЛАКАВИЙ ИШИ

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

ТОШКЕНТ – 2013

М У Н Д А Р И Ж А

	бет
Кириш.....	3
1-боб. Адабиётлар шархи.....	5
1.1. Эстеразанинг амалий аҳамияти.....	5
1.2. Ачитқи ферментларининг эфир хосил қилиш хусусияти.....	8
1.3. Ферментларни иммобиллаш усуллари.....	10
1.4. Эстеразани ажратиб олиш.....	13
1.5. Эстеразанинг органик синтездаги аҳамияти.....	15
1.6. Танин ва унинг ўзига хос хусусиятлари.....	17
 ТАЖРИБА ҚИСМИ.....	 21
2-боб. Тадқиқотларда қўлланилган услуб ва ашёлар.....	21
2.1. Эстеразанинг эфир хосил қилувчи фаоллигини аниқлаш.....	21
2.2. Лоури усули бўйича оксил миқдорини аниқлаш.....	22
2.3. Танинни экстракциялаш.....	23
2.4. Эстеразани иммобиллаш.....	23
3-боб. ОЛИНГАН НАТИЖАЛАР ВА УЛАРНИНГ ТАҲЛИЛИ.....	24
3.1. Эман гранулаларидан танинларни экстракциялаш.....	24
3.2. Ачитқи эстеразасини иммобиллаш.....	29
3.3. Иммобилланган ферментни муҳитга таъсирини аниқлаш.....	32
3.4. Иммобилланган эстераза олишнинг технологик босқичлари.....	34
 Хулоса.....	 36
 Адабиётлар рўйхати.....	 37
Иловалар.....	43

Кириш

Мавзунинг долзарблиги. Кўпгина гидролитик ферментлар асосан гидролитик фаолликни намоён қилиш билан бир қаторда трансфераз ёки янги маҳсулот синтез қилувчи фаолликка ҳам эга. Эфирлар синтезловчи фаолликка эга бўлган ферментлардан бири эстеразадир. Эстеразани бу фаоллиги табиий шароитда, бижғиш жараёнида, ачитқи ўсишининг чекланган шароитида юзага келади. Мазкур жараёнда юқори спиртлари эфирларга айланади. Дастлабки тажрибалар шуни кўрсатдики, мазкур жараёнлар унчалик чуқур кечмайди. Бунинг сабаби эса ферментлар барқарорлигини паст эканлигидир. Шуни таъкидлаш лозимки, эстеразани эфир хосил қилувчи фаоллиги асосан сув-органик муҳитда юзага келади. Бу муҳитда инактивация жараёнлари кучаяди. Юқоридагилардан келиб чиққан ҳолда, ферментлар барқарорлигини сувли ва сув-органик муҳитда барқарорлигини ошириш вазифаси вужудга келади. Маълумки, бу муаммонинг ечими ферментларни иммобиллашдир.

Ҳозирги вақтда ферментларни иммобиллашнинг кўплаб усуллари тавсия этилган ва улар фермент барқарорлигини ошириш учун эффектив бўлсада, ҳозиргача ферментларни сув-органик муҳитда қўллаш учун стандарт услуб ишлаб чиқилмаган. Ҳар бир фермент аниқ бир технологик жараёнда юқори барқарорликка эга бўлиши ва эффектив таъсир қилиши учун ташувчи танлови ва махсус шароитлар талаб қилинади.

Турли ёғоч гранулалари ўзининг экологик тозаллиги учун озиқ-овқат саноатида катта қизиқиш уйғотади. Шу сабабли улар ферментларни иммобиллаш учун жуда яхши ташувчи сифатида қўлланилиши мумкин. Лекин уларни таркибидаги танин моддалари озиқ-овқат маҳсулот (алкогол ичимликлар) лари таъмига салбий таъсир кўрсатиши мумкин. Эстераза ферментини фаоллигига келсак, у (спиртли) органик муҳитда юқори спиртларни эфирларга айлантира олади. Дастлабки тажрибалар шуни кўрсатадики, эман гранулаларига иммобилланган ферментни сувли-органик

мухитда қўлланилганда, танинлар ташқи мухитга экстракцияланиб чиқади ва бу ходиса ферментни озиқ-овқат саноатида ичимликлар таркибидан юқори спиртларни камайтириш мақсадда қўллаш имкониятларини чегаралайди.

Мавзунинг долзарблиги шундаки, ҳозирги кунда биологик фаол моддалар (ферментлар) га бўлган талаб кундан кунга ортмоқда. Натижада тоза ферментлар нархи қимматлашиб кетган. Мазкур муаммони қисман бўлсада енгиллаштириш учун иммобилланган ферментлар ишлаб чиқариш йўлга қўйилган. Чунки иммобилланган ферментлар органик мухитда ҳам ўз фаоллигини сақлаб қолиш хусусиятига эга бўладилар. Бундан ташқари иммобилланмаган ферментлар қисқа муддат ичида ўз фаоллигини йўқотиши аниқланган.

Ишнинг мақсади: Мазкур ишда ачитқи эстераза ферментини ковалент иммобиллаш учун ташувчи сифатида эман гранулаларини қўллаш ва ундан танинларни чиқариб ташлаш мақсад қилиб қўйилган. Тадқиқот мақсадини амалга ошириш учун қўйидаги вазифаларни бажариш белгилаб олинди:

1. Эман гранулаларидан танинни экстракция шароитларини ўрганиш.
2. Эстераза ферментини иммобиллаш .
3. Иммобилланган ферментни эфир ҳосил қилувчи фаоллигини спиртли мухитда аниқлаш.
4. Иммобилланган ферментни (махсулот) спиртли ичимликларнинг дегустацион хусусиятларига таъсирини аниқлаш.

Ишда объект сифатида *Saccharomyces cerevisiae* ачитқисининг эстераза ферменти қўлланилди.

Битирув малакавий иши кириш, адабиётлар шарҳи (1-боб), тадқиқотларда қўлланилган услуб ва ашёлар (2-боб), олинган натижалар ва уларнинг таҳлили (3-боб), хулосалар, 45 номдаги адабиётлар руйхатидан иборат бўлиб, асосий мазмуни 41 саҳифани ташкил қилади. Ишни ёритишда 5 расм, битта таблица ва битта схемадан фойдаланилди.

1-боб. Адабиётлар шархи

1.1. Эстеразанинг амалий аҳамияти

Хозирги кунда ферментлар иммобилизациясининг жуда кўп усуллари мавжуд бўлсада, ушбу усулларнинг ҳеч бири мазкур шароитда қўллаш учун стандарт услуб деб топилмаган. Хар бир фермент ўзига хос бўлган технологик жараёнда юқори даражадаги барқарорликка эга бўлиши ва эффектив таъсир қилиши учун ташувчи танлови ҳамда махсус шарт-шароит талаб қилинади. Озиқ-овқат ва кимё саноатлари ривожланиши ферментлар ташувчилари соҳасида ҳам мислсиз даражадаги ўзгаришларни келтириб чиқарди ва шу билан бирга таклиф қилинаётган ташувчиларга ҳам талаб кучайиб бормокда. Шундай ташувчилардан бири, целлюлоза тутувчи ташувчилар бўлиб, ҳозирги кунга келиб бутун дунёда ўзини экологик тозаллиги, табиатда кенг тарқалганлиги ва нархининг ҳам нисбатан арзонлиги учун кўп миқдорда қўлланилаётган ташувчи ҳисобланади. Бундай бирикмаларнинг реакцияга киришиш қобилияти юқори даражада бўлиб, ўз сиртида альдегид ва бошқа гуруҳлар ҳосил қилиш қобилиятига эга.

Эстеразалар – энг кўп тарқалган популяцион-генетик маркерлардан бири ҳисобланади. Улар алифатик ҳамда ароматик эфирларни гидролизини катализлайди. Ўзининг метаболитик функцияси, озиқ овқат маҳсулотлари таъмини яхшилашдаги фойдаси учун [McKay A.M., 1993] ва инсекцидларни парчалашдаги роли учун кенг миқёсда ўрганиб чиқилган [A.R.Main et al, 1998-99].

Адабиётлардан маълумки [K.E.Zaeger et al, 1998-99] микроорганизмлардан ажратиб олинган эстераза ва липазалар биотехнологиянинг озиқ-овқат ишлаб чиқариш ва қайта ишлашда, сирт фаол моддаларни, оптик фаол медикаментларни, детергентларни, қоғоз ва нефт ишлаб чиқаришда, ҳамда, ташҳис қўйишда катта қизиқиш уйғотади.

Узоқ вақт мобайнида олимлар сут маҳсулотларини ишлаб чиқариш соҳасида турли пишлоқларни етилиш вақтини қисқартириш, нархини

камайтириш, хушбўй хидини ҳамда таъмини яхшилашга урундилар. Изланишлар натижасида углерод занжирида 6 тадан 10 тагача углерод тутган карбон кислоталарининг оптимал аралашмаси махсулотнинг таъмига пишлок таъмини бериши аниқланди [Nelson J.H. et al, 1977].

Микроб табиатли липазалар таъсирида узун занжирли (C_{10} дан C_{16} гача) ёғ кислоталарининг ажралиши совун таъмини беради, шу билан бирга хайвонлардан ажратиб олинган эстеразалар таъсирида олинган қисқа занжирли ёғ кислоталари жуда ёқимсиз ва тушунарсиз таъм беради [Sood V.K. et al, 1979]. Кўпгина сут махсулотларини етилиш даврида липаза ва эстеразалар таъсирида ёғ кислоталарининг парчаланиши бошқа компонентлар билан реакцияга киришиш имконини беради, бу ўз навбатида бошқа таъмларни шаклланишига имкон яратади [Stead D., 1986].

Бунга қўшимча сифатида эстераза поликарбонатга асосланган полиуретанларни ҳам парчалаш хусусиятига эга [Labow R.S. et al, 2005]. Фенилметилсульфонил фторид (серин эстераза ва протеиназа ингибитори), фторид натрий (моноцит – специфик эстераза ингибитори) ва таурохолат натрий (холестерол эстераза рағбатлантирувчиси) таъсири деградация усули орқали аниқланади, яъни радиактив тарқалиши ва макрофаглларнинг моноцит – хосилалари лизис махсулотларидаги эстераза фаоллиги орқали ўлчанади. Хозирги кунда диизоционат структурасидаги кимёвий фарқлар специфик моддалар деградациясидаги ҳар бир эстеразанинг нисбий иштирокини белгилаш мумкинлиги ҳақида тахминлар бор. Мазкур ҳолат бундай эстеразанинг субстрат спецификлиги билан ва ҳар бир эстеразанинг мувофиқ қилувчи миқдори билан боғлиқдир.

Бундан ташқари икки липолитик ферментлар – замбуруғли кутиназа ва ачитқи эстеразасининг дигексил фталатни биологик парчалаш хусусияти тадқиқ етилади [Kim V.H. et al, 2007]. Метанолда ериган дигексил фталатнинг ферментатив парчаланиши жараёнида, бир нечта парчаланиш махсулотларини аниқлаб, динамикадаги ўзгаришлари кузатилади. Маълумки,

кутиназадаги дигексил фталат деградация кўрсаткичи юқори бўлади, яъни дигексил фталатнинг бошланғич миқдорининг 70% (500 мг/л) 4-5 соат деярли ериган. Худди шу миқдордаги эстераза қўлланилганда, 3 кундан сўнг дигексил фталатнинг 85% дан ортиқ миқдори эримасдан қолган. Дигексил фталатнинг деярли барча миқдори кутиназа ёрдамида 1.3-изобензофурандионга ўтказилди, бу вақтда эса эстераза кўп миқдорда 1.3-изобензофурандион ва гексиметил фталатдан синтезлаган. Бундан ташқари, турли хил рекомбинат биоломинисцент бактериялари қўллашда, дигексил фталатни эстераза билан парчалаш орқали олинган махсулотларни захарлилик даражаси аниқланган. Бу махсулотлар оксидланишли ва оксилли зарарланишга олиб келган, бу вақтда эса кутиназа иштирокида гидролиз махсулотлари метанал тутувчи реакцион тизимда ҳеч қандай хужайравий тузулишга олиб келмаган шароитларда *Kluyveromeces fragilis* ўстириш жараёнида этанол катоболизмида ва сирка кислотанинг этил эфирининг синтезида иштирок етувчи ферментлар ўрганилган [Kallea – Mhiri et al, 1993] жараён узлуксиз режимда олиб борилди ($D = 0,25$). Натижалар шуни кўрсатадики, *Kluyveromeces fragilis* сирка кислотанинг этил эфири синтези, эстераза каби алькогол ацетил трансфераза томонидан ҳам катализланган. Эстераза аниқловчи фермент бўлиб алькогол трансфераза эса рағбатлантирувчи фермент ҳисобланади. Этанолнинг катаболизми натижасида (*Kluyveromeces fragilis*) сирка кислотасининг этил эфирининг сирка кислотани ва сирка алдегидини ишлаб чиққан. Сирка алдегидининг синтези фақатгина алькоголь дегидрогеназа томонидан бошқарилади.

Маълумки, коньякнинг таъми ва ҳушбўй хидини (букетини) жамлаш учун узумнинг ҳушбўй хид ҳосил қилувчи моддалари алоҳида аҳамиятга эгадир. Узум меваларининг эфир мойлари, узум вино махсулотининг мураккаб ҳушбўй композицияси таркибига киради, буни ўз навбатида бошқа хом ашёдан ажратиб олиш ёки сунъий равишда ҳосил қилишни имкони йўқ. Шунга қарамадан, биокимёвий жараёнларни бошқаришдаги муҳим ролни

хужайрадан ташқари ачитки ферментлари ўйнаб, улар ачиткиларнинг бошқарилган ачиш жараёнида иккиламчи метоболизм махсулотларини юқори синтезини таъминлаб беради, яъни – хужайрадан ташқари ферментларни (эстеразани, β – фруктофуранозидазани, протеинакиназани), бу ферментлар ўз навбатида энант ферментларининг синтезини, юқори спиртларнинг алкил фруктозидазага боғланишини ҳамда вино махсулотларини аминокислоталар билан бойишини амалга оширади [Абдуллаев У.К., ва бошқалар., 2006]. Ачиш, ачиткиларнинг ачиётган узум шарбати билан узоқ вақт таъсирлашиши натижасида амалга ошиб, бу вино махсулотларидаги энант эфирларини кўп миқдорда ҳосил бўлишини таъминлаб беради, ҳамда аминокислота ва бошқа азот асосларини ҳосил бўлишини кучайтиради. Олинган коньяк спиртларидаги энант эфирлар, юқори алдегидлар ва юқори спиртлар миқдори аниқланган. ГЖХ усули ёрдамида юқори температурада қайновчи компонентларнинг таркибини тадқиқ етишда коньяк спиртларини юқори сифатини белгиловчи β – фенил этанол, терпинол, линалоол, энант эфирининг компонентлари миқдори кўп бўлади.

1.2. Ачитки ферментларининг эфир ҳосил қилиш хусусияти

Эфирлар биосинтезини амалга ошириш учун ачитиш жараёни олиб борилади. Юқори даражадаги ачитиш муҳитдаги этил эфирлари миқдорини камайишига олиб келади. Бундан ташқари юқори температурадаги ачитиш кўп миқдордаги этил-октанат ва деконоатни синтезланишига сабаб бўлади. Миқдор жихатидан кўп бўлган азот ачиш жараёнида этил эфири синтезини нормал ҳолатга олиб келтиради. Анализ экспрессия генлари ЕЕВ 1 ва ЕНТ 1 га ёғ кислоталарининг ўртача занжири қўшилганда этилестераза биосинтезининг синтезланиш экспрессияси этилацетатга нисбатан чегараланмайди. Ўрта занжирли ёғ кислоталарининг қўшилиши этил эфирининг асосий пайдо бўлувчи қисми бўлиб бу ачиткили муҳитда этил спиртини синтезланишини бирданига кўпайтиради. Нофаол биосинтезловчи

ферментлар этил эфирининг синтезланишини чегараловчи асосий омил хисобланади. Шунинг учун экспрессия даражаси ва биосинтезловчи фермент фаоллиги хид ўзгариши модификацияси жараёнининг кўрсаткичларида ёки штаммлар танловида муҳим рўл ўйнайди [S.M.G.Saerens et al, 2008].

Иккинчи параметр – бу актив фермент трансфераза бўлиб, у этил эфирини пайдо бўлишини амалга оширади. Ушбу фермент сирка эфирини синтез қилиши биокимёвий йўл билан аниқланган [Dufour J.-P. et al, 2003; Verstrepen K.J. et al, 2003]. Аниқланган ферментлар ачитқилар ичида этил эфирини синтезланишига жавобгар бўлади. Ачиш жараёнида этил эфирини синтезланиши учун ацетил-КоА: этанол О-ацетилтрансфераза, EEB1 ва EHT1 ларни катализлайди [S.M.G.Saerens et al, 2006]. EEB1 асосий фермент бўлган вақтда EHT1 иккиламчи рол ўйнайди. Шунга қарамасдан юқори экспрессияга учровчи генлари хисобланувчи EEB1 ёки EHT1 лабораториялардаги ачитқи штаммлари ёрдамида ишлаб чиқариладиган этил эфирини миқдор жihatдан кўпайишига тасир қилмайди [S.M.G.Saerens et al, 2006]. Бошқа томондан қараганда юқори экспрессияланувчи аллели EHT1 вино ачитқиси штаммлари ичида этил эфирини синтезланишини кўпайишига олиб келди [Lilly M et al, 2006].

Айни вақтда *Saccharomyces cerevisiae* турли хидли махсулотлар ишлаб чиқаради. Бундай экстрактлар алкоголь ичимликлар ишлаб чиқариш учун муҳим хисобланади. Масалан саноат миқёсида кўп миқдорда пиво ва вино ишлаб чиқаришда айнан *Saccharomyces cerevisiae* махсулотларидан фойдаланилади. Спиртли ичимликлар таркибида икита муҳим хидга эга бўлган актив эфирлар мавжуд. Биринчи гуруҳ – ацетат эфирлари (этилацетат, изоамилацетат ва фенилетилацетат). Иккинчи гуруҳ – этил эфирлари (этил-гексанат, этил-октонат ва этил-деконат). Алифатик килота ва спиртлар мева ва полиз экинлари хидини беради. Чумоли ва сирка кислоталари ароматик спиртлар билан гулли ўсимликларнинг меваси хидларини ўзларида мужассамлаштирган. Этилацетат кучсиз ва оддий хидларни ўзида сақлайди.

Этил эфирлари, ёғ кислоталари ва уларнинг гомологлари, юқори спиртларнинг ҳар хил кислоталари мевалар хидини ўзида тутди. Шундай эфирларга мисол қилиб изоамилбутират, изоамилацетат, этилкапронат, этилкаприлат, этилкапринат кабиларни айтиш мумкин. Асосий этибор фенилсирка кислотаси эфирларига қаратилади. Чунки бу кислота эфирлари ўзида асал хидини тутди. Агар бензилацетатни кучли аралаштирилса жасмин хиди ажралади, фэнилацетатдан атиргул хидини, этиллинолеат гуллар ва шампан виноси рангини тиниқлаштириб чиройли қилади. Ушбу эфирлар вино учун етиштириладиган узум таркибидаги эфир ёғлари таркибида учрайди ва ажиш жараёнида қатнашиб кейинчалик винога айланади [Вытовтов А.А. 2001].

Ароматик актив эфирлар ачиш жараёнида пайдо бўлади. Ёғлар қуюлиши сабабли этил эфирлари хужайра мембраналари орқали ташқи мухитига осон диффузияланади. Этил эфирлари занжирининг узунлиги ачиш жараёнига ўтиши билан ацетат эфирларининг тўлиқ ва тез секрециясига нисбатан камаяди. Кўрсаткичлар этил-гексонатат учун 100%, этил-октонат учун 54-68% ва этил-деконат учун 8-17% ни ташкил қилади. Этил эфирларининг синтезланиши учта омилга боғлиқ: икита косубстрат (ацетил-СоА ва этанол) концентрацияси, актив ферментларнинг эфирларни синтезловчи ва гидролизловчи марказлари ҳам қатнашади. Шунинг учун барча параметрлар субстрат концентрациясига ёки этил эфирини синтезловчи фермент фаоллигига тасир қилади.

1.3. Ферментларни иммобиллаш усуллари

Ферментнинг (инвертаза) дрожжали мембрано алоқаси кальций альгинатга иммобиллашган [Milovanovic A., 2007]. рН оптимум 5,0 ва оптимум 60⁰С ҳароратда иммобиллашувнинг оптимал шароитлари аниқланди. 55 соатдан сўнг препарат активлигини намоён қилади ва 40 соатлик қисқа вақтли фойдаланишдан сўнг ҳам у 90 % ли активлигини

кўрсатади. Шунга ўхшаш натижалар поливинилальгинатдаги инвентарларида ҳам ҳосил бўлади [Idris A., 2008].

Активлашган полиамид (Найлон-6) ва глутар альдегид орқали ферментнинг иммобиллашуви амалга оширилади [Segura-Ceniceros E., 2006]. Бирикманинг эффементи 57-60% бўлиб, олинган препарат 12 соатлик кўлланилишдан кейин ўз активлигини сақлаб қолади.

Ферментлар (инвертаза) кимёвий активлаштирилган 2-гидроксиэтилметакрилат ковалент даражада иммобиллаштирилган ва эпихлорогидрин ташувчиси орқали активлаштирилган [Altinok H., 2007]. Аниқланишича, натив ва иммобиллашган инвертаза учун pH 4,5 ва 5,5 ни ташкил қилди, ферментларнинг оптимал температураси - 45 ва 55⁰С ни ташкил қилди.

Анион алмашинуви резинасига (Dowex(R) (1x8:50-400, 1x4:50-400, and 1x2:100-400) адсорбция таъсир эттириб, молиявий мақсадларда дрожжа ферментлари ёрдамида (инвертаза) «Bioinvert» препарати яратилди. Ферментнинг оптимал боғланиши 32⁰С ҳароратда ва и pH 5.5. K_m и V_{max} ферментида: 38.2 мМ ва 0.0489 Ед/мл ларда ҳам кузатилди [Tomotani E., 2004].

Ферментлар (инвертаза) 1-2 диаминэтан ва 1-3 диаминпропан билан активация қилинганидан сўнг со-алкил полиамин кислота димерида иммобиллаштирилди. Катализнинг кинетик параметрлари эркин фермент учун V_{max} и K_m ёки 18.2 мМ и 6.43×10^{-5} моль дМ⁻³ ва иммобиллашган препаратда V_{max} и K_m 23.8-35.3 мМ ва $7.97-11.71 \times 10^{-5}$ моль дМ⁻³ мин⁻¹ни ташкил қилди. 1 ой 4⁰С да сақланиш натижасида ферментлар 89% ва 40-30% тажрибадан олдинги ҳолатига нисбатан ўз активлигини йўқотади ва оптимум температурада 4,5 ва 50⁰С да иммобиллашган. 43 марта фойдаланилганидан сўнг уч кунлик препарат 76-80% бошланғич активликни кўрсатди [Tufan H., 2004].

ферментлар тозаланган ва қуритилган гуруч пленкасида иммобиллаштирилди, пленка 2 % полиэтилен билан глутаральдегид (2%) орқали қопланган [D'Souza S. F., 2002].

Иммобилизация вақтида фермент карбоксил боғланиш ва хитозан орқали боғланди, у ўз фаолигини 91% сақлаб қолди, ва ферментнинг термостабиллиги кўтарилди. Тогда как при иммобилизации инвертазы через связывание белковой части фермента хитозан ва сефарозада оксил боғланишнинг фермент қисмида инвертазанинг иммобилизацияси термостабилликни жуда кичик микдорда кўрсатади. рН оптимум 4,5 дан 2,5 га кўтарилди, субстратнинг оптимал концентрациси ферментнинг максимал активлиги учун 0,5 дан 1,0 М гача кўтарилди [Hsyue J., 2000]. Инвертазанинг иммобилизацияси жараёнида *Saccharomyces cerevisiae* модификацияланган хитозан ва карбоксиметилцеллюлозада эффектив боғланиш оксилдан 72% ни кўрсатди, фермент 68% га ўз актив ҳолатини сақлаб қолди [Leissy G., 2006].

Мазкур ишнинг асосий мақсади тайёр олинган махсулотнинг озиқа технологияси, органик муҳит, мисол учун этанолда қўланиладиган ферментнинг иммобилланиши методини аниқлашдир. Қўйилган мақсад ташувчи сифатида эман гранулалари, фермент сифатида ачитқи эстеразаси қўлланилиши билан амалга оширилади. Бу эса ферментни барқарорлаштириш, юқори фаолликка, озиқа технологиясида озуқавийли хусусиятга эга ферментни олиш, фермент эфирининг синтезини амалга ошириш имконини беради.

Эстеразани иммобилизацияси шуни кўрсатдики, аввал таклиф қилинган методлар мураккаб ва технологик эмас, уларнинг баъзилари тор ва спесифик қўлланилиш усуллари ўз ичига олади, шаклланган боғламлар доим барқарор бўлади. Уларнинг кўпчилигини озиқ технологиясида, хусусан, лекер сув қурилмаларининг қайта тозаланиши учун қўлланилиши мумкин эмас, чунки бу ферментнинг ўзини органик муҳитда қандай тутиши номаълум. Шунингдек баъзи ташувчилар токсик бўлиб, улар озиқа технологияси учун бегона ва хавфли махсулотни ўз таркибига олиши

мумкин. Бу ердаги энг асосий муаммо бу модданинг реакцион формасининг ўзгаришидир, эстеразанинг боғланиши учун функционал группасининг шаклланиши ва уни таркибидан таннинларни ажратиб ташлаш ҳам бу ерда жуда мухим.

1.4. Эстеразани ажратиб олиш

Эстераза бу мураккаб эфирлар ўртасидаги алоқаларни катализловчи ферментларнинг катта гуруҳидир (20 дан кам бўлмаган). Эстераза (ЕС 3.1.1.1) қисқа занжирли ёғ($\leq C10$) эфирли субстратларни гидролизлай олади. ($\leq C10$), бундай ҳолларда липазалар эса узун занжирли ацилглицеролларни ($\geq C10$) гидролизлайди. Одатда эстеразалар 4 турга бўлинади: холинэстеразалар – зарядланган субстратларни маъқул кўради (холин эфири ва бқ.), мазкур эстераз тури кўпроқ анъанавий электрофоретик анализ орқали турли организмларга аниқланади; ацетилэстеразалар – алифатик субстрактт сифатида углеводородларни маъқул кўради, хусусан, сирка кислотасини; арилэстеразлар – ароматик субстрат сифатида углеводородларни маъқул кўриб, олтингугурт водородининг бирикмаларии билан ингибирланади; карбоксилэстеразлар – субстрат сифатида эфирларнинг алифатичек турини маъқул кўради (етарлича узун бўлган) бирикмаларни мақул кўриб, ингибирланади, шунингдек фосфорорганик бирикмали холинэстеразлар ҳам шунга тегишли.

Турли манбалардан олинадиган эстеразалар кучли фарқланади. *Candidarugosa* хужайрасиз эстеразани ёки липазни озиқ муҳитидаги оксил манбасидан қатъий назар ажратиб кўрсатган экан, соя пептони эстеразнинг, мочевина липазанинг ажралишини кўрсатди. Ўрмон ёнғоғи, оливка, кунжут дони, соя пояси ёғ кислоталари манбаи сифатида қўлланилди. Ўрмон ёнғоғи ва оливка кунжут донлари биомасса тўпланишига олиб келганда, эстераз ва липазаларнинг ажралиб чиқишини кўрсатди. Культивациялаш жараёнида *C.rugosa* 30⁰ С да хужайрасиз эстераз ва липаза ичида синтезланади, 35⁰С- да эса хужайрали биомасса тўпланди [Serpil T. at al, 2009].

Хозирги кунга қадар эстеразалар куплаб микроорганизмлардан ажратиб олинган. Масалан: ацетилциклин эстераза *Thermobifida fusca* NTU 22 културал филтиратдан ультрафилтрацион концентрация, Сефароза CL-6В ва ДЕАЕ – Сефароза CL-6В да колонкали хроматография орқали тозаланган [Yang et al, Ch.H., 2008]. Мазкур ҳолатда тозаланган фермент йиғиндиси 14,4% ни ташкил қилди. Тозаланган ферментнинг молекуляр массаси 30 – 28 кДт ни ташкил этди. Бунда ацетилскилан эстераза *T.fusca* NTU 22 нинг мономерии эканлиги аниқланди. Температура 80⁰ С ва рН 8,0 бўлган муҳит тозаланган фермент учун оптималлиги аниқланди. Zn ва Hg ионлари фермент активлигини ингибирлаши маълум бўлди. *p*-нитрофенилацетат ва ацетилсиланни Км ўлчами 1,86 мМ ва 0,15% ни ташкил қилди.

Бундан ташқари хужайра ичидаги эстеразаларни синтез қилувчи ачитқилар мавжудлиги аниқланган. *Kluyveromyces marxianus* CBS 1553 дан рацемик эфирлар глицерин 1.2-0-изопропилиденга нисбатан энантиоселектив гидролитик фаолликка эга бўлган хужайра ички эстеразаси ажратиб олинди ва тозаланди [Monti D. Et al, 2008]. Энантиоселектив эстеразаларни ажратиб олиш учун ўстиришнинг оптимал шароитлари ўрганилди. Охирги специфик активлик 300 Ед/мг. Бунда оксилнинг молекуляр массаси 29 кДа эди. EST1 рН 8,0 ва 10,0 оралиғида активлик намоён қилди ва рН турғунлиги 7,0 – 10,0 оралиғида бўлди. бундан ташқари, фермент 80⁰ С температурада барқарорлигини ва фаол ҳолатини сақлади ҳамда эритма таркибида 15% турли органик эритувчилар мавжуд бўлганда ҳам ўз фаоллигини катта қисмини сақлай олди. Глицерин 1.2-0-изопропилиден эфирларнинг сирка кислотасини гидролизлаганда Км ўлчами (R) – енантиомерга нисбатан ацетат (S) изопропилиден глицеринники анча паст бўлган бир вақтда фермент ўхшаш бўлган V_{max} ни намоён қилди (5,3 ва 70 мМ). Хар хил глицерин эфирлари ва турлича занжир узунлигига эга бўлган синтетик субстратлар иштирокида EST1 ни фаоллигини солиштириш унинг калта занжирли субстратлар билан специфик эканлигини намоён қилади.

1.5. Эстеразанинг органик синтездаги аҳамияти

Охирги ўн йилликда сувсиз мухитдаги биокатализ жараёнини ўрганиш жуда ривожланиб кетди [Castro G.R., 2003; Serdakowski et al., 2008]. Бу борада бир қанча органик синтезлаш реакциялари олиб борилди. Сувли ферментацияга нисбатан биотрансформациянинг органик аралашмали мухитда олиб борилиши саноатда муҳим ўрин эгаллади. Масалан: энантиоцелектив реакциясини кучли ўзгариши натижасида – реакция гидролизда термодинамик мувозанати, сувга бўлган талаби ва бактерияларда қирланишига қарши ўзгаришлар юз берган. Хозирги кунда гетероген биокатализ етакчи ўринни эгаллаган. Чунки булар ферментларнинг қуруқ қукунларидан тайёрланган крест шаклидаги кристаллардан иборат. Бундан ташқари ферментларни иммобиллашда қатнашмайдиган бефарқ ташувчилари ҳам мавжуд. Чунки улар энантиоцелектив синтеда қўлланилади. Реакциянинг паст кўрсаткичи гетероген биокатализ учун муаммо туғдиради. Шу пайтда гомоген системалардан фойдаланиш самарали ҳисобланади. Чунки диффузион тўсиқ субстратларни органик ва сувли мухит ўртасидаги реакция кўрсаткичларини ортишига олиб келади.

Эстераза ферментлари – биокатализлар ҳисобланиб, улар эфирларни гидролизлайди. Масалан: гидролаза (SNSM-87) *Klebsiella oxytoca* этил эфирлари гидролизи учун ишлатилади, 2-гидроксикарбоксил кислотаси оптик тозалиги учун саноатда кўп миқдорда фойдаланилади [Wang P.H. et al, 2008]. *S.cerevisiae* эстеразаси фэнилураг гидролизини амалга ошира олади [Bialecka-Florjanczyk E. Et al, 2010].

Ушбу ферментлардан органик синтезларда тез-тез фойдаланилади. Ҳеч бўлмаганда уларнинг табиий функцияси сувли эфирлар гидролизидида қатнашади. Аммо органик аралашмаларнинг кам миқдорида ферментлар фаоллиги юқори даражада бўлади. Буни афзаллиги шундаки, улар гидрофоб реакциялар ўрнига этерификация реакцияларини олиб боради. Этерификация жараёнида спирт эфирларининг синтезланиши қайтариш реакциялари

дейилади. Қўлланилган актив эфирлар кислота донори сифатида мувозанат константасини махсулот томонга силжитади. Хозирги кунга қадар қўплаб актив эфирлар синтезланган аммо шуларнинг хаммасидан ҳам қўлланилавермайди. Қўп қўлланиладиган актив эфирларга кислота донори ва винилацетатларни айтиш мумкин [Chenevert R., 2006].

Эстераза ва липазалар органик синтезда ўз ўрнини топа олди [Tutino M.L., 2010]. Турғун ферментларнинг гомогенлари тузлар аралашмасида аниқланган. Шу билан бирга юқори температурада ферментлар турғунлиги ва органик аралашмалар турғунлигининг корреляцияси ўрганилган. Масалан: глюкозадегидрогеназининг 80% гача бўлган турғунлиги органик аралашмаларда аниқланган [Vazquez-Figueroa E. et al., 2008]. *Fusarium solani pisi* нинг органик мухитида этил эфирининг ўрта занжири кутиназа ферменти ёрдамида синтезланган [De Barros D.P.C. et al., 2010].

Ибупрофеннинг энантиоселектив этерификацияси рацемик қоришмада иммобиллашган липаза орқали текширилди (Novozym 435). S-изопрофен липазалар мухитда ажратиб олинди, уларда моляр алоқа ва этанол и ибупрофеннинг -7, 4,8% ли суви, 160 мг фермент 45⁰Сда хосил бўлди. ибупрофена консерванти 54-63% ни ташкил қилди [Foresti M.L. et al, 2009; Woodcock et al, 2008]. Икки фазли системада (R,S) этил эфири хосил бўлди (55⁰С, pH6, изооктан); геранил-пропионат (конверсия 93%) пропин кислотасининг ферментатив этерификацияси липазанинг сувсиз мухитида [Paroul N.et al, 2010] 40⁰С да хосил бўлди, гераниолнинг моляр алоқаси гераниолнинг пропионин ферментига рақиоси 3:1, 10% ферментни; бетулин кислотасининг антирак агенти 3-о-фталил- (64,7% конверсия) н-гексан (хлороформа) этерификацияси ва бетулин кислотаси ҳамда фтал ангидриди иммобил липаза *CandidaAntarctica* (Novozym 435) мухитда, молярным алоқа орқали бетулин кислотасининг фтал 1:1,11 нинг 54 ⁰С хароратда [Faujan at al, 2010] 20 соатлик инкубациядан сўнг хосил бўлишига олиб келади; иммобиллашган липаза *Bulkholderiamultivorant* L-аскорбин кислотасининг

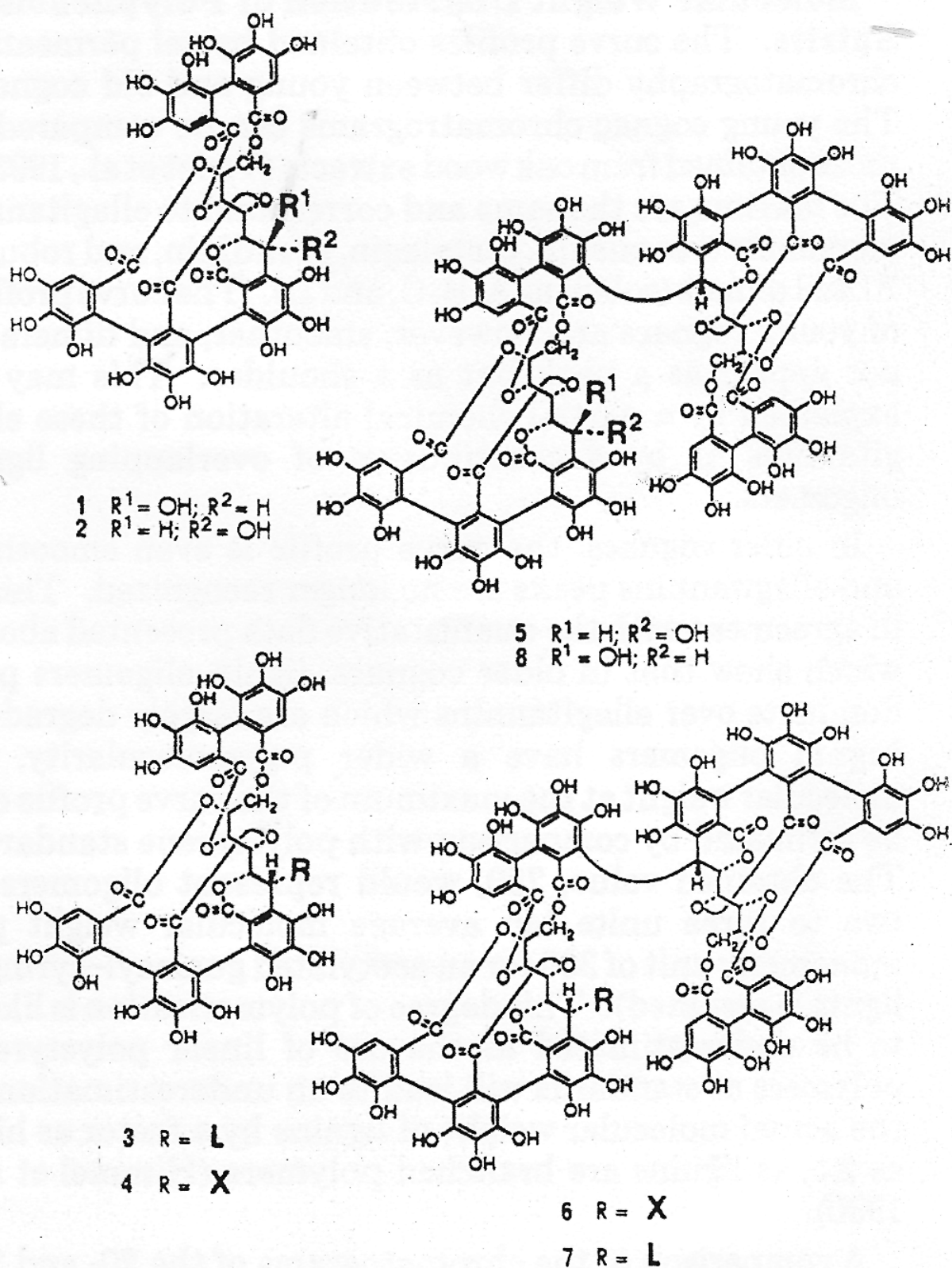
антиоксидант эфирлари (чиқиш 80%) да микротўлқинлар фаоллашади [Kidwai M.et al, 2009].

Органик мухит ферментлар ва уларнинг синтетаз фаоллиги учун жуда зарур, лекин, ажратиб олинган шаклдаги ферментлар уларда барқарор эмас. Ферментларнинг барқарорлаш учун уларнинг иммобилизацияси жуда мухим.

1.6. Танин ва унинг ўзига хос хусусиятлари

Асрлар мобайнида спиртли ичимликлар каторига кирувчи виски, коньяк ёки вино ичимликларини таъмини, хидини ва рангини яхшилаш мақсадида ёғоч бочкалар ичида сақланган. Аммо бундай ичимликлар ҳар қандай ўсимлик ёғочидан таёрланган идишларда ҳам сақланавермайди. Америкада ўсувчи оқ эман дарахти (*Quercus alba L.*) ва Европа давлатларида ўсувчи эман дарахти (*Quercus robur L.*) дан ясалган идишларда сақланадиган ичимликларнинг сифати вақт ўтган сари яхшиланиб боради. Бир қанча изланишлар шуни кўрсатадики, дуб ёғочларида умумий таъсир қилувчи хусусият бор масалан физик механик ва кимёвий. Оқ эман 45-50 % целлюлоза, 22-25 % гемицеллюлоза, 23-32 % лигнин ва 3-10 % турли хил кислотали бирикмалар яни карбогидратлар ва фенолли бирикмаларни ўз ичига олади. Америка ва европа давлатларида ўсувчи эманлар ўртасидаги асосий фарқ *Quercus robur L* кўпроқ қуруқ масса ташкил қилади ва ташқи мухитга фенолли бирикмаларни *Quercus alba L* га қараганда камроқ ажратади аммо *Quercus alba L* танин таъмини яхшилашга ёрдам беради [Nabeta K., et al, 1987].

Ҳозирги кунга қадар танинларнинг бир қанча турлари ўрганилган. Масалан, эллагитанин структураси қуйидагилардан ташкил топган (1.6.1-Расм): 1- Эллагитанинни вескалагин изомери, 2-Эллагитанинни касталагин изомери, 3- Грандинин, 4- Робурин Е, 5- Робурин А димери, 6- Робурин В димери, 7-Робурин С димери ва 8- Робурин D димери.



1.6.1-рasm. Эллагитанин ва унинг изомерлари.

Лекин ёғоч таркибидаги айрим эрувчан моддалар спиртли эритмада эриб алкоголь ичимликлар сифатига салбий таъсир кўрсатиши мумкин. Бундан ташқари ичимликни таъмини яхшиловчи консерватлар билан ўзаро бирикиб комплекс бирикмалар ҳосил қилиш хусусиятига ҳам эга. Адабиётлардан маълумки эман гранулалари таркибидаги этанол экстрактлари винога эман таъмини беради. [Mayer W., at al, 1967]

Бундан ташқари, С-гликозидли грандинин ва робурин Е бир канча винолар учун фақат вескалагин ва касталагин қизил вино тамига салбий таъсир кўрсатиши мумкин. Ушбу кашфиётлар ва маълумотларни биргаликда қўллаш натижасида эман бочкаларидан полифенолнинг ажралаб чиқиши натижасида фенол концентрацияси ортиб бориши ва фенолли бирикмалар вино таъмини юмшатиши аниқланган. [Росов, К. F., at al, 1994].

Эман ёғочидан ясалган идишларда сақланувчи спиртли ичимликларнинг сифати йилдан-йилга яхшиланиб боради. Чунки эман ёғочлари таркибидан ажраладиган моддалар асосан фенолли бирикмалар ҳисобланади. Буни текшириш учун икита идиш устида олиб борилган изланишлар натижасига назар солсак, бунда, умумий моддалар (қуруқ экстрактлар) ва полифеноллар икита эман ёғочидан ясалган идиш ичида бўлиб, биринчи идиш 7 йиллик аммо ишлатилмаган, иккинчи идиш эса 10 йиллик ишлатилган. Эски идишдан ажралган экстракт моддалар миқдори биринчи (7 йиллик ишлатилмаган) идишдан экстракцияланган моддаларга қараганда 7 марта камлиги аниқланди. Янги идиш ичидаги кўп йиллик бренди ичимлиги таркибидаги полифенол концентрацияси тахминан 0,7 г/л. Бу кўрсаткич қуруқ экстрактнинг 1/3 қисмини ташкил қилади. Идиш ичидаги полифенолларнинг кўпчилиги сувда эрийди. Эритма таркибида асосан икки хил органик моддалар бўлади. Унинг асосий қисмини эллаготанинлар ташкил қилса қолган ярмини лигнин олигомерлари ташкил қилади [J. Argic., Food Chem., -V.41. № 11, 1993., -P. 1874].

ТАЖРИБА ҚИСМИ

2-боб. Тадқиқотларда қўлланилган услуб ва ашёлар

Ишда *Saccharomyces cerevisiae* ачитқиси ферментидан фойдаланилди.

Асбоб –ускуналар: Центрифуга К-24Д (“VEB MLW Medizintechnik”, ГДР), магнит аралаштиргич ММБ, спектрофотометрик тадқиқотлар ФЭК-М да олиб боради (Загорский оптика-механик завод, СССР), ультратермостат TYPE LV-644 (“HTA RUTESX”, Венгрия).

Реагентлар: эман гранулалари ва этанол (“Тошкентвино”, томонидан тақдим этилган, Ўзбекистон), н-бутанол, хлорид кислота, сирка кислота, танин, K_2HPO_4 , этилацетат, изоамилоцетат (к.т. ёрлиғида “Реахим”, Россия), дистилланган сув. Фосфат буферни тайёрлаш учун K_2HPO_4 ва KH_2PO_4 дан фойдаланилди.

2.1. Эстеразанинг эфир хосил қилувчи фаоллигини аниқлаш

Эстеразанинг синтезловчи фаоллигини (ЭС) аниқлаш 20 мл центрифугаланиб олинган култура суюқлиги 20 мл 2 % ли сирка кислотасини ва 20 мл 10 % ли этил спиртини тутган инкубацион аралашма (културал мухит) олиб борилади. Назорат аралашмага вино тескари музлатгичли сув хаммомида бир соат қайнатиш йўли билан иннактивациялангандан сўнг қўлланилади. Тайёрланган аралашмалар (тажриба ва назорат) 1 – 5 суткагача термостатга 37^0 га инкубацияга қўйилади. Инкубациядан сўнг тўғридан-тўғри титрлаш усули ёрдамида назорат инкубацион аралашмага нисбатан тажриба инкубацион аралашмасидаги сирка кислотасини миқдорини камайиши аниқланади.

Фермент фаоллиги шартли бирликларда ифодаланилади (у.е.-ш.б.). Синтезловчи эстеразанинг ширтли бирлиги бу бир литр мухитда

ферментнинг шундай миқдорики, бунда маълум шароитларда бир дақиқа ичида бир микромоль сирка кислотасидан эфир ҳосил бўлишини катализлайди. Ҳисоблашлар қуйидаги формулалар ёрдамида амалга оширилади:

$$\frac{b-a}{c} \cdot 1000 \cdot 6$$

$$\text{ЭГ} = \frac{7200 \cdot 0,06}{c} = 4,2 \text{ (в-а) у.е.}$$

Бунда: ЭС – синтезлаётган эстераза фаоллиги, у.е.

а;в; 100; 0,06; 6 – см. ЭГ аниқланган ёзувлари,

с – титрлаш учун олинган, 10 мл инкубацион аралашмасидаги культурал суюқликнинг мл,

7200 – инкубацион вақт, минутда [Райдер ва бошқалар., 2010].

2.2. Лоури усули бўйича оксил миқдорини аниқлаш

1. 0,1 н NaOH да тайёрланган Na_2CO_3 – 2 % еритмаси
 2. 1% ли натрий цитрат эритмасидаги CuSO_4 нинг 0,5 % ли эритмаси
 3. № 2 – реактивнинг 50 мл билан аралаштирилади.
- Аралашма бевосита ишлатишдан олдин тайёрланади.
4. Фолин реактиви.

Ишининг бориши: 10 – 100 мкг оксил тутган тадқиқ этилган эритма дистилланган сув билан 4 мл гача етказилади. 2 мл 3 № реактив билан аралаштирилиб хона ҳароратида 101 дақиқага қолдирилади. Сўнг 0,2 мл фолин реактиви қушилади, аралаштирилади ва 30 – 40 дақиқадан сўнг мос келувчи фильтрни қуллаган ҳолда ФЭК да 750 нм оптик зичлиги ўрганилади (Lowry O., 1954).

2.3. Танинни экстракциялаш

4 грам эман гранулаларига 50 мл NaOH ни 0,5 % ли эритмаси қўшилади ва 25⁰ да 24 соат давомида магнит аралаштиргич ёрдамида экстракцияланди. Экстракт дистилланган сувда суюлтирилди ва экстракцияланган танинлар миқдори ФЕК (D₃₁₅) да аниқланди [Jordao A.M., et al, 2005].

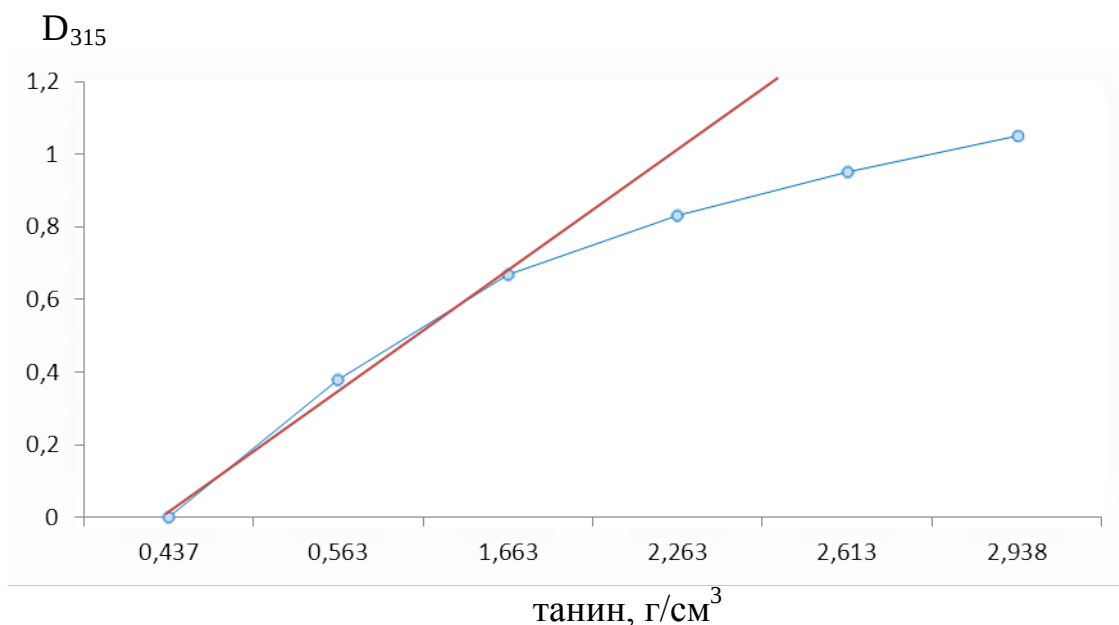
2.4. Эстеразани иммобиллаш

Эман гранулалари 5 – 20 % ли NaOH билан 20 – 25⁰ С да 20 дақиқа давомида аралаштирилган холда илаб берилди ва 2 маротаба дистилланган сув билан ювилди. Сўнг ташувчи 10 мл (5 мг/мл) дан ошмаган метапериодат натрий ёрдамида аралаштирилган холда 25⁰ да 30 соат давомида фаоллантирилди. Сўнг суюқлик оқизиб филтирланиб ташланди ва фаолланган ташувчи аввал 10 мл 0,1 н рН 7,5 га тенг бўлган борат буфери билан ювилди, сўнг 10 мл глицериннинг (10 %) буфер эритмасида (рН 7,5) ва яна 0,1 рН 7,5 борат буфери билан ювилди. Сўнггра ишлов берилган ташувчига ферментни иммобиллаш амалга оширилди, бунинг учун эман гранулаларига фермент қўшилди 10 мл (0,4 – 2мг/мл). Фермент эса аввалдан 0,1 н рН 7,5 бўлган борат буферида эритилди. Иммобиллаш жараёни 4⁰ С да доимо аралаштирилган холда 20 соат давомида олиб борилди. Бундан сўнг хосил бўлган шифф асосларининг барқарорлаштириш амалга оширилди, бунинг учун мухитга 2 – 10 мг/мл миқдорда бор гидрид натрий қўшилди ва доимий аралаштирилган холда яна 3 соат давомида ушлаб турилди. Адсорбцияланган ферментларни олиб ташлаш учун, иммобилланган препаратни 1 н NaCl тутган 1 мм ЭДТА билан ювилди ва охирида дистилланган сув билан ювилди. Иммобилланган фермент препарати 4⁰ да куритилди [Райдер ва бошқалар., 2011].

3-боб. ОЛИНГАН НАТИЖАЛАР ВА УЛАРНИНГ ТАХЛИЛИ

3.1. Эман гранулаларидан танинларни экстракциялаш

Эстеразани спиртли ичимликларни таъмини яхшилаш учун қўллаш мақсад қилиб қўйилганлиги сабабли эман гранулалари таркибидаги танин моддаларини чиқариб ташлаш керак, чунки танин спиртли ичимликларни (дистиллатларни) таъмини бузади. Бу эса кутилаётган натижага янада салбий тасир кўрсатиши мумкин. Бунда бошқа муаммо келиб чиқиши мумкин, эстераза ферментини эман гранулаларига тўғридан-тўғри иммобилланса, эман гранулалари таркибидаги танин моддаси фермент билан бирикиб танин-фермент комплексини ҳосил қилиши мумкин. Шунинг учун бу ишда танинни эман гранулалари таркибидан чиқариб ташлаш мақсад қилиб қўйилди. Адабиётлардан маълумки ёғоч гранулалар таркибидаги танин моддасини ажратиб ташлаш учун гранулаларга NaOH нинг 0,1 – 20 % оралиғидаги эритмалари билан ишлов бериш мумкин. Шунинг учун биринчи босқичда тоза танин моддасини миқдорини аниқлаш мақсадида бирламчи калибровка чизиғи таёрланади. Бунинг учун, дастлаб тоза танин моддасидан 1,0 грам олиб уни 100 см³ дистилланган сувда эритилди, центрифугаланди (5000 а/мин) ва супернатантдан кейинчалик турли суютирилган намуналар тайёрланади ва қўлланилди. Шундан сўнг тайёрланган эритмадан дистилланган сувда турли концентрацияли эритмалар таёрлаб, уларнинг ҳар бирини ФЕК (D₃₁₅) ёрдамида танин оптик зичлиги аниқланди [Jordao at al., 2005]. Тажрибадан олинган натижалар 3.1.1- расмда келтирилган. Мазкур жараён 20 – 25⁰ ли хона ҳароратида олиб борилди.

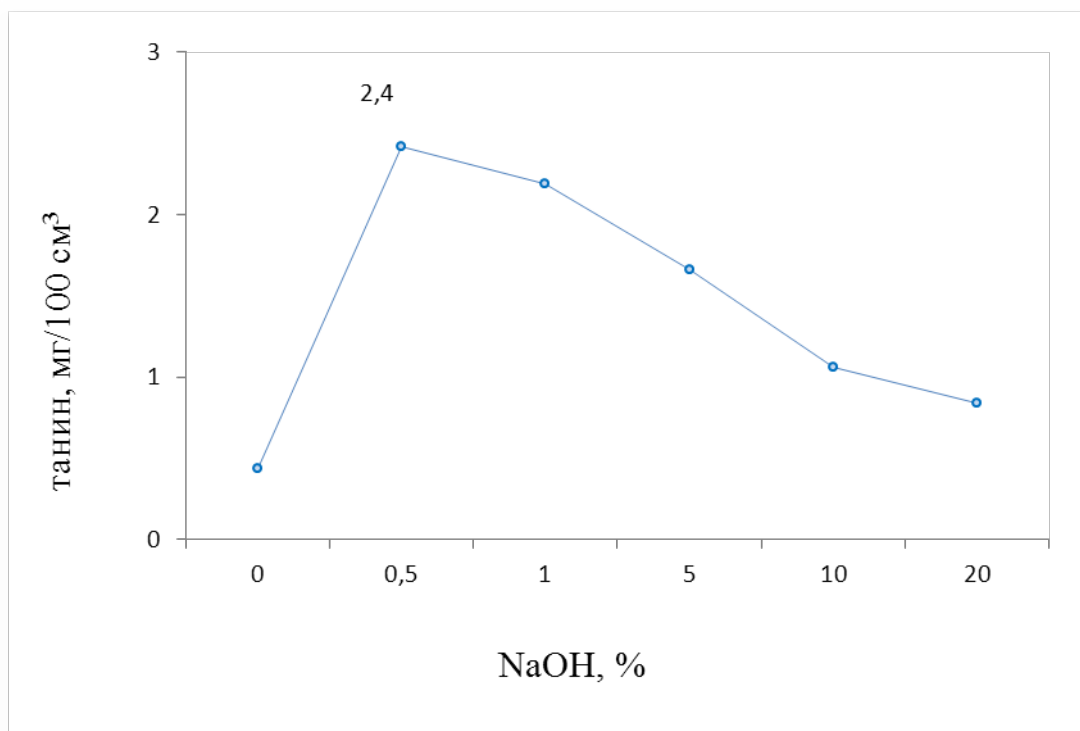


3.1.1-расм. 1,000 грам. тоза танин моддасидистилланган сувда эритиб оптик зичлигини аниқлаш ва калибровка чизиғи чизиш.

Бунда ордината ўқига ФЕК (D_{315})да олинган оптик зичлик натижалар келтирилган. Абсисса ўқига эса таниннинг миқдори мг/см^3 кўрсатилган (1-илова).

Кейинги боскичда гранулаларга NaOH нинг турли концентрациядаги эритмалари билан ишлов берилди. Бунда, 100 мл хажмга эга бўлган 6 та колба олинади, уларнинг ҳар бирига 1,000 граммдан эман гранулалари солиб, NaOH (50 мл) нинг 0.5% дан 20% гача турли концентрациядаги эритмалари билан 48 соат давомида экстракцияланди. Олинган натижалар 2-иловада келтирилган. Ушбу тажрибадан мақсад: NaOH нинг неча фоизли эритмаси танинлар экстракцияси учун оптималлигини аниқлаш. Тажрибадан олинган натижалар 3.1.2-расмда келтирилган. Бунда экстракт:сув нисбати

гидромули 1:20 ва суюқликда экстракцияланган танин миқдори оптик зичлиги ФЕК D_{315} да аниқланди.

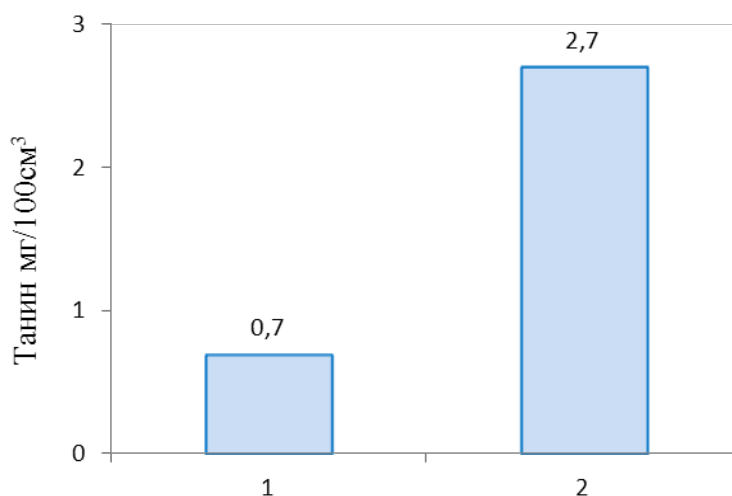


3.1.2-рasm. NaOH нинг турли % даги еритмалари билан ишлов берилган, екстракт дистилланган сувда суюлтирилган.

Шундан сўнг, олдиндан дистилланган сувда ивитилган эман гранулалари 0,5% ли NaOH билан экстракцияланди. Бунда гранулалар ва NaOH 1:50 нисбатда олинган. Экстракт дистилланган сувда суюлтирилди, гидромул 1:10 (экстракт:дистилланган сув) нисбатида олинди. Тажрибада экстракцияланган танин оптик зичлиги ФЕК D_{315} да аниқланди.

Мазкур ишдан мақсад шуки, NaOH нинг 0,5% ли эритмаси танин экстракциялашда оптималлигини аниқлаш. Маълумки, танинлар намланган эман гранулалари таркибидан куруқ холатдагисига нисбатан яхшироқ

экстракцияланади. Шунини текшириш мақсадида (0,5% ли) NaOH билан экстракция тўғридан-тўғри яъни сувда намланмаган эман грануларида ва бир сутка давомида 1:10 (экстракт:дистилланган сув) гидромодулда дистилланган сувда ивитилган эман гранулаларида олиб борилди. Тажриба натижалари 3.1.3-расмда акс эттирилган.



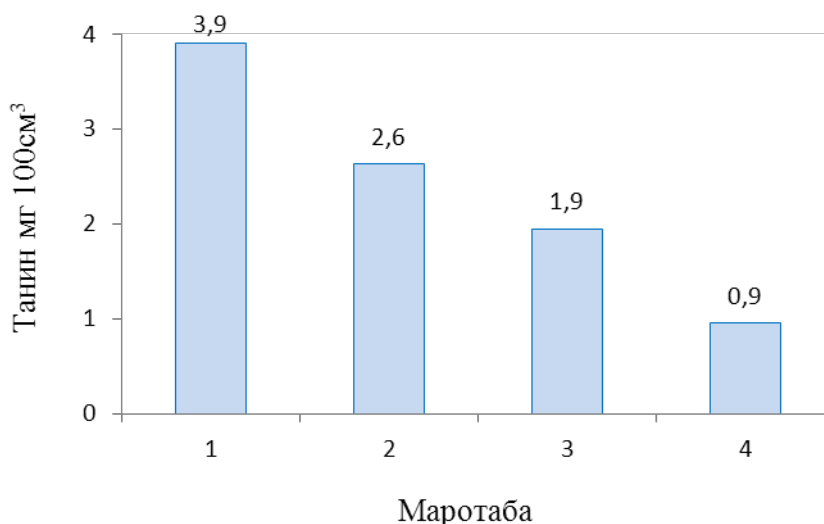
3.1.3-расм. Танинлар экстракциясига намликни таъсирини аниқлаш.

1 – гранулалар тўғридан тўғри 0,5% ли NaOH эритмаси ёрдамида экстракцияланди; 2 – гранулалар дастлаб дистилланган сувда ивитилган сўнг 0,5% ли NaOH эритмаси ёрдамида экстракцияланди.

Кўриниб турибдики, эман гранулаларининг намлиги таркибидаги танинлар экстракциясини кучайтирди ва экстракцияланган танинлар миқдори 2,7 мг/см³ ни ташкил қилди.

Навбатдаги босқичда, 4,000 гр эман гранулалари 60 мл 0,5 % ли NaOH эритмаси билан экстракция қилинди. Ажратиб олинган танинли эритма яни экстракт дистилланган сувда суюлтирилди. Бунда гидромодул 1:15 (экстракт:сув) нисбатда олинди. Тажрибадан мақсад: гранулалар дистилланган сувда экстракцияланганда, қанча миқдорда танин ажратиб олиш мумкинлигини аниқлаш. Тажриба 4 босқичда амалга оширилди. Хар

бир босқичда ажралиб чиққан танин оптик зичлиги ФЕК D_{315} да аниқлаб борилди. Олинган натижалар 3.1.4-расмда келтирилган.

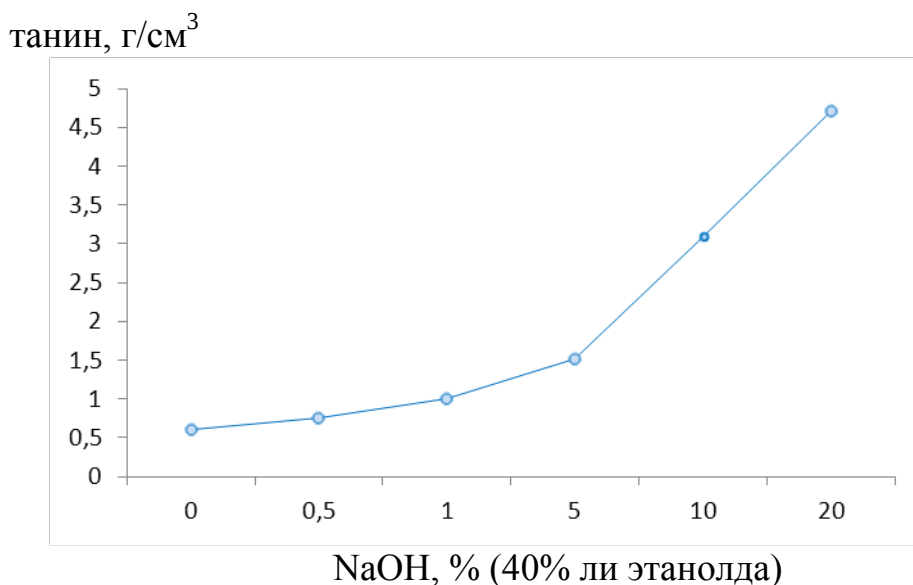


3.1.4-расм. 0,5 % ли NaOH эритмаси ёрдамида танинларни эман гранулаларидан экстракциялаш (тажриба 4 босқичда амалга оширилди)

3.1.4-расмдан кўриниб турибдики, эман гранулалари биринчи маротаба 0,5 % ли NaOH эритмаси билан экстракцияланганда танин ажралиб чиқиши энг юқори даражада ($3,9 \text{ мг/100 см}^3$) эканлиги аниқланди.

Кейинги босқичда 1,000 гр эман гранулалари 100 см^3 40% ли этанолда ивитилди ва NaOH нинг (40% ли этанолдаги) 0,5; 1; 5; 10; 20 % ли эритмалари ёрдамида экстракцияланди. Тажриба давомида ажратиб олинган экстракт дистилланган сувда суюлтирилди. Бунда гидромодул 1:10 (экстракт:сув) нисбатда олинади. Экстракт таркибига ажралиб чиққан танин миқдорини оптик зичлиги ФЕК D_{315} да аниқланди. Мазкур экспериментни амалга оширишдан мақсад, 40% ли этанол эритмасида қанча миқдорда танин экстракцияланишини ва этанол NaOH нинг 0,5; 1; 5; 10; 20 % ли

эритмаларининг қайси бирида кучлироқ таъсир қилишини аниқлаш. Тажриба натижалари 3.1.5- расмда акс эттирилган.



3.1.5-расм. Эман гранулаларидан танинларни 40 % ли этанолдаги турли % ли NaOH эритмалари билан экстракциялаш.

Жадваллардан кўриниб турибдики, NaOH нинг 0,5 % дан 20 % га қараб концентрацияси ортиб бориши билан, эман гранулалари таркибидан танинни экстракцияланиш миқдори ҳам ортиб борган. Гранулалар таркибидан танинни экстракциялаш учун NaOH нинг 20% ли эритмасидан фойдаланилса танин экстракцияланиши юқори кўрсаткични намоён қилди.

3.2. Ачитқи эстеразасини иммобиллаш

Хозирги даврга келиб иммобиллаш ва ферментларнинг барқарорлигини самарали оширишга йўналтирилган кўпгина услублар ишлаб чиқарилганига қарамасдан ханузгача бу мақсад учун стандарт услублар мавжуд эмас. Алохида технологик жараёнда юқори барқарорлик ва самарадорликни

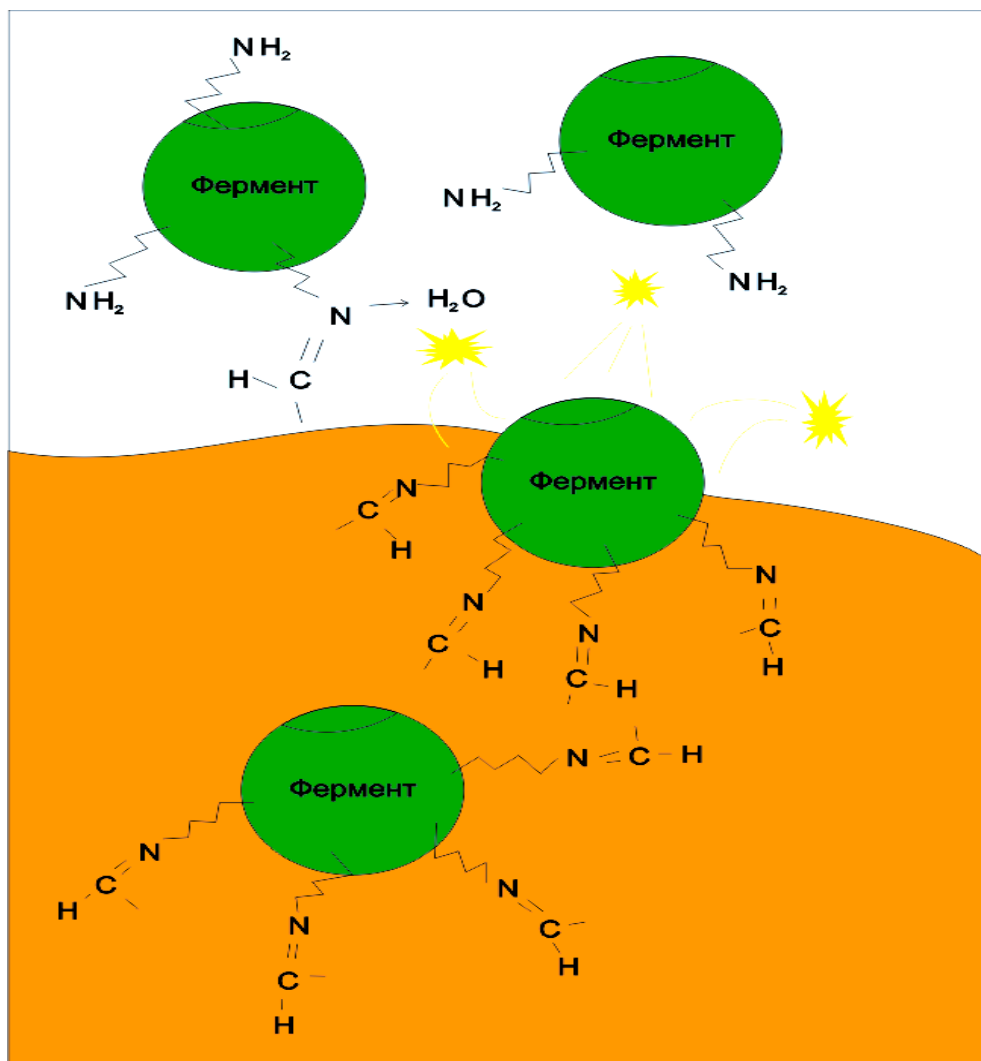
таъминлаш мақсадида ҳар бир фермент учун махсус шароитлар ва ташувчилар талаб қилинади.

Қўйидаги ишинг мақсади озиқ-овқат саноатида, органик муҳитда, хусусан, этанолда қўллаш мумкин бўлган махсулотни олиш учун ферментларни иммобиллашни оддий, арзон ва соддалаштирилган услубини яратишдир.

Фермент иммобилизациясини кимёвий асоси қўйида келтирилган, бунда:

1. Ташувчи юзасида альдегид группаларини ҳосил бўлиши учун эман гранулаларини натрий периодат билан фаоллантириш (0,2%).
2. Эман гранулаларини ортиқча қолган натрий периодатдан тозалаш (ювиш 10% ли глицерин ва дистилланган сувда олиб борилди).
3. Шифф боғлари орқали фермент (2 мг/мл, рН 7, 40⁰С) иммобилизацияси.
4. Шифф боғларининг натрий боргидрид орқали қайтариш.
5. Иммобилланмаган ва ноковалент боғланган ферментни ажратиб чиқариш (ювиш дистилланган сув ва 40% ли этанол ёрдамида олиб борилди).

Тавсия этилаётган услубда ташувчи сифатида юқорида келтирилгани каби, метапериодат натрий билан активланган ва ферментнинг аминогурухлари билан ковалент боғ ҳосил қилувчи альдегид гурухларини тутган эман гранулаларини қўлланилади, уларни натрий боргидрид билан барқарорланиши шифф боғларини ҳосил бўлишига олиб келади. Услубни юқорида келтирилган шароитда амалга оширганда ферментни барқарорлаштириш, жараённинг давомийлигини қисқартириш, уни соддалаштириш (ихчамлаштириш), вақт ва реагентларни кам харажатлар билан озиқ-овқат технологиясида эфирларни ферментатив синтезида қўллаш учун юқори самарали иммобилланган ферментларни олишга имкон яратади.



3.2.1-расм. Фермент иммобилизацияси кимёвий асоси.

Ферментларни қуйидаги усулда иммобиллаш учун эман гранулалари 5 – 20 % ли NaOH билан 20 – 25⁰ С да 20 дақиқа давомида аралаштирилган холда илаб берилади ва 2 маротаба дистилланган сув билан ювилади. Сўнг ташувчи 10 мл (5 мг/мл) дан ошмаган метапериодат натрий ёрдамида аралаштирилган холда 25⁰ да 30 соат давомида фаоллантирилади. Сўнг суюқлик оқизиб филтрланиб ташланади ва фаолланган ташувчи аввал 10 мл 0,1 н рН 7,5 га тенг бўлган борат буфери билан ювилади, сўнг 10 мл глицериннинг (10 %) буфер эритмасида (рН 7,5) ва яна 0,1 рН 7,5 борат буфери билан ювилади. Сўнггра ишлов берилган ташувчига ферментни иммобиллаш амалга оширилади, бунинг учун эман гранулаларига фермент қўшилади 10 мл

(2мг/мл). Фермент эса аввалдан 0,1 н рН 7,5 бўлган борат буферида эритилади. Имобиллаш жараёни 4⁰ С да доимо аралаштирилган холда 20 соат давомида олиб борилади. Бундан сўнг хосил бўлган шифф асосларининг барқарорлаштириш амалга оширилади, бунинг учун мухитга 2 мг/мл микдорда бор гидрид натрий қўшилади ва доимий аралаштирилган холда яна 3 соат давомида ушлаб турилади. Адсорбцияланган ферментларни олиб ташлаш учун, имобилланган препаратни 1 н NaCl тутган 1 мм ЭДТА билан ювилади ва охирида 20% ли этанол (дистилланган сувдаги) эритмаси билан ювилди. Имобилланган фермент препарати 4⁰ да қурилади. Бунда эстеразанинг синтезловчи фаоллиги 16 Ед/мг лиги аниқланди.

3.3. Имобилланган ферментни мухитга таъсирини аниқлаш

Эстеразани имобиллаш учун бир хил устунликка эга бўлган спиртлар конверсияланади. Бу борада этил спиртлари ёрдамида тажриба ўтказилган. Мазкур жараён 2 г/л сахароза ва имобилланган ачитки эстеразаси тутувчи 40% ли этанолда, 25⁰ С да олиб борилган.

Имобиллашувнинг эстеразани конвертрлаш орқали бажариш учун қоришмаларда олий нав спиртлар янги коньяк спиртлари билан эксперимент қилиб қўрилди. Бунинг учун этил спиртининг купажи тайёрланиб (68,1%), 2 г/л сахароза билан этил спиртининг (мустаҳкамлик, 40%) эстерази олинди ва 10 г микдорда ачитки эстеразаси 16 Ед/мг синтезловчи активлик билан 1 – 30⁰ С да 5 сутка давомида унинг активлиги кузатилди, аниқланган оптимал параметрлари конверсияси 3.3.1-жадвалда келтирилган. Этил спиртининг янги купажи текширув моддаси бўлди, юқорида келтирилган шароитларда дуб гранулалари қайта ишланди. Спиртли ичимликларнинг сифатига эман гранулаларининг таъсирини аниқлаш учун фермент иммобилизациясининг экстракт активлиги ва купажнинг мазаси текширилади, 10 грамли дуб гранулалари билан қайта ишланган этил спиртлари имобиллашуви ферментга нисбатан қўлланилади. Солиштириш учун шунингдек, оқ динар

коньяк ичимлигининг «Белый Ястреб» ва ёзги коньяк спиртидан тайёрланган купаж (мустаҳкамлик, 40%), (Самарқанддаги Ховренко заводи томонидан ишлаб чиқарилган 2 г/л сахарозали қоришма ҳам унинг таркибида мавжуд.

3.3.1-жадвалда келтирилган иммобилланган эстеразнинг этил спиртларининг органолептик баҳоланиши шуни кўрсатдики, қайта ишлаш этил спиртирнинг таъмини ўзгаришига олиб келади.

3.3.1-жадвал

Этил спиртларининг органолептик баҳоланиши

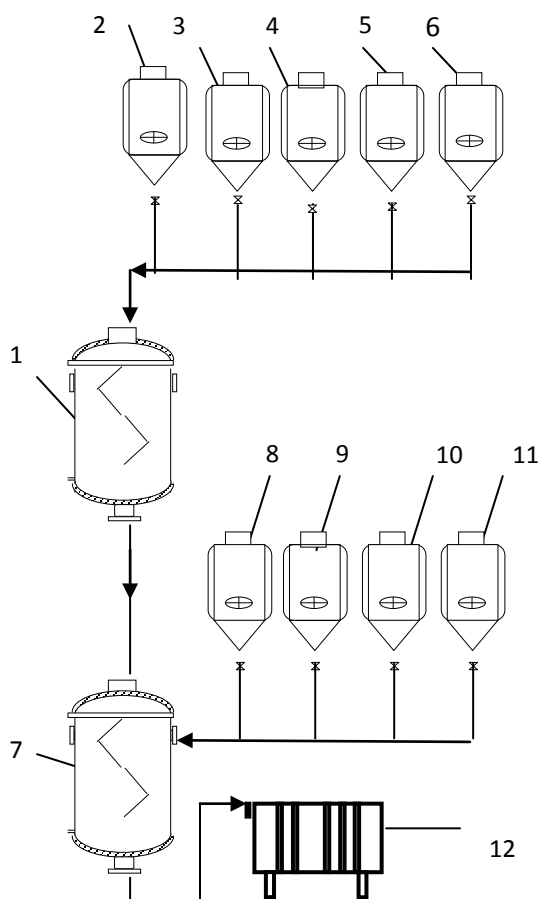
Классификация	Баҳолаш мезонлари	Хусусиятлари
<i>Солиштирма намуна</i>	1. Ранги- 2. Ташқи кўриниши – 3. Таъми -	Оч сариқ ; Тиниқ (шаффоф), ҳеч қандай чўкмасиз; Тахир ва аччиқ таъмга эга.
<i>Экспериментал намуна</i>	1. Ранги- 2. Ташқи кўриниши – 3. Таъми-	Рангсиз; Тиниқ (шаффоф), ҳеч қандай чўкмасиз; Жуда хушбўй ва йоқимли таъмга эга.

Шунингдек, алкоголь ичимликларнинг таъмини юмшаши ва соф ҳолга келиши, ароматда гул хидининг пайдо бўлиши стандарт наъмунадан уларнинг фарқли жиҳатлари ҳисобланади. Дуб гранулалари этил спиртининг наъмуналари билан қайта ишланган купажда оч сариқ соломен гуллари рангига ўхшаш рангни намоён қилди.

3.4. Имобилланган эстераза олишнинг технологик босқичлари

Аввало 1-реакторда ташувчи (эман гранулалари) сульфат кислота ва дистилланган сув билан ювилади, сўнг натрий метапериодат билан фаоллантирилади. Фаоллантириш жараёни сўнггида ташувчи глицерин ва буфер эритмалари билан ювилади. Ферментларни ковалент имобилланиш жараёни реакторга фаолланган ташувчи, фермент ва натрий боргидрид қўшилиши билан олиб борилади. Кейин олинган маҳсулотни суюқ қисми ажратилиб, натрий хлоридни сувли эритмаси ва дистилланган сув билан ювилади ва қуритишга қўйилади

Амалиётга қуйдаги технологик схемани таклиф этамиз.



1-ташувчи фаолланиши учун реактор; 2-NaOH учун резервуар, 3-дистилланган сув учун резервуар, 4-натрий метапериодат эритмаси учун резервуар, 5-глицерин учун резервуар, 6-буфер эритмаси учун резервуар, 7-ферментни имобиллаш учун реактор, 8-эриган фермент учун резервуар, 9-натрий боргидрид эритмаси учун резервуар, 10-натрий хлорид эритмаси учун резервуар, 11-дистилланган сув учун резервуар, 12-қуритиш аппарати.

Ишлаб чиқилган ушбу усул қуйидагиларни таъминлайди

1. Фаол фермент препаратларини олиш.
2. Бу усул турли ферментлар иммобиллаш учун осон ва арзон.
3. Озуқа аҳамиятига эга фермент маҳсулотларини олиш.
4. Келтирилган бу усулда иммобилланган фермент маҳсулотлари этанолда ва бошқа органик эритувчиларда барқарордир.
5. Ушбу усулда иммобилланган ачитқи эстеразасини ҳар хил турдаги эссенциялар тайёрлашда ва ичимликлардаги эфирларни фермент ёрдамида синтезлашда қўллаш мумкин.

Хулосалар

1. Эман гранулалари таркибидан танинларни чиқариб ташлаш учун экстракция жараёни шартлари қуйидагича: 0,5% ли NaOH, ташувчи – эритма нисбати 1:10, 25⁰ С, 24 соат давомида.
2. 0,5% ли NaOH билан ишлов берилган эман гранулаларида иммобилланган фермент фаоллиги 17 бирлик ($\frac{\text{МК МОЛЬ}}{\text{МИН} \cdot \text{МГ}}$).
3. 0,5% ли NaOH билан ишлов берилган эман гранулалари спиртли ичимлик сифатига салбий таъсир кўрсатмайди ва уни фермент иммобиллаш учун ташувчи сифатида қўллаш мумкин.

Адабиётлар руйхати

1. Абдуллаев У.К., Абдуразакова С.Х. Технология производства высококачественных натуральных красных вин // Индустрия напитков. 2006. -№.6. – С 30-32.
2. Вытовтов А.А., В.А. Герасимова Коллектив авторов Санкт-Петербургского Торгово-Экономического Института «Товароведение и экспертиза потребительских товаров», Глава 4 –// Учебник. – М.: ИНФРА-М, 2001.(серия «Высшее образование»).
3. Райдер Е.Ю., Мирзарахметова Д.Т., Дрожжева эстераза в водно – органической среде // 2010 № 2., С. 9-11.
4. Райдер Е.Ю., Мирзарахметова Д.Т., Способ иммобилизации эстеразы // Химия и химические технологии., 2011. -№ 1. ст. 76-78.
5. Altinok H., Aksoy S., Hasirci N. Covalent immobilization of invertase on chemically activated poly (styrene-2-hydroxyethyl metacrylate) microbeads // Russian chemical bulletin. 2007. –V.55. -# 10. –P.1860-1864.
6. Bialecka-Florjanczyk E., Krzyczkowska J., Stolarzewicz I. Catalytic activity of baker's yeast in ester hydrolysis // Biocatalysis and Biotransformation. 2010. –V.28. –№4. –P.288-291.
7. Castro G.R., Knubovets T. Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures // Critical reviews in Biotechnology. 2003. - V.23. -№3. -P. 195-231.
8. Chenevert R., Pelchat N., Jacques F. Stereoselective enzymatic acylations (Transesterifications) // Current Organic Chemistry. 2006. -V.10. -№10. -P. 1067-1094.
9. De Barros D.P.C, Fernandez P., Cabral J.M.S., Fonseca L.P. Operational stability of cutinase in organic solvent system: model esterification of alkyl esters // Journal of Chemical Technology&Biotechnology.2010. –V.85. – #12. –P.1553-1560.

10. Dufour J.-P., Malcorps P., Silcock P. Control of ester synthesis during brewery fermentation // *Brewing yeast fermentation performance*. 2003. – V.2. –P.213-233.
11. Faujan Bin A.H., Mansour Ghaffari M., Mahiran B., Rahman A., Basyaruddin M., Ensymatic synthesis of betulinic acid ester as an anticancer agent: optimization study // *Biocatalysis and Biotrandformation*.2010. – V.28. –№3. –P.192-200.
12. Foresti M.L., Galle M., Ferreira M.L., Briand L.E. // Enantioselective esterification of ibuprofen with ethanol as reactant and solvent catalyzed by immobilized lipase // *Journal of Chemical Technology&Biotechnology*. 2009. –V.84. –#10. –P.1461-1473.
13. Hsyue Jen H., Po Chin L., Wan Jun L. Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability // *Biotechnology Letters*. 2000. –V.22. –#18. –P.1459-1464.
14. Idris A., Azimah N., Suardi M. Immobilization of Baker’s yeast invertase in PVA-alginate matrix using innovative immobilization technique // *Process Biochemistry*. 2008. –V.43. –#. 4. –P.331-338.
15. Jordao A.M., Ricardo-da-Silva J.M., Laureano O. *S.Afr.J.Enol.Vitic.*, 2005, 26 (2), 83-89.
16. Kallea – Mhiri H., Miclo A. Mechanism of ethyl acetate synthesis by *Kluyveromeces fragilis* // *FEMS Microbiology Letters*. 1993. –V.111. –#2. – P.207-212.
17. Kim Y.-H., Seo H-S., Min J., Kim Y.-C., Ban Y.-H., Han K.-Y., Park J.-S., Bae K.-D., Gu M.-B., Lee J. Enhanced degradation and toxicity reduction of dihexyl phthalate by *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* cutinase // *J. Appl. Microbiol.* 2007. –V. 102. –#1. –P.221-228.

18. Leissy G., Raminez H., Villalonga R. Immobilization of chitosan-invertase neoglucoconjugate on carboxymethylcellulose-modified chitin // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2006. –V.36. –#. 3. –P.259-271.
19. Lowry O., Rosenbryl N., Farr A. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1954 –V.193. –P.265-275.
20. Main A.R., Dauterman W.C. Kinetics for the inhibition carboxylesterase by malaoxon // Can.J. Biochem. 1967. –V.45. –P.757-771.
21. McKay A.M. A review: microbial, carboxylic ester hydrolases (E.C.3.1.1) in food technology // Lett. Appl. Microbiol. 1993. –V.16. –P.1-6.
22. Milovanovic A., Bozic N., Vujcic Z. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads // Food Chemistry. 2007. –V.104. –#.1. –P. 81-86.
23. Monti D., Ferrandi E.E., Righi M., Romano D., Molinari F. Purification and characterization of the enantioselective esterase from *Kluyveromyces marxianus* CBS 1553 // J. Biotechnol. 2008. -V.133. -№1. -P.65-72.
24. Nelson J.H., Jensen R.G., Pitas R.E. Pregastric esterases and other oral lipases – a review // J.Dairy Sci. 1997. –V.60. –P.327-362.
25. Paroul N., Grzegozeski L.P., Chiaradia V., Treichel H., Cansian R.L., Oliveira J.V., de Oliveira D. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system // Journal of Chemical Technology&Biotechnology.2010. –V.85. –№12. -P.1636-1641.
26. Saerens S.M.G., Delvaux F., Verstrepen K.J., Van Dijck P., Thevelein J.M., Delvaux F.R. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces vini* during fermentation // Appl. Environ. Microbiol. 2008. –V.74. -P.454-461.
27. Saerens S.M.G., Verstrepen K.J., Van Laere S.D.M., Voet A.R.D., Van Dijck P., Delvaux F.R., Thevelein J.M. The *Saccharomyces vini* EHT1 and

- EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity // J. Biol. Chem. 2006. –V.281. –P.4446-4456.
28. Segura- Cenicerros E., Dabek K., Iylina A. Invertase immobilization on nylon-6 activated by hydrochloric acid in the presence of glutaraldehyde as cross-linker // Vestnik Moskovskogo Universiteta. 2006. –V.47. –#.2. –P.
 29. Serdakowski A.L., Dordick J.S. Enzyme activation for organic solvents made easy //Trends in Biotechnology. 2008. –V.26. – # 1, –P.48-54.
 30. Serpil T., Banu E. Media Formulation using complex organic nutrients for improved activity, productivity, and yield of *Candida rugosa* lipase and esterase enzymes // Preparative Biochemistry&Biotechnology. 2009. –V.39. –#3. –P.323-341.
 31. Sood V.K., Kosikowski F.V. Ripening changes and flavor development in microbial enzyme treated Cheddar cheese slurries // J.Food Sci. 1979. –V.44. –P.1690-1694.
 32. Stead D. Microbial lipases; their characteristics, role in food spoilage and industrial uses // J.Dairy Res. 1986. –V.53. –P.481-505.
 33. Tomotani E., Vitolo M. Screening of Dowex anion-Exchange Resins for invertase immobilization // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2004. – V.113. – #.1-3. –P.145-160.
 34. Tufan H. Y. Immobilization of invertase onto dimer acid-co-alkyl polyamine // Journal of Applied Polymer Sciences. 2004. –V.93. –P.1526-1530.
 35. Tutino M.L., Parrilli E., De Santi C., Giuliani M., Marino G., Se Pascale D. Cold adapted esterases and lipases: a biodiversity still under-exploited // Current Chemical Biology. 2010. –V.4. –№1. –P.74-83.
 36. Vazquez-Figueroa E., Hyh V.,Broering J.M., Chaparro-Riggers J.F., Bommarius A.S. Thermostable variants constructed via the structure-guided consensus methods also show increased stability in salts solutions and

- homogeneous aqueous-organic media // Protein Engineering, Design, and Selection. 2008. –V.21. –#11. –P.673-680.
37. Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Dufour J.-P., Winderickx J., Thevelein J.M., Pretorius I.S., Delvaux F.R. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer // J. Biosci. Bioeng. 2003. -V.96. -P.110-118.
 38. Wang P.H., Tsai S.W., Chen T.L. Improvement of enantioselectivity and stability of *Klebsiella oxytoca* hydrolase immobilized on Eupergit C250L // Journal of Chemical Technology&Biotechnology.2008.–V.83.–#11. - P.1518-1525.
 39. Woodcock L.L., Wiles C., Greenway G.M., Watts P., Wells A., Eyley S. Enzymatic synthesis of a series of alkyl esters using novosyme 435 in a packed-bed, miniaturized, continuous flow reactor // Biocatalysis and Biotransformation. 2008. –V.26. –№6. -P.466-472.
 40. Yang Ch.-H., Liu W.-H. Purification and properties of an acetylxylenesterase from *Thermobifida fusca* // Enz. Microb. Technol. 2008. -V.42. - P.181-186.
 41. Zaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T. Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases // Annu. Rev. Microbiol. 1999. –V.53. –P.315-351
 42. Zaeger K.E., Reetz M.T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology // Trends Biotechnol. 1998. –V.16. –P.396-403.
 43. Pocock, K. F., Sefton, M.A. Williams P.J Taste thresholds of phenolic extracts of French and American oak wood: The influence of oak phenols on wine flavor. *Am. J.Enol. Vitic.* 1994, 45, 429-434
 44. Nabeta, K., Yonekubo, J.; Miyake, M Phenolic compounds from the heartwood of European oak (*Quercus robur L.*) and brandy. *Mokuzai Gakkaishi* 1987., -№ 33,. –P 408-415.

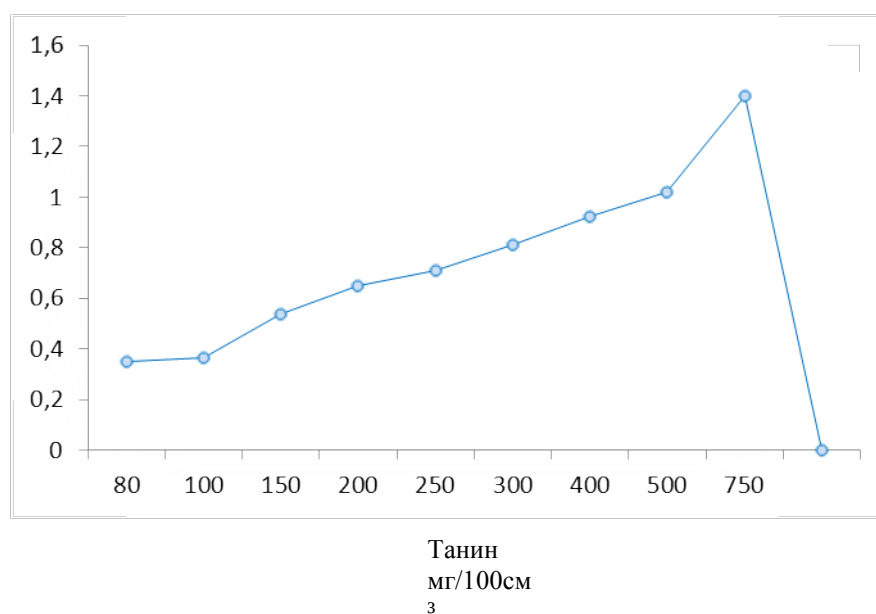
45. Mayer W., Gabler W., Riester A.,Korger H., On tannins in chestnut and oak wood, II, The isolation of castalagin, vescalagin, *Liebigs Ann. Chem.* 1967., 707., P., 177-181.

Иловалар

1-илова

Танин бўйича калибровка чизиғи 1,000 гр танинъ 100 см³ дистилланган сувда еритилган бошланғич еритма. Бундан ажратиб олинган экстракт дистилланган сувда суюлтирилган.

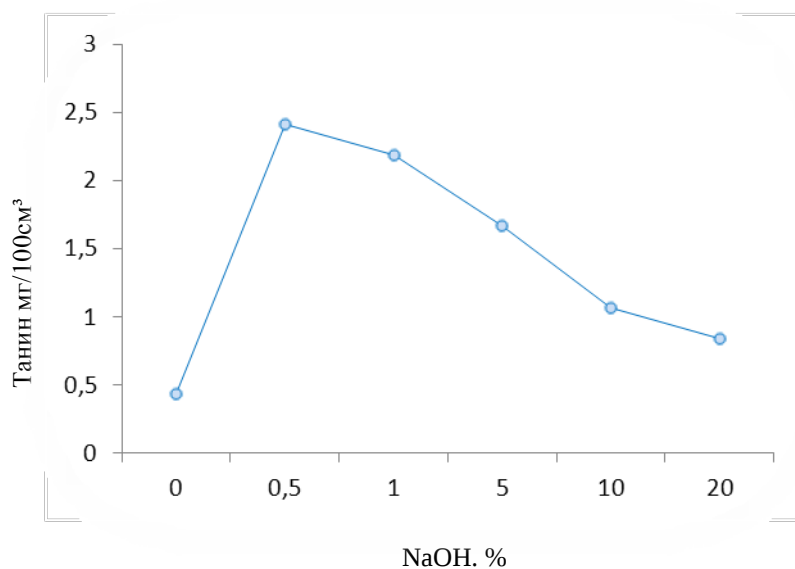
№	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Танин мг/100см ³	80	100	150	200	250	300	400	500	750
Марта	125	100	75	50	40	33	25	20	13
Танин мл	1	4	5	5	5	0,25	0,4	0,5	1
Сув мл	4	4	5	5	5	8	9,6	9,5	12
Д – 315	0,35	0,367	0,538	0,65	0,71	0,81	0,925	1,02	1,4



Бунда 22.09.2011 йилда ишлов берилган эман гранулаларига
иккинчи марта NaOH нинг турли % ли эритмалари билан ишлов
берилди. Экстракт дистилланган сувда суюлтирилган.

Бунда гидромодул мл 1:20 (экстракт:сув) нисбатда олинган.

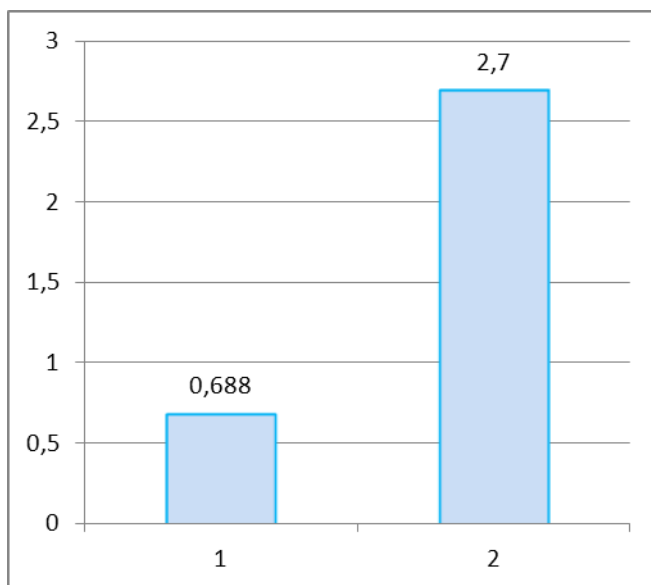
№	1	2	3	4	5	6
Эман гранулалари гр	1	1	1	1	1	1
NaOH концентрланган %	0	0,5	1	5	10	20
Гидромодул мл	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
Д – 315	0,04		0,37	0,29	0,25	0,22
	5	0,47	7	4	2	4
Танин мг/100см ³	0,43	2,41	2,18	1,66	1,06	0,83
	7	3	8	3	3	8



Танинлар экстракциясига намликни таъсирини
аниқлаш.

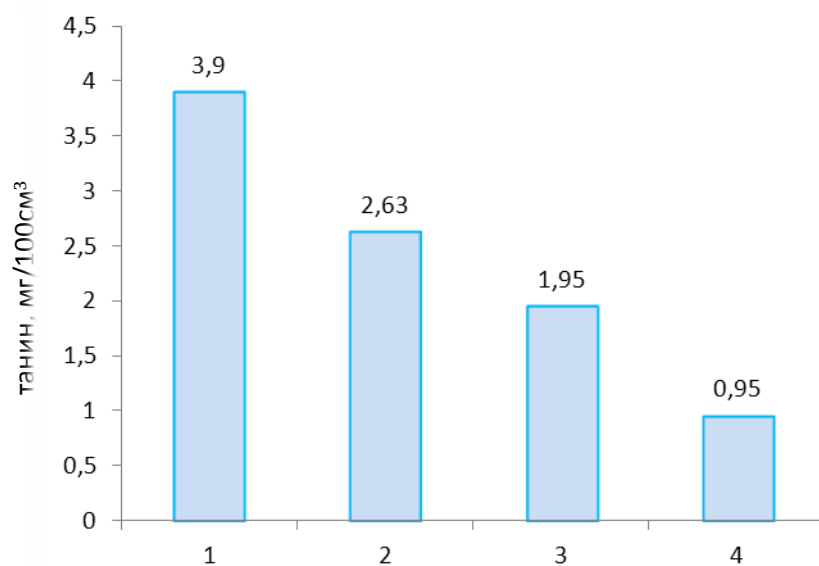
1 – гранулалар тўғридан тўғри 0,5% ли NaOH
эритмаси ёрдамида экстракцияланди. 2 – гранулалар
дастлаб дистилланган сувда ивитилган сўнгра 0,5%
ли NaOH эритмаси ёрдамида экстракцияланди.

1	2
0,688	2,7



0,5 % ли NaOH эритмаси ёрдамида танинларни эман гранулаларидан
экстракциялаш (тажриба 4 босқичда амалга оширилди)

1	2	3	4
3,9	2,63	1,95	0,95



Бунда 1,000 гр эман гранулалари 40 % ли этанолда эритилган ва NaOH нинг турли % ли эритмаларида экстракцияланди ва экстракт дистилланган сувда суюлтирилган. Бунда гидромодуль 1:10 (экстракт:сув) нисбатда олинган

№	1	2	3	4	5	6
Суюлтирилганлик чегараси	20	15	10	5	2	0
NaOH %	0	0,5	1	5	10	20
Танин эритмаси мл	5	2	5	2	5	4
Сув мл	5	3	5	8	5	0
Д – 315	0,355	0,39	0,46	0,61	1,05	1,5
Д – 364	0,065	0,054	0,123	0,215	0,52	1,05
Д – 400	0,025	0,02	0,045	0,0875	0,21	0,385
Д – 440	0,015	0,015	0,03	0,05	0,12	0,24
Д – 490	0,01	0,01	0,02	0,035	0,08	0,15
Танин мг/100см ³ , 40% этанолда	0,608	0,759	1,009	1,509	3,09	4,709
Танин г/100см ³ , дист сувда	0,437	0,563	1,663	2,263	2,613	2,938

