

**ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН
ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 16.07.2013.Т.08.01
РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ
ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

МИРЗАРАХМЕТОВА ДИЛБАР ТОХТАМУРАТОВНА

**СПИРТЛИ ИЧИМЛИКЛАРНИ ИШЛАБ ЧИҚАРИШ
ТЕХНОЛОГИЯСИНИ ТАКОМИЛЛАШТИРИШ УЧУН ОРГАНИК
МУҲИТДА БАРҚАРОР БЎЛГАН ИММОБИЛЛАНГАН
ФЕРМЕНТЛАРНИ ОЛИШ**

- 02.00.17 – Қишлоқ-хўжалик ва озиқ-овқат маҳсулотларига
ишлов бериш, сақлаш ҳамда қайта ишлаш
технологиялари ва биотехнологиялари**
- 03.00.01 – Биокимё
(техника фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент шаҳри - 2016 йил

Докторлик диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата докторской диссертации
Content of the abstract of doctoral dissertation

Мирзарахметова Дилбар Тохтамуратовна Спиртли ичимликларни ишлаб чиқариш технологиясини такомиллаштириш учун органик муҳитларда барқарор бўлган иммобилланган ферментларни олиш.....	5
Мирзарахметова Дилбар Тохтамуратовна Получение иммобилизованных ферментов, стабильных в органических средах, для совершенствования технологии производства спиртных напитков.....	27
Mirzarakhmetova Dilbar Tokhtamuratovna Production of immobilized enzymes stable in organic media for the development of alcoholic beverages production technologies.....	51
Эълон қилинган ишлар рўйхати Список опубликованных работ List of published works.....	74

**ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН
ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 16.07.2013.Т.08.01
РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ
ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

МИРЗАРАХМЕТОВА ДИЛБАР ТОХТАМУРАТОВНА

**СПИРТЛИ ИЧИМЛИКЛАРНИ ИШЛАБ ЧИҚАРИШ
ТЕХНОЛОГИЯСИНИ ТАКОМИЛЛАШТИРИШ УЧУН ОРГАНИК
МУҲИТДА БАРҚАРОР БЎЛГАН ИММОБИЛЛАНГАН
ФЕРМЕНТЛАРНИ ОЛИШ**

- 02.00.17 – Қишлоқ-ҳўжалик ва озиқ-овқат маҳсулотларига
ишлов бериш, сақлаш ҳамда қайта ишлаш
технологиялари ва биотехнологиялари**
- 03.00.01 – Биокимё
(техника фанлари)**

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент шаҳри - 2016 йил

**Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар
Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида 30.09.2014/В2014.5.Т285
рақам билан рўйхатга олинган.**

Докторлик диссертацияси Ўзбекистон Миллий университетида ва Тошкент кимё-технология институтида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) илмий кенгаш веб-саҳифаси (www.tkti.uz) ва «ZIYONET» таълим-информацион тармоғида (www.ziyonet.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчилар:

Абдурақонова Сабира Ходжаевна
техника фанлари доктори, профессор

Рахимов Мирзаатхам Мирзахакимович
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар:

Абдурахимов Саидакбар Абдурахманович
техника фанлари доктори, профессор

Маҳсумов Абдухамид Гофурович
кимё фанлари доктори, профессор

Гулямова Тошхон Гафуровна
биология фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот:

ХК «Узвиносаноат-Холдинг»

Диссертация ҳимояси Тошкент кимё-технология институти ҳузуридаги 16.07.2013. Т.08.01 рақамли илмий кенгашнинг 2016 йил «__» _____ соат ___ даги мажлисида бўлиб ўтди. (Манзил: 100011, Тошкент ш, Шайхонтохур тумани, А.Навоий кўчаси 32-уй. Тел.: (+99871) 244-79-20; факс: (+99871) 244-79-17; e-mail: tkti_info@edu.uz).

Докторлик диссертацияси билан Тошкент кимё технология институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (__ рақами билан рўйхатга олинган). (Манзил: 100011, Тошкент ш, Шайхонтохур тумани, А.Навоий кўчаси 32-уй. Тел.: (+99871) 244-79-20).

Диссертация автореферати 2016 йил «__» _____ куни тарқатилди.

(2016 йил «__» _____ даги ___-рақамли баённомаси)

С.М.Туробжонов

Фан доктори илмий даражасини берувчи илмий кенгаш
раиси, т.ф.д., профессор

А.С.Ибодуллаев

Фан доктори илмий даражасини берувчи илмий кенгаш
илмий котиби, т.ф.д., профессор

Қ.О.Додаев

Фан доктори илмий даражасини берувчи илмий кенгаш
ҳузуридаги илмий семинар раиси, т.ф.д., профессор

КИРИШ (докторлик диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Жаҳонда спиртли ичимликларни дегустацион ва технологик кўрсаткичларини яхшилашга йўналтирилган рақобатбардош технологияларни ишлаб чиқишга алоҳида эътибор қаратилмоқда. Мавжуд бўлган технологияларни ферментлар ёрдамида такомиллаштириш, спиртли ичимликлар таркибидаги юқори (сивуш) спиртлар миқдорини камайтириш ва республикада экспортга йўналтирилган сифатли маҳсулотлар ишлаб чиқариш имкониятларини яратади.

Спиртли ичимликлар олиш технологик жараёнига таъсир қилувчи ферментларни ўзига хослиги, органик муҳитда ферментларни ўз субстрати билан таъсирлашувига оид физик-кимёвий қонуниятларни очилиши, нафақат биотехнологик жараёнларни яхшилайти, балки фермент барқарорлиги ҳақида тушунчаларимизни кенгайтиради, ноанъанавий шароитлардаги биокатализ тўғрисида маълумотлар беради ва анъанавий сувли муҳитдаги тадқиқотларда амалга ошириб бўлмайдиган амалий имкониятларни очиб беради. Амалий жихатдан спиртли ичимликларни дегустацион кўрсаткичларини яхшилашда улар таркибидаги изоамил спирти миқдорини камайтириш, бренди ишлаб чиқаришда дистиллятларни этилишини тезлаштириш ва узок муддатли этилиш жараёнида этанолни йўқотишни тежаш имкониятини беради.

Ферментлар ёрдамида юқори спиртларни алкилфруктозидлар ва эфирларга айланиши натижасида уларнинг миқдорини камайтириш орқали спиртли ичимликлар сифатини, таъминини ва ҳушбўйлигини ҳамда уларни технологик кўрсаткичларини яхшилаш ва спиртли муҳитда ферментлар фаоллиги ва барқарорлигини таъминлаш учун уларни қаттиқ ташувчиларга имобиллаш ёрдамида барқарорлаш, шунингдек, ачитқи хужайраларининг имкониятларидан ва хусусий захирасидан унумли фойдаланиш, ферментлар ва эфирлар ҳосил бўлишини бошқариш учун ачитқи-замбурғларни назорат остида турли босқичли бижғиш шароитларда ўстириш, ферментларни органик муҳитда технологик аҳамиятини аниқлаш ва улардан унумли фойдаланиб, маҳсулотнинг асосий кўрсаткичларини йўналтирилган ҳолда ўзгартириш ва дистиллятларни этилишини тезлаштириш ёрдамида спиртли ичимликлар тайёрлаш технологиясини такомиллаштириш бўйича тадқиқотлар олиб бориш мақсадга мувофиқдир.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2011 йил 31 октябрдаги ПҚ-1633 сон «Озиқ-овқат саноатини бошқаришни ташкил этишни янада такомиллаштириш ва ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида»ги (2012-2015 йй.) ва 2013 йил 13 мартдаги ПҚ 1937-сон «Республика узумчилигини янада ривожлантириш чора тадбирлари тўғрисида»ги (2013-2015 йй.) қарорлари ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялар ривожланишининг устувор йўналишларига боғлиқлиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V.«Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф-муҳит муҳофазаси» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи. Спиртли ичимликларни сифатини яхшилаш ва уларни ишлаб чиқариш технологиясини такомиллаштиришга ҳамда технологик заруратга эга ферментларни озик-овқат маҳсулотлари сифатини оширишда қўллашга йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасаларида, жумладан, Technical University of Munich, University of Muenster, University of Geisenheim, University of Hohenheim (Германия), University of Cordoba, University of Barcelona, (Испания), The Fruit, Vine and Wine Institute of the Agricultural Research Council, University of Stallebosch (Жанубий Африка Республикаси), Université de Bordeaux, Université de Caen, Station Viticole du BNIC, IUT-UFR Sciences, UNGDA, UMR-Arômes (Франция), University of California (АҚШ), Kochi and Yamaguchi University (Япония), University of Bern (Швейцария), University of Belgrade (Сербия), Россияда Шимолий Кавказ узумчилик ва виночилик минтақавий илмий-тадқиқот институти ва «МАГАРАЧ» Узум ва Вино Миллий институтида олиб борилмоқда.

Ферментлар ёрдамида сувсиз муҳитдаги биокатализга оид жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида бир қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: учувчан моддаларни таркибини ўзгартириш усуллари ишлаб чиқарилган («МАГАРАЧ» Узум ва Вино Миллий институти, Озик-овқат саноати Одесса технологик институти, Россия; University of Hohenheim, Германия); эстеразаларни бижғиш жараёнидаги роли кўрсатилган (Kyoto University, Япония; Institute des Produits de la Vigne, Institute National de la Recherche Agronomique, Франция; Institute Préparatuare aux Etudes d'Ingénieurs, Тунис); ферментларни ажратиб олиш ва иммобиллаш усуллари яратилган (University of Toronto, Канада; University of Adelaide, Австралия; University of Washington, Brandeis University, Walter Reed Army Institute of Research; Brookhaven National Laboratory, АҚШ; University of Hohenheim, University of Geisenheim, University of Dortmund, Германия; The Weizmann Institute of Science, Израил); ачитки замбуруғи маннопротеинларларини структураси аниқланган (University of California, АҚШ) ва органик синтезни татбиқи учун турли реакциялар ферментлар ёрдамида оптималлаштирилган (Massachusetts Institute of Technology, University of California, АҚШ; University of Bern, Швейцария; Dalian University of Technology, Китай).

Дунёда спиртли ичимликлари, бренди сифатини ва технологик кўрсаткичларини яхшилаш бўйича бир қатор устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда, жумладан, шароб ва дистиллятларни асслигини белгилайдиган маркерларни аниқлаш; органик муҳитда

ферментлар ёрдамида катализ; турли дистиллятларнинг учувчан моддаларини келиб чиқишини ва маҳсулот сифатига таъсирини аниқлаш; спиртли ичимликларни етилишини тезлаштириш; спиртли ичимликларни етилишини тезлаштириш; спиртли ичимликларни дегустация кўрсаткичларини яхшилаш; ферментларни барқарорлаш ва ферментларни иммобиллаш усуллариини ишлаб чиқиш ва ферментларни органик муҳитларда қўллаш технологияларини яратиш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Спиртли ичимликлар сифатига сақлаш муддатининг таъсири ва етилиш жараёнида уларнинг таркибидаги ўзгаришлар қонуниятларини очиб бериш, спиртли бижғитиш жараёнини биокатализ асосида бошқариш, дистиллятларни энант эфирлар билан бойитиш ва етилишини тезлаштириш, спиртли ичимликларни дегустацион кўрсаткичларини яхшилаш, ҳамда спиртли ичимликларни ишлаб чиқариш технологиясини такомиллаштириш бўйича С.Х.Абдуразакова, Г.Г.Валуйко, А.К.Родопуло, И.М.Скурихин, В.И.Нилов, В.М.Малтабар, Е.Л.Мнжоян, Л.М.Джанполадян, Е.М.Датунашвили, И.М.Грачева, А.А.Мартаков, Л.Н.Нечаев, Е.А.Гогичайшвили, А.Д.Лашхи, В.А.Маслов, В.А.Загоруйко, В.Г.Гержилова, О.А.Чурсина, Н.М.Агеева, Э.Я.Мартыненко, О.А.Сапрыкина, У.К.Абдуллаев, М.В. Центроев, Т.А.Начева, Gerald Ferrary, Jerome Ledauphin, Pierre-Louis Teissedre, Rodriguez Madrera, Rodriguez Doderо M.C., Cristina Martinez Montero, David M.Goldberg ва бошқалар илмий изланишлар олиб боришган.

Ферментларни ажратиб олиш, уларнинг молекуляр шакллариини ва меъёрий кўрсаткичларини аниқлаш, ферментларни барқарорлаш, ферментлар ёрдамида гетероген катализ назарияси ва амалиёти, сувли-органик муҳитда катализ жараёнлар ва ферментларни қўллашда асосланган технологиялар яратиш, ферментларни органик муҳитдаги ўзига хослиги ва ноанъанавий шароитлардаги катализ имкониятлари очиб бериш, органик муҳитда ферментларни ўз субстрати билан таъсирлашувига оид қонуниятларини ўрганиш ривожига салмоқли ҳисса кўшган А.И.Опарин, А.М. Безбородов, И.В.Березин, М.М. Рахимов, М.Т.Туйчибаев, А.А.Ахунов, К.Д.Давранов, З.Р.Ахмедова, О.Н. Вагина, Ш.С.Ташмухамедова, Ш.У.Турдикулова, Н.Дж.Сагдиев, И.Т.Якубов, Х.Т.Хасанов, А.М.Klibanov, J.O.Lampen, Lizhong Dai, V.Urlacher, Zhang Shu-fen, Isabelle Dugelay, Castro G.R., Munishwar N.Gupta, Yoshiharu Inoue ва бошқаларнинг илмий изланишларини кўрсатиш мумкин.

Биокатализ асосида бижғиш технологияларни такомиллаштириш, ачитки замбуруғларни назорат остида ўстириш жараёнида ферментларни ҳосил бўлишини бошқариш, гидролитик ферментларни ноанъанавий шароитлардаги биокатализининг ўзига хослиги, уларни технологик аҳамиятини технологик ва биокимёвий жихатдан аниқлаш, спиртли ичимликлар таркибидаги учувчан моддаларни йўналтирилган ҳолда бошқариш, жумладан, инвертаза ва эстераза ферментлари ёрдамида уларни таркибидаги юқори спирт-

ларни миқдорини камайтириш ва энант эфирлар билан бойитиш тадқиқотларни амалга ошириш долзарб, илмий-амалий аҳамиятга эга.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилаётган олий таълим муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Ўзбекистон Миллий университети илмий-тадқиқот ишлари режасининг «Гетероген ферментатив катализни назарияси ва амалиёти» (1995-2015 йй.), Тошкент кимё-технология институтининг ЗИ-12-01 «Экологик тоза ва юқори сифатли спиртли ичимликлар ресурс тежамкор технологияларини яратиш» (2003-2005 йй.) ҳамда «Ферментлар ёрдамида олиб борилган этерификация ва трансэтерификация жараёнларидаги учувчан моддаларни таҳлили» (Erasmus Mundus CASIA-I, University of Hohenheim, 2011-2012 йй.), «Ачитқи замбуруғлари ферментларини қўллаш асосида спиртли ичимликларни тайёрлаш технологиясини такомиллаштириш» (DAAD, University of Geisenheim, 2014 й.) мавзусидаги амалий лойиҳалар доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади спиртли муҳитда барқарор бўлган иммобилланган ферментларни олиш технологиясини яратиш ва улар ёрдамида спиртли ичимликларни тайёрлаш технологияларини такомиллаштиришдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

сувли-органик муҳитда барқарор бўлган иммобилланган ачитқи инвертазаси ва эстеразасини олиш;

ачитқи инвертазаси ва эстеразасини юқори спиртларга нисбатан субстрат спецификлигини сувли-органик муҳитда аниқлаш;

иммобилланган ферментлар ёрдамида юқори спиртларни конверсиясини оптимал шароитларини яратилган модел системада аниқлаш;

спиртли муҳитда барқарор бўлган иммобилланган ферментларни олиш технологияларини ишлаб чиқиш;

иммобилланган ферментларни қўллаш асосида ликёр-ароқ маҳсулотлари ва бренди тайёрлаш технологиясини такомиллаштириш ҳамда техник-иктисодий самарадорлигини ҳисоблаш.

Тадқиқотнинг объекти узум (коньяк) ва буғдой дистиллятлари ҳамда *Saccharomyces cerevisiae* (инвертаза и эстераза) ферментлари.

Тадқиқотнинг предмети ферментлар ёрдамида юқори спиртларни конверсияси ва спиртли ичимликлар таркибидаги юқори спиртларни йўналтирилган усулда камайтириш.

Тадқиқотнинг усуллари. Диссертацияда биокимёвий ва физик-кимёвий, хроматография, масс-спектрометрия, спиртли ичимликлар дегустацияси ва олинган натижаларни статистик қайта ишлаш каби замонавий тадқиқот ва таҳлил усуллари қўлланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

сувли-органик муҳитда барқарор бўлган иммобилланган ферментлар олиш оптимал шароитлари ва технологиялари ишлаб чиқилган;

олинган ферментларни сув-органик муҳитларда юқори спиртларга

нисбатан субстрат спецификлиги аниқланган;

спиртли муҳитда юқори спиртларни конверсиясини амалга ошириш учун олинган иммобилланган инвертаза ва эстераза ферментларини қўллаш оптимал технологик шароитлари ишлаб чиқилган;

иммобилланган ферментлар асосида юқори спиртларни алкилфруктозидларга ва эфирларга айлантириш ҳисобига уларни миқдорини спиртли ичимликлар таркибида камайтириш кўрсатилган;

инвертаза ва эстераза ферментлари ёрдамида спиртли ичимликлар таркибидаги учувчан моддаларини профилини ўзгартириш учун янги технология тавсия этилган;

ишлаб чиқилган ачитки ферментларини қўллаш ёрдамида бренди ва ликёр-ароқ маҳсулотларини ишлаб чиқариш технологияси такомиллаштирилган.

Тадқиқотнинг амалий натижаси:

спиртли муҳитда барқарор ачитки ферментларини иммобиллаш усули ишлаб чиқилган;

сув-органик муҳитли модел системада ферментлар ёрдамида юқори спиртларни эфирлар ва алкилфруктозидларга айлантириш шароитлари аниқланган;

юқори спиртларни конверсияси бўйича модел экспериментларда олинган натижалар ликёр-ароқ ва бренди ишлаб чиқариш шароитида жорий этиш учун берилган;

иммобилланган ферментлар олиш технологиялари ишлаб чиқилган ва улар асосида юқори спиртлар миқдорини камайтириш ҳамда энант эфирлар миқдорини ошириш орқали спиртли ичимликлар ишлаб чиқариш технологияси такомиллаштирилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги. Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги ишда қўлланилган ёндашув ва усуллар, унинг доирасида фойдаланилган назарий ва амалий ёндошувлар расмий манбалардан олингани, юқори спиртлар конверсиясини ферментатив катализидаги субстратлар (юқори спиртлар) ва маҳсулотларни (эфирлар) аниқлаш учун замонавий физик-кимёвий усуллари ва замонавий ускуналар (газли хроматограф, хромато-масс-спектрометр, Agilent Technologies, США) қўлланиши, модел системада олиб борилган тажриба натижалари саноат дистиллятларида олинган натижалари билан мос келиши; анъанавий ва таклиф этилган технология бўйича олинган маҳсулотларни солиштирма физик-кимёвий ва дегустацион баҳолашга асосланганлиги; хулоса, таклиф ва тавсияларнинг амалиётда жорий этилгани билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти спиртли муҳитда барқарор иммобилланган ферментлар олиш технологияларини яратиш ҳамда спиртли муҳитда юқори спиртларни эфирлар ва алкилфруктозидларга айлантириш имкониятларини очиб бериш билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти иммобилланган

ферментлар (инвертаза ва эстераза) сифатли, экологик тоза ва экспорт учун йўналтирилган спиртли ичимликларни олишда қўлланилиши, таклиф этилаётган технология спиртли ичимликлар таркибидаги учувчан моддалар миқдорини назорат қилишга, учувчан моддалар профилини ўзгартиришга, сивуш спиртларни (изоамил спирти) миқдорини камайтиришга ва энант эфирлар билан бойитишга, дегустацион кўрсаткичларини яхшилашга ҳамда юқори сифатли брендиларни етилишини тезлаштиришга бағишланган мақсадли технологияларни ишлаб чиқишга хизмат қилади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши: Органик муҳитда барқарор бўлган иммобилланган ферментларни олиш ва спиртли ичимликларни ишлаб чиқариш технологиясини такомиллаштириш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

иммобилланган инвертаза олиш технологиясига Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтирога патент олинган (IAP 04401, 2011). Спиртли муҳитда юқори спиртларни конверсиясини ва алкилфруктозидлар ҳосил бўлишини ошириш имконини беради;

иммобилланган эстераза олиш технологиясига Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлигининг ихтирога патент олинган (IAP 04595, 2012). Спиртли муҳитда юқори спиртларни конверсиясини ва эфирлар ҳосил бўлишини ошириш имконини беради;

иммобилланган инвертаза ёрдамида спиртли ичимликларнинг юқори спиртларини миқдорини камайтириш технологиясига Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлиги ихтирога патент олинган (IAP 03222, 2004). Юқори спиртларни миқдорини камайтириш имконини беради;

иммобилланган эстераза ёрдамида спиртли ичимликларнинг сифатини яхшилаш технологиясига Ўзбекистон Республикаси Интеллектуал мулк агентлиги ихтирога патент олинган (IAP 04852, 2014). Бренди таркибидаги юқори спиртларни миқдорини камайтириш ва энант эфирлар билан бойитиш имконини беради;

иммобилланган эстераза ферменти «Комбинат Ташкентвино» ЧИ АЖда бренди ишлаб чиқариш жараёнига татбиқ этилган («Ўзвинпром-Холдинг» ХКнинг 2016 йил 23 февраль 04-401-сон маълумотнома). Олинган натижаларнинг иқтисодий самараси бренди ишлаб чиқариш жараёнида дистиллятларини етилишини тезлаштириш, уларни сақлаш муддатини 2 йилга қисқартириш ва узоқ муддатли етилиш жараёнида этанолни йўқотишни тежаш имконини беради.

Тадқиқот натижаларинг апробацияси: Тадқиқот натижалари 14 та илмий-амалий анжуманларда, жумладан, акад. С.Ю.Юнусовнинг 85 йиллигига бағишланган халқаро конференцияси (Тошкент, 2005), Маъмун Академиясини 1000 йиллигига бағишланган ёш олимларнинг халқаро илмий конференция (Хива, 2006), Ломоносов-2007 (Москва, 2007) ёш олимлар халқаро конференцияси, «Замонавий микробиология ва биотехнологиянинг муаммолари» Ўзбекистон микробиологиларининг 4-қурултойи (Тошкент, 2008), «Биология, экология ва тупроқшуносликнинг долзарб муаммолари»

(Тошкент, 2008) Республика илмий конференцияси, «Биоорганик кимё ривожланишининг долзарб мауаммолари» номли халқаро илмий конференция (Тошкент, 2010), Ломоносов-2010 (Москва, 2010) ёш олимлар халқаро конференцияси, «Ёшлар ва илм: реаллик ва келажак» номли 3-халқаро илмий-амалий конференцияси (Невинномысск, 2010), «Биология XXI аср илми» номли 14-ёш олимлар халқаро Пушино мактаби конференцияси (Пушино, 2010), «Озиқ-овқат муҳандислиги ва биотехнология» (Париж, 2012) халқаро илмий-техник конференцияси, «Микроорганизмлар ва биосфера» Microbios-2015 халқаро симпозиум (Тошкент, 2015), Ўзбекистон Миллий университетининг «Биофизика ва физиология», «Биокимё» ва «Микробиология ва биотехнология» кафедраларининг бирлашган йиғилиши (Тошкент, 2015), «Ўзвиносаноат-холдинг» ХК илмий семинари ҳамда ТКТИ қошидаги 16.07.2013.Т.08.01 рақамли илмий Кенгаш семинари (Тошкент, 2015, 2016).

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 34 та илмий иш чоп этилган, шулардан, 4 та ихтирога патент, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг доктор-лик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этишга тавсия этилган илмий нашрларда 10 та мақола, жумладан, 7 таси республика ва 3 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, бешта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 198 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиқ берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Спиртли ичимликларни тайёрлаш технологиясини такомиллаштириш тенденциялари ва муаммолар ҳолати**» деб номланган биринчи бобида спиртли ичимликлар таркибида юқори спиртлар миқдорини камайтириш асосида технологияни такомиллаштириш тенденцияси ва муаммолар шарҳи келтирилган. Бренди ва ликёр ичимликлар тайёрлаш технологиясини такомиллаштириш тенденцияси, ундаги муаммолар танқидий нуқтаи назардан таҳлил қилинган ва фермент препаратларини олишнинг замонавий ҳолати ёритилган. Шунингдек, ферментларни турли шакллари биосинтезига, ачитқи-замбуруғларни турли босқичли шароитларда ўстиришга, ферментлар фаоллигини бошқаришга ва бижғиш жараёнида эфирлар ҳосил бўлишига, ферментларни органик муҳитда технологик аҳамиятига оид маълумотлар келтирилган. Микроорганизмлар томонидан ферментлар ҳосил бўлишини бошқарилишига оид бир неча қонуниятлар бўйича мавжуд тушунчалар ёритилган.

Адабиёт манбалари таҳлиliga кўра, юқори спиртларнинг миқдорини камайтириш ва уларни йўналтирилган ҳолда эфирларга айлантириш ёрдамида спиртли ичимликлар тайёрлаш технологиясини такомиллаштиришга доир қўлланилмаган технологик имкониятлар мавжудлигини кўрсатган. Шундан келиб чиққан ҳолда, тадқиқот мақсади ва вазифалари қўйилди.

Диссертациянинг «**Иммобилланган ферментларни олиш технологияси**» деб номланган иккинчи бобида, ачитқи-замбуруғларни ўстириш, инвертаза ва эстераза ферментларини ажратиб олиш ва уларни юқори спирт таркибли муҳитларда қўллаш мақсадида барқарорлаштиришга оид олинган натижалар муҳокамасига бағишланган.

Ачитқи-замбуруғларни ўстириши. Маълумки, ферментлар ҳосил бўлишини таъминлаб бериш учун ишлаб чиқаришнинг асосий технологик бошқариладиган икки босқичли бижғиш жараёнини ўтказиш ҳисобланади (Абдуразакова С.Х., 1990). *Saccharomyces cerevisiae* ачитқисини ўстириш жараёни биореакторда 26⁰С ҳароратда дастлабки озика муҳити билан узлуксиз - озика қуйиб бориш шароитида ачитқилар стационар фазага чиққунга қадар олиб борилди. Ачитқилар кўпайиши мазкур фазага етгандан кейин 2-сунъий озика муҳит 20 мл/соат оқим тезлигида қўшилиб, инвертаза олиш учун муҳит ҳарорати 6⁰С гача ва эстераза олиш учун 12⁰С гача туширилди. Бижғиш 6⁰С (инвертаза олиш учун) ва 12⁰С (эстераза олиш учун)

ҳароратда 6 сутка давом этди. Ҳосил бўлган биомасса кейинчалик ферментни ажратиб олиш учун культурал суюқликдан ажратиб олинди.

Ачитқи-замбуруғлар ферментларини ажратиб олиш ва тозалаш. Ачитқи биомассаси культурал суюқлигидан 4⁰С ҳароратда центрифугалаш (6000g) ёрдамида ажратилди. Инвертаза ачитқи-замбуруғлар биомассасидан ажратиб олинди ва тозаланди, унинг гидролизловчи фаоллиги 541±6,5 бирлик/мг ва трансфераз фаоллиги 23,1±0,2 бирлик/мг ташкил этди. Эстераза ачитқи-замбуруғлар ўстирилган муҳитдан ажратиб олинди ва тозаланди, унинг эфир гидролизловчи фаоллиги 140±2,5 бирлик/мг ва эфир ҳосил қилувчи фаоллиги 3,2±0,2 бирлик/мг ташкил этди. Ферментларни ажратиб олиш ва тозалаш схемаси ишлаб чиқилди.

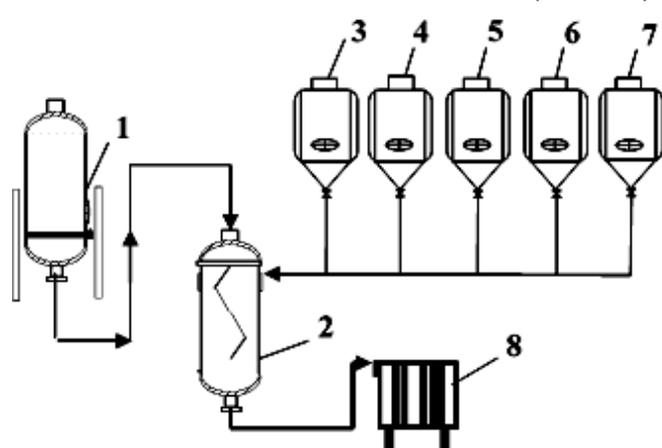
Ферментларни иммобилизацияси. Ферментларни иммобиллаш учун ташувчи сифатида БАУ-А маркали активланган қайин кўмири ва эман гранулалари қўлланилди.

а) Ачитқи-замбуруғ инвертазасини БАУ-А маркали қайин активланган кўмирга (БАУ) иммобиллаш. Инвертазани иммобиллашни амалга ошириш учун БАУ олдиндан тайёрланди. Бунинг учун БАУ диметил-формаид муҳитида мочевина (1:1) иштирокида Бергиус-1Л автоклавида 300⁰С ҳароратда 2 соат (80 атм) давомида қуйидаги схема асосида олиб борилди. Реакция давомида юқорида келтирилган азот тутган бирикмалар иштирокида ҳосил бўлган амин гуруҳлар иштирокида активланган кўмир юзасида маҳсус қатлам ҳосил бўлади. Ушбу қатлам юзасида ҳосил бўлган амин ва карбонил гуруҳлар ҳамда фермент аминокислоталари ва углевод қолдиқлари таркибидаги гуруҳлари иштирокида инвертазани ковалент иммобиллаш амалга оширилди. Ачитқи инвертазасини иммобиллаш реакторда фермент, 50% сахароза эритмаси (0,1М буфер, рН 7,6) ва биринчи реактордан кимёвий ишлов берилган БАУ иштирокида 21 соат давомида 4⁰С ҳароратда олиб борилди. Иммобилланган фермент миқдори дастлабки оксил миқдоридан боғланмаган оксил миқдорини айириш орқали Лоури усули бўйича аниқланди (Lowry, 1954). Кейин иммобилланган фермент буфер эритмаси (рН 7,6) билан ювилди ва ҳосил бўлган шифф боғларини барқарорлаштириш учун 3 соат давомида 1мг/мл миқдордаги натрий боргидрид эритмаси билан ишлов берилди.

Инвертазани трансфераз фаоллиги изоамил спиртини камайиши асосида газ хроматография ва 0,1М ацетат буферида (рН 6,0) эритилган (100,1 г/л) изоамил спирти (8,8 г/л), сахароза (20,1 г/л), ацетонитрилдан (200 г/л) иборат модел системада 25⁰С ҳароратда 12 соат мобайнида изоамил-фруктозидни ҳосил бўлиши асосида юпқа қаватли хроматография усуллари ёрдамида аниқланди. Иммобилланган инвертазанинг трансфераз фаоллиги 46 бирлик/мг ташкил қилди.

Олинган натижалар асосида, иммобилланган инвертазани олишнинг технологик схемаси ишлаб чиқилди. Иммобилланган инвертазани олиш технологик схемаси 1-расмда тасвирланган.

Иммобилланган инвертазани олиш қуйидаги босқичларни ўз ичига олади: дастлаб реакторда (1) БАУ диметилформаид муҳитида мочевино билан 300⁰С да 2 соат давомида (80 атм) кимёвий модификацияланди.



- 1- БАУни кимёвий модификациялаш учун реактор;
- 2- ферментни иммобиллаш учун реактор;
- 3- нарий боргидрид учун резервуар;
- 4- дистилланган сув учун резервуар;
- 5- сахароза (50%) ва унда эритилган фермент эритмаси учун резервуар;
- 6- натрий хлоридни сувли эритмаси учун резервуар;
- 7- сув-этанол эритмаси учун резервуар;
- 8- қуритиш аппарати.

1-расм. Иммобилланган инвертазани олиш технологик схемаси

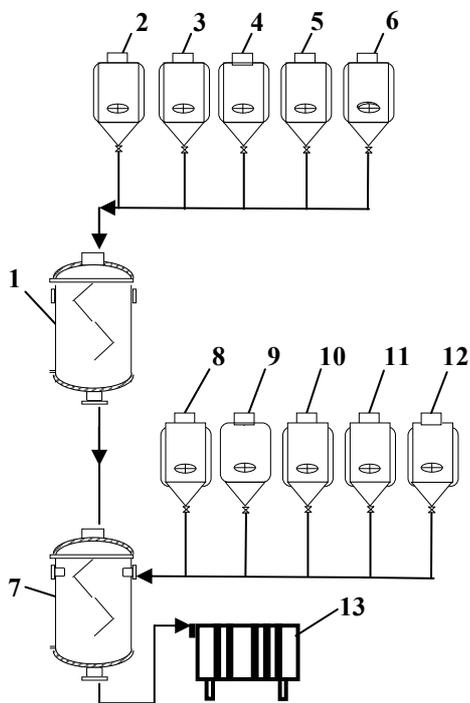
Реакция тугатилгандан сўнг кимёвий модификацияланган активланган кўмир иссиқ дистилланган сув (90⁰С) ва 25⁰С дистилланган сув (4) билан ювилди. Инвертазани ковалент иммобиллаш реакторга (2) 50% ли сахароза эритмасида эритилган (1 кг ташувчига 1,2 г фермент, гидромодуль 1:10) ва 3 соат давомида натрий боргидрид (0,5 мг/мл) билан ишлов берилган (рН кўрсаткич 7,6 га борат буфери ёрдамида келтирилади) ферментни (5) ва 1-реактордан (1) 21 соат давомида 4⁰С ҳароратда кимёвий модификацияланган БАУни қўшиш орқали амалга оширилди. Кейин 1мг/мл миқдорда натрий боргидрид (3) қўшилиб, 3 соат давомида доимий аралаштирилади. Ушбу жараёнлардан сўнг, препарат суюқ фазадан ажратиб олинди, дистилланган сув билан (4), 6% натрий хлорид эритмаси (6), сувли-этанолли (20%) эритма (7) билан ювилди ва қуритиш (8) учун юборилди.

б) *Ачитқи-замбуруғ эстеразасини эман гранулаларига иммобиллаш.* Ачитқи эстеразасини эман гранулаларига ковалент иммобиллаш учун дастлаб целлюлоза (глюкоза) углерод боғларини узиш ва натижада юзада альдегид гуруҳларни ҳосил қилиш учун натрий метапериодат билан кимёвий ишлов берилди (Кочетков ва бошқалар, 1967). Эстеразани ковалент иммобиллаш эман гранулалари юзасида ҳосил бўлган альдегид гуруҳлар ва фермент амин гуруҳлари ўртасида шифф боғлари орқали амалга оширилиб, кейинчалик бу боғлар натрий боргидрид билан қайта тикланди. Иммобилланган эстеразанинг эфир ҳосил қилувчи фаоллиги 16 бирлик/мг ташкил қилди.

Эстеразани эфир ҳосил қилиш фаоллиги 30⁰С ҳароратда 48 соат давомида 0,1 М (рН 6,0) ацетат буферида (100,1 г/л) изоамил спирти (8,8 г/л), капрон кислотаси (6,6 г/л), ацетонитрил (200 г/л) иборат модел системада изоамилкапронат синтезланиши билан газ хроматография усули ёрдамида аниқланди. Олинган натижалар асосида иммобилланган эстераза олишнинг технологик схемаси ишлаб чиқилди ва бу схема 2-расмда акс этган.

Иммобилланган эстеразани олиш қуйидаги босқичларни ўз ичига олади (2-расм): дастлаб реакторда (1) 1:10 нисбатда эман гранулалари ва 0,5 М

натрий гидроксиди эритмаси 1 соат давомида (2) 80°C ҳароратда ишлов берилди ва дистилланган сув (3) билан ювилади. Кейинчалик эман гранулалари 1:10 гидромодулида натрий метапериодат (10 мг/мл) ёрдамида 25°C ҳароратда 60 соат (4) давомида активлаштирилади.



- 1 – эман гранулаларини активациялаш учун реактор,
- 2 – натрий гидроксид учун резервуар,
- 3 – дистилланган сув учун резервуар,
- 4 – натрий метапериодат эритмаси учун резервуар,
- 5 – глицерин учун резервуар,
- 6 – буфер эритмаси учун резервуар,
- 7 – ферментни иммобилизациялаш учун реактор,
- 8 – фермент учун резервуар,
- 9 – натрий боргидрид эритмаси учун резервуар,
- 10 – натрий хлорид учун резервуар,
- 11 – дистилланган сув учун резервуар,
- 12 – 20% этанол учун резервуар,
- 13 – қуритиш аппарати.

2-расм. Иммобилланган эстераза олиш технологик схемаси

Фаоллаштириш реакцияси тугатилгандан сўнг, эман гранулалари 25°C ҳароратда 30 дақиқа давомида (5) 0,1М фосфат буфериди эритилган 10% ли глицерин (рН 7,5) ва 0,1М фосфат буфери (рН 7,5) билан ювилди (6).

Ферментни ковалент иммобиллаш (7) биореакторда амалга оширилди, унда активланган эман гранулалари (1) реактордан, фермент (8), фосфат (рН 7,5) буфери (6) қўшилди ва иммобиллаш жараёни 4°C ҳароратда 20 соат давомида олиб борилди. Сўнг, иммобилланган фермент фосфат буфери билан (рН 7,5) ювилди ва 1 мг/мл натрий боргидрид (9) таркибли фосфат буфери билан (рН 7,5) 3 соат давомида 4°C ҳароратда ишлов берилди, натрий хлорид 6%-ли эритмаси (10), дистилланган сув (11), 20% ли этанол эритмаси (12) билан ювилди ва қуритиш аппаратига юборилди (13).

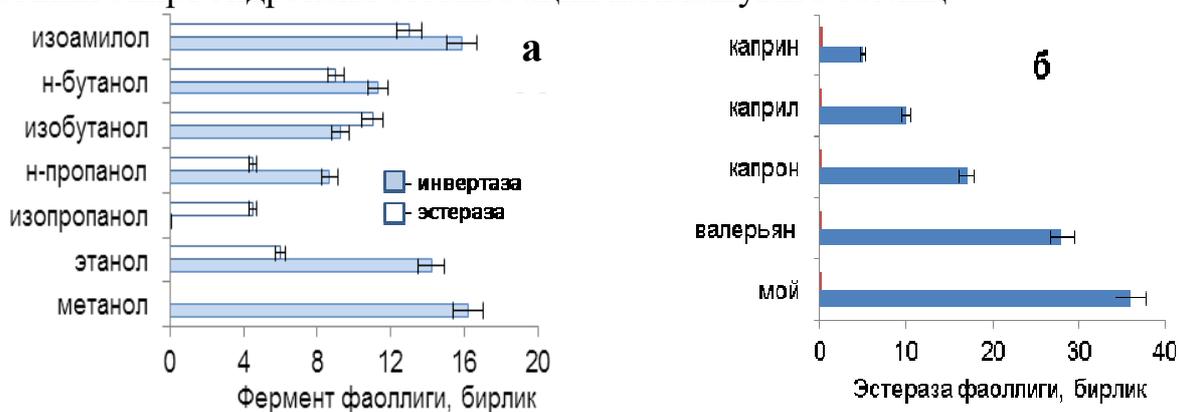
Диссертациянинг «**Модел системада юқори спиртларни ферментлар ёрдамида конверсияси**» деб номланган учинчи боби ачитқи ферментларини органик муҳитда субстрат спецификлигини ўрганиш ва юқори спиртларни эфирлар ва алкилфруктозидларга айланишини оптималлашга бағишланган.

Кўпгина гидролазалар каби ачитқи инвертазаси ва эстеразаси сув-буферли муҳитда эфир ҳосил қилиш фаоллигини намоён этмайди, бундай муҳитда реакция мувозанати эфирларни гидролизлашга оғади. Бирок, адабиётларда инвертаза сув-органик муҳитда турли спиртларни алкилфруктозидларга [Опарин, 1955; Абдуразакова, 1990] ва эстераза эса эфирларга [Holland et al., 2005; Krista et al., 2010] айланиш реакцияларини катализлаши

ҳақидаги маълумотлар мавжуд. Диссертациянинг 4.1 бўлимида модел системада ушбу реакцияларга оид натижалар тўлиқ ёритилган.

Ачитқи инвертазаси ва эстеразасининг субстрат спецификлиги. Ачитқи ферментларининг субстрат спецификлиги фермент субстратлар тутган “ацетонитрил-сув” модель системасида аниқланди.

Олинган натижалар шуни кўрсатдики (3-расм, а), инвертаза ва эстераза ферментлари гидроксил гуруҳи α -ҳолатга эга бўлган спиртлар билан таъсир этиш фаоллиги юқорироқ. C_3 - C_5 углеродли юқори спиртлар молекуласидаги углерод занжирини $C_3 < C_4 < C_5$ тартибда ортиши билан этерификация самараси ошганлиги кузатилди. Ферментлар изобутил ва изоамил каби тармоқланган занжирга эга спиртларга нисбатан юқорироқ фаолликни намоён этиб, бунда ОН ва метил гуруҳлар фермент-субстрат таъсирлашувида муҳим аҳамият касб этди. Шундан келиб чиққан ҳолда, фермент томонидан субстратни “танилиши” биринчи углерод атомидаги ОН гуруҳни фазовий жойлашуви, углерод занжирини тармоқланганлиги ва иккиламчи углерод атомини спирт гидроксил атомига яқин жойлашувига боғлиқ.



а. Инвертазани субстрат спецификлигини аниқлаш шароити: спиртли субстрат (30 мМ), сахароза (60 мМ), ацетонитрил (200 г/л), 0,1М ацетат буфери рН 6.0 (100,1 г/л), температура -30°C , реакция давоми-12 соат.

Эстеразани субстрат спецификлигини аниқлаш шароити: спиртли субстрат (30 мМ), капрон кислота (30 мМ), ацетонитрил (200 г/л), 0,1М ацетат буфери рН 6.0 (100,1 г/л), температурату -30°C , реакция давоми - 20 соат.

б. Эстеразани субстрат спецификлигини аниқлаш шароити: спиртли субстрат- изоамил спирти (30 мМ), кислотали субстратлар (30 мМ), ацетонитрил (200 г/л), 0,1М ацетат буфери рН 6,0 (100,1 г/л), температура -30°C , реакция давоми - 20 соат.

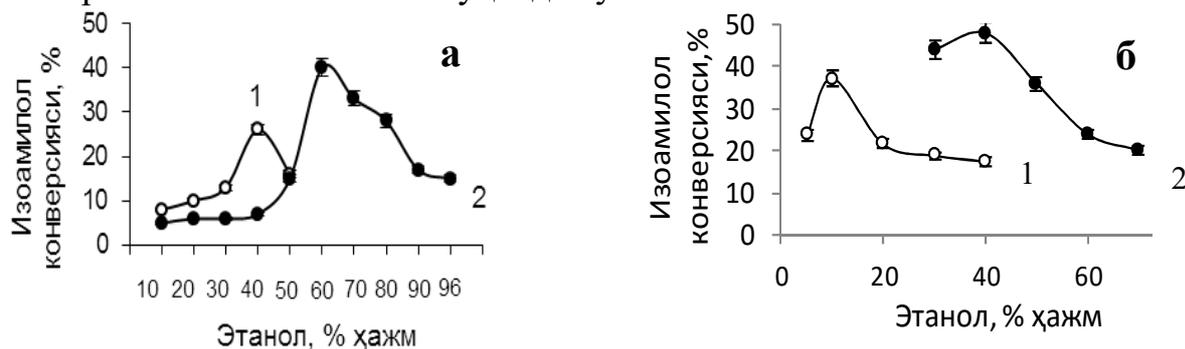
Изоҳ: I-мавжудлиги $P < 0,05$ да назорат вариантдан ишончли фарқ қилишини билдиради.

3-расм. Ачитқи инвертазаси ва эстеразасини сув-органик муҳитда спиртли (А) ва кислотали субстратларга (Б) нисбатан субстрат спецификлиги

Эстеразани турли карбон кислоталарга нисбатан субстрат спецификлигини тадқиқ қилиш давомида изоамиллолдан спиртли субстрат сифатида фойдаланилди (3-расм, б). Олинган натижаларга кўра, органик муҳитда эстераза C_4 - C_{10} углерод занжирига эга карбон кислоталар билан эфир ҳосил қилиш фаоллигини намоён қилиб, ушбу фаоллик углерод занжирини $C_4 < C_5 < C_6 < C_8 < C_{10}$ тарзда узайиб бориши билан пасайганлиги аниқланди.

Иммобилланган ферментларни сув-органик муҳитдаги хоссалари. Кўпгина гидролитик ферментлар ўзининг трансфераз ёки эфир ҳосил қилувчи фаоллигини органик муҳитда намоён этмайди, чунки мувозанат гидролитик реакциялар томонда бўлади. Мазкур реакциялар биокимёвий нуқтаи назардан тўла тадқиқ қилинмаган бўлиб, бунга мисол сифатида фермент-спирт модел системасини келтириш мумкин. Шунинг учун юқоридаги жараёни ажратиб олинган ва иммобилланган ачитқи ферментлари ёрдамида сув-органик муҳитда ўрганиш вазифалардан бири қилиб белгиланди.

Муҳитдаги этанолни оптимал концентрацияси. Ажратиб олинган ва иммобилланган ферментларни фаоллиги этанол концентрациясининг 10 дан 96% гача бўлган диапозонида олиб борилди (4-расм). Бунда реакцияни сувли фазаси сифатида ажратиб олинган инвертаза учун рН 6,0, иммобилланган инвертаза учун рН 7,0, иммобилланмаган эстераза учун рН 8,0 ва иммобилланган эстераза учун рН кўрсаткичи 6,0 бўлган 0,1М ацетат буфери қўлланилди. Этанол органик фаза сифатида қўлланган реакцияларда уни концентрациясининг ошиши муҳитда изомилол миқдорини камайишига олиб келди. Олинган натижалар 4-расмда келтирилган бўлиб, унга кўра, иммобилланган инвертазани трансфераз фаоллиги асосида изоамилолни 40% конверсияси 60% этанолли муҳитда кузатилди.



а. Модел система ва реакцияни ўтказиш шароити: изоамил спирти (30 мМ), сахароза (60 мМ), этанол (10-96% ҳажм), 0,1М ацетат буфери (100,1 г/л), температура - 25⁰С, реакция давоми-12 соат. Инвертазани бошланғич фаоллиги: 1-иммобилланмаган инвертаза – 34 мМ/соат, 2-активланган кўмирга иммобилланган инвертаза– 46 бирлик/мг),

б. Модел система ва реакцияни ўтказиш шароити: изоамил спирти (30 мМ), капрон кислотаси (30 мМ), этанол (10-70% ҳажм), 0,1М ацетат буфери (100,1 г/л), температура - 30⁰С, реакция давоми - 48 соат. Эстеразани бошланғич фаоллиги: 1-иммобилланмаган эстераза– 3,2 бирлик/мг), 2-эман гранулаларига иммобилланган эстераза– 16 бирлик/мг),
Изоҳ: I-мавжудлиги P<0,05 да назорат вариантдан ишончли фарқ қилишини билдиради.

4-расм. Инвертаза (а) ва эстераза (б) фаоллигига этанолнинг таъсири

Иммобилланган эстераза ўзининг максимал эфир ҳосил қилиш фаоллигини 40% этанолли муҳитда намоён этиб, бунда изоамилол конверсияси 48% ни ташкил қилди. Иммобилланган ферментларни физик-кимёвий ва кинетик хусусиятларини “сув-этанол” модел системасида урганиш асосида иммобилланган ферментлар иштирокида юқори спиртлар биоконверсиясини оптимал технологик шароитлари аниқланди (1-жадвал).

**Иммобилланган ферментлар билан юқори спиртлар
биоконверсиясини оптимал технологик шароитлари**

Параметрлар	Кўрсаткичлар	
	инвертаза	Эстераза
Муҳитдаги иммобилланган фермент, г/л	10	10
1 гр сорбентга иммобилланган фермент миқдори, мг	10	17
Иммобилланган фермент фаоллиги, бирлик/мг	42	16
Инкубацион муҳит рН кўрсаткичи	6.0	6.0
Муҳит ҳарорати, °С	25	30
Муҳитдаги сивуш спиртларини миқдори (сувсиз спиртга нисбатан, а.а.), мг/100 см ³	264	660
Муҳитдаги этанол концентрацияси, % ҳажм.	60	40
Даврий режимда ишлов бериш вақти, соат	12	48

Брендига ишлов бериш технологик жараёни аниқ бир босқичда амалга оширилиши зарур ҳисобланиб, бу одатда биореакторни оптимал шароитларида (1-жадвал) ичимликни қуйишдан олдин амалга оширилди.

Бунда 40% ли сувли-спиртли сортировка ёки дистиллятлар купажи 25°С ҳароратда иммобилланган инвертаза (46 бирлик) ва 30°С ҳароратда эстеразани (16 бирлик) иммобилланган препаратли биореакторга юборилади.

Диссертациянинг «**Иммобилланган ферментларни спиртли ичимликлар тайёрлаш технологиясида қўллаш**» деб номланган тўртинчи боби иммобилланган инвертаза ва эстеразани ликёр-ароқ маҳсулотлари ва бренди тайёрлашда қўллаш технологияси ёритилган.

Иммобилланган инвертазани ликёр ичимликлар тайёрлаш технологиясида қўллаш бўйича тавсиялар. Модел системада иммобилланган инвертаза сивуш спиртларини трансформациялаш хусусиятини ўрганиш учун, спирт-ректификат (96,6%) ва сахарозадан (2%) тайёрланган сортировка (сувли-спиртли аралашма, 40% ҳажм этанол, 2% сахароза) иммобилланган инвертаза билан юқори спиртлар конверсиясини амалга ошириш учун аниқланган оптимал шароитларида (1-жадвал) ишлов берилди. Иммобилланган ферментатив билан ишлов берилган сортировка органиколептик (2-жадвал) ва физик-кимёвий (3-жадвал) хоссалари текширилди.

Тажриба сортировка назорат намунасига нисбатан юмшоқ хушбўй таъмга эга бўлиши, таъмида мева мазаси пайдо бўлгани билан тавсифланади. Иммобилланган инвертаза (3-жадвал) билан ишлов берилган сортировка физик-кимёвий баҳолаш, уни таркибидаги юқори спиртлар миқдори меъерий талабларда белгиланган миқдорга кўра 20%-гача камайганини кўрсатди.

Изоамил спиртининг миқдори юқори спиртлар таркибида кўпроқ бўлади ва спиртли ичимликлар дегустацион ва гигиеник кўрсаткичларини пасайтиради, шу сабабли тадқиқот иш айнан шу спиртининг камайтиришга йўналтирилган. 3-жадвалдан кўриниб турибдики, ферментатив ишлов

берилган намуна таркибида изоамил спирти 50%-га камайди ва унинг миқдори 1,4 мг/л а.а. ташкил этди. Бунда бошқа кўрсаткичлар ўзгармаган.

2-жадвал

БАУ ва иммобилланган ачитқи инвертазаси билан ишлов берилган сорттировканинг органолептик кўрсаткичлари

Сортировка	Кўрсаткич	Тавсифи
БАУ билан ишлов берилган сорттировка (назорат)	1. Ташқи кўриниши- 2. Ранги – 3. Таъм ва ҳиди-	Бошқа бирикма ва чўкмаларсиз тиник суюқлик; Рангсиз суюқлик; мазкур ароққа хос, ортиқча таъм ва хидсиз.
Иммобилланган ачитқи инвертазаси билан ишлов берилган сорттировка	1. Ташқи кўриниши- 2. Ранги – 3. Таъм ва ҳиди-	Бошқа бирикма ва чўкмаларсиз тиник суюқлик; Рангсиз суюқлик; Мазкур ароққа хос юмшоқ, мевалар ноталари, хушбўй

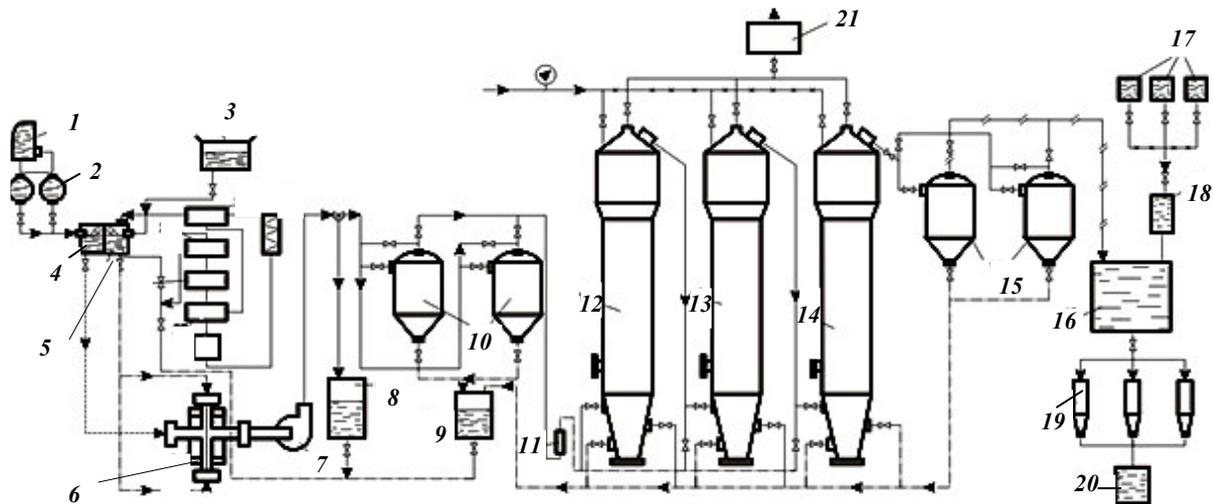
3-жадвал

Иммобилланган ачитқи инвертазаси ва БАУ-А билан ишлов берилган сорттировканинг физик-кимёвий хоссалари

Номланиши	Этанол, %ҳажм	Альдегидлар, мг/л а.а.	Мураккаб эфирлар, мг/л а.а.	Сивуш спиртлари, мг/л а.а.	Изоамил спирти, мг/л а.а.	Изобутил спирти, мг/л а.а.	Метанол, г/дм ³ а.а.
Меъёрий хужжатлар бўйича талаб	40	4	4	3	-	-	0,05
Сортировка	40	3	4	4	2,7	1,3	0,03
БАУ-А билан ишлов берилган сорттировка	40	4	4	3	2,2	0,8	0,03
Иммобилланган ачитқи инвертазаси билан ишлов берилган сорттировка	40	4	4	2,4	1,4	1,0	0,02

Олинган натижалар ликер-ароқ маҳсулотлари ишлаб чиқаришда уларнинг таркибидаги изоамил спиртини фермент ёрдамида йўналтирилган холда изоамилфруктозидга айлантириш мумкин. Бунинг учун технологик жараённинг маълум босқичида, асосан якуний босқичида, сорттировкага биореакторда иммобилланган инвертаза билан ишлов берилади (технологик схемада био-қурилма) ва ушбу босқичда юқори спиртларни конверсияси амалга ошади.

Таклиф этилаётган ускунадан фойдаланишда ароқ тайёрлашнинг ҳозирги технологиясини ўз ичига олган усул иштирокида ароққа таъм бериш ва сорттировка (сорттировка ёки купаж – бошқа компонентлар қўшилган ёки қўшилмаган спирт ва сувни аниқ бир нисбатидаги эритмаси) таркибидан юқори спиртларни йўқотиш учун рецепт бўйича тайёрланган сорттировка биореакторда иммобилланган инвертаза билан ишлов берилди (5-расм).



1-спирт учун идиш; 2-спиртни ўлчагич; 3-юмшоқ сувни тўпловчи; 4-спирт даражаси босимини бошқарувчи; 5- юмшоқ сув даражаси босимини бошқарувчи; 6-оқимлар аралаштиргичи; 7-марказдан қочма насос; 8-тоза брак тўпловчиси; 9-кўмирни регенерациялашдан кейинги хайдалган маҳсулотни тўпловчи; 10 – дастлабки филтрлар; 11-суяқлик сарфини ўлчовчи; 12,13,14-реактор колонналари 1-, 2- ва 3-даражалар; 15-охирги тозалаш филтрлари; 16-ишлов берилган сув-спирт аралашмасини тўпловчи; 17-ёрдамчи хом-ашё эритмаларини тўпловчи; 18-хомашё эритмалари даражасини бошқарувчи; 19-иммобилланган инвертаза таркибли реактор; 20-тайёр маҳсулотни тўпловчи.

5-расм. Ликёр-ароқ маҳсулотлар ишлаб чиқариш технологик схемаси

Жараён қуйидагича амалга оширилади: спирт сақловчи цистернадаги ректификацланган спирт (1) сортировка бўлимига ўрнатилган ўлчагичга (2) тушади. Ўлчагичдан спирт (2) ва тўпловчидан юмшатиш сув (3) босим регулятори орқали узлуксиз аралаштиргичга (6), дастлабки тозалов учун филтрга (10), кейинчалик реактор-колонналарга (12-13-14) тушиб, у ерда эритма турбулент ҳаракат орқали доимий аралаштириш билан активланган кўмир билан ишлов берилади. Активланган кўмир билан ишлов берилган сув-спирт аралашмаси филтрация учун охириги тозалаш филтри (15) орқали тўпловчига (16) боради. Бу ерда ёрдамчи хом-ашё эритмаларини тўпловчида (17) керакли ингредиентлар қўшилади ва аралашма иммобилланган инвертазадан иборат биореакторда (19) ишлов берилади, тайёр маҳсулот тўпловчида (20) тўпланади ва қуйиш учун юборилади.

Купажни бутун цикл бўйлаб давомийлиги хона шароитида 12 соатдан кам бўлмаслиги лозим. Ушбу вақт давомида фермент сортировка таркибидаги юқори спиртларини алкилфруктозидларга айлантиришга улгуради.

Иммобилланган ачитқи эстеразасини бренди тайёрлаш технологиясида қўллаш. Олинган натижалар амалий аҳамиятга эга бўлиб, ферментатив ишлов бериш жараёнида спиртли ичимликлар таркибидаги юқори спиртлар миқдорини камайтириш ва шу орқали ичимликлар сифатини ошириш мақсадларида қўллаш мумкин.

Узум шарбатини биожғитиш жараёнида сезиларли даражада ўткир, ёқимсиз ҳидли ва таъмли, организм учун токсик таъсирга эга юқори

спиртлари тўпланади (300-600 мг/л) ҳамда бу спиртлар миқдори олинган дистилятда (а/а) камида 1,8 г/л ни ҳосил қилади (Мартыненко, 2005). Дистиляция жараёнида дистилятга учувчан карбон кислоталар ҳам ўтади (мой, изовалерьян, капрон, каприл ва каприн кислоталар) ва маҳсулот дегустацион кўрсаткичларини пасайтиради. Таркибида ушбу кислоталар миқдори кўпайиб кетган узум дистилятидан тайёрланган бренди таъмида унга хос бўлмаган тонлар пайдо бўлади ва уч йиллик сақлаш давомида ҳам ўзгариш юз бермайди (Лашхи, 1962). Ушбу юқори спиртлар ва карбон кислоталарни иммобилланган эстераза ёрдамида эфирларга айлантириш амалга оширилди. Бунинг учун дистилятидан купаж тайёрланди (шакарли сироп, сахароза миқдори 2 г/л), 5 сутка давомида 30⁰С ҳароратда 1 литр маҳсулотга нисбатан 10 г миқдорини дастлабки эфир ҳосил қилувчи фаоллиги 16 бирлик/мг бўлган иммобилланган ачитки эстеразаси билан ишлов берилган коньяк дистиляти (68,1% ҳажм) асосида купаж (40%) тайёрланди. Назорат намуна сифатида ферментатив ишлов берилмаган коньяк дистилятидан тайёрланган купаж қўлланилди.

Коньяк спиртларини органолептик кўрсаткичларини баҳолаш натижаларига кўра, иммобилланган эстераза (4-жадвал) билан ишлов бериш коньяк дистиляти купажининг таъми ва букети яхшиланди.

4-жадвал

Иммобилланган ачитки эстеразаси билан ишлов берилган коньяк дистиляти купажининг органолептик кўрсаткичлари

Купаж	Кўрсаткич	Тавсифи
эман гранулалари билан ишлов берилган дистилят купажи (назорат)	1. Ранги/Ташқи кўриниши- 2. Ҳушбўйлиги- 3. Таъми - 4. Уйғунлиги-	Оч-сарик рангли тус, тиниқ суюқлик, кўшимча бирикмаларсиз ва чўкмасиз; типик, сивуш тонлар; куйдирувчи, намлик таъми; уйғун эмас.
Иммобилланган эстераза билан ишлов берилган дистилят купажи	1. Ранги/Ташқи кўриниши- 2. Ҳушбўйлиги- 3. Таъми – 4. Уйғунлиги-	Оч сарик рангли тус, тиниқ суюқлик, кўшимча бирикмаларсиз ва чўкмасиз; типик, мураккаб, гуллар ноталари; тоза, юмшоқ, хушбўй, гуллар ноталари; жуда уйғун.

Ичимликни сезиларли даражада юмшоқланиши ва букетида ранг тусини ҳосил бўлиши кузатилди. Купажнинг рангида оч сарик тусини ҳосил бўлиши эман гранулалари билан ишлов бериш жараёнида ундан купажга рангли моддалар ўтиши билан боғлиқдир. Дистилятлар (5-жадвал) купажларини физик-кимёвий баҳолашда уларни ферментатив ишлов берилгандан сўнг юқори спиртлар миқдорининг камайганлигини ҳамда этил- ва изоамилэфирлар миқдорининг кўпайганини кўрсатиб берди ва тасдиқлади.

Иммобилланган эстераза билан ишлов берилган купажнинг хромато-масс-спектрометрия натижасига кўра, изоамил, изопропил ва бутил спиртлари миқдорининг камайганлигини кўрсатди (6-расм).

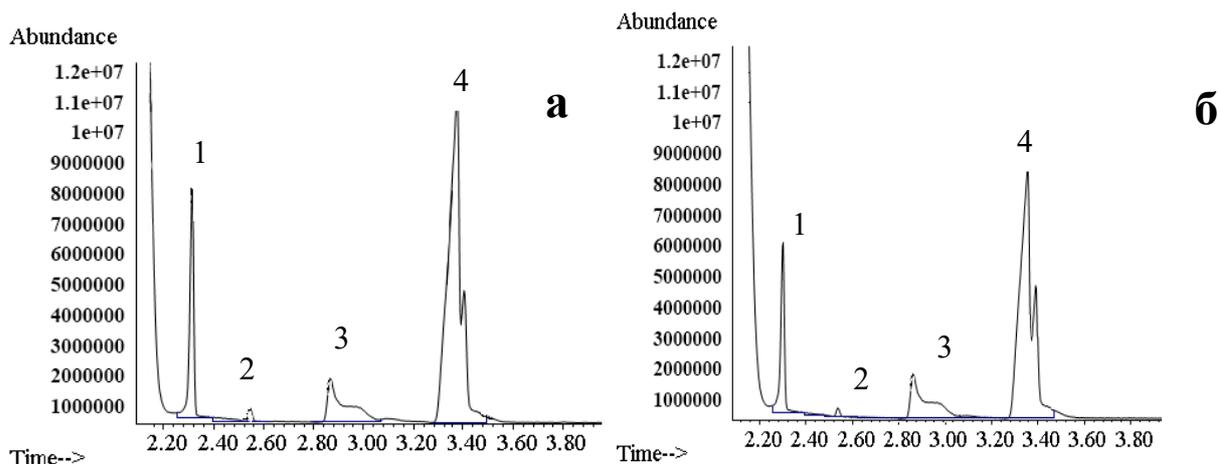
Учувчан моддалар хромато-масс-спектрометрия (7-расм) ёрдамида таҳлил қилинганда дистилят таркибида этилвалерьят ва этилкапринатларни

миқдори ошгани ҳамда изоамил-ацетат, изоамил-валерьят, изоамилкапронат, изоамилкаприлат каби эфирлар ҳосил бўлгани кузатилди.

5-жадвал

Иммобилланган ачитқи эстеразаси билан ишлов берилган коньяк дистилляти купажининг физик-кимёвий кўрсаткичлари

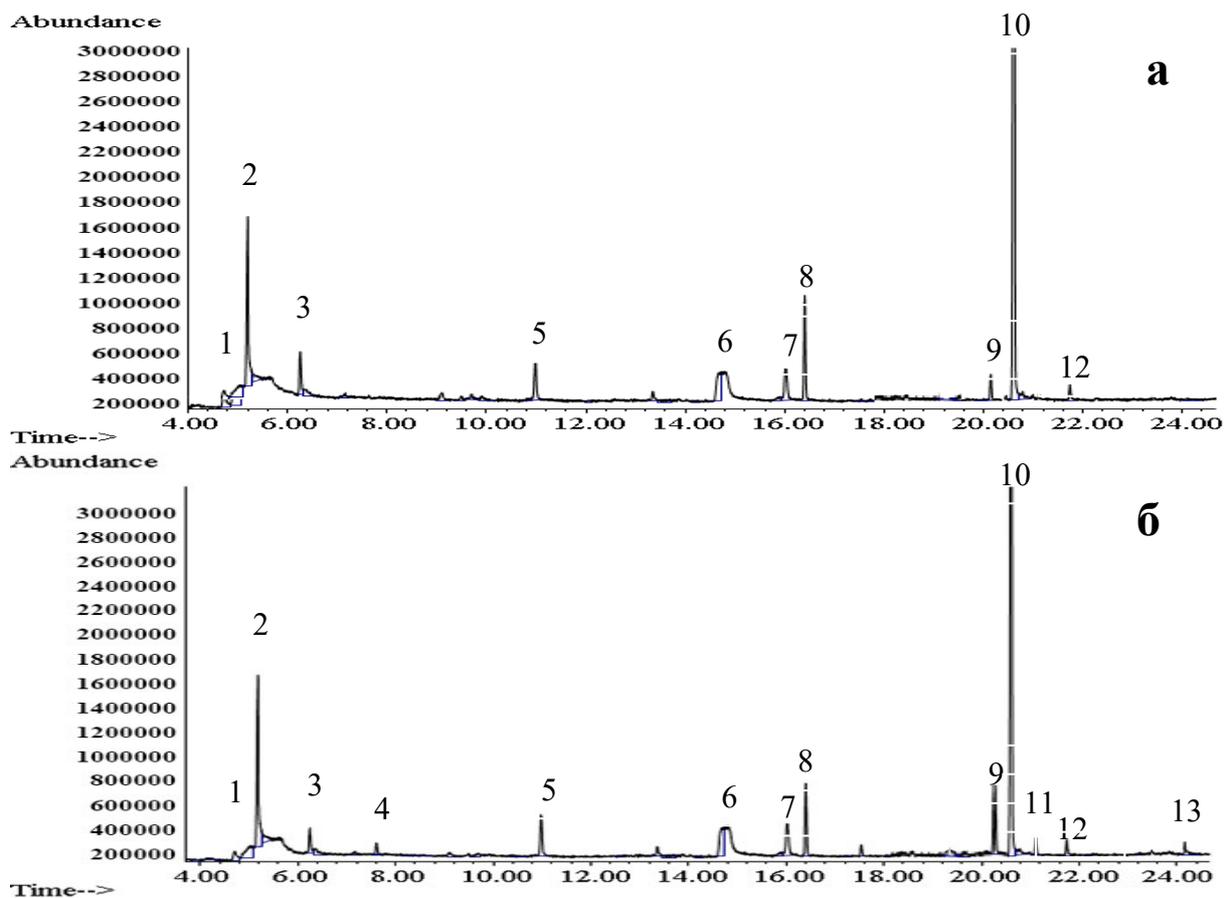
Кўрсаткични номланиши	Этанол, % ҳажм	Альдегидлар, мг/100 см ³ а.а.	Ўрта эфирлар, мг/100 см ³ а.а.	Юқори спиртлар, мг/100 см ³ а.а.	Учувчан ислоталар, мг/100 см ³ а.а.	Метанол, г/дм ³	Темирни масса концентрацияси, мг/дм ³
Меъёрий хужжатлар бўйича талаб	55-70	5-50	50-270	170-500	250	1,2	1,0
Ёш дистиллятдан тайёрланган купаж (назорат)	40	29,7	51,0	174,2	12,8	0,8	0,68
Иммобилланган эстераза билан ишлов берилган ёш коньяк спирти купажи	40	30,6	57,9	158,2	8,7	0,5	0,24



Анализ EVDX-5m (5% фенилметилсилоксан) капиляр (30м×0,25 мм) колонка билан таъминланган Agilent Technology GC/MS AT 5973N хромато-масс-спектрометр ёрдамида колонка термостатининг программалаштирилган (70⁰С-2 мин, температура кўратириш тазлиги 10⁰С/мин) температураси 70⁰С дан 280⁰С гача бўлган шароитда олиб борилди. 1-ацеталь, 2- изопропил спирти, 3-изоамил спирти, 7-н-бутил спирти

6-расм. Учувчан моддаларнинг дистиллятга фермент ёрдамида ишлов беришдан олдин (а) ва кейин (б) олинган хромато-масс-спектрометрия натижаси

Олинган натижалар тайёрланадиган ординар брендилар ишлаб чиқаришда юқори спиртларни эфирларга ферментатив айланиши орқали сифатини яхшилашда ҳамда дистиллятларни сақлаш муддатларини қисқартириш мақсадларида қўлланилиши мумкин. Бунинг учун бренди тайёрлаш технологик жараёнини аниқ бир босқичида, асосан купаж тайёрлашдан олдин, дистиллятларни иммобилланган ачитқи эстеразаси билан биореакторда ишлов берилади.



Анализ шароити 6-расмда келтирилган.

1-изопропанол, 2-фурфурол, 3-сирка кислотаси, 4-этил-валерият, 5-этил-капронат, 6-фенилэтил спирти, 7-этил-сукцинат, 8-этил-каприлат, 9-этил-капринат, 10-метил-ундеcanoат (ички стандарт), 11-изоамил-капронат, 12-изоамил-каприлат, 13-изоамил-капринат.

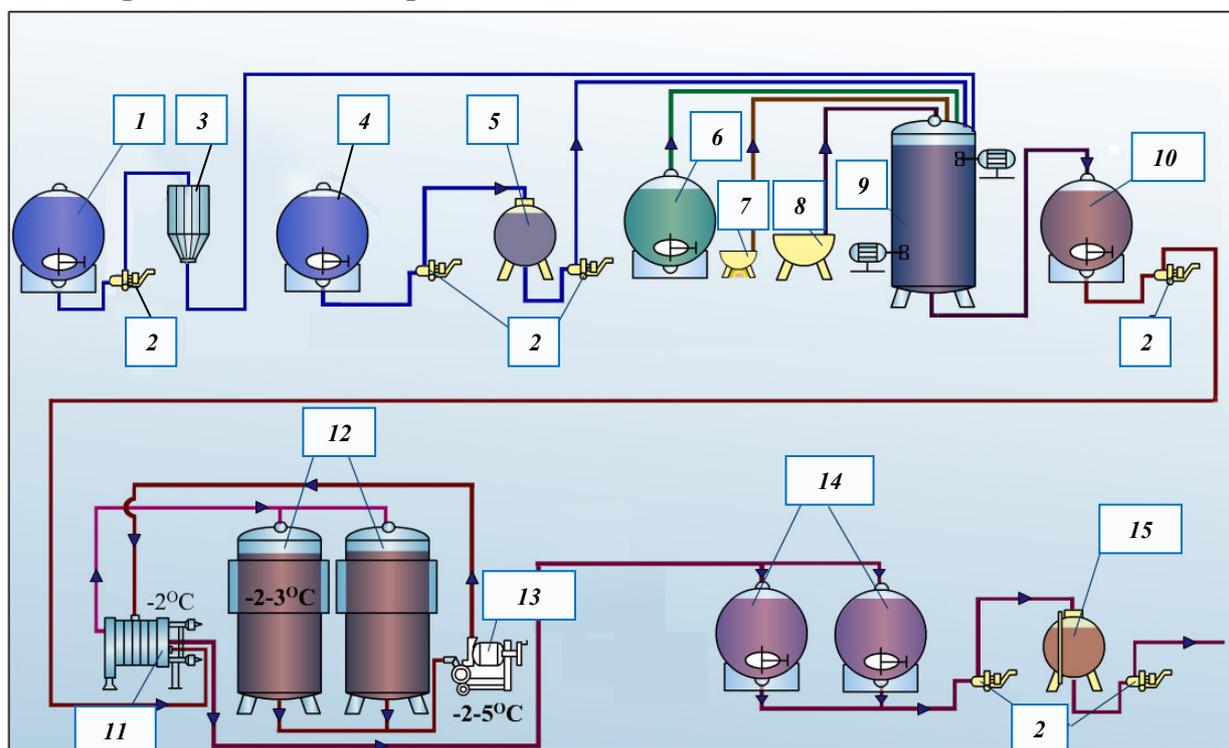
7-расм. Учувчан моддаларнинг дистиллятга фермент ёрдамида ишлов беришдан олдин (а) ва кейин (б) олинган хромато-масс-спектрометрия натижаси

Мазкур услуб қуйидаги кетма-кетликда амалга оширилади: дастлаб биореактор иммобилланган эстераза билан тўлдирилади. Технологик схемага биноан (8-расм), купажда ишлатиладиган дистиллятни бир қисми 40% ҳажм спирти кондициясига спиртли сувлар билан келтирилади (1) ва иммобилланган эстераза тўлдирилган биореакторга (3) юборилади, аниқланган оптимал шароитларда (1-жадвал) ишлов берилади ва купаж резервуарига (9) юборилади.

Иммобилланган инвертаза ва эстераза ферментлари ёрдамида спиртли ичимликлар тайёрлаш технологиясини такомиллаштириш учун ишлаб чиқилган мазкур усул айти пайтда қўлланилаётган технологиялардан қуйидаги афзалликларга эга:

бренди учун тайёрланган купаж биореакторда иммобилланган эстераза билан ишлов беришда ичимликни бошқа кўрсаткичларига таъсир қилмаган

ҳолда, фақатгина юқори спиртлар (айниқса изоамил спирти) миқдорини камайтириш имконини беради;



1-купаж резервуари, 2-насос, 3-иммобилланган эстераза тўлдирилган биореактор, 4-эман ёғочи бўлаклари (парчалари) билан ишлов бериш цистернаси, 5-дистиллят ҳажмини ўлчагич, 6-спиртли сувларни сақлаш резервуари, 7-колер сиғими, 8-қиём сиғими, 9-купаж резервуари, 10-купаж сақлаш резервуари, 11- совутгич, 12-термос резервуар, 13-фильтр, 14-оралиқ резервуари, 15-ўлчагич, 10- қабул қилиш резервуари.

8-расм. Иммобилланган эстераза асосида бренди тайёрлаш технологик схемаси

ишлаб чиқилган спиртли ичимликлар ишлаб чиқариш технологик схемаси ўз ичига ихчам, тантарҳи арзон бўлган иммобилланган фермент билан тўлдирилган био-қурилмани олади;

иммобилланган ферментларни ишлаб чиқаришни амалга оширишни спиртли ичимликлар ишлаб чиқарадиган заводларининг ўзида ташкиллаштириш мумкин;

дистиллятлар таркибидаги юқори спиртлар миқдорини камайтириш имконияти пайдо бўлиб, улар асосида юқори сифатли бренди ишлаб чиқариш имконияти юзага келади;

дистиллятларни етилишини тезлаштириш имконияти пайдо бўлиб, етилиш даражасини кўрсаткичи бўлувчи энант эфирлар ҳосил бўлиши ҳисобига ичимлик таъми ва хушбўйлиги таъминловчи учувчан моддаларнинг сифати яхшиланади;

дистиллятларни эман бочкаларга сақлашга юборгунга қадар, улар таркибидаги бошланғич юқори спиртлар миқдорини камайтириш ва учувчан моддалар профилини тўғрилаш имкониятини беради;

купаж тайёрлаш учун дистиллят таркибидаги учувчан компонентлар таркибини ўзгартириш, қандолатчилик учун маҳсус ликёрлар тайёрлаш ва

юқори кийматли тойифага эга спиртли ичимликлар ассотиментини ошириш имконияти юзага келади.

ХУЛОСА

1. Ачитки замбуруғидан ажратиб олинган инвертаза ва эстераза ферментлари сувли-органик муҳитда трансфераз ва эфир ҳосил қилувчи фаолликларини намоён қила олмайди ва юқори спиртларни конверсияси етарли даражада амалга ошмайди.

2. Ачитки инвертазаси ва эстеразасини субстрат спецификлиги ўрганилиб, углерод занжирини $C_3 < C_4 < C_5$ тарзда узайиши билан юқори спиртларни конверсия даражаси ошиши аниқланди. Бунда спирт молекуласидаги биринчи углерод атомидаги ОН гуруҳини фазовий жойлашуви, углерод занжирини тармоқланганлиги ва спиртдаги гидроксил гуруҳидан иккиламчи углерод атоми орасидаги масофа фермент субстратни «таниш» омили эканлиги кўрсатилди. Фермент изоамил ва изобутил спиртларга нисбатан юқори фаолликда эканлиги аниқланди. Кислотали субстратлар бўйича эстераза C_4-C_{10} бўлган карбон кислоталарга нисбатан ўз фаоллигини намоён қилиб, этерификация углерод занжирини узайиши билан фермент фаоллиги $C_4 < C_5 < C_6 < C_8 < C_{10}$ тарзда пасаяди.

3. 46 бирлик/мг трансфераз фаолликка эга кимёвий модификацияланган БАУ-А маркали активланган қайин кўмирига иммобилланган инвертазани олиш технологияси тавсия этилади.

4. 40% ҳажм этанол тутган «этанол-сув-изоамил спирти-сахароза» модел системада иммобилланган инвертазанинг физик-кимёвий ва кинетик хоссаларини тадқиқ қилиш асосида иммобиллаш ферментнинг спиртли муҳитда барқарорлиги ошиши аниқланди. Изоамил спиртини максимал (40%) конверсияси 60% ҳажм этаноли модел системада кўрсатилди.

5. 16 бирлик/мг эфир ҳосил қилиш фаолликка эга кимёвий модификацияланган эман гранулаларига иммобилланган эстеразани олиш технологияси тавсия этилади.

6. 40% ҳажм этанол тутган «этанол-сув-изоамил спирти-капрон кислота» модел системада иммобилланган эстеразанинг физик-кимёвий ва кинетик хоссаларини тадқиқ қилиш асосида ферментнинг спиртли муҳитда барқарорлиги ошиши аниқланди. Изоамил спиртини максимал (48%) конверсияси 30 мМ изоамил спирти ва капрон кислотасини тутган модел системада аниқланди. Иммобилланган эстераза спиртли ичимликлар таркибидаги юқори спиртлар билан карбон кислоталар (капрон, каприл ва каприн кислоталар) этерификацияси ёрдамида энант эфирлар билан ичимликни бойитиш тавсия этилади.

7. Иммобилланган инвертаза билан сув-спиртли аралашмага ишлов бериш, унинг таркибидаги юқори спиртларнинг миқдорини камайтириши ва алкилфруктозилар бўлиши ҳамда иммобилланган эстераза билан дистиллятга ишлов бериш, унинг таркибидаги юқори спиртларнинг миқдорини камайтириши ва энант эфирлари ҳосил бўлишини таъминлай бера оладиган усуллар ишлаб чиқилди. Био-қурилмада иммобилланган ферментлар

ёрдамида ишлов бериш шароитлари аниқланди ва ароқ ва бренди тайёрлаш янги технологияси ишлаб чиқилган.

8. Имобилланган инвертаза ёрдамида ликёр-ароқ ичимликлар олишнинг такомиллашган технологияси ишлаб чиқилди ва 25°С ҳароратда 12 соат давомида сув-спирли аралашмани 10 г/л миқдорда имобилланган инвертаза билан ишлов бериш технологик шароит тавсия этилади.

9. Имобилланган эстераза ёрдамида бренди тайёрлашнинг такомиллаштирилган технологияси ишлаб чиқилди ва технологик шароит (30°С ҳароратда 48 соат давомида дистиллят 10 г/л миқдорда имобилланган эстераза билан ишлов бериш) тавсия этилади.

10. Олинган илмий натижаларни бренди ишлаб чиқариш жараёнида тадбиқ этиш дистиллятларни етилишини тезлаштириш, дистиллятларни сақлаш муддатини 2 йилга қисқартириш ва узоқ муддатли етилиш жараёнида дистиллятлани йўқотишни тежаш имконини беради.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
ДОКТОРА НАУК 16.07.2013.Т.08.01 ПРИ
ТАШКЕНТСКОМ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ИНСТИТУТЕ**

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

МИРЗАРАХМЕТОВА ДИЛБАР ТОХТАМУРАТОВНА

**ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ,
СТАБИЛЬНЫХ В ОРГАНИЧЕСКИХ СРЕДАХ,
ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ
ПРОИЗВОДСТВА СПИРТНЫХ НАПИТКОВ**

**02.00.17 – Технология и биотехнология обработки, хранения
и переработки сельскохозяйственных и пищевых
продуктов**

**03.00.01 – Биохимия
(технические науки)**

АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

Город Ташкент – 2016 год

Тема докторской диссертации зарегистрирована за № 30.09.2014/В2014.5.Т285 в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан.

Докторская диссертация выполнена в Национальном университете Узбекистана и Ташкентском химико-технологическом институте.

Автореферат диссертации на трёх языках (узбекский, русский, английский) размещен на веб-странице по адресу www.tkti.uz и Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» по адресу www.ziynet.uz

Научные консультанты:

Абдуразакова Сабира Ходжаевна
доктор технических наук, профессор

Рахимов Мирзаатхам Мирзахакимович
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Абдурахимов Саидакбар Абдурахманович
доктор технических наук, профессор

Махсумов Абдухамид Гофурович
доктор химических наук, профессор

Гулямова Тошхон Гафуровна
доктор биологических наук, профессор

Ведущая организация:

ХК «Узвинпром-холдинг»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2016 года в «___» часов на заседании Научного совета 16.07.2013.Т.08.01 при Ташкентском химико-технологическом институте. (Адрес: 100011, г.Ташкент, Шайхонтахурский район, улица А.Навои, 32. Зал заседаний Ташкентского химико-технологического института. Тел.: (+99871) 244-79-20; факс: (+99871) 244-79-17, e-mail: info_tkti@edu.uz)

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Ташкентского химико-технологического института (зарегистрирован за №___). (Адрес: 100011, г.Ташкент, Шайхонтахурский район, улица А.Навои, 32. Административное здание Ташкентского химико-технологического института. Тел.: (+99871) 244-79-20).

Автореферат диссертации разослан: «___» _____ 2016 года
(Протокол рассылки №___ от _____ 2016 года).

С.М.Туробжонов
Председатель научного совета по присуждению учёной степени доктора наук, д.т.н., профессор

А.С.Ибодуллаев
Учёный секретарь научного совета по присуждению учёной степени доктора наук, д.т.н., профессор

К.О.Додаев
Председатель научного семинара при научном совете по присуждению учёной степени доктора наук, д.т.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация докторской диссертации)

Актуальность и востребованность темы диссертации. Во всем мире особое внимание уделяется созданию конкурентоспособных технологий, направленных на улучшение дегустационных и технологических показателей спиртных напитков. Усовершенствование существующих технологий с применением ферментов даст возможность уменьшить содержание сивушных (высших) спиртов в составе спиртных напитков и производить в республике экспорториентированную высококачественную продукцию.

Специфичность ферментов, влияющих на технологический процесс получения спиртных напитков, выявление физико-химических закономерностей взаимодействия иммобилизованных ферментов со своими субстратами в водно-органических средах позволяет не только улучшить биотехнологические процессы, но и существенно расширит наши представления о стабилизации ферментов, биокатализе в нестандартных условиях и раскрывает прикладные возможности, которые недоступны в рамках традиционных исследований в водных средах. В практическом плане для улучшения дегустационных показателей спиртных напитков возникает возможность уменьшения количества изоамилового спирта, ускорения созревания дистиллятов и снижения потерь этанола, которое неизбежно имеет место при длительной выдержке.

При этом особо востребованы научные исследования по применению ферментов в направленном изменении целевого показателя пищевых продуктов, улучшению качества, вкуса, букета и технологических показателей спиртных напитков за счет ферментативного снижения количества изоамилового спирта путем его связывания в алкилфруктозиды и эфиры, стабилизации ферментов путём их иммобилизации на твердых носителях для гарантии их активности и стабильности в высокоспиртозной среде, а также рациональное использование собственных резервов и возможностей дрожжевых клеток, управляемое культивирование дрожжей в условиях многоступенчатого брожения для образования ферментов и эфиров, совершенствование технологии приготовления спиртных напитков на основе определения технологического значения ферментов в органических средах и их использования в направленном изменении целевого показателя и ускорении созревания дистиллятов.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных постановлениями Президента Республики Узбекистан № ПП-1633 от 31 октября 2011 года «О мерах по дальнейшему совершенствованию организации управления и развитию пищевой промышленности республики» (2012-2015 гг.) и № ПП-1937 от 13 марта 2013 года «О мерах по дальнейшему развитию виноградарства в республике» (2013-2015 гг.), а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии приоритетного направления развития науки и технологий республики V.«Сельское хозяйство, биотехнология, экология и охрана окружающей среды».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации. Научные исследования, направленные на улучшение качества спиртных напитков и совершенствованию технологии их производства, а также на применение технологически значимых ферментов в улучшении качества пищевых продуктов, осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе, Technical University of Munich, University of Muenster, University of Geisenheim, University of Hohenheim (Германия), University of Cordoba, University of Barcelona, (Испания), The Fruit, Vine and Wine Institute of the Agricultural Research Council, University of Stallebosch (ЮАР), Université de Caen, Station Viticole du BNIC, IUT-UFR Sciences, UNGDA, UMR-Arômes, Université de Bordeaux (Франция), University of California (АКШ), Kochi and Yamaguchi University (Япония), University of Bern (Швейцария), University of Belgrade (Сербия), Северно-кавказском зональном научно-исследовательском институте садоводства и виноградарства (Россия) и Национальном институте винограда и вина «МАГАРАЧ».

В результате исследований, проведенных в мире по ферментативному катализу в органических средах были получены ряд научных результатов, в том числе: разработаны способы изменения состава летучих компонентов (Национальный институт винограда и вина «МАГАРАЧ», Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхоз-Академии, Одесский технологический институт пищевой промышленности Россия); University of Hohenheim, University of Geisenheim, Германия); показана технологическая роль эстеразы (Kyoto University, Япония; Institute des Produits de la Vigne, Institute National de la Recherche Agronomique, Франция; Institute Préparatuare aux Etudes d'Ingénieurs, Tunisia); выделены ферменты и созданы способы иммобилизации (University of Toronto, Канада; University of Adelaide, Австралия; University of Washington, Brandeis University, Walter Reed Army Institute of Research; Brookhaven National Laboratory, АКШ; University of Dortmund, Германия; The Weizmann Institute of Science, Израил); определена структура дрожжевых маннопротеинов (University of California, США) и оптимизированы условия ряда реакций с помощью ферментов для применения в органических средах (Massachusetts Institute of Technology, University of California, США; University of Bern, Швейцария; Dalian University of Technology, Китай).

В мире по улучшению качества и технологических показателей ликероводочных изделий и бренди по ряду приоритетных направлений проводятся исследования, в том числе: определению маркеров для идентификации подлинности вин и дистиллятов; ферментативному катализу в органической

среде; выявлению происхождения летучих компонентов и определению их влияния на качество продукции, ускорению созревания спиртных напитков, улучшению дегустационных показателей спиртных напитков; стабилизации ферментов и разработке методов иммобилизации ферментов; созданию технологий применения ферментов в органических средах.

Степень изученности проблемы. Научным исследованиям по раскрытию закономерностей по влиянию времени хранения и процесса созревания на качество спиртных напитков, управлению процессом брожения на биокаталитической основе, обогащению дистиллятов энантиомерными эфирами и ускорению их созревания, улучшению дегустационных показателей спиртных напитков и совершенствованию технологии производства спиртных напитков были посвящены работы С.Х.Абдуразаковой, Г.Г.Валуйко, А.К.Родопуло, И.М.Скурихин, В.И.Нилов, В.М.Малтабар, Е.Л.Мнжоян, Л.М.Джанполадян, Е.М.Датунашвили, И.М.Грачева, А.А.Мартаков, Л.Н.Нечаев, Е.А.Гогичайшвили, А.Д.Лашхи, В.А.Маслов, В.А.Загоруйко, В.Г.Гержилова, О.А.Чурсина, Н.М.Агеева, Э.Я.Мартыненко, О.А.Сапрыкина, У.К.Абдуллаев, М.В. Центроев, Т.А.Начева, Gerald Ferrary, Jerome Ledauphin, Pierre-Louis Teissedre, Rodriguez Madrera, Rodriguez Doderо M.C., Cristina Martinez Montero, David M.Goldberg и др.

В развитие научных исследований по выделению ферментов, определению их молекулярных форм и количественных характеристик, стабилизации ферментов, теории и практике гетерогенного ферментативного катализа, катализу в водно-органических средах и разработке технологий с применением ферментов, специфичности ферментов в органических средах и раскрытию возможностей катализа в нестандартных условиях, изучению закономерностей фермент-субстратных взаимодействий в органических средах внесли свой вклад А.И.Опарин, А.М. Безбородов, И.В.Березин, М.М. Рахимов, М.Т.Туйчибаев, А.А.Ахунов, К.Д.Давранов, З.Р.Ахмедова, О.Н. Вагина, Ш.С.Ташмухамедова, Ш.У.Турдикулова, Н.Дж.Сагдиев, И.Т.Якубов, Х.Т.Хасанов, А.М.Klibanov, J.O.Lampen, Lizhong Dai, V.Urlacher, Zhang Shufen, Isabelle Dugelay, Castro G.R., Munishwar N.Gupta, Yoshiharu Inoue и др.

Проведение исследований по совершенствованию технологии бродильных производств на биокаталической основе, контролю образования ферментов в процессе управляемого культивирования дрожжей, специфичности биокатализа гидролитических ферментов в нестандартных условиях, определению технологической значимости ферментов с технологической и биохимической позиций, направленному изменению состава летучих компонентов спиртных напитков, а именно снижению количества высших спиртов и обогащению энантиомерными эфирами с использованием ферментов инвертазы и эстеразы очень актуально и имеет научно-практическую значимость.

Связь темы диссертации с планами научно-исследовательских работ института и высшего учебного заведения. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ по

прикладным проектам Национального университета Узбекистана «Изучение теории и практики гетерогенного ферментативного катализа» (1995-2015 гг.) и Ташкентского химико-технологического института ЗИ-12-01 «Разработка ресурсосберегающих технологий производства экологически чистых и высококачественных спиртных напитков» (2003-2005 гг.), а также научных проектов «Анализ летучих компонентов в процессе ферментативной этерификации и трансэтерификации» (CASIA-I Erasmus Mundus, University of Hohenheim, 2011-2012 гг.), «Совершенствование технологии приготовления спиртных напитков на основе применения дрожжевых ферментов» (DAAD, University of Geisenheim, 2014 г.).

Целью исследования является создание технологии получения стабильных в спиртовой среде иммобилизованных дрожжевых ферментов и совершенствование технологии приготовления спиртных напитков с их использованием.

Задачи исследования:

получение иммобилизованных препаратов дрожжевой инвертазы и эстеразы, стабильных в водно-органической среде;

определение субстратной специфичности дрожжевой инвертазы и эстеразы к высшим спиртам в водно-органической среде;

выявление оптимальных условий для конверсии высших спиртов иммобилизованными ферментами в специально созданной модельной системе;

разработка технологии получения иммобилизованных ферментов, стабильных в спиртовой среде;

совершенствование технологии получения ликеро-водочных изделий и бренди с применением иммобилизованных ферментов и расчет технико-экономической эффективности.

Объектом исследования являются виноградные (коньячные) и пшеничные дистилляты, а также ферменты *Saccharomyces cerevisiae* (инвертаза и эстераза).

Предмет исследования составляет ферментативную конверсию высших спиртов и направленное уменьшение их количества в составе спиртных напитков.

Методы исследования. В диссертации применены современные биохимические и физико-химические, хроматографические, хромато-масс-спектрометрические, дегустационные и статистические исследовательские и аналитические методы.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

разработаны технологии и оптимальные условия получения иммобилизованных ферментов, стабильных в водно-органических средах;

определена субстратная специфичность полученных ферментов (дрожжевой инвертазы и эстеразы) по отношению к высшим спиртам в водно-органических средах;

показано уменьшение количества высших спиртов в составе спиртных напитков, их превращением в алкилфруктозиды и эфиры на основе

применения иммобилизованных ферментов;

разработаны оптимальные технологические условия применения иммобилизованных ферментов инвертазы и эстеразы для конверсии высших спиртов в спиртных напитках;

предложена новая технология для изменения профиля летучих компонентов спиртных напитков с использованием ферментов инвертазы и эстеразы;

усовершенствованы технологии приготовления бренди и ликёро-водочных изделий с использованием полученных иммобилизованных дрожжевых ферментов.

Практические результаты исследования:

разработаны способы иммобилизации дрожжевых ферментов, стабильных в спиртовой среде;

выявлены условия для ферментативной трансформации высших спиртов в эфиры и алкилфруктозиды в модельной водно-органической среде;

результаты по конверсии высших спиртов, полученные в модельных экспериментах переданы для внедрения в промышленных условиях для производства бренди и ликеро-водочных изделий;

разработана технология получения иммобилизованных ферментов и на основе их применения путем снижения количества высших спиртов и увеличения количества энантиковых эфиров усовершенствована технология производства спиртных напитков.

Достоверность полученных результатов. Достоверность результатов исследования основывается примененными в работе подходами и методами, использованием теоретических и практических научных подходов, идентификацией субстратов (высших спиртов) и продуктов (эфиров) ферментативного катализа в процессе конверсии высших спиртов с использованием современных физико-химических методов и современных приборов (газовый хроматограф, хромато-масс-спектрометр, Agilent Technologies, США); согласованностью результатов, полученных в модельных экспериментах с данными, полученными на промышленных дистиллятах; сравнительной физико-химической и дегустационной оценкой продукции, полученной по традиционной и предлагаемой технологиям; внедрением рекомендаций, предложений и заключения диссертации в практику.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования. Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в разработке технологии получения иммобилизованных ферментов, стабильных в высокоспиртозной среде и выявлении возможностей ферментативного превращения высших спиртов в эфиры и алкилфруктозиды в спиртовой среде.

Практическая значимость работы заключается в том, что иммобилизованные инвертаза и эстераза использованы для получения качественных, экологически чистых и экспорто-ориентируемых спиртных напитков.

Предлагаемая технология даёт возможность контролировать количество летучих компонентов в составе спиртных напитков, изменять профиль летучих компонентов дистиллятов (спиртных напитков), снизить содержание сивушных спиртов (изоамилового спирта) и обогатить энантиомерными эфирами, улучшить дегустационные показатели спиртных напитков, а также служит для разработки целевых технологий для ускорения созревания и получения высококачественных бренди.

Внедрение результатов исследования. На основе результатов исследований по получению иммобилизованных ферментов, стабильных в органических средах и совершенствованию технологии производства спиртных напитков:

технология получения иммобилизованной инвертазы защищена патентом Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан на изобретение (IAP 04401, 2011). Она дает возможность уменьшить количество высших спиртов и образование алкилфруктозидов в спиртовой среде;

технология получения иммобилизованной эстеразы защищена патентом Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан на изобретение (IAP 04595, 2012). Она дает возможность уменьшить количество высших спиртов и образование эфиров в спиртовой среде;

технология применения иммобилизованной инвертазы для снижения количества высших спиртов в спиртных напитках защищена патентом Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан на изобретение (РУз IAP 03222, 2004). Она дает возможность снижать количество высших спиртов в составе ликеро-водочных изделий;

технология применения иммобилизованной эстеразы для улучшения качества спиртных напитков защищена патентом Агентства по интеллектуальной собственности Республики Узбекистан на изобретение (РУз IAP 04852, 2014). Она дает возможность уменьшить количество высших спиртов в составе купажа коньячных дистиллятов, и обогатить их энантиомерными эфирами;

иммобилизованная эстераза применена в приготовлении бренди на предприятии АО ИИ «Комбинат Ташкентвино» (Справка № 04-401 от 23 февраля 2016 года от ХК «Узвинпром-Холдинг»). Экономический эффект достигается за счет ускорения созревания дистиллятов, сокращения времени их выдержки на два года и уменьшения потерь дистиллятов за счет испарения.

Апробация работы. Результаты исследования были изложены в виде докладов и прошли апробацию на 14 международных и республиканских, научно-практических конференциях, в том числе, Международной конференции посвященный на 85 летию акад.А.С.Садыкова (Ташкент, 2005); Международной конференции молодых ученых посвященный 1000 летию академии Маъмуна (Хива, 2006); Международной конференции молодых

ученых Ломоносов-2007 (Москва, 2007); IV съезде микробиологов Узбекистана «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии» (Ташкент, 2008); Республиканской конференции «Актуальные проблемы биологии, экологии и почвоведения» (Ташкент, 2008); Республиканской научной конференции «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии» (Ташкент, 2009); Международной научной конференции «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Ташкент, 2010); Международной конференции молодых ученых Ломоносов-2010 (Москва, 2010); 3-ей Международной научно-практической конференции «Молодежь и наука: реальность и будущее» (Невинномысск, 2010); 14-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2010); International Conference on Food Engineering and Biotechnology (Paris, 2012); Международном симпозиуме «Микроорганизмы и биосфера» Microbios-2015 (Ташкент, 2015), а также научных семинарах, в том числе, объединённом заседании кафедр «Биофизика и физиология», «Биохимия», «Микробиология и биотехнология» НУУз (Ташкент, 2015), ХК «Узвинпром-Холдинг» (Ташкент, 2015), Научном семинаре при Ученом Совете ТКТИ 16.07.2013.Т.08.01 (Ташкент, 2015, 2016).

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации опубликовано всего 34 научных работ. Из них 4 патента на изобретение, 10 научных статей, в том числе 7 в республиканских и 3 в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, 4 глав, заключения, списка использованной литературы, приложений. Объем диссертации составляет 198 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации **«Анализ состояния вопросов и тенденции совершенствования технологии приготовления спиртных напитков»** приведен обзор состояния вопросов и тенденции совершенствования технологий по уменьшению количества высших спиртов в спиртных напитках. С критических позиций проведен анализ состояния вопросов и тенденции совершенствования технологии приготовления ликеро-водочных изделий и бренди, а также освещено современное состояние получения ферментных препаратов. Приведены данные о биосинтезе различных форм ферментов, культивирование дрожжей в условиях с различными степенями брожения, регуляции ферментативной активности и эфинообразования в процессе брожения, технологической значимости ферментов в органических средах. Освещены существующие представления о закономерности регуляции образования ферментов микроорганизмами. Анализ литературных источников показывает, что существуют неиспользованные технологические возможности для уменьшения количества высших спиртов, а также совершенствования технологии получения спиртных напитков путём направленного превращения высших спиртов в эфиры. Исходя из этого, сформулирована цель и задачи исследования.

Во второй главе диссертации **«Технология получения иммобилизованных ферментов»** исследованы пути повышения эффективности, а также научно-практические и методологические основы культивирования дрожжей, выделения ферментов инвертазы и эстеразы, стабилизации дрожжевой инвертазы и эстеразы в целях их использования в высокоспиртозной среде.

Культивирование дрожжей. Общеизвестно, что основным технологическим процессом для увеличения количества ферментов в бродящей среде является проведение управляемого двухступенчатого процесса брожения (Абдуразакова С.Х., 1990). В связи с этим, культивирование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* проводилось в непрерывно-доливном процессе в биореакторе с исходной средой при 26⁰С до достижения стационарной фазы роста, затем температура бродящей среды снижалась до 6⁰С (для получения инвертазы) и до 12⁰С (для получения эстеразы) со скоростью 2⁰С/ч и подключалась система с искусственной средой №2 и скоростью потока 20 мл/ч. Дображивание проводилось при 6⁰С (для получения инвертазы) до 12⁰С (для получения эстеразы) в течение 6 суток. В последующем дрожжевая

биомасса отделялась от культуральной среды для последующего выделения ферментов.

Выделение и очистка дрожжевых ферментов. Биомасса дрожжей была отделена от культуральной жидкости центрифугированием (6000g) при 4⁰С. Инвертаза была выделена из дрожжевой биомассы и очищена. Ее гидролитическая активность составила 541±6,5 ед/мг и трансферазная активность-23,1±0,2 ед/мг. Эстераза была выделена из культуральной жидкости дрожжей и очищена. Ее гидролитическая активность составила 140±2,5 ед/мг и эфиробразующая активность-3,2±0,2 ед/мг. Была разработана схема выделения и очистки ферментов.

Иммобилизация ферментов. В качестве носителей для связывания ферментов был выбран березовый активированный уголь марки БАУ и дубовые гранулы.

а) Иммобилизация дрожжевой инвертазы на березовом активированном угле марки БАУ-А (БАУ). Для подготовки носителя для иммобилизации на нем инвертазы, БАУ был обработан мочевиной (1:1) в среде диметилформамида в автоклаве Бергиус-1Л при 300⁰С в течение 2 часов (80 атм), при котором образуется особый слой на поверхности активированного угля с кооперативным эффектом введенных амино групп, образованных в ходе реакции азотсодержащих соединений. Используя амино- и карбонильные группы на поверхности образованного слоя, а также амино- и другие группы на поверхности фермента, представленные аминокислотными остатками и углеводами, осуществляли ковалентную иммобилизацию инвертазы. Иммобилизация дрожжевой инвертазы осуществлялась в реакторе с добавлением фермента, 50% сахарозы и добавлением химически модифицированного БАУ из первого реактора в течение 21 ч при 4⁰С. Количество иммобилизованного фермента определяли по убыли белка в исходном растворе в процессе связывания по методу Лоури (Lowry, 1954). Затем иммобилизованный фермент промывали буфером (рН 7,6) и образованные шиффовы связи стабилизировали восстановлением боргидри-дом натрия в количестве 1мг/мл при постоянном перемешивании в течение 3 часов. Трансферазную активность инвертазы определяли с помощью газовой хроматографии по уменьшению изоамилового спирта, а также по тонкослойной хроматографии по образованию изоамилфруктозида в модельной системе, содержащей изоамиловый спирт (8,8 г/л), сахарозу (20,1 г/л), ацетонитрил (200 г/л), в 0,1М ацетатном буфере рН 6.0 (100,1 г/л) при 25⁰С в течение 12 ч. Трансферазная активность иммобилизованного фермента составила 46 Ед/мг.

По полученным данным разработана технологическая схема иммобилизации инвертазы, которая представлена на рис.1.

Технология получения иммобилизованной инвертазы включает следующие операции: вначале в реакторе (1) проводится химическая модификация БАУ мочевиной и диметилформаимидом при 300⁰С в течение 2 ч (80 атм). После этого химически обработанный БАУ промывается сначала

горячей дистиллированной водой (90°C), а потом дистиллированной водой при 25°C (4).



Рис. 1. Технологическая схема получения иммобилизованной инвертазы

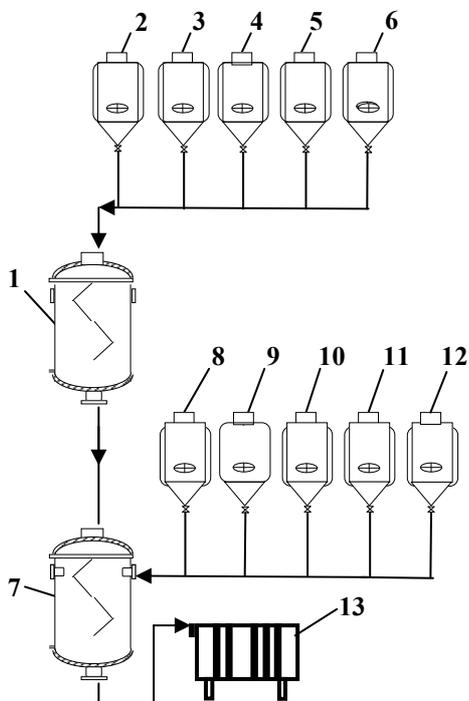
Ковалентная иммобилизация дрожжевой инвертазы осуществляется в реакторе (2) с добавлением фермента (1,2 г фермента на 1 кг БАУ, гидромодуль 1:10), растворённого в 50% сахарозе (5) и обработанного восстановителем-боргидридом натрия (0,5 мг/мл) в течение 3 часов (рН 7,6), добавлением химически модифицированного БАУ из реактора (1) и инкубации при постоянном перемешивании в течение 21 ч при 4°C . Затем добавляется восстановитель – боргидрид натрия (3) в количестве 1мг/мл и смесь оставляют инкубироваться при постоянном перемешивании в течение 3 часов. Далее препарат отделяется от жидкой фазы, промывается дистиллированной водой (4), 6%-ным раствором хлорида натрия (6); 20% водно-спиртовой смесью (7) и отправляется на сушку (8).

б) Иммобилизация дрожжевой эстеразы на дубовых гранулах. Для проведения ковалентной иммобилизации дрожжевой эстеразы дубовые гранулы были предварительно активированы химической обработкой метапериодатом натрия в целях разрыва углеродных связей в молекуле целлюлозы (глюкозы) и образования альдегидных групп на поверхности (Кочетков и др., 1967). Используя альдегидные группы на поверхности активированных дубовых гранул и аминокруппы фермента осуществляли ковалентную иммобилизацию эстеразы на носителе через шиффовые связи, которые затем восстанавливались боргидридом натрия. Эфиروобразующая активность иммобилизованного фермента составила 16 Ед/мг.

Эфиروобразующую активность эстеразы определяли с помощью газовой хроматографии образовавшегося изоамилкапроната в модельной системе, содержащей изоамиловый спирт (8,8 г/л), капроновую кислоту (6,6 г/л), ацетонитрил (200 г/л) или этанол (40% об), в 0,1М ацетатном буфере рН 6,0 (100,1 г/л) при 30°C в течение 48 ч. По полученным данным разработали технологическую схему иммобилизации эстеразы, которая представлена на рис.2.

Технология получения иммобилизованной эстеразы включает следую-

щие этапы (рис.2): вначале в реакторе (1) проводится обработка дубовых гранул 0,5 М раствором гидроксида натрия в соотношении 1:10 при температуре 80°C в течение 1 ч (2) и промывка дистиллированной водой (3), далее носитель активируется метапериодатом натрия (10 мг/мл) при гидромодуле 1:10 и температуре 25°C в течение 60 ч (4).



- 1 - реактор для активации носителя,
- 2 - резервуар для гидроксида натрия,
- 3 - резервуар для дистиллированной воды,
- 4 - резервуар для раствора метапериодата натрия,
- 5 - резервуар для глицерина,
- 6 - резервуар для буферного раствора,
- 7 - реактор для иммобилизации фермента,
- 8 - резервуар для фермента,
- 9 - резервуар для раствора боргидрида натрия,
- 10 - резервуар для раствора хлористого натрия,
- 11 - резервуар для дистиллированной воды,
- 12 - резервуар для 20% этанола,
- 13 - аппарат для сушки.

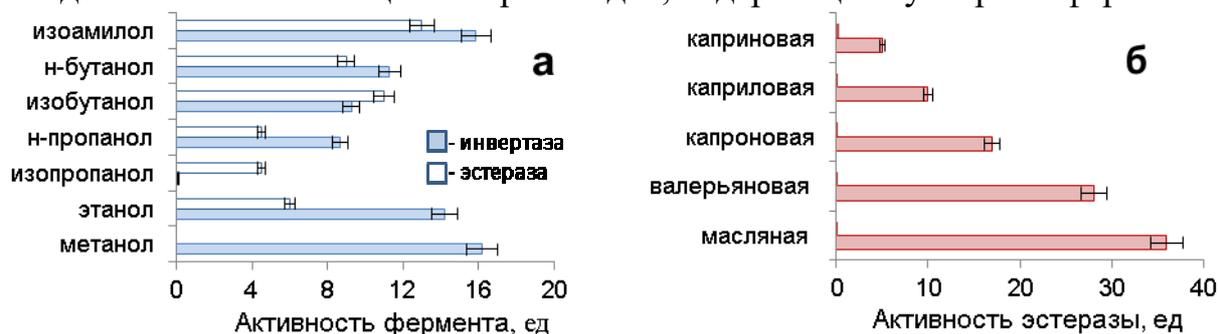
Рис. 2. Технологическая схема получения иммобилизованной эстеразы

После завершения реакции активации носитель промывается 10% глицерином в 0,1М фосфатном буфере, рН 7,5 при температуре 20-25°C в течение 30 мин (5) и 0,1М фосфатным буферным раствором рН 7,5 (6). Процесс ковалентной иммобилизации ферментов осуществляется в реакторе (7) с добавлением активированного носителя, с добавлением 30 г фермента на 1 кг дубовых гранул (8), фосфатного буфера (гидромодуль 1:6) рН 7,5 (6) и инкубации смеси при постоянном перемешивании в течение 20 ч при 4°C. Далее иммобилизованный фермент промывается фосфатным буфером (рН 7,5) и выдерживается в фосфатном буфере (0,1М, рН 7,5), содержащим 0,5 мг/мл восстановителя-боргидрида натрия (9) и смесь постоянно перемешивается в течение 3 ч при 4°C. Полученный иммобилизованный фермент отделяется от жидкой фазы, промывается 6% раствором хлорида натрия (10), дистиллированной водой (11), 20%об. этанолом при 4°C (12) и отправляется на сушку (13).

В третьей главе диссертации «**Ферментативная конверсия высших спиртов в модельных системах**» представлены данные по исследованию субстратной специфичности дрожжевых ферментов в органической среде и путей оптимизации процессов конверсии высших спиртов с помощью использования иммобилизованных ферментов (инвертазы и эстеразы).

Большинство гидролаз, к которым относятся дрожжевые инвертаза и эстераза не проявляют своей эфириобразующей активности в водно-буферных средах, т.к. равновесие смещено в сторону гидролитической реакции. Однако, имеются литературные данные, что инвертаза в водно-органической среде катализирует связывание некоторых спиртов в алкилфруктозиды [Опарин, 1955; Абдуразакова, 1990] и эстераза – эфириобразование [Holland et al., 2005; Krista et al., 2010]. В данной главе приведены результаты по специальному изучению вышеназванных реакций в модельных системах.

Субстратная специфичность дрожжевой инвертазы и эстеразы. Определение субстратной специфичности дрожжевых ферментов проводили в модельной системе «ацетонитрил-вода», содержащей субстраты ферментов.



а. Условия для определения субстратной специфичности инвертазы: спиртовые субстраты (30 мМ), сахара (60 мМ), ацетонитрил (200 г/л), 0,1М ацетатный буфер pH 6,0 (100,1 г/л), температура-25⁰С, продолжительность реакции-12 ч. Условия для определения субстратной специфичности эстеразы: спиртовые субстраты (30 мМ), капроновая кислота (30 мМ), ацетонитрил (200 г/л), 0,1М ацетатный буфер pH 6,0 (100,1 г/л), температура-30⁰С, продолжительность реакции-48 ч.

б. Условия для определения субстратной специфичности эстеразы: спиртовой субстрат-изоамиловый спирт (30 мМ), кислотные субстраты (30 мМ), ацетонитрил (200 г/л), 0,1М ацетатный буфер pH 6,0 (100,1 г/л), температура-30⁰С, продолжительность реакции -48 ч. Примечание: I-наличие достоверных различий от показателя контрольного варианта при P<0,05.

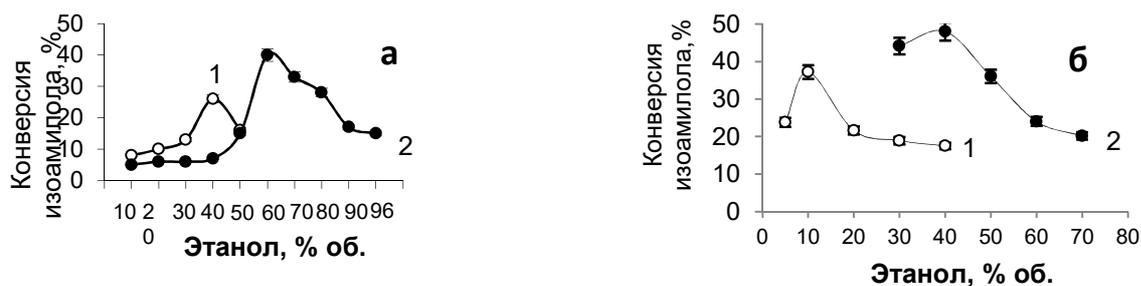
Рис.3. Субстратная специфичность дрожжевой инвертазы и эстеразы к спиртовым субстратам (а) и кислотным субстратам (б) в водно-органической среде

Результаты проведенных исследований показали (рис.3), что ферменты инвертаза и эстераза более активно действуют на спирты, гидроксильная группа которых расположена в α-положении; в отношении высших спиртов С₄-С₅ этерификация увеличивается с увеличением количества углерода в цепи С₃<С₄<С₅ ферменты более специфичны к спиртам с разветвленной цепью, таких как изобутиловый спирт и изоамиловый спирт; расстояние между ОН-группой и метиловой группой спирта играет важную роль в фермент-субстратных взаимодействиях. Поэтому, предполагается, что критерием “узнавания” является пространственное расположение ОН-групп у первого углеродного атома и разветвленность углеродной цепочки, а также близость вторичных углеродных атомов к гидроксильной группе спиртов.

При изучении специфичности эстеразы к различным карбоновым кислотам в качестве спиртового субстрата был выбран изоамиловый спирт. Результаты проведенных исследований показали, что эстераза в органической среде проявляет эфиروобразующую активность с карбоновыми кислотами C₄-C₁₀ и этерификация уменьшается с увеличением количества углерода в цепи C₄ < C₅ < C₆ < C₈ < C₁₀ (рис.3, б).

Свойства иммобилизованных ферментов в водно-органической среде. Большинство гидролаз не проявляют своей трансферазной и эфируобразующей активности в отсутствие органической фазы, т.к. равновесие смещено в сторону гидролитической реакции. Вместе с тем, такая реакция недостаточно исследована в биохимическом плане, например, в модельных системах: «фермент-вода-спирты». Поэтому одной из задач явилось изучение данного процесса как с неиммобилизованными, так и иммобилизованными дрожжевыми ферментами в водно-органической среде.

Оптимальная концентрация этанола в среде. Определение активности неиммобилизованной и иммобилизованной форм ферментов проводили в диапазоне концентраций этанола в среде от 10 до 96% об (рис.4).



а. Модельная среда и условия проведения реакции: изоамиловый спирт (30 мМ), сахароза (60 мМ), этанол (10-96%об), 0,1М ацетатный буфер (100,1 г/л), температура-25⁰С, продолжительность реакции-12 ч. Исходные активности инвертазы: 1-неиммобилизованная инвертаза – 34 Ед/мг, 2-иммобилизованная на активированном угле инвертаза – 46 Ед/мг.

б. Модельная среда и условия проведения реакции: изоамиловый спирт (30 мМ), капроновая кислота (30 мМ), этанол (10-70%об), 0,1М ацетатный буфер (100,1 г/л), температура-30⁰С, продолжительность реакции-48 ч. Исходные активности эстеразы: 1-неиммобилизованная эстераза– 3,2 Ед/мг, 2-иммобилизованная на дубовых гранулах эстераза – 16 Ед/мг.

Примечание: I-наличие достоверных различий от показателя контрольного варианта при P<0,05.

Рис.4. Влияние этанола на активность инвертазы (а) и эстеразы (б)

В качестве водной фазы служил 0,1М ацетатный буфер для неиммобилизованной инвертазы- рН 6.0, иммобилизованной инвертазы – рН 7.0, неиммобилизованной эстеразы- рН 8.0, иммобилизованной эстеразы – рН 6.0. Использование этанола в качестве органической фазы показало, что увеличение его концентрации сопровождалось уменьшением количества изоамилового спирта в среде. Полученные результаты приведены на рис.4. Как видно из рисунков, 40%-ная конверсия изоамилового спирта

наблюдается при 60%об этанола за счет трансферазной активности иммобилизованной инвертазы и 48%-ная конверсия изоамилового спирта наблюдается при 40%об этанола за счет эфиробразующей активности иммобилизованной эстеразы.

На основании исследований физико-химических и кинетических свойств иммобилизованных ферментов в модельной «водно-спиртовой среде» были определены оптимальные параметры биоконверсии высших спиртов посредством иммобилизованных ферментов (табл.1).

Таблица 1

**Оптимальные параметры биоконверсии высших спиртов
иммобилизованными ферментами**

Параметры	Показатели	
	Инвертаза	Эстераза
Иммобилизованный фермент в среде, г/л	10	10
Количество иммобилизованного на 1г носителя фермента, мг	10	17
Активность иммобилизованного фермента, ед/мг	46	16
рН инкубационной смеси	6.0	6.0
Температура среды, °С	25	30
Количество сивушных спиртов в среде (изоамиловый спирт в пересчёте на безводный спирт), мг/100 см ³	264	660
Содержание этанола в среде, % об.	60	40
Время обработки в периодическом режиме, час	12	48

Водно-спиртовая сортировка или купаж коньячных спиртов крепостью 40%об направляется в биореактор, содержащий иммобилизованный фермент с исходной активностью инвертазы (46 Ед/мг) или эстеразы (16 Ед/мг).

Четвертая глава «**Применение иммобилизованных ферментов в технологии приготовления спиртных напитков**» посвящена применению иммобилизованной инвертазы и эстеразы в приготовлении ликеро-водочных изделиях и бренди.

Применение иммобилизованной инвертазы в технологии приготовления ликёро-водочных изделий. Для выявления способности иммобилизованной инвертазы трансформировать сивушные спирты была создана модельная система «этанол-вода-этанол» содержащая 40%об. этанола, 2% сахарозы (рН 6,0) и обработана иммобилизованной инвертазой при найденных оптимальных параметрах конверсии (табл.1). Проверка органолептических (табл.2) и физико-химических свойств (табл.3) сортировки после ферментативной обработки показала, что опытный образец сортировки по сравнению с контрольным образцом сортировки характеризовался очень мягким, гармоничным вкусом и ароматом с еле уловимыми фруктовыми нотками.

Физико-химическая оценка сортировки, обработанной иммобилизованной инвертазой (табл.3) подтвердила и показала снижение количества высших спиртов на 20%, предусмотренных в нормативной документации.

Необходимо отметить, что изоамиловый спирт всегда превалирует в составе сивушных спиртов и снижает дегустационные и гигиенические

показатели спиртных напитков и поэтому исследовательская работа изначально была нацелена именно на направленное снижение его количества. Из табл.3 видно, что содержание изоамилового спирта в составе сортировки снизилось на 50% и составило 1,4 мг/л б.с. Другие же показатели остались на прежнем уровне.

Таблица 2

Органолептические показатели сортировок, обработанных БАУ-А и иммобилизованной дрожжевой инвертазой

Наименование	Наименование показателя	Характеристика
Сортировка, обработанная БАУ (контроль)	1. Внешний вид- 2. Цвет- 3. Вкус и аромат-	Прозрачная жидкость без посторонних включений и осадка; Бесцветная жидкость; Характерные для водки, без постороннего привкуса и аромата.
Сортировка, обработанная иммобилизованной на БАУ дрожжевой инвертазой	1. Внешний вид- 2. Цвет- 3. Вкус и аромат-	Прозрачная жидкость без посторонних включений и осадка; Бесцветная жидкость; Характерные для водки, мягкий, гармоничный, округленный с еле уловимыми фруктовыми нотами

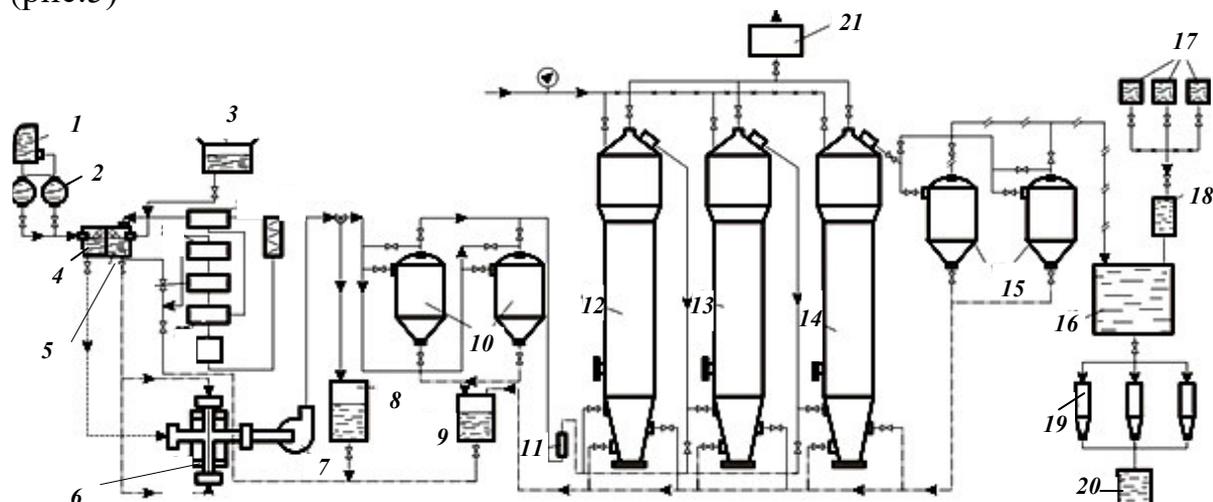
Таблица 3

Физико-химические показатели сортировок, обработанных БАУ-А и иммобилизованной дрожжевой инвертазой

Наименование	Этанол, %об	Альдегиды, мг/л б.с	Сложные эфиры, мг/л б.с.	Сивушные спирты, мг/л б.с.	Изоамиловый спирт, мг/л б.с.	Изобутиловый спирт, мг/л б.с.	Метанол, г/дм ³ б.с.
Требования по нормативной документации	40	4	4	3	-	-	0,05
Сортировка	40	3	4	4	2,7	1,3	0,03
Сортировка, обработанная БАУ	40	4	4	3	2,2	0,8	0,03
Сортировка, обработанная иммобилизованной на БАУ дрожжевой инвертазой	40	4	4	2,4	1,4	1,0	0,02

Следовательно, полученные данные могут применяться в приготовлении ликеро-водочных изделий для направленного снижения количества изоамилового спирта за счёт его ферментативного превращения в изоамилфруктозид. Для этого сортировка, на определенной стадии технологического процесса, в основном перед розливом, обрабатывается иммобилизованной дрожжевой инвертазой в биореакторе (биоузел в технологической схеме), где происходит процесс конверсии высших спиртов.

По предлагаемому способу, приготовленная по рецепту сортировка (водно-спиртовая смесь, 40%об. этанол) обрабатывается в биоузле, которая включена в существующую технологическую схему приготовления водки (рис.5)



1-ёмкость для спирта; 2-мерники спирта; 3-сборник умягченной воды; 4-регулятор напора уровня спирта; 5-регулятор напора уровня умягченной воды; 6-проточный смеситель; 7-центробежный насос; 8-сборник чистого брака; 9-сборник отгона после регенерации угля; 10 – предварительные фильтры; 11-расходомер жидкости; 12,13,14-колонны реакторы 1-й, 2-й и 3-й ступени; 15-фильтры окончательной очистки; 16-сборник обработанной водно-спиртовой смеси; 17-сборники растворов вспомогательных видов сырья; 18-регулятор напора уровня растворов вспомогательного сырья; 19- реакторы с иммобилизованной инвертазой; 20- сборник готовой продукции.

Рис. 5. Технологическая схема производства ликеро-водочных изделий

Производство ликеро-водочных изделий в динамических условиях осуществляется следующим образом: ректифицированный спирт из цистерны спиртохранилища (1) поступает самотеком в мерник (2), установленный в сортировочном отделении. Спирт из мерника (2), умягчённая вода из сборника (3) поступают самотёком через регуляторы напора в смеситель непрерывного действия (6) и идет на фильтры предварительной очистки (10), далее в колонны-реакторы (12-13-14), где в условиях турбулентного движения происходит обработка смеси активированным углём при интенсивном перемешивании. Обработанная углём водно-спиртовая смесь поступает на фильтрацию через фильтры окончательной очистки (15) в сборник (16). Здесь добавляются вкусовые вещества из бачка (17) и смесь проходит через биоузел, который представляет собой биореактор с иммобилизованной инвертазой (19), поступает в сборник готовой продукции (20) и отправляется на розлив. Время прохождения сортировки через полный цикл, т.е. продолжительность очистки должна составлять не менее 12 ч при комнатной температуре. За это время фермент успевает трансформировать сивушные спирты в алкилфруктозиды, которые будут находиться в растворенном состоянии в составе сортировки.

Применение иммобилизованной дрожжевой эстеразы в технологии приготовления бренди. Полученные данные имеют прикладное значение при ферментативной обработке спиртных напитков в целях уменьшения в них

количества сивушных спиртов и улучшения, тем самым, их качества. Так, при сбраживании виноградного сусла образуется достаточное количество сивушных спиртов (300-600 мг/л), которые при перегонке концентрируются и составляют минимум 1,8 г/л (Мартыненко, 2005). Из них изоамиловый спирт, который характеризуется токсичностью и довольно резким и неприятным запахом и вкусом, составляет большую часть сивушных спиртов. В дистиллят также переходят некоторые летучие карбоновые кислоты (маслянная, изовалерьяновая, капроновая, каприловая, каприновая) и снижают дегустационные показатели продукта. При повышенном содержании этих кислот в дистилляте, приготовленное бренди приобретает нехарактерные ему тона, которые сохраняются и после трех лет выдержки (Лашхи, 1962).

Для выявления способности иммобилизованной эстеразы превращать вышеупомянутые летучие кислоты в эфиры в составе молодого виноградного дистиллята был проведен следующий эксперимент. Приготовили купаж крепостью по этанолу 40 %об из молодого коньячного дистиллята (68,1 %об) и сахарного сиропа (сахароза, 2 г/л) и обработали иммобилизованной эстеразой с исходной эфиробразующей активностью 16 Ед/мг в количестве 10 г/л в течение 5 суток при 30⁰С. Контролем служил купаж молодых коньячных спиртов, обработанный дубовым гранулятом.

Органолептическая оценка купажа виноградных дистиллятов, обработанных иммобилизованной эстеразой (табл.4) показала, что такая обработка позволяет улучшить их вкус, букет и гармоничность.

Таблица 4

Органолептические показатели купажа коньячных дистиллятов, обработанного иммобилизованной дрожжевой эстеразой

Купаж	Наименование показателя	Характеристика
Купаж, приготовленный из молодого коньячного дистиллята и обработанный дубовыми гранулами (контроль)	1. Цвет/ Внешний вид- 2. Аромат- 3. Вкус- 4. Гармоничность	Светло-соломенный; прозрачный, без посторонних включений и осадка; типичный, резковатый, сивушный тон; чистый, мягкий, жгучий, чувствуется сырость; не гармоничный.
Купаж, приготовленный из молодого коньячного спирта и обработанный иммобилизованной на дубовых гранулах эстеразой	1. Цвет/ Внешний вид- 2. Аромат- 3. Вкус- 4. Гармоничность	Светло-соломенный; прозрачный, без посторонних включений и осадка; типичный, сложный, приятный, легкий с выраженными цветочными тонами; чистый, мягкий, округленный, цветочные ноты; очень гармоничный.

Отмечается значительное смягчение и слаженность вкуса, а также появление цветочных тонов в аромате в опытных образцах. В купаже, обработанном дубовыми гранулами, цвет стал светло-соломенным, чувствуется резковатый тон сивушных спиртов, а также «сырой» тон во вкусе. В образце купа-

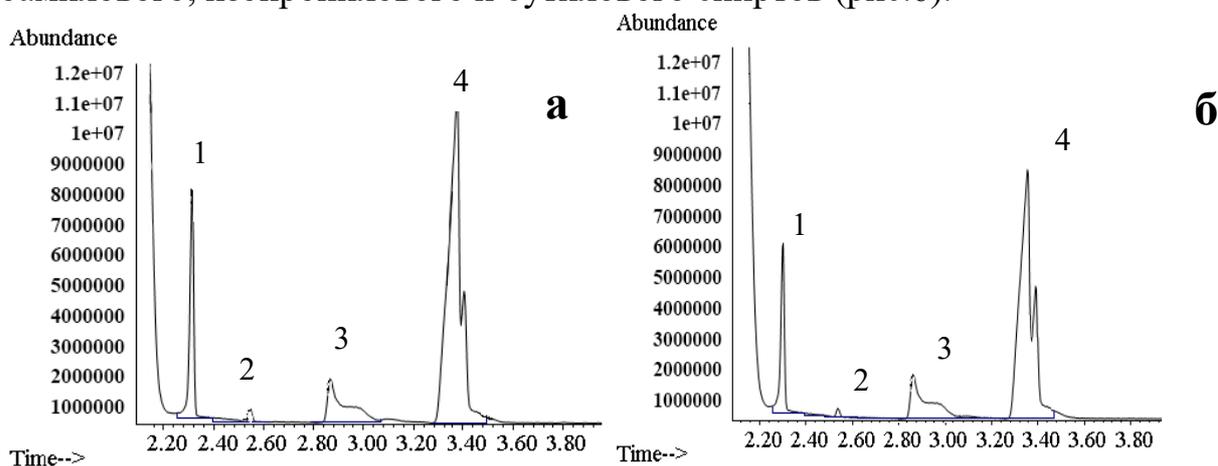
жа, обработанном иммобилизованной эстеразой, вкус округленный, очень гармоничный, букет улучшился, цветочные тона стали более выраженными.

Таблица 5

Физико-химические показатели купажа коньячных дистиллятов, обработанного иммобилизованной дрожжевой эстеразой

Наименование Показателя	Этанол, %об	Альдегиды, мг/100 см ³ б.с	Средние эфиры, мг/100 см ³ б.с	Высшие спирты, мг/100 см ³ б.с	Летучие кислоты, мг/100 см ³ б.с	Метиловый спирт, г/дм ³	Массовая концентрация железа, мг/дм ³
Требования нормативной документации	55-70	5-50	50-270	170-500	250	1,2	1,0
Купаж, приготовленный из молодого коньячного дистиллята (контроль)	40	29,7	51,0	174,2	12,8	0,8	0,68
Купаж, приготовленный из молодого коньячного дистиллята и обработанный иммобилизованной эстеразой	40	30,6	57,9	158,2	8,7	0,5	0,24

Физико-химическая оценка купажей коньячных спиртов (табл.5) после ферментативной обработки подтвердила значительное снижение количества высших спиртов и летучих кислот, и увеличение содержания средних эфиров. Хромато-масс-спектрометрия купажа коньячного дистиллята до и после обработки иммобилизованной эстеразой показала уменьшение изоамилового, изопропилового и бутилового спиртов (рис.6).



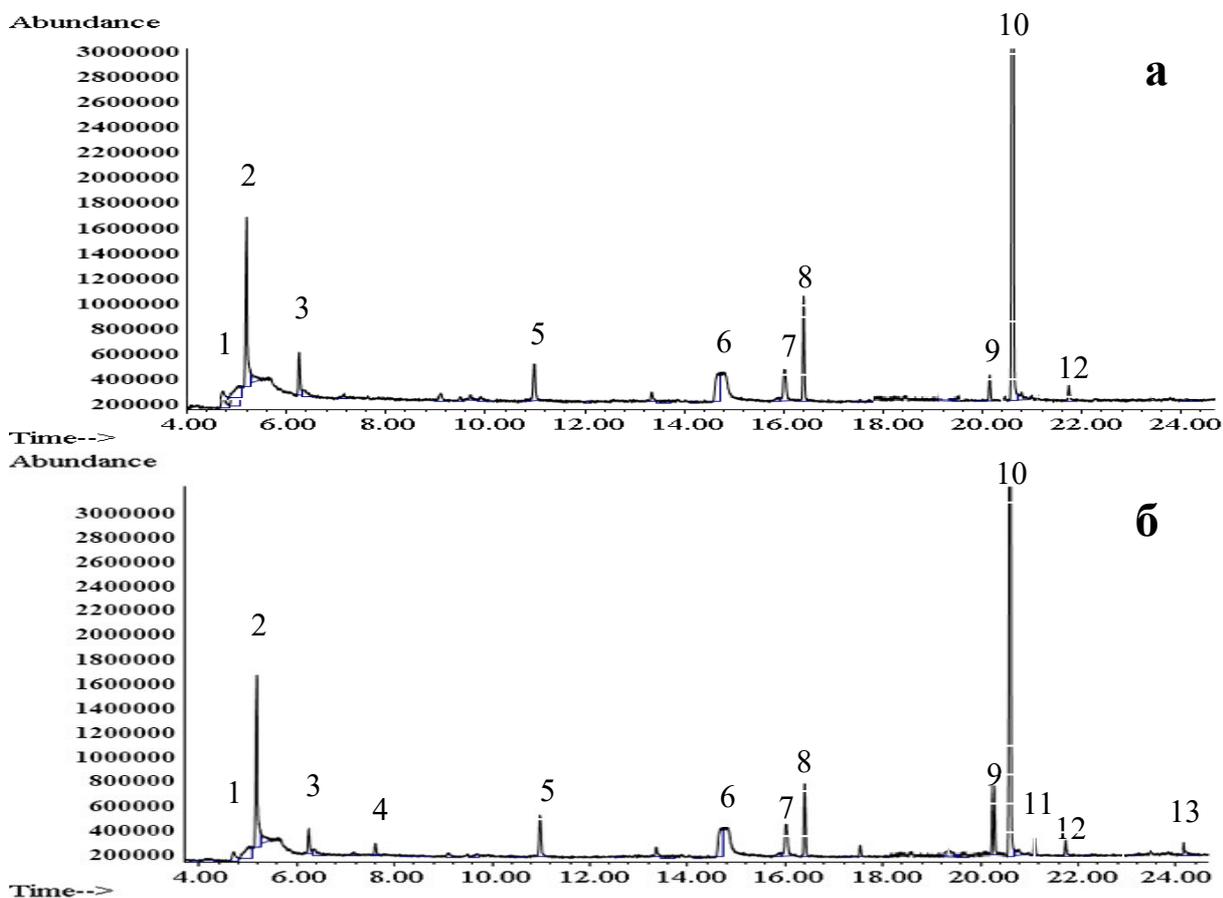
Анализ проводился на хромато-масс-спектрометре Agilent Technology GC/MS AT 5973N с применением капиллярной колонки EVDX-5m (5% фенилметилсилоксан) размером 30м×0,25 мм при программировании температуры термостата колонки: 70⁰С -2 минуты, повышение температуры со скоростью 10⁰С/мин от 70 до 280⁰С.

1-изобутанол, 2- н-бутанол, 3-ацеталь, 4- изоамиловый спирт

Рис. 6. Хромато-масс-спектрометрический анализ летучих компонентов купажа дистиллята до (а) и после (б) ферментативной обработки

Также показано (Рис.7) в составе обработанного иммобилизованной

эстеразой купажа дистиллята наличие увеличение количества этил валерията и этилкаприната, а также появление изоамиловых эфиров изовалерьяной, капроновой, каприловой и каприновой кислот.



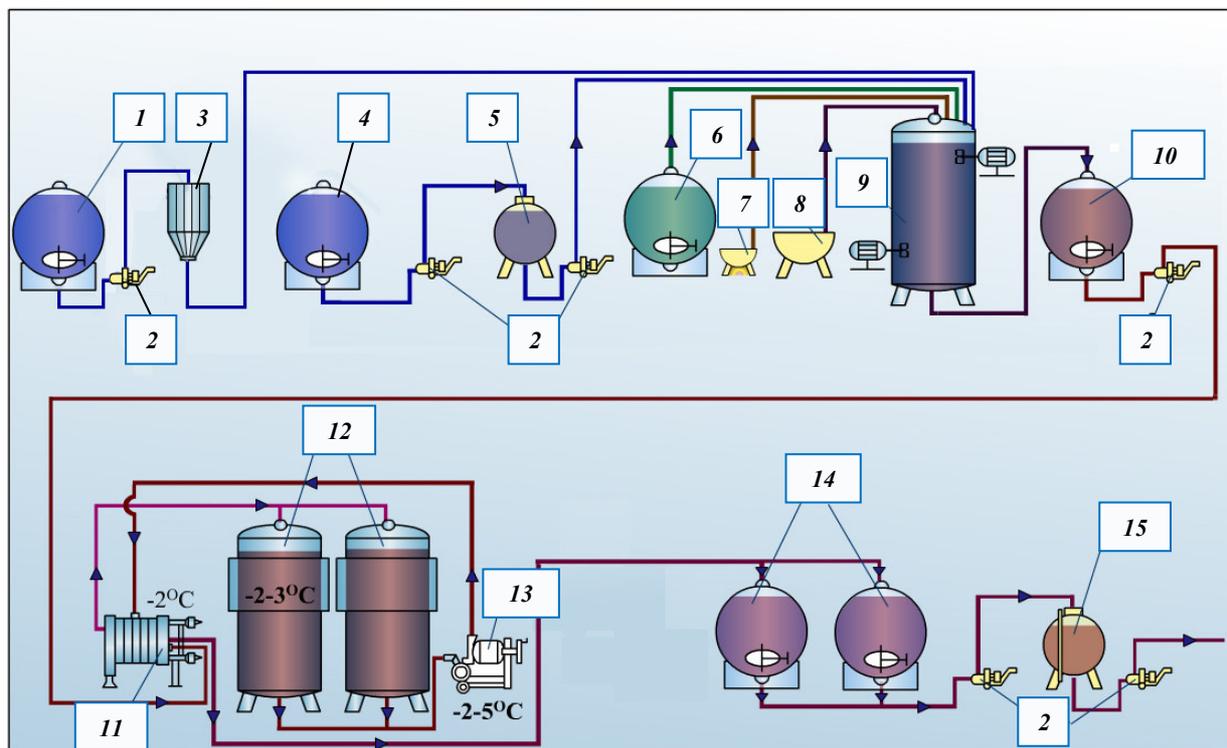
Условия анализа как на рис.6. 1-изопропанол, 2-фурфурол, 3-уксусная кислота, 4-этил-валерият, 5-этил-капронат, 6-фенилэтиловый спирт, 7-этил-сукцинат, 8-этил-каприлат, 9-этил-капринат, 10-метил-ундеcanoат (внутренний стандарт), 11-изоамил-капронат, 12-изоамил-каприлат, 13-изоамил-капринат.

Рис.7. Хромато-масс-спектрометрический анализ летучих компонентов купажа дистиллята до (а) и после (б) ферментативной обработки

По мнению ряда исследователей (Начева Т.А., 1974), основное отличие французских виноградных бренди заключается в присутствии в них «мыльных» тонов. Причины этого кроются в содержании в дистиллятах энантиковых эфиров. В связи с этим, для обогащения дистиллятов энантиковыми эфирами, нами предложена технология обработки купажей виноградных дистиллятов в биореакторе с иммобилизованной эстеразой (биоузел в технологической схеме). Для этого купаж виноградного дистиллята, на определенной стадии технологического процесса, в основном в начале перед купажированием, обрабатывают иммобилизованной дрожжевой эстеразой в биореакторе, где происходит процесс этерификации высших спиртов и карбоновых кислот.

Способ осуществляется в следующей последовательности: сначала необходимо получить иммобилизованную эстеразу. Затем подготавливается биореактор, заполняя его иммобилизованной эстеразой. Согласно технологической схеме (рис.8), определенную часть дистиллята доводят до крепости

40%об. (1), направляют в биореактор (3), содержащий иммобилизованную эстеразу и после обработки при подобранных оптимальных параметрах (табл.1) купаж подается в купажный резервуар (9).



1-резервуар для дистиллятов, подготовленных для обработки иммобилизованной эстеразой, 2-насос, 3-биореактор с иммобилизованной эстеразой, 4- цистерна для обработки дубовыми клепками, 5-мерник дистиллята, 6-резервуар для спиртованных вод, 7-ёмкость для колера, 8-ёмкость для сиропа, 9-купажный резервуар, 10-резервуар для хранения купажа, 11- охладитель, 12- цистерны для обработки холодом, 13-фильтр, 14- промежуточный резервуар, 15-мерник.

Рис.8. Технологическая схема приготовления бренди с использованием иммобилизованной эстеразы

Определенная часть дистиллятов, которые являются выдержанными в дубовых бочках или эмалированных цистернах на дубовых клепках, имеющие необходимую экстрактивность и цвет из цистерны (3) направляется в купажный резервуар (9). Добавляют спиртованные воды (6), при необходимости колер (7) и сахарный сироп (8), перемешивают и оставляют в купажном резервуаре на 1-2 дня. Это необходимо для установления равновесия между составными частями купажа. После этого купаж потом направляют в приемный резервуар (10) на отдых, обрабатывают холодом при $-2-3^{\circ}\text{C}$ (11, 12) и фильтруют при $-3-5^{\circ}\text{C}$ (5). Далее готовый продукт собирается в приемный резервуар (14) и направляется на розлив. В соответствии с вышеприведенным способом обработки в купаже улучшаются вкусовые показатели.

Разработанный подход совершенствования технологии приготовления бренди с применением иммобилизованной дрожжевой инвертазы и эстеразы имеет ряд преимуществ по сравнению с существующими традиционными технологиями:

обработка купажей для приготовления бренди иммобилизованной

эстеразой в биореакторе позволяет избирательно уменьшить содержание высших спиртов, в особенности изоамилового спирта, не оказывая влияние на другие параметры напитков;

разработанная технологическая схема получения ликёро-водочных изделий и бренди включает в себя биоузел, который представляет собой биореактор с иммобилизованным ферментом, который является компактным, недорогим и доступным;

получение иммобилизованного препарата может быть организовано на самих заводах, производящих спиртные напитки; появляется возможность регулирования содержания высших спиртов в дистиллятах и на их основе вырабатывать высококачественную продукцию;

появляется возможность уменьшения количества высших спиртов в молодых дистиллятах в целях изменения исходных летучих компонентов до закладки на выдержку в дубовые бочки;

открываются перспективы для ускорения созревания дистиллятов, при этом улучшится качество летучих компонентов продукции, формирующих букет напитка на основе образования энантиковых эфиров, которые являются показателем степени созревания коньячных дистиллятов;

представляет определенную важность для получения специальных партий дистиллятов для купажа в целях выправления состава летучих компонентов и улучшения их качества;

создается возможность получения высококачественных сортов ликёро-водочных изделий, особых сортов ликёров кондитерского назначения и расширения ассортимента спиртных напитков высокой ценовой категории.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выделенные дрожжевые ферменты (инвертазы и эстеразы) в водно-органической среде не проявляют достаточную трансферазную и эфириобразующую активности и конверсия высших спиртов не осуществляется в достаточной степени.

2. Определена субстратная специфичность дрожжевой инвертазы и эстеразы. Установлено, степень конверсии высших спиртов увеличивается с увеличением количества углерода в цепи $C_3 < C_4 < C_5$. При этом, критерием «узнавания» субстрата является пространственное расположение ОН-групп у первого углеродного атома и разветвленность углеродной цепочки, а также удаленность вторичных углеродных атомов от гидроксильной группы спирта. Инвертаза и эстераза проявляют большую активность к изоформам спиртов, таким как изоамиловый и изобутиловый спирты. В отношении кислотных субстратов эстераза проявляет активность с карбоновыми кислотами C_4-C_{10} и этерификация уменьшается с увеличением количества углерода в цепи $C_4 < C_5 < C_6 < C_8 < C_{10}$.

3. Предложена разработанная технология получения иммобилизованной дрожжевой инвертазы, которая основана на ковалентной иммобилизации фермента на предварительно химически модифицированном активированном угле марки БАУ-А с трансферазной активностью 46 Ед/мг.

4. Исследованием физико-химических и кинетических характеристик иммобилизованной дрожжевой инвертазы в модельной системе «этанол-вода-изоамил спирты-сахароза» с содержанием этанола 40%об. показано, что иммобилизация фермента приводит к повышению стабильности фермента в спиртовой среде. Выявлено, что максимальная конверсия изоамилового спирта (40%) происходит в модельной системе с содержанием этанола 60%об.

5. Предложена разработанная технология получения иммобилизованной дрожжевой эстеразы путем ковалентной иммобилизованной эстеразы на химически модифицированных дубовых гранулах с эфиробразующей активностью 16 Ед/мг.

6. Исследованием физико-химических и кинетических характеристик иммобилизованной дрожжевой эстеразы в модельной системе «этанол-вода-изоамиловый спирт-капроновая кислота» с содержанием этанола 40%об. показано, что иммобилизация фермента приводит к повышению стабильности фермента в спиртовой среде. Выявлено, что максимальная конверсия изоамилового спирта (48%) происходит в модельной системе при исходной концентрации изоамилового спирта и капроновой кислоты - 30 мМ. Иммобилизованная эстераза рекомендована для обогащения спиртных напитков энантиомерными эфирами этерификацией в их составе высших спиртов и карбоновых кислот (капрон, каприл и каприн кислоталар).

7. Разработан способ обработки водно-спиртовой сортировки иммобилизованной инвертазой, обеспечивающей снижение количества высших спиртов путем их превращения в алкилфруктозиды и способ обработки дистиллятов иммобилизованной эстеразой, позволяющий снизить в них количество сивушных спиртов и обогатить их энантиомерными эфирами. Предложены оптимальные технологические параметры биореактора с иммобилизованными ферментами и разработана новая технология приготовления водки и бренди.

8. Разработана усовершенствованная технология получения ликеро-водочных изделий с использованием предлагаемой стабильной инвертазы, иммобилизованной на БАУ и предложены технологические условия применения (водно-спиртовую смесь рекомендуется обрабатывать иммобилизованной инвертазой в количестве 10 г/л в течение 12 часов при температуре 25 °С).

9. Разработана усовершенствованная технология получения бренди с использованием предлагаемой стабильной эстеразы, иммобилизованной на дубовых гранулах и предложены технологические условия применения (дистиллят крепостью 40%об. рекомендуется обрабатывать иммобилизованной эстеразой в количестве 10 г/л в течение 48 часов при температуре 30 °С).

10. Применение полученных научных результатов в процессе производства бренди даст возможность ускорить созревание дистиллятов, сократить сроки выдержки дистиллятов на два года и ежегодные безвозвратные потери дистиллятов за счет испарения, которые имеют место при длительной выдержке.

**SCIENTIFIC COUNCIL 16.07.2013.T.08.01 ON AWARD
OF SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCES
AT THE TASHKENT CHEMICAL TECHNOLOGICAL INSTITUTE**

**NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN
TASHKENT CHEMICAL TECHNOLOGICAL INSTITUTE**

MIRZARAKHMETOVA DILBAR TOKHTAMURATOVNA

**PRODUCTION OF IMMOBILIZED ENZYMES STABLE IN ORGANIC
MEDIA FOR THE DEVELOPMENT OF ALCOHOLIC BEVERAGES
PRODUCTION TECHNOLOGIES**

**02.00.17 – Technology and biotechnology of processing, storage and
reprocessing of agricultural and food products**
03.00.01 – Biochemistry
(technical sciences)

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

Tashkent city - 2016

The subject of the doctoral dissertation is registered at the Supreme Attestation Commission under the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan numbered 30.09.2014/B2014.5.T285.

The doctoral dissertation has been done at The National University of Uzbekistan and the The Tashkent Chemical Technological Institute.

The abstract of the dissertation in three (Uzbek, Russian, English) languages is placed on the website of the Scientific Council www.tcti.uz and the website of the Information and Education Portal «ZiyoNet» www.ziynet.uz.

**Scientific
Consultant:**

Abdurazakova Sabira Hodzhaevna
Doctor of Technological Sciences, Professor

Rakhimov Mirzaatkham Mirzakhakimovich
Doctor of biological Sciences, Professor

**Official
Opponents:**

Abdurakhimov Saidakbar Abdurakhmanovich
Doctor of technological Sciences, Professor

MakhsumovAbdukhamid Gofurovich
Doctor of chemical Sciences, Professor

Gulyamova Toshkhon Gafurovna
Doctor of biological Sciences, Professor

Leading Company:

Holding Company «Uzvinosanoat-Holding»

The defence of the dissertation will be held at _____ on “ ____ ” _____ 2016 at the meeting of the Scientific Council 16.07.2013.T.08.01 at The Tashkent Chemical Technological Institute (Address: Navoi str., 32, Tashkent, 100011, Tel.: +998-71-244-79-20, Fax: +998-71-244-79-17, e-mail: info_tkti@edu.uz Conference hall of the Tashkent Chemical Technological Institute).

The doctoral dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the Tashkent Chemical Technological Institute under No _____ (Address: Navoi str., 32, Tashkent, 100011, Administrative Building of the Tashkent Chemical Technological Institute, Tel.: +998-71-244-79-20).

The abstract of the dissertation is distributed on “ ____ ” _____ 2016
Protocol at the register No _____ dated “ ____ ” _____ 2016.

S.M.Turobjonov

Chairman of the scientific council on award of an academic degree of doctor of sciences, Doctor of technical sciences, Professor

A.S.Ibodullaev

Scientific secretary of the scientific council on award of an academic degree of doctor of sciences, Doctor of technical sciences, Professor

K.O.Dodaev

Chairman of the scientific seminar under the scientific council on award of an academic degree of doctor of sciences, Doctor of technical sciences, Professor

INTRODUCTION (Annotation of doctoral dissertation)

Topicality and relevance of the subject of the dissertation. Around the world the special attention is paid to the development of the competitive technologies directed to the Development of sensory and technological performance of alcoholic beverages. Advancement of the existing technologies by application of enzymes will give a chance to reduce the content of fusel (higher) alcohols in the content alcoholic beverages and produce export-oriented high-quality product in the Republic.

The identification of enzymes specificity influencing technological process of producing alcoholic beverages, detection of chemical and physical specifications of interaction of immobilized enzymes with their substrates in aqueous-organic environment allows not only to improve biotechnological processes, but also significantly expand our ideas of stabilization of enzymes, a biocatalysis in non-conventional conditions, and opens applied opportunities which are not available within traditional studies in water environment. On the practical level for the improvement of sensory performance of alcoholic beverages there is a possibility of reducing of isoamyl alcohol amount, acceleration of maturing of distillates and decrease in losses of ethanol which inevitably takes place at a long ageing.

Meanwhile especially in high demand are the researches on the use of enzymes in directed changing of the targeted parameters of food products as well as improving the quality, taste, bouquet and technological parameters of alcoholic beverages by enzymatic reduction of the amount of isoamyl alcohol by its binding to alkyl-fructozides and esters, stabilization of enzymes by their immobilization on solid support to ensure their activity and stability in alcoholic environment, rational utilization of reserves and potentiality of yeast cells, controlled cultivation of yeast in the fermentation within multistage conditions for the formation of enzymes and esters, development of technology of alcoholic beverages production based on the definition of the technological value of enzymes in organic environment as well as their application in directed changing of the targeted parameters and acceleration of maturation of distillates.

Thus, the current research is carried out, in a sense to accomplish the tasks mentioned in the Decree of the President of the Republic of Uzbekistan № 1633 dated October 31, 2011 «On measures for the further improvement of the management and development of the food industry in the Republic» (2012-2015 years) and № 1937 dated March 13, 2013 «On measures for further improvement of Viticulture in the Republic» (2012-2015 years) and also in other legal documents related to this sphere.

Compliance of the research with priority areas of Science and Technology of the Republic. The present research was performed in accordance with the priority areas of Science and Technology of the Republic V. «Agriculture, Biotechnology, Ecology and Environmental protection» (2009-2015 years).

Review of international researches on the dissertation topic. Research in the field of Production of immobilized enzymes stable in organic media for the development of alcoholic beverages production technologies is carried out in the leading research centers and higher education institutions around the world, including, Technical University of Munich, University of Geisenheim, University of Hohenheim (Germany), University of Barcelona, University of Cordoba (Spain), The Fruit, Vine and Wine Institute of the Agricultural Research Council, University of Stellenbosch (South African Republic), IUT-UFR-Sciences, Université de Bordeaux (France), University of California, Massachusetts Institute of Technology (USA), Kochi and Yamaguchi University (Japan), Northern Caucasus regional Research Institute of Gardening and Viticulture (Russia) and the National Institute of Grape and Wine "Magarach" (Russia).

As a result of the researches, the following scientific and practical conclusions were obtained: the ways of changing the composition of volatile components were developed (the National Institute of Grape and Wine "Magarach", the North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, Odessa technological Institute of Food Production (Russia); University of Hohenheim, University of Geisenheim (Germany); the technological role of esterase was proved (Kyoto University, Japan; Institute des Produits de la Vigne, Institute National de la Recherche Agronomique, France; Institute Préparatoire aux Etudes d'Ingénieurs, Tunisia); isolated enzymes and developed ways of their immobilization (University of Toronto, Canada; University of Adelaide, Australia; University of Washington, Brandeis University, Walter Reed Army Institute of Research; Brookhaven National Laboratory, USA; University of Dortmund, Germany; The Weizmann Institute of Science, Israel); defined the structure of yeast mannoproteins (University of California, USA), optimized conditions for a number of reactions by enzymes for use in organic media (Massachusetts Institute of Technology, University of California, USA; University of Bern, Switzerland; Dalian University of Technology, China).

Thus, a series of studies on the development of the quality and technological parameters of liqueur-vodka products and brandy are being conducted around the world; there are the following priority areas, including the definition of markers for the authentication of wines and distillates, enzymatic catalysis in organic media, identifying the origin of volatiles and definition their impact on product quality, acceleration the maturation of alcoholic beverages, improvement of sensory properties of alcoholic beverages, stabilization of enzymes and development of enzyme immobilization methods, establishment of technology of enzymes application in organic environment.

The problem studying status. There were devoted the works of S.Kh. Abdurazakova, G.G.Valuyko, A.K.Rodopulo, I.M.Skurihin, V.I.Nilov, V.M.Malta-bar, E.L.Mnzhoyan, L.M.Dzhanpoladyan, E.M.Datunashvili, I.M.Gracheva, A.A.Martakov, L.N.Nechaev, E.A.Gogichayshvili, A.D.Lashhi, V.A.Maslov, V.A.Zagoruyko, V.G.Gergikova, O.A.Chursina, N.M.Ageeva, E.Ya.Martinenko, O.A.Saprykina, U.K.Abdullaev, M.V. Tsentroev, T.A.Nachev, Gerald Ferrary,

Jerome Ledauphin, Pierre-Louis Teissedre, Rodriguez Madrera, Rodriguez Dodero M.C., Cristina Marti-nez Montero, David M.Goldberg to the research on patterns disclosure on the effect of aging time and the maturation process on the quality of alcoholic beverages, control of fermentation process on biocatalytical basis, enrichment of distillates with oenante esters and acceleration of their maturation, improvement sensing performance of alcoholic beverages and the development of the alcoholic beverages production technology.

A.I.Oparin, A.M.Bezborodov, I.V.Beresin, M.M.Rakhimov, M.T.Tuychi-baev, A.A.Akhunov, K.Davranov, Z.R.Akhmedova, O.N.Vagin, Sh.S.Tashmukha-medova, Sh.U.Turdikulova, N.J.Sagdiev, I.T.Yakubov, Kh.T.Khasanov, M.Klibanov, J.O.Lampen, Lizhong Dai, V.Urlacher, Zhang Shu-fen, Isabelle Dugelay, Castro G.R., Munishwar N.Gupta, Yoshiharu Inoue et al. have made their valuable contributions into the development of research on enzymes isolation, identification of their molecular forms, and quantitative characteristics, theory and practice of heterogenic enzymatic catalysis, catalysis in water-organic environment and development of technologies with the application of enzymes, specificity of enzymes in organic environment, disclosure of catalysis opportunities in non-standard conditions, specifications of the interaction of enzymes with their substrates in aqueous-organic environment.

It is very topical and significant from the scientific and practical point of view to conduct researches on the development of fermentation technologies on a biocatalytical basis; control of enzymes formation during the process of managed yeasts cultivation; catalysis specificity of hydrolytic enzymes in non-conventional conditions; definition of the technological importance of enzymes from technological and biochemical positions; directed changing the composition of the volatile components of alcoholic beverages, particularly, reducing the amount of higher alcohols and enrichment with oenant esters by the application of invertase and esterase.

The correlation between the dissertation topic and the plans of Research Institutes and Higher Education Institutions. The dissertation research was performed within the framework of the research plan on applied projects of the National University of Uzbekistan «Theory and practice of heterogeneous enzymatic catalysis» (1995-2015 years) and the Tashkent Chemical Technological Institute ZI-12-01 «Development of resource saving technologies for production of ecological and high quality alcoholic beverages» (2003-2005 years) as well as "Analysis of volatile components during enzymatic esterification and transesterification» (CASIA-I Erasmus Mundus, University of Hohenheim, 2011-2012 years) and «Improving the technology of alcoholic beverages production on the basis of application of yeast enzymes» (DAAD, University of Geisenheim, 2014).

The purpose of the research is the development of technology for the production of stable in alcoholic environment immobilized yeast enzymes and the improvement of the technology of alcoholic beverages production with the their application.

The objectives of the research work:

obtaining of immobilized yeast invertase and esterase stable in water-organic medium;

determination of substrate specificity of yeast invertase and esterase to higher alcohols in water-organic environment;

definition of optimal conditions for conversion of higher alcohols by immobilized enzymes in a special created model system;

development of technologies of immobilized enzymes production, stable in alcoholic environment;

improvement of alcoholic beverages and brandy production technologies with the application of immobilized enzymes and calculation of technical and economic efficiency.

The object of the research work includes the grape and wheat distillates, enzymes *Saccharomyces cerevisiae* (invertase and esterase).

The subject of the research work constitutes the enzymatic conversion of higher alcohols and directed reducing of higher alcohols content in the alcoholic beverages.

Methods of research work. The thesis under review contains up-to-date biochemical and physical-chemical, chromatographic, gas-chromatographic mass spectrometric, degustation evaluation and statistical research and analytical methods.

The academic novelty of the research lies in the following:

developed technologies and optimal conditions for obtaining immobilized enzymes, stable in water-organic medium;

defined substrate specificity of isolated enzymes (esterases and yeast invertase) in relation to higher alcohols in an aqueous-organic medium;

developed the optimal technological conditions for application of the obtained immobilized enzyme (invertase and esterases) in conversion of higher alcohols in an alcoholic environment;

indicated reducing of higher alcohols in the content of alcoholic beverages by their transformation into alkylfructozides and esters with the application of immobilized enzymes;

proposed the new technology for changing the profile of the volatile components of alcoholic beverages by using immobilized invertase and esterase;

developed the technology of production of brandy and liquor-vodka products by usage of immobilized yeast enzymes (invertase and esterase).

Practical results of the research:

developed the ways of obtaining of immobilized yeast enzymes stable in alcoholic medium;

defined the conditions for the enzymatic transformation of higher alcohols into esters and alkyl fructozides in the model aqueous-organic environment;

results on the conversion of higher alcohols in model experiments transferred for implementation in the industrial conditions for the production of brandy and other alcoholic beverages;

developed the technologies of immobilized enzymes production and on the basis of their application by reducing the quantity of higher alcohols and increasing the amount of oenanthic esters improved the technology of the alcoholic beverages production.

The reliability of the results of research are based on the applied approaches and methods, the use of theoretical and practical scientific approaches, identification of the substrates (higher alcohols) and the products (esters) during the enzymatic catalysis of conversion of higher alcohols by using the modern physical and chemical methods and the modern appliances (GC, GC-MS, Agilent Technologies, USA); consistency of results obtained during model experiments with those obtained in industrial distillates; comparative physical-, chemical- and degustation evaluation of products obtained by traditional and proposed technologies; implementation of the recommendations, proposals and conclusions of the dissertation into practice.

Theoretical and practical significance of research results. The theoretical significance of the dissertation is to develop the technology of immobilized enzymes production, stable in the high alcoholic medium and determination of the opportunities for the enzymatic conversion of higher alcohols into esters and alkylfruktozides in an alcoholic environment.

The practical significance of the work lies in the fact that the immobilized invertase and esterase is applied in the production of the high-quality, eco-friendly and export-oriented alcoholic beverages. The proposed technology makes it possible to control the amount of volatile components in the composition of alcoholic beverages, to change the profile of the volatile components of distillates, to reduce the content of fusel alcohols (isoamyl alcohol) and enrich them by oenanthic esters, improve the sensory performance of alcoholic beverages, as well as serve to develop targeted technologies for the acceleration of aging of brandy and produce the high-quality products.

Implementation of the research results. On the basis of research on the production of immobilized enzymes, stable in organic environment and development of liquor products and brandy production technology:

the technology of obtaining the immobilized invertase is developed and the invention is patent secured by the Agency on Intellectual Property of the Republic of Uzbekistan (IAP 04401, 2011). It gives the possibility to reduce an amount of the higher alcohols and formation of alkylfruktozides in the alcoholic environment;

the technology of obtaining the immobilized esterase is developed and the invention is patent secured by the Agency on Intellectual Property of the Republic of Uzbekistan (IAP 04595, 2012). It gives the possibility to reduce an amount of the higher alcohols and formation of oenanthic esters in the alcoholic environment;

the technology of application of the immobilized invertase for reducing in amount of the higher alcohols in alcoholic beverages is developed and the invention is patent secured by the Agency on intellectual property of the Republic of Uzbekistan on the invention (RUZ IAP 03222, 2004). It gives the possibility to reduce an amount of the higher alcohols in the content of liqueur-vodka products.

the technology of the immobilized esterase application to improve the quality of alcoholic drinks is developed and the invention is patent secured by the Agency on Intellectual property of the Republic of Uzbekistan on the invention (RUZ IAP 04852, 2014). It gives the possibility to reduce an amount of the highest alcohols in the content of grape distillates and enrich them with oenanth esters.

immobilized esterase has been applied in brandy production at the Joint-Stock Company "Kombinat Tashkentvino" (The Letter № 04-401 by the Holding company "Uzvinsanoat-Holding", 23 February, 2016). The economic effect is achieved by acceleration of grape distillates maturation, reducing the exposure time of distillates for two years as well as irretrievable losses of distillates during the ageing process.

Approbation of the research results. The results of the study were presented in the form of reports and were approbated on 14 international and national scientific and practical conferences, including, the International conference dedicated to the 85th anniversary of Academician A.S. Sadikov (Tashkent, 2005); the International conference of young scientists devoted to 1000 anniversary of Mamun Academy (Khiva, 2006); the International conference of young scientists Lomonosov-2007 (Moscow, 2007); IV Congress of Microbiologists of Uzbekistan «Contemporary problems of Microbiology and Biotechnology» (Tashkent, 2008); the Republican Conference «Actual problems of Biology, Ecology and Soil science» (Tashkent, 2008); the Republican Scientific Conference «Problems of modern Microbiology and Biotechnology» (Tashkent, 2009); the international conference of young scientists Lomonosov-2007 Lomonosov-2010 (Moscow, 2007, 2010); the 3rd International Scientific and Practical Conference «Youth and Science: Reality and Future» (Nevinnomyssk, 2010); the 14th International Pushchino School-Conference for Young Scientists «Biology - the Science of the twenty-first century» (Pushchino, 2010); International Conference on Food Engineering and Biotechnology (Paris, France, 2012); the International symposium "Microorganisms and Biosphere. Microbios-2015» (Tashkent, 2015) as well as in Scientific Seminars, including, the Joint Meeting of the Chairs of «Microbiology and Biotechnology», «Biochemistry», «Biophysics and Physiology» at the National University of Uzbekistan (Tashkent, 2015); "Uzvinprom-Holding» (Tashkent, 2015) and the Academic Council 16.07.2013.T.08.01 at the Tashkent Chemical Technological Institute (Tashkent, 2015, 2016).

Publication of the research results. 34 scientific works have been posted on the dissertation topic, in total. 4 of them - patents on the invention, 10 - scientific articles, including 7 in the national and 3 in the international journals which are recommended for the publication of major scientific results of dissertation by The Higher Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan.

The structure and volume of the dissertation. Structure of the dissertation consists of an Introduction, 4 Chapters, Conclusion, List of references and Annexes. Volume of dissertation makes up 198 pages.

THE MAIN CONTENT OF THE DISSERTATION

In the **Introduction** of the dissertation, topicality and relevance of the subject of the dissertation, the purpose and objectives of the research are substantiated, the object and the subject are characterized, the compliance of the research with the priority areas of Science and Technology of the Republic is shown, the scientific novelty and practical results of the study are described, the theoretical and practical significance of the obtained results is revealed, a list of the research results implemented into practice, information on published works and the structure of the dissertation is provided.

The first chapter of the dissertation titled "**Analysis of the issues and trends in improving the technology of preparation of alcoholic beverages**" includes an overview of the issues and trends of improving of technologies on reducing the amount of higher alcohols in alcoholic beverages. From critical positions the analysis of the condition of questions and tendencies of the development of technology of liquer-vodka products and brandy is held, as well as the up-to-date state of obtaining of enzymes is highlighted. It also contains the information about the various forms of enzymes biosynthesis, yeast cultivation in the different multistage conditions, the regulation of enzyme activity and esters formation during the fermentation, technological importance of enzymes and their usage in organic environment. The existing ideas about the regulation of enzyme appearance by means of the microorganisms are presented. Analysis of the literary sources reveals that there are untapped technological capabilities to reduce the amount of fusel alcohols, as well as improvement of alcoholic beverages technologies based on directed transformation of higher alcohols into alkylfructozides and esters. Therefore, the purpose and objectives of the study has been formulated.

The second chapter of the dissertation titled "**The technology of producing of immobilized enzymes**" explores the ways of enhancing the efficiency, as well as scientific and practical and methodological bases of yeast cultivation, isolation of invertase and esterase, stabilization of yeast invertase and esterase for their usage in high alcoholic environment.

Yeast cultivation. It is known that the main technological process for the enhancing of enzymes forming was the conduction of the managed two-step fermentation process (Abdurazakova SH, 1990). Cultivation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was carried out in a fed-batch process in a bioreactor with an initial medium at 26°C until the yeast growth reaches the stationary phase, and then the temperature of the fermentation medium was reduced (2°C/h) to 6°C (for invertase) and up to 12°C (for esterase) and was connected to the system with an artificial medium # 2 and flow rate of 20 ml/h.

Isolation and purification of yeast enzymes. Yeast biomass was separated from the culture fluid by centrifugation (6000g) at 4°C. Inverase was isolated from the yeast buimasse and purified. Its hydrolytic activity amounted to 541±6.5 units/mg and transferase activity-23,1±0.2 units/mg. Esterase was isolated from the

growth medium and purified. Its hydrolytic activity amounted to 140 ± 2.5 units/mg and esterification activity to $3,2 \pm 0.2$ units/mg. The schemes of isolation and purification of enzymes was developed.

Immobilization of invertase. Activated birch charcoal (BAC) and oak granulate were selected as supports for the enzymes immobilization.

a) *Immobilization of yeast invertase on activated birch charcoal (BAC).* For preparing of support for immobilization of enzyme the BAC was treated with urea (1:1) in a medium of dimethylformamide in an autoclave Bergius-1L at 300°C for 2 hours and 80 atm. During the modification process on the surface of BAC the special layer is formed with carbonyl- and introduced amino groups. By using amino and carbonyl groups on the BAC surface as well as the amino and other groups on the enzyme surface, represented by amino acid residues and carbohydrates, covalent immobilization of invertase was carried out. Immobilization of yeast invertase is performed in the second reactor with the addition of chemically-treated BAC from the first reactor and enzyme in 50% sucrose (pH 7,6) and constant stirring for 21 hours at 4°C . Then, the immobilized enzyme was washed with buffer (pH 7,6) and the formed Schiff bounds were stabilized by treatment with sodium borohydride in an amount of 1 mg/ml at a constant stirring for 3 hours. The amount of the immobilized enzyme was determined as a difference of protein amount in the starting solution and washing solutions by the Lowry method (Lowry, 1954). Transferase invertase activity was determined in a model system containing isoamyl alcohol (8.8 g/L), sucrose (20.1 g/L), acetonitrile (200 g/L) in 0.1 M acetate buffer pH 6.0 (100.1 g/L) at 25°C for 12 hours. Substrates and products of enzymatic reaction subjected to gas chromatographic analysis (isoamyl alcohol) and thin layer chromatographic analysis (isoamyl fructozide). Thus, the immobilized enzyme possesses the 46 units/mg of transferase activity. The technological scheme obtaining of immobilized invertase is shown in Fig.1.

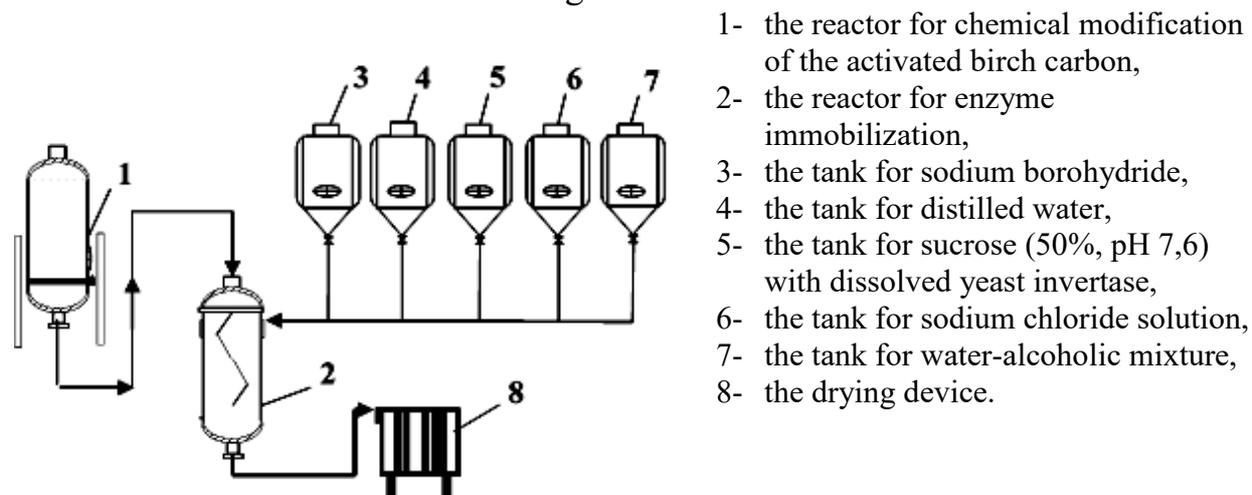
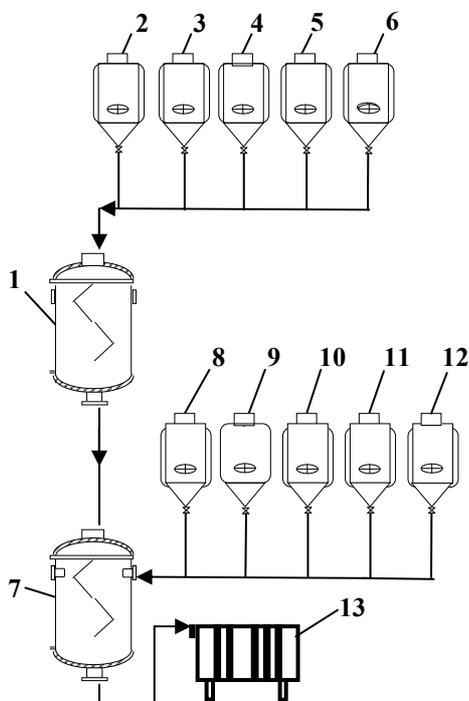


Fig. 1. Technological scheme of obtaining immobilized invertase

Technology for producing immobilized invertase comprises the following steps: at first step (1), the chemical modification of activated birch carbon carried in the reactor in the medium with urea and dimethylformamide at 300°C for 2 hours (80 atm). Thereafter, the chemically-treated BAC is washed (4) with hot distilled water

(90°C) and with distilled water at 25°C. Covalent immobilization of the yeast invertase is performed in a reactor (2) with the addition of enzyme (5) dissolved in 50% sucrose treated with sodium borohydride (0,5 mg/mL) for 3 hours (pH is adjusted to 7.6 by buffer) and chemically treated BAC from the reactor (1) and stirred continuously during 21 hours at 4°C. Then, a sodium borohydride (3) is added in an amount of 1 mg/mL to the mixture and incubated with a continuous stirring for 3 hours. Hereinafter, the immobilized invertase is separated from the liquid phase, washed with distilled water (4), 6% sodium chloride solution (6); ethanol 20%v/v (7) and sent for drying (8).

b) *Immobilization of yeast esterase on oak granules.* For the covalent immobilization of yeast esterases oak granules were pre-activated by chemical treatment with sodium metaperiodate in order to break carbon bonds in the cellulose molecule (glucose) and form aldehyde groups on the support surface (Kochetkov et al, 1967). By forming the Schiff bounds between aldehyde groups on the surface of activated oak granules and amino-groups on the enzyme surface, the covalent immobilization of esterase was performed. Schiff bounds then were reduced by means of sodium borohydride. Thus the immobilized esterase possesses the 16 units/mg of ester-forming activity. Ester-forming esterase activity was determined in a model system containing isoamyl alcohol (8.8 g/L), caproic acid (6.6 g/L), acetonitrile (200 g/L) in 0.1 M acetate buffer pH 6.0 (100.1 g/L) at 30°C for 48 hours. Substrates and products of enzymatic reaction subjected to gas chromatographic analysis (isoamyl alcohol, isoamyl hexanoate). The technological scheme of obtaining of immobilized invertase is shown in Fig.2.



- 1 – the reactor for the activation of the carrier,
- 2 – the tank for sodium hydroxide,
- 3 – the tank for distilled water,
- 4 – the tank for a reservoir for the sodium metaperiodate,
- 5 – the tank for glycerol,
- 6 – the tank for buffer,
- 7 – the reactor for enzyme immobilization,
- 8 – the tank for the enzyme,
- 9 – the tank for a solution of sodium borohydride,
- 10 – the tank for a solution of sodium chloride,
- 11 – the tank for distilled water tank,
- 12 – the tank for 20% ethanol,
- 13- the drying device.

Fig. 2. Technological scheme of obtaining immobilized esterase

The technological scheme of obtaining an immobilized esterase comprises the following steps (Fig.2): at first step (1) the oak granules treated during one

hour with 0,5 M sodium hydroxide 1:10 at 80°C (2), washed with distilled water (3), treated with sodium metaperiodate (10 mg/mL) at ratio of 1:10, at 25 °C during 60 hours (4). After the activated support (oak granulate) is completed, the support is washed with 10% glycerol (pH 7,5) at 20-25 °C (5) and 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 (6). Covalent enzyme immobilization process is carried out in a reactor (7) with the addition of the activated support (8), phosphate buffer pH 7.5 (6) and incubation the mixture under a constant stirring for 20 hours at 4°C. After that the immobilized enzyme is washed with phosphate buffer (pH 7.5) and treated with sodium borohydride (9) 1 mg/mL in a phosphate buffer (pH 7.5) within the continuously stirring for 3 hours at 4°C. Next, the obtained immobilized enzyme is separated from the liquid phase, washed with 6% sodium chloride solution (10), distilled water (11), 20% ethanol at 4°C (12) and sent to the drying device (13).

The third chapter of the dissertation titled "**The enzymatic conversion of higher alcohols in model systems**" presents a study of substrate specificity of yeast enzymes in organic environment and ways to optimize the conversion processes of higher alcohols into alkylfructosides and esters by using immobilized enzymes (invertase and esterase).

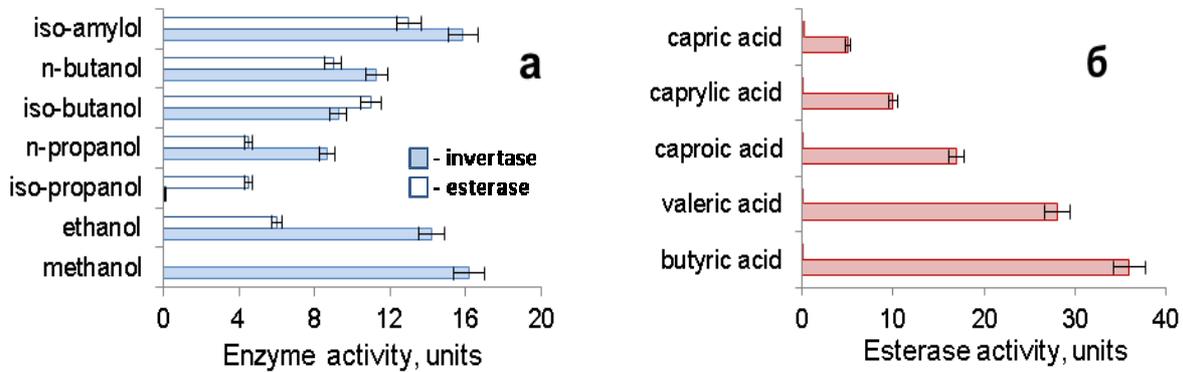
The majority of Hydrolases, which include yeast invertase and esterase do not show their ester-forming activity in aqueous-buffer environments, as the balance is shifted toward the hydrolytic reaction. However, there is literary evidence that invertase in water-organic environment catalyzes the binding of certain alcohols with fructose and forming alkylfructozides [Oparin, 1955; Abdurazakova, 1990] and esterase - esterification [Holland et al, 2005; Krista et al., 2010]. Chapter 4.1 presents the results of the detailed study of the reactions described in the model systems.

Substrate specificity of yeast invertase and esterase. Determination of substrate specificity of yeast enzymes was carried out in the model system "acetonitrile-buffer" containing enzyme substrates. The results of these studies have shown (Figure 3) that the enzymes invertase and esterase are more active with the alcohols, the hydroxyl group of which is located in the α -position; regarding the higher alcohols C_3 - C_5 esterification increases with the amount of carbon in the chain $C_3 < C_4 < C_5$; enzymes are specific for the branched-chain alcohols such as isobutyl alcohol and isoamyl alcohol; the distance between the OH group and the methyl group of the alcohol has an important role in enzyme-substrate interactions.

Therefore, it is assumed that the criterion of "recognition" of the substrate is a special arrangement of OH groups from the first carbon atom and a carbon chain branching, as well as proximity to a secondary carbon atom of the hydroxyl group of alcohols. In case of studying of esterase specificity to various carboxylic acids the isoamyl alcohol (fig.3, b) has been chosen as the alcoholic substrate. The results of the studies have shown, that the esterase in organic media shows an ester-forming activity with carboxylic acids C_4 - C_{10} and esterification is decreased with increasing in the amount of carbon in the chain $C_4 < C_5 < C_6 < C_8 < C_{10}$ (Fig.3).

Properties of immobilized enzymes in an water-organic medium. Most hydrolases do not show their transferase activity in the absence of the organic

phase, as the equilibrium is shifted towards hydrolysis reaction. However, such a response is not sufficiently researched in biochemical terms, for example, in model systems: "enzyme-water-alcohols". Hence, one of the tasks was to study the process with both non-immobilized and immobilized yeast enzymes in a water-alcohol environment.

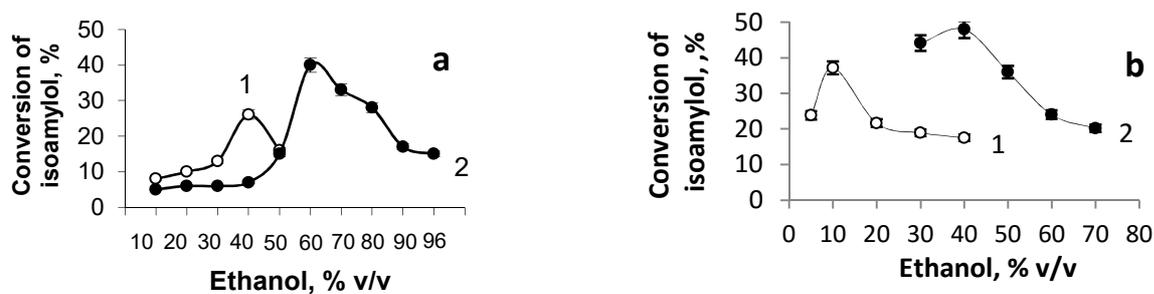


a. Conditions for determining the substrate specificity of invertase: alcoholic substrate (30 mM), sucrose (60 mM), acetonitrile (200 g/L), 0.1M acetate buffer pH 6.0 (100.1 g/L), temperature-25°C, the reaction duration-12 hours. Condition for determination of the substrate specificity of esterase: alcoholic substrate (30 mM), hexanoic acid (30 mM), acetonitrile (200 g/L), 0.1M acetate buffer pH 6.0 (100.1 g/L), the temperature-30°C, the reaction duration-48 hours.

6. Conditions for the determination of the substrate specificity of invertase: alcoholic substrate-isoamyl alcohol (30 mM), acidic substrate (30 mM), acetonitrile (200 g/L), 0.1M acetate buffer pH 6.0 (100.1 g/L), temperature-30°C, the reaction duration- 48 hr.

Note: I-existence of significant differences from the control parameter options at P < 0.05.

Figure 3. Substrate specificity of yeast invertase and esterase to alcoholic (a) and acidic substrates (b) in an aqueous-organic environment.



a. Model medium and the reaction conditions: isoamyl alcohol (30 mM), sucrose (60 mM), ethanol (10-96% v), 0.1 M acetate buffer (100.1 g/L), temperature-25°C, the teaction duration-12 h, the initial invertase activity: 1-non-immobilized invertase-34 units/mg, 2-immobilized invertase- 46 units/mg).

b. Model Medium and reaction conditions: isoamyl alcohol (30 mM), caproic acid (30 mM), ethanol (10-70% v), 0.1 M acetate buffer (100.1 g/L), temperature- 30°C, the rection duration-48 h, the initial esterase activity: 1- non-immobilized esterase- 3.2 units/mg), 2-immobilized esterase- 16 units/mg)

Note: I-existence of significant differences from the control parameter options at P < 0.05.

Figure 4. Impact of ethanol on invertase (a) and esterases (a) activity

The optimal concentration of ethanol in the environment. The measurement of the activity of non-immobilized and immobilized forms of enzymes was held in a range of concentrations of ethanol in a “water-ethanol” system from 30 to 96%. The 0,1M acetate buffer pH 6.0 for non-immobilized invertase served as the aqueous phase; for the immobilized invertase - pH 7.0, non-immobilized esterase - pH 8.0, for the immobilized esterase - pH 6.0. The results are shown in Fig.4. Using the ethanol as the organic phase showed that increasing its concentration in the medium was accompanied by a reducing in the amount of isoamyl alcohol.

As can be seen from the figures, the immobilized invertase provides 40% conversion of isoamyl alcohol in the alcoholic medium containing 60% ethanol by means of its transferase activity and immobilized esterase - 48% of isoamyl alcohol conversion in the medium containing 40% of ethanol by means of its ester-forming activity.

The optimal technological parameters of bioconversion of higher alcohols in the bioreactor packed with immobilized enzymes (Table 1) were determined on the basis of researching the physical, chemical and kinetic properties of immobilized enzymes in the model “water-ethanol” environment.

Table 1

The optimal technological parameters of bioconversion of higher alcohols by application of immobilized enzymes

Parameters	Indicators	
	invertase	Esterase
Amount of immobilized enzyme in the medium, g/L	10	10
Quantity of immobilized enzyme, mg per 1 g of support	10	17
The activity of immobilized enzyme, units/mg	46	16
The pH of the incubation mixture	6,0	6,0
Temperature of the medium, °C	25	30
The amount fusel alcohols in the medium (isoamyl alcohol in terms of the anhydrous alcohol) mg / 100 cm ³	264	660
The ethanol content in a medium, % vol.	60	40
The processing time in a periodic mode, hour	12	48

Distillates at a certain stage of the technological scheme processed in the bio-link under optimal operating conditions of the bioreactor (Table 1), where the water-spirituous or distillates blend proof of 40 vol% is directed to the bioreactor containing immobilized enzyme with an initial activity of invertase (46 units/mg) and esterase (16 units/mg).

The fourth chapter of the dissertation titled "**The application of immobilized enzymes in the technology of alcoholic beverages production**" is devoted to the application of the immobilized invertase and esterase in the production of liqueur-vodka products and brandy.

The application of the immobilized invertase in the production of liqueur-vodka products. In order to detect the ability of the immobilized invertase to transform fusel alcohols a so called “ethanol-water” mixture model system was prepared (40% v/v ethanol, 2% sucrose, pH 6.0), which was processed with the immobilized invertase under the found optimal conversion conditions (Table 1).

The evaluation of organoleptic (Table 2) as well as physical and chemical properties (Table 3) of the mixture after the enzymatic treatment has shown that an experimental sample in comparison with the control sample is characterized by a soft and pleasant taste and flavour, with some almost perceptible fruit tinge in taste.

Table 2

Organoleptic characteristics of the water-alcohol mixture processed with the BAC and the immobilized yeast invertase

Name	Indicator name	Characteristic
Mixture processed with the BAC (control)	1. Appearance - 2. Colour- 3. Taste and flavour -	Transparent liquid without any extraneous inclusions and sediments; Colorless liquid; Typical for vodka, without any extraneous taste and flavour.
Mixture, processed with the immobilized on BAC yeast invertase	1. Appearance - 2. Colour- 3. Taste and flavour-	Transparent liquid without any extraneous inclusions and sediment; Colorless liquid; Typical for vodka, soft, pleasant, with almost perceptible fruit tinges

Table 3

Physical and chemical characteristics of the water-alcohol mixture processed with the BAC and the immobilized yeast invertase

Name	Ethanol, %v	Aldehydes mg/L a.a.	Esters, mg/L a.a.	Fusel alcohols, mg/L a.a.	Isoamyl alcohol, mg/L a.a.	Isobutyl alcohol, mg/L a.a.	Methanol, g/dm ³ a.a.
Requirements according to the regulations	40	4	4	3	NA	NA	0,05
Water-alcohol mixture	40	3	4	4	2,7	1,3	0,03
Water-alcohol mixture processed with the BAC (control)	40	4	4	3	2,2	0,8	0,03
Water-alcohol mixture processed with the immobilized yeast invertase	40	4	4	2,4	1,4	1,0	0,02

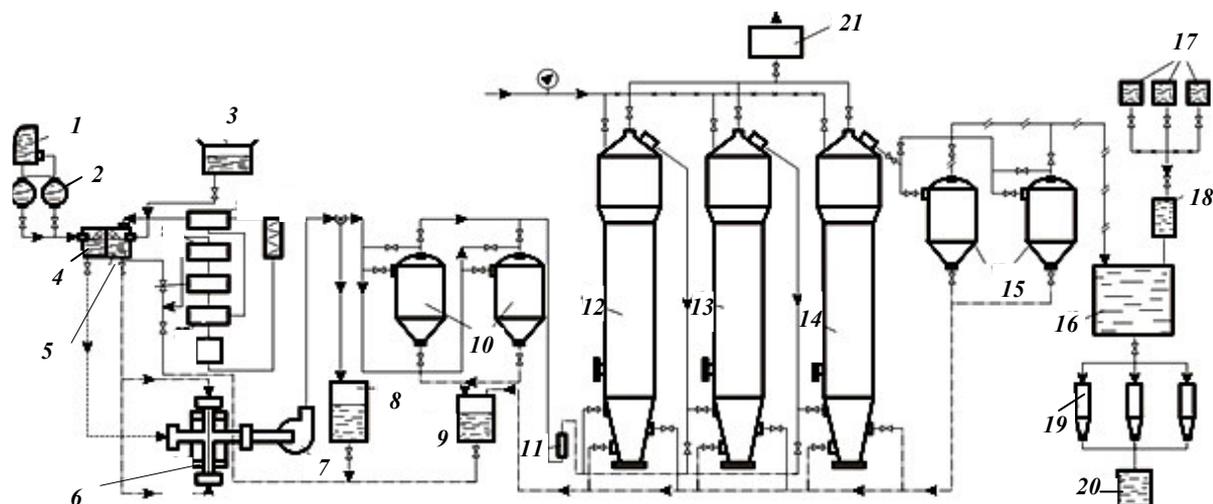
Physical and chemical assessment of the mixture, processed with the immobilized invertase (Table 3), has confirmed and shown a significant reduction of higher alcohols amount up to 20%, which have been considered in regulations.

It should be noted, that the isoamyl alcohol gets always prevailed in the composition of fusel alcohols and reduces taste and hygiene properties of alcoholic beverages, and the research was aimed at the direct reduction of its amount. Table 3 shows that the composition of the isoamyl alcohol in the mixture has been reduced by 50 % and made up 1.4 mg/L a.a. The other parameters have been remained unchanged.

Hence, the received data can be applied in the production of liquor and vodka beverages for the direct reduction of the quantity of isoamyl alcohol through

its enzymatic conversion into isoamylfructoside. For this reason, the mixture at a certain stage of technological process, mainly before the bottling, is processed by the immobilized yeast invertase in a bioreactor (bio-link in the technological scheme), where the conversion process of higher alcohols is taking place.

As per suggested way, the mixture, which has been produced according to the recipe (water and alcohol mixture, 40% v/v ethanol, 2% sucrose), is processed in a bio-link, which is included into the existing vodka production technological scheme (Fig.5).



1-the tank for alcohol; 2-the alcohol measuring tank; 3-the tank for softened water; 4-the regulator of the alcohol level of pressure; 5-the regulator of softened water level pressure; 6-the flow mixer; 7-the centrifugal pump; 8-tank for the defective alcohol-water mixture; 9-the tank for alcohol-water charcoal regeneration; 10-the pre-filters; 11-the flow-measuring device; 12,13,14-the reactors with activated charcoal (BAC); the 1st, 2nd and 3rd degree; 15-the finishing filters; 16- tank for treated water-alcohol mixtures; 17- the tank for additives; 18- the regulator of additives; 19-bioreactor with immobilized invertase; 20-the tank for the final products.

Fig. 5. Technological scheme of the alcoholic beverages production

The production process of liquor and vodka beverages under dynamic conditions is implemented in the following way: rectified alcohol from the alcohol storage tank (1) flows into the measuring cylinder (2) mounted in the alcohol and water-alcoholic mixture compartment. The alcohol through the measuring device (2), softened water from the collector (3) are fed through the pressure regulators in a continuous mixer (6) and go to the pre-filters (10), further in column reactors (12-13-14), wherein in conditions of turbulent motion processing an activated carbon mixture with a vigorous stirring is occurred. The BAC-processed water-alcoholic mixture enters the filter through the filters of the final filtration (15) in the collection (16). Here are added the additives from the reservoir (17) and the water-alcoholic mixture passes through a bio-link, which is represented by a bioreactor with the immobilized invertase (19), enters the collection of the finished products (20) and sent to the bottling.

The time of passage through the entire technological cycle, i.e. the duration of treatment should be at least 12 hours at a room temperature. During this period,

the enzyme has time to transform fusel alcohols into alkylfructozides, which will be in a dissolved state in the mixture composition.

Application of the immobilized yeast esterase in the technology of brandy production. Received data have applied significance in the enzymatic treatment of alcoholic beverages in order to reduce the amount of fusel alcohols in them, and, thus, to improve their quality. Hence, during the grape must fermentation, sufficient amount of fusel alcohol is generated (300-600 mg/L) (Martinenko, 2005), which is concentrated during distillation and constitutes, for example, in brandy at least 1.8 g/L, having rather harsh and off-smell together with toxic properties. Some volatile carboxylic acids (butyric, isovaleric, capron, caprylic, capric) are also moved in the distillate and reduce the sensory properties of the product. With the high content of these acids in the distillate, the prepared brandy acquires non-typical tinges in flavour, which remains also even after three years of aging (Lashkhi, 1962).

To identify the ability of the immobilized esterase to convert the above-mentioned volatile acids into esters in the composition of non-aged grape distillate, the following experiment with was conducted. A blending with the ethanol concentration 40% was prepared from the non-aged brandy distillate (68.1 %) and sugar syrup (sucrose, 2 g/L) and processed with the immobilized esterase with an initial ester-forming activity source 16 units/mg in an amount of 10 g/L during 5 days at 30°C. As a control there was a blending of non-aged grape distillate without enzymatic treatment.

Table 4

Sensory characteristics of blend prepared from grape distillate and processed with the immobilized yeast esterase

Blend	Indicator Name	Properties
Blend, made from non-aged distillate and processed with oak granules (control)	1. Colour- Appearance- 2. Flavor- 3. Taste- 4. Harmony	Colour of a light straw; transparent, without extraneous inclusions and sediments; typical, harsh, fusel-like; clean, soft, burning, with a damp taint; non-harmonious
Blend, made from non-aged distillate and processed with the immobilized esterase	1. Colour- Appearance- 2. Flavor- 3. Taste- 4. Harmony	Colour of a light straw; transparent, without extraneous inclusions and sediments; typical, complex, pleasant, light with distinctive floral tinges, rounded; clean, soft, floral tinges, rounded; very harmonious

Sensory evaluation of non-aged grape blending distillates after the treatment with the immobilized esterase (Table 4) has shown that this treatment can improve the taste and bouquet of brandy distillates. A significant softening and rounded consistency of taste and appearance of floral tinge is observed in the flavor of prototypes. In the blending, which was processed by oak granules, the colour had become of a light straw, a harsh taint of fusel alcohol was felt, as well as a “damp” tinge in flavour. The sample, which was processed with the immobilized esterase,

has an improved very harmonious taste and flavour, floral tinges had become more perceptible.

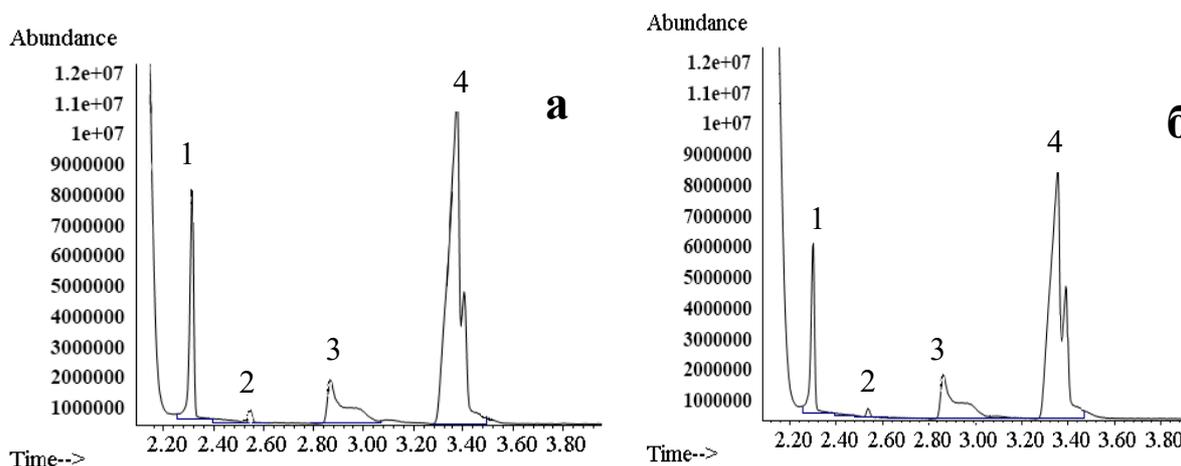
Physical and chemical assessment of grape distillate blend (Table 5) after the enzymatic treatment has confirmed a significant reduction in the amount of higher alcohols and volatile acids and an increase in the content of secondary esters.

Table 5

Physical and chemical characteristics of grape distillate processed with immobilized yeast esterase

Name of Indicator	Ethanol, %v/v	Aldehydes mg/100 cm ³ a.a.	Esters, mg/100 cm ³ a.a.	Higher alcohols, mg/100 cm ³ a.a.	Volatile acids, mg/100 cm ³ a.a.	Methanol, g/dm ³ a.a.	Airon, g/dm ³
Requirements according to regulations	55-70	5-50	50-270	170-500	250	1,2	1,0
Blend made from non-aged grape distillate (Control)	40	29,7	51,0	174,2	12,8	0,8	0,68
Blend made from non-aged grape distillate and processed with immobilized esterase	40	30,6	57,9	158,2	8,7	0,5	0,24

GC-MS of the blend before and after treatment has shown reducing of isoamyl, isopropyl and butyl alcohols (Figure 6). Also as it is shown (Figure 7) in the composition of the processed with the immobilized esterase blend we can see increasing the amount of ethyl-valeriate and ethyl-caprinat as well as formation of isoamyl-valeriate, isoamyl-capronate, isoamyl-caprilate and isoamyl-caprinate.

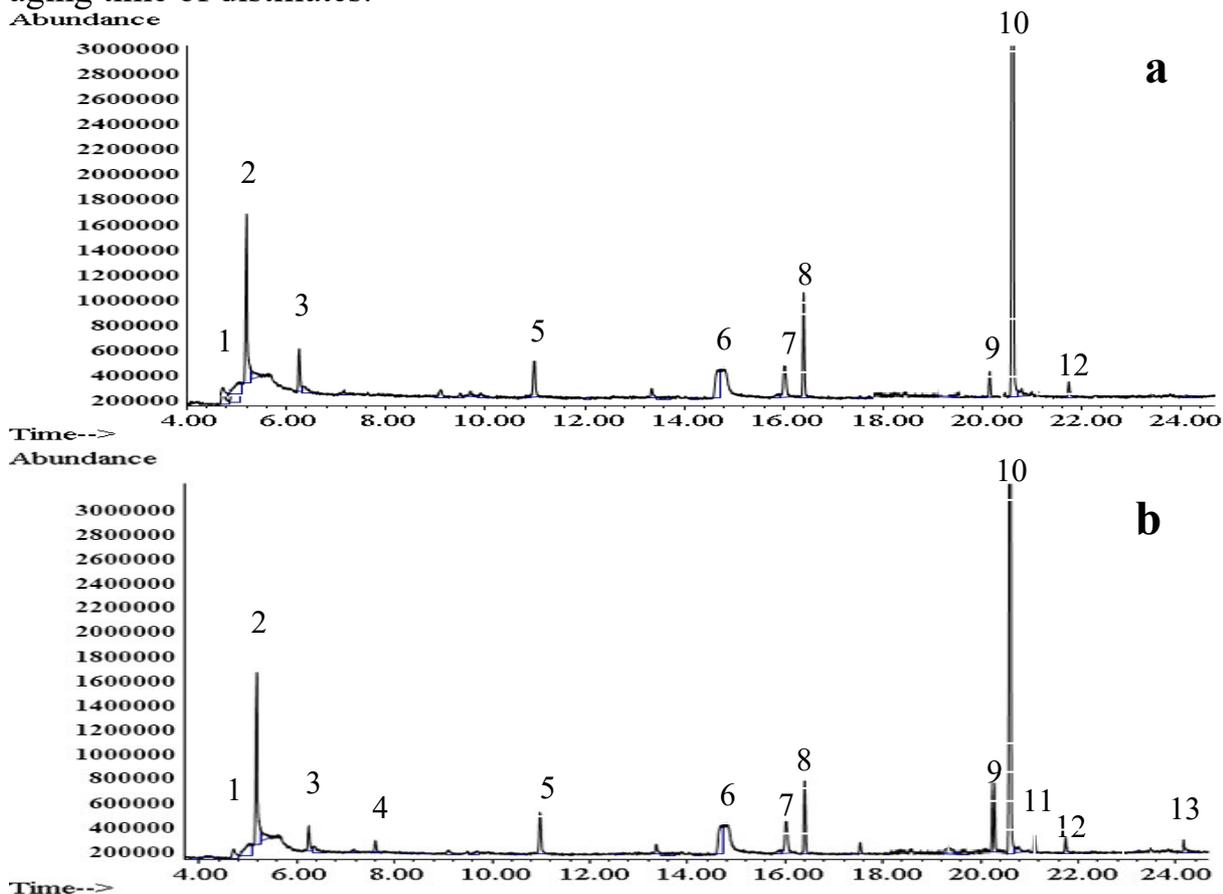


Analysis was performed with a Agilent Technology AT 5973N GC/MS with installed in the GC oven a 30m×0,25 mm capillary column coated with EVDX-5m (5% phenyl-methyl siloxane) at the GC oven program: start at 70 °C (hold time 2 min), which was raised at 10 °C/min to 280 °C. 1- isobutyl alcohol, 2- n-butyl alcohol, 3-acetal, 4- isoamyl alcohol, methyl-undecanoate (internal standard)

Fig. 6. GC-MS determination of the volatile compound pattern of distillate derived before (a) and after enzymatic treatment (b)

Consequently, data obtained may be used in the production of brandy in order to improve its quality due to enzymatic reducing the amount of higher

alcohols and formation, along with this, of oenanth esters as well as the reducing the aging time of distillates.



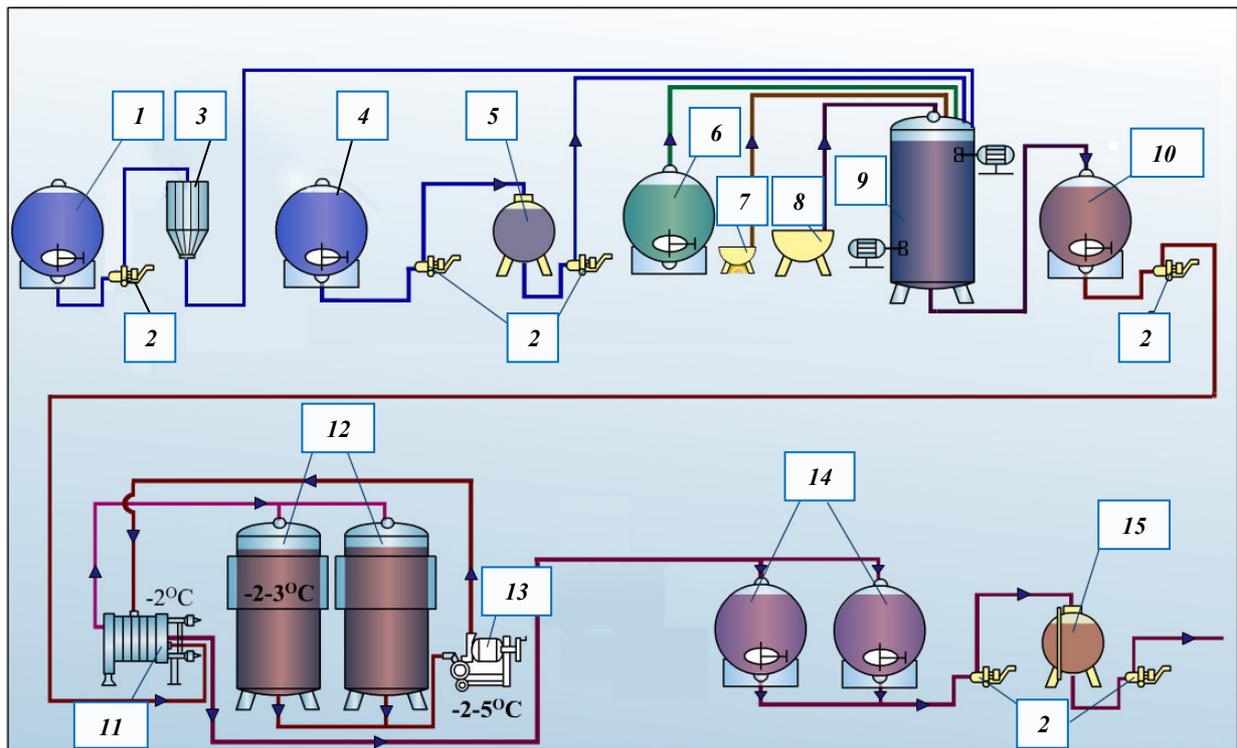
Analysis was performed with a Agilent Technology AT 5973N GC/MS with installed in the GC oven a 30m×0,25 mm capillary column coated with EVDX-5m (5% phenyl-methyl siloxane) at the GC oven program: start at 70 °C (hold time 2 min), which was raised at 10 °C/min to 280 °C. 1- isopropyl alcohol, 2-furfural, 3-acetic acid, 4-ethyl-valeriate, 5-ethyl capronate, 6-phenyl-ethyl alcohol, 7-ethyl-succinate, 8-ethyl-caprilate, 9-ethyl-caprinate, 10-methyl-undecanoate (internal standard), 11-isoamyl-capronate, 12-isoamyl-caprilate, 13- isomyl-caprinate.

Figure 7. GC-MS determination of the volatile compound pattern of distillate derived before (a) and after enzymatic treatment (b)

According to the opinion of a number of researchers (Nachev T.A., 1974) the main difference between domestic and french grape brandy lies in the absence of first “soap-like” tinges. The reasons for that are hidden in the fewer amounts of high boiling components in the domestic distillates, including oenanth esters. In this relation, in order to enrich distillates with oenanthic esters, we have proposed a technology of the grape distillate blends treatment in a bioreactor with the immobilized esterase (bio-link in technological scheme).

For this purpose the blends of distillates at a required stage of the process, generally before filling, are processed with the immobilized yeast esterase in the bioreactor where the higher alcohols and carbon acids esterification process occurs. The process is carried out in the following order: first, preparing an immobilized esterase. Next - a bioreactor - by filling it with the immobilized esterase. According to the technological scheme (Figure 8) a certain part of distillate has to reach

up to 40% concentration (1), and then is shifted to a bioreactor (3), which contains the immobilized esterase and after the treatment under the regulated optimal parameters (Table1) the blend goes to the blending reservoir (9).



1-the unaged distillates prepared for treatment with immobilized esterase, 2-the pump, 3-the bioreactor with immobilized esterase, 4- the aged distillates, 5- the measuring device, 6-the special spirited water, 7- the color on the basis of burnt sugar, 8- the sugar syrup, 9-the reservoir for blending, 10- the reservoir for storage of the blend, 11- the cooler, 12- reservoir for sub-zero treatment, 13- the filter, 14- the intermediate reservoir, 15- the measuring device.

Figure 8. Technological scheme of production of grape brandy

A certain part of distillates, which are aged in special tuns or enameled tanks in oak staves, with the necessary color and extract content from the tank (3) is sent to the blending reservoir (9). Then alcoholized sugar syrup (6), if necessary, color prepared on the base of burned sugar (7) and sugar syrup (8) are added, it gets stirred and left in the blending tank for 1-2 days. It is necessary to establish a balance between the components of the blend. After this the blend is sent to the reservoir for the storage (10), then it is gets cilled at $-2-3^{\circ}\text{C}$ (11, 12) and filtered at $-3-5^{\circ}\text{C}$ (13). Next, the final product is collected in the intermediate reservoir (14) and goes for bottling. In accordance with the above-given way of treatment a blend gets better taste features.

The developed approach to improve the technology of brandy preparation by means of immobilized yeast invertase and esterase has a number of advantages over existing technologies:

processing of distillates blends is realized on the basis of immobilized esterase in a bioreactor, which allows to selectively reduce the content of higher alcohols, especially isoamyl alcohol without affecting other parameters of beverages;

the developed technological scheme for obtaining alcoholic beverages and

brandy includes bio-link, which is a bioreactor with immobilized enzyme and which is compact, inexpensive and affordable;

obtaining an immobilized product can be organized at the place where alcoholic beverages are manufactured;

it gives an opportunity to control the content of higher alcohols in the distillates and on their basis to produce high-quality products;

it gives an possibility to reduce the amount of higher alcohols in non-aged distillates to correct the original volatiles before they get to the aging in oak barrels;

it opens prospects to accelerate the maturation of the distillates, thus improving the quality of production of volatile components, forming a bouquet of the beverage through the appearance of formed oenant esters, which is an indicator for the ageing degree of grape distillates;

it is significant to obtain special batches of distillates for blending in order to correct the composition of the volatile components and improve their quality;

a potential of producing high-quality varieties of alcoholic beverages, special varieties of liqueurs for confectionery purposes and expanding the range of products of high-priced category is created.

CONCLUSION

1. The isolated yeast enzymes (invertase and esterase) in a water and alcoholic environment show low transferase and ester-forming activities, and a conversion of higher alcohols is not performed sufficiently.

2. The substrate specificity of yeast invertase and esterase has been identified. In particular, it was found that the degree of conversion of higher alcohols gets increased with the amount of carbon in the chain $C_3 < C_4 < C_5$. Meanwhile, the spacing OH- groups from the first carbon atom and a carbon chain branching as well as the distance from the secondary carbon atom of the hydroxyl group of alcohol is the criterion "recognition" of the substrate and most likely plays the important role in the enzyme-alcoholic substrates interactions. Invertase and esterase activities are more isoforms to alcohols, such as isoamyl and isobutyl alcohols. Regarding acid substrates esterase is active with the carboxylic acids C_4 - C_5 , and the esterification gets decreased with an increasing amount of carbon in the chain $C_4 < C_5 < C_6 < C_8 < C_{10}$.

3. A developed technology of the obtaining immobilized yeast invertase, which is based on a covalent immobilization of invertase on a previously chemically modified activated carbon BAU transferase activity with 46 units/mg, was proposed.

4. The research on physical and chemical and kinetic properties of the immobilized yeast invertase in the model system "ethanol-water-isoamyl alcohol - sucrose" with an ethanol content of about 40% has shown, that the enzyme immobilization leads to the increased stability of the enzyme in an alcoholic medium. It was revealed that the maximum conversion of isoamyl alcohol (40%) occurs in the model system with ethanol content of about 60%.

5. A developed technology of obtaining immobilized yeast esterase, based on the receipt of esterase covalently immobilized on chemically modified oak granules with ester-forming activity of 16 units/mg, was proposed.

6. The research on physical, chemical and kinetic properties of the immobilized yeast esterase in the model system «ethanol-water-enzyme substrates» with an ethanol content of about 40% has shown, that the immobilization of enzyme leads to the increased stability of the enzyme in an alcoholic medium. It was revealed that the maximum conversion of isoamyl alcohol (48%) occurs in a model system at an initial concentration of isoamyl alcohol together with caproic acid - 30 mM. The immobilized esterase is recommended for the enrichment of alcohol beverages with oenanth ethers by means of etherification in the composition of higher alcohols and caproic acids.

7. A method for the processing of an aqueous-alcoholic sorting by the immobilized invertase, providing a reduction in the number of higher alcohols by converting it to alkylfructozids, and way of treatment of distillates by immobilized esterase, allowing it to reduce in the number of fusel alcohols and enrich it with oenanthic esters, has been elaborated. Thus, there were proposed the optimal parameters of bioreactor with the immobilized enzymes, and a new technology to prepare vodka and brandy was developed.

8. The advanced technology of the alcoholic beverages production using the proposed stable invertase, immobilized on birch activated carbon and the following application conditions, are developed and offered: water-alcoholic mixture is recommended to be processed by the immobilized invertase at 10 g/L for 12 hours at a temperature of 25 °C.

9. The advanced technology of production of brandy with the proposed stable esterase immobilized on oak granules and the following conditions of use are developed and proposed: distillate proof of 40% vol. is recommended to be processed by the esterase immobilized at 10 g/L for 48 hours at 30 °C.

10. The application of the received scientific results in the process of brandy production will give an opportunity to accelerate the maturing of distillates, reduce the aging period of distillates by 2 years and annual irreversible losses of distillates at a cost of evaporation, which can occur at a longer aging.

Эълон қилинган ишлар рўйхати
Список опубликованных работ
List of published works

I бўлим (I часть; I part)

1. Дехканов Д.Б., Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М., Ахмедова З.Р. Получение высокоактивной дрожжевой инвертазы // Вестник НУУз. – Ташкент, –2004. – №4. – С.3-4. (02.00.00; №12).
2. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М., Абдуразакова С.Х., Ахмедова З.Р. Ферментативная конверсия субстратов инвертазы в водно-органической среде // Прикладная биохимия и микробиология. – Москва, –2006. –Т.42. –№2. –Р.169-174. (№5 Global IF 0.735).
3. Дехканов Д.Б., Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. Свойства инвертазы выделенной из местных дрожжей Ркацителли-6 *Saccharomyces cerevisiae* // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2007. - №4. – С.6-9. (03.00.00; №5).
4. Дехканов Д.Б., Мирзарахметова Д.Т. Влияние условий культивирования на биосинтез различных форм дрожжевой инвертазы // Вестник НУУз. – Ташкент, –2008. – №4. – С.136-138. (02.00.00; №12).
5. Щербак Е.Ю., Мирзарахметова Д.Т. Влияние условий культивирования дрожжей на биосинтез эстеразы // Вестник НУУз. – Ташкент, –2008. – №4. – С.154-155. (02.00.00; №12).
6. Мирзарахметова Д.Т., Дехканов Д.Б., Рахимов М.М., Абдуразакова С.Х., Ахмедова З.Р. Свойства инвертазы, ковалентно иммобилизованной на активированном угле // Прикладная биохимия и микробиология. – Москва, –2009. –Т.45. –№ 3. –Р.258-261. (№5 Global IF 0.735).
7. Райдер Е.Ю., Мирзарахметова Д.Т., Абдуразакова С.Х. Способ иммобилизации эстеразы // Химия и химическая технология.– Ташкент, – 2010. –№ 4. – С.76-78. (02.00.00; №3).
8. Райдер Е.Ю., Мирзарахметова Д.Т. Дрожжевая эстераза в водно-органической среде // Узбекский биологический журнал. –Ташкент, – 2010. –№2. – С.9-11. (03.00.00; №5).
9. Mirzarakhmetova D.T. The enzymatic approach to making of alcoholic beverages // Bioautomation. –Bulgaria, – 2011. –V.15. –№3. –Р.172-176. (№5 Global IF 0.876).
10. Мирзарахметова Д.Т. Субстратная специфичность дрожжевой инвертазы в водно-органической среде // Вестник НУУз. – Ташкент, –2015. – №3/2. – Р.154-157. (02.00.00; №12).
11. Мирзарахметова Д.Т., Абдуразакова С.Х., Рустамбекова Г.У. Способ очистки спиртных напитков от высших спиртов. Патент РУз IAP 03222. – Ташкент. –2004. (02.00.17).

12. Мирзарахметова Д.Т., Дехканов Д.Б., Рахимов М.М. Способ получения иммобилизованной инвертазы. Патент РУз IAP 04401. – Ташкент. –2011. (03.00.01)
13. Мирзарахметова Д.Т., Райдер Е.Ю., Абдуллаев У.К., Абдуразакова С.Х. Способ иммобилизации эстеразы на твердой основе, содержащей целлюлозу и лигнин. Патент РУз IAP 04595.– Ташкент. –2010. (03.00.01)
14. Мирзарахметова Д.Т., Абдуллаев У.К., Абдуразакова С.Х. Способ очистки спиртных напитков от высших спиртов // Патент Уз. IAP 04852.– Ташкент. –2014. (02.00.17).

II бўлим (II часть; II part)

15. Дехканов Д.Б., Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М. Выбор питательной среды для культивирования дрожжей с целью получения высокоактивной инвертазы // Проблемы современной Биотехнологии и Микробиологии: Тез. докл. науч. конф. посвященной памяти Аскаровой Салимы Аскаровны. Институт Микробиологии АН РУз. 21-22 октября 2003. – Ташкент, 2003. – С. 23.
16. Дехканов Д.Б., Мирзарахметова Д.Т. Ковалентная иммобилизация инвертазы на активированном угле // Сборник тезисов международной конференции посвященной 85 летию акад. С.Ю. Юнусова. Институт химии растительных веществ АН РУз. 18 март. 2005. –Ташкент, 2005. – С.107.
17. Мирзарахметова Д.Т. Биотехнология очистки спиртных напитков // 3 съезд микробиологов. –Ташкент, 2005. – С.102.
18. Мирзарахметова Д.Т. Биотехнология конверсии сивушных спиртов в спиртных напитках // Международная конференция посвященная 1000 летию академии Маъмуна. – Хива, 2006. – С. 115-116.
19. Дехканов Д.Б., Мирзарахметова Д.Т. Стабилизация инвертазы для промышленных целей // Международная конференция посвященная 1000 летию академии Маъмуна. – Хива, 2006. – С. 115-116.
20. Мирзарахметова Д.Т., Дехканов Д.Б. Перспективы использования инвертазы, ковалентно иммобилизованной на активированном угле // 4 съезд микробиологов Узбекистана, 9-10 октября. –Ташкент, 2008. – С.29.
21. Щербак Е.Ю., Тохтахунова А.К., Мирзарахметова Д.Т. Поведение дрожжевой эстеразы в водно-органической среде // 4 съезд микробиологов Узбекистана, 9-10 октября. –Ташкент, 2008. – С.87-88.
22. Щербак Е.Ю., Мирзарахметова Д.Т. Усиление биосинтеза дрожжевой эстеразы // Актуальные проблемы биологии, экологии и почвоведения. НУУз, 16 сентября. –Ташкент, 2008. – С.163-164.
23. Райдер Е.Ю., Тохтахунова А.К., Мирзарахметова Д.Т. Получение дрожжевой эстеразы // Материалы республиканской научной

- конференции «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии», 23 октября. Ташкент- 2009. – С. 40-41.
24. Райдер Е.Ю., Мирзарахметова Д.Т. Ковалентная иммобилизация дрожжевой эстеразы // Сборник тезисов международной конференции молодых ученых. Ломоносов 12-15 апреля 2010. –Москва, 2010. – С.101.
 25. Райдер Е.Ю., Тохтахунова А.К, Мирзарахметова Д.Т. Влияние условий культивирования дрожжей на выход секретируемой эстеразы // Материалы 3 международной научно-практической конференции «Молодежь и наука: реальность и будущее». –Ташкент, 2010. – С.53-55.
 26. Райдер Е.Ю., Тохтахунова А.К., Мирзарахметова Д.Т. Получение эстеразы при двухступенчатом способе культивирования дрожжей // Сборник тезисов 14-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», 19 – 23 апреля. – том 1. – Пущино, 2010. –С.281.
 27. Райдер Е.Ю., Мирзарахметова Д.Т. Дрожжевая эстераза в реакциях эфиروобразования // Международная научная конференция «Актуальные проблемы развития биорганической химии». 20-21 сентября. – Ташкент, 2010. – С.88.
 28. Мирзарахметова Д.Т. Использование дрожжевой инвертазы в производстве ликеро-водочных изделий // Индустрия напитков. – Петербург, – 2010. –№4. – С.8-11.
 29. Райдер Е.Ю., Мирзарахметова Д.Т. Поведение дрожжевой эстеразы в реакциях эфируобразования // Журнал научных публикаций аспирантов и докторантов. –Курск, – 2011. –№6. – С.67-69.
 30. Мирзарахметова Д.Т. Ферментативная конверсия сивушных спиртов в коньячных спиртах // Производство спирта и ликеро-водочных изделий. – Москва, –2011. –№1. –С.30-31.
 31. Райдер Е.Ю., Мирзарахметова Д.Т. Ферментативная этерификация сивушных спиртов в спиртных напитках // Производство спирта и ликеро-водочных изделий. –Москва, –2011. –№4. –С.28-29.
 32. Мирзарахметова Д.Т., Райдер Е.Ю. Использование дрожжевой эстеразы в изменении профиля летучих компонентов бренди // Индустрия напитков. –Петербург, – 2011. –№7. – С.8-12.
 33. Mirzarakhmetova D. Enzymatic Esterification of Carboxylic Acids and Higher Alcohols in Organic Medium //Conference organized by World Academy of Science, Engineering and Technology “Food Engineering and Biotechnology”, 25-26 April. –Paris, 2012. –P.743-745.
 34. Мирзарахметова Д.Т. Стабилизация эстеразы для совершенствования пищевых технологий // Международный симпозиум «Микроорганизмы и биосфера» Microbios-2015. 25-30 ноября. – Ташкент, 2015. – С.73.

Авторефератнинг ўзбек, рус ва инглиз тиллари мувофиқлантирилди ва матн таҳрир қилинди.