

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

**МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ
БИОЛОГИЯ-ТУПРОҚШУНОСЛИК ФАКУЛЬТЕТИ**

БИОТЕХНОЛОГИЯ КАФЕДРАСИ

МАЛАКАВИЙ БИТИРУВ ИШИ

B-420100

мавзу: ***Махаллий ачитқи ишаммларидан гидролитик
ферментлар олиш***

Бажарди: Тўраева Нигора

Илмий рахбар: т.ф.н. Д. Т. Мирзарахметова

Тошкент-2006

МУНДАРИЖА

КИРИШ.....

1	АДАБИЕТЛАР ШАРХИ.....
1.1	Ачитқи ферментлари.....
1.2	Инвертазанинг умумий характеристикаси.....
1.3	Ачитқи ферментларини қўлланилиши.....
	ТАЖРИБА КИСМ
2	Тадкикотларда кулланилган услуб ва ашёлар.....
2.1	Ачитқини культивациялаш.....
2.2	Инвертазанинг фаоллигини бижғиш жараёнида аниқлаш.....
2.3	Глюкозани микдорини Бертран усули ёрдамида аниқлаш.....
2.4	Ачитқи биомассасини намлигини аниқлаш.....
2.5	Эстераза ферментининг фаоллигини аниқлаш усули.....
3	ШАХСИЙ ТАДКИКОТЛАР НАТИЖАСИ ВА ТАЛКИНИ
3.1	Культивациялаш давридаги олинган натижалар.....
3.2	Бижғиш жараёнида инвертазани активлигини кузатиш натижалари.....
3.3	Бижғиш жараёнида эстеразани активлигини кузатиш натижалари.....
	ХУЛОСАЛАР.....
	АДАБИЁТЛАР РУЙХАТИ.....
	ИЛОВАЛАР.....

КИРИШ

Ҳозирги вақтда бижғиш жараёнини контрол қилиш ва унинг асосида такомиллаштириш биотехнологлар олдида энг долзарб муаммолардан бири ҳисобланади. Ундан ташқари, микроорганизмлар орқали турли ферментлар ажратиб олиш ва уларни ҳар-хил технологияларда ва ишлаб чиқаришда қўллаш ҳам жуда бир прогрессив йўналиштирилган масала деб тан олинади.

Шунинг учун маҳалий хом-ашёлардан биотехнологик йўл билан турли ферментларни олиш – мақсад қилиб қўйилган эди.

Ҳозирги пайтгача ачитки фермент препаратлари муваффақият билан фойдаланилмоқда. Ажратиб олиш усуллари технологик эмаслиги учун, соф ферментнинг нархи жуда қиммат бўлиб, озиқ-овқат технологиясида ишдатишда муаммо бўлиб турибди. Шунинг учун биотехнологлар турли арзон фермент ажратиб олиш манбалари ва усуллари устида изланиш олиб бормоқдалар.

Инвертаза ва эстераза саноат аҳамиятига молик ферментлардан биридир. Инвертаза саноатда, яъни қандолат маҳсулотлар, мураббо ва сунъий асал ишлаб чиқаришда, шакарни кристаллизациялашдан химоя қилиш учун қўлланилади. Эстеразанинг трансфераз функцияси орқали турли эфир моддалар синтез қилиш мумкин.

Адабиётлардаги маълумотларга кўра, Ркацители-6 ачитқисини чекланган шароитда узлуксиз усулда культивациялаш жараёнида экзо ҳолатдаги инвертазани юкори миқдорда синтезланиши кузатилади. Бу маълумотлар озиқ-овқат саноатида ишлатиладиган инвертаза препаратларини олишга асос бўлиши мумкин.

Бироқ бу ферментни ажралиб чиқиш шароитлари яхши ўрганилмаган. Шунинг учун бу ишда қуйидаги вазифалар қуйилди:

- *Ркацители-6* ачитқисини уч хил шароитда ўстириш;
- Инвертаза ферментини активлигини бижғиш жараёнида кузатиш;
- Эстераза ферментини активлигини бижғиш жараёнида кузатиш.

1. АДАБИЁТЛАР ШАРҲИ

1.1. Ачитки ферментлари

Адабиётлардаги маълумотларга кўра (Абдуразакова С.Х., 1990), ачитқилар чекланган шароитда узлуксиз усулда культивациялаш жараёнида турли ферментлар экзо ҳолатда юкори миқдорда синтезланиши кузатилади.

Моддалар алмашинуви аэроб типда бўлган ачитки организмларнинг этанол метаболизмида қатнашишидан олинган натижалар кўрсатилган. Ачитқиларни аэроб шароитда этанолда ўстиришганда НАД га боғлиқ алкогольдегидрогеназининг паст фаоллиги шуни кўрсатдики, яъни спиртни оксидланишида альтернатив фермент системалар иштирок этиши мумкин, булар: алкогольоксидаза (КФ 1.1.3.13), цитохром Р-450 га эга микросомал этанол-оксидловчи система, шунингдек каталога (КФ 1.11.1.6). Этанолнинг оксидланишида бу системаларнинг роли ва ишлаш шароити ўрганиб чиқилди. Олинган натижалар темир ионларининг ушбу микроорганизмларида бўлиши этанол метаболизмида мушм регулятор (бошқарув) ролини ўйнашини кўрсатади (Ильченко А.П., 2005).

Аэроб метиловактерия ва метанотроф бактериялардан озиқа оқсил, биополимер (полибутират, полисахаридлар) ферментлар (оксидоредуктазалар), биопротекторлар (эктоин) олишда, C_1 ва C_n токсик бирикмаларнинг парчаланишида фойдаланиб биотехнологик жихатдан ривожлантириш бўйича қилинган ишларнинг муаллифларини асосий натижалари умумлаштирилган. Экстремофил, толерант метилотрофларнинг ягона хусусиятга эга структур-функционал метеболизми замонавий биотехнологиянинг турли соҳаларида, шунингдек биокатализ ва нанотехнологияда ҳам муваффақиятли ишлатилиши кўриб ўтилган (Троценко Ю.А., 2005).

Г.К.Скрябин номидаги РФАнинг биохимия ва микроорганизмлар физиологияси институтида *Yarrowia lipolytica* ачитқисининг турли углерод манбааларида– Н–алканларда, глюкозада, глицеринда ва органик кислоталарда ўсишининг физиологик хусусиятлари бўйича олиб борилган ишларнинг натижалари кўрсатилган. α -кетоглутарат, пирозум, изолимон ва лимон кислоталарни олишнинг микробиологик жараёнлари мушокама қилинган (Финогенова Т.В., 2005).

Бутун Россия микроорганизмлар коллекциясида мавжуд 70 дан ортиқ вино ачитқиларининг ирқларини тоза культурасини рўйхати келтирилган. Бу штаммларни ажратган ва ўрганган муаллифларнинг мақолалари кўрсатилган (Голубев В.И., 2005).

Юқори инвертаза активликка эга бўлган турли ачитқи штаммларидан автолиз йўли билан ачитқи мембраналари олинган. табиий ва турли маҳсулотлардан (керамзит, сапропель, лигнин) тайёрланган ачитқи мембраналари ва донча шаклидаги углерод тутувчи ташувчилар асосида сахароза инверсияси жараёнининг гетероген биокатализаторлари олинган ва ўрганилган. Керамзит устига синтезлантирилган углерод қаватнинг морфологиясидан қатъий назар иммобилланган ачитқи мембраналарининг биокаталитик активлиги ва стабиллиги ундан аввалги ташувчига нисбатан ошиши кўрсатилган. Сапропелега адсорбция қилинган ачитқи мембраналаридан олинган гетероген биокатализаторлар максимал (активлик) фаоллик ва турғунлик (стабил)ни намоён қилди, шу вақтнинг ўзида лигнин асосидаги бир катализаторлар нисбатан паст стабиллиги билан ажралди (Коваленко Г.А., 2005).

1.2.ИНВЕРТАЗАНИНГ УМУМИЙ ХАРАКТЕРИСТИКАСИ

Инвертаза (β -фруктофуранозидаза, инвертин, сахароза, К.Ф. 3.2.1.26)-саноат ашамиятига молик бўлган ферментлардан биридир. Бирор ачитқи ферменти инвертаза каби узок ўрганилмаган.

Инвертазанинг фаоллиги ферментнинг бирламчи структурасига, яъни аминокислоталар кетма-кетлиги боғлиқ бўлиб, икки оилага бўлинади. Улардан бири (КФ 3.2.1.32, гликозилгидролазалар оиласидан бўлиб) ўз ичига сахароза ва фруктаназларни олиб эукариот ва прокариотларда учраса, бактериялар инвертазаси левансахазалардир.

Бу икки оила аъзоларида, аминокислоталар кетма-кетлигини солиштириш учун ўтказилган анализлар шуни кўрсатадики, левансахаразаларда 9 та қисмлар борлиги аниқланиб, бу қисмлар юқори консерватив олигопептид сахароза ва фруктоназалар оксилларидан, тузилган. Бу шуни кўрсатадики оксилларнинг умумий эволюцион келиб чикишида иккита оила битта супер оилага бирлашган. Яна шуни аниқлаш мумкинки, *Asp. niger* нинг инвертазаси бошқа оксилларга нисбатан гомолог эмаслиги глюкогидролаз оиласига дивергенцияланганини кўрсатади (Наумов Д., 1998).

Инвертаза β -Д-фруктофуранозидга нисбатан спецификдир. Сахароза асосий субстрат бўлиб (иккита углеводдан иборат), бир томондан инвертаза учун, бошқа томондан α -глюкозид бўлиб, глюкозидаза учун субстрат ҳисобланади (К.Ф.3.2.1.20). Бу ферментлар субстрат молекуласини глюкоза ёки фруктоза томонидан “хужум” қилади.

Инвертаза қолдикларидан ташкил топган раффиноза ҳам инвертаза ферменти таъсирида гидролизланади. Лекин унга бўлган мойиллиги, сахарозага нисбатан, кучсизроқ. Инвертаза таъсирида гидролизланувчи шаклар сахароза типдаги дисахаридлар, яъни глюкоза билан биргаликда галактоза ёки ксилоза ҳисобланади (Berggen B., 1970).

Sacchomyces cerevisiae шужайрасида инвертазанинг икки тури учрайди (Basser, 1971; Abrams, 1978). “Енгил” тури, яъни шужайраици формаси углевод қисмига эга бўлмаган, шужайра ичида жойлашган, цитозолда эритма шотида бўлиб 135000Д оғирликка эга.

Ферментнинг “оғир” тури (экзоформа)- шужайра цитоплазматик мембранасининг ташқи томонида жойлашган бўлиб, таркибида 50% полиманнан ва 3% глюкозоамин тутади.

Оғирлиги 270000Д ва 50% углевод тутган аминокислоталар таркиби аниқланган (Hounsell., 1994).

Инвертаза шунингдек вакуолада ва шужайра мембранасида учрайди (Beteta 1971 Mollelan 1963). Инвертазанинг турли хил молекуляр формалари бор. Ачитқи инвертазаларини бир-бирига солиштириш орқали уларнинг кўпгина умумий хоссалари аниқланди. Булар Михаэлис константасининг яқинлиги ва гидролиз рНининг ўхшашлигидир. Ачитқи инвертазасининг оғир ва енгил турлари орасидаги фарқ чўктирувчи системадаги уларнинг эрувчанлиги, шунингдек фаркланувчи аминокислоталар таркиби, молекуляр оғирлиги ва седиментация константасидир. Ферментнинг юқори фаоллиги шужайрасирти, яъни экзоформасида кузатилади.

Тадқиқотлар шуни кўрсатадики, инвертазанинг углевод қисми 30 та полисахарид занжиридан тузилган бўлиб, оксил қисмининг турли қисмларига боғланган (Lampen J 1968; REDDY A.1999). Оксил ва углевод ўртасидаги боғлар жуда кучли бўлиб, кўпгина таъсирлар натижасида ҳам узилмайди.(Abrams B.1978). Полисахарид занжирининг фермент молекуласидаги вазифаси оксил молекуласини ферментатив фаол конформациясини барқарорлаштиришдан иборатдир (Rudd P, 1997; WANG C. 1996). Агар углевод қисми оксил қисмдан ажратилса, фермент ўз фаоллигини йўқотади.

Адабиётлардаги далилларга кўра (RodriguesL 1980) инвертазанинг оксил қисми полисомаларга боғлиқ шолда мембранада синтезланади. Бу оксил гидрофоб N-охирли

пептиддан ташкил топган бўлиб, оксилни люмен эндоплазматик тур ичига киришини таъминлайди. Оксилнинг гликозилланиши бутун олигосахарид фрагментини кушилиши натижасида содир бўлади. Фермент ҳосил бўлишининг охириги босқичида биосинтезнинг аниқ бошқарувчи механизмлари таъсирида фермент ажралиб чиқади (Sund m.1980, Nakajima H.1991) ва культура муҳитидаги фаол фермент охириги маҳсулотга тескари муносабатда бошқарилади (Verosek M, 1993; DUNESSET J., 1998). Ачитки шужайра юзасидаги специфик рецепторлар ферментнинг муҳитга боғланишини таъминлайди (Юркевич В,1972).

Фермент фаоллигини бошқарилишида иштирок этадиган шужайра сиртининг ащамияти шундан иборатки, агар шужайра мембранаси олиб ташланса ёки шикаст етказилса ҳам фермент ажратиб чиқаришга таъсир қилмайди, лекин фермент ва муҳит ўртасидаги муносабатлар бузилади. Ачитки хужайра девори протопластларида кечадиган регенерация жараёнида бошқарувда углеводни фақат манба сифатида қўлланилса, инвертазанинг хужайрасирти тури синтезланади. Хужайраларни сахароза муҳитида устириш натижасида инвертазанинг хужайрасирти ва хужайраичи турлари синтезланиб, улар уз муҳитига мослашади ва хужайрасиртида жойлашади (Friis J.,1959).

Хужайраичи ва хужайрасирти инвертазалари 5 охирли қисмлари билан фаркланадиган 2 хил бошқарувчи мРНКоркали кодланади. “Сигнал” гипотезасига мувофиқ гидрофоб N-охирли аминокислота кетма-кетлиги булган фаол оксил ферментни хужайра деворидан киришига шароит яратиб беради. Икки хил хусусиятга эга булган ферментатив оксилни кодлайдиган структура ген ва турли промотор ёки бирламчи транскрипт процессингини турли йуллар билан тезлаштириш мумкин (Larate V. 1996; Ceregyino G., 1996).

1.3. Ачитки ферментларининг қўлланилиши

Адабиётларда инвертазанинг гидролитик функцияси кенг ёритилган. Сахарозанинг ферментатив гидролизи сунъий асал, қандолатчилик ва нон саъноатларида, спирт ва вино саъноатларида ва фруктоза ишлаб чиқаришда ўз аксини топган (Катаева А.А., 1966). Инвертазанинг концентрланган препарати қандолатчиликда қўлланилса, паст концентрацияли препарати эса алкохолсиз ичимликлар тайёрлашда катта имконияти бор. Бизга маълумки сироп таркибида 64% сахароза бўлса, у кристалланади ва сиропни сифати пасайтиради. Аммо 80% инверт сиропи кристалланмай сахарозақланади.

Инвертаза суюқ ва юмшоқ “начинкали” қандолатлар тайёрлашда муваффақиятли қўлланилиб келмоқда. қандолат маҳсулотларини маълум бир температурада сақлаш жараёнида қоплама инвертаза таъсирида суюқлашади. “Помадка”ли қандолатларга инвертазани кушиш юмшоқ консистенцияли бўлишини таъминлайди ва фруктоза ҳосил бўлади. “Помадка”ли қандолатлар инвертазасиз суви қочкан ҳолатга келади.

Инверт сиропнинг хамирга кушиш нон саноатида сифат даражасини оширади, шакар чикимини 50%га камайтиради ва шу бирга қанд сиғимини камайтиради (Мазур П.Я., 1987).

Инвертаза эркин фруктозадан муҳим аҳамиятга эга булган пархез таомларидаги фруктоолигосахарид-1-кестоза, нистоза ва углеводларни парчалайди. Фруктоолигосахаридларни давомий олишда колонкада иммобилланган инвертаза реактори қўлланилади. Инвертазанинг трансфераза функцияси анча олдин маълум бўлган, лекин яқин кунларгача унинг биологик роли, биохимик функцияси ишлаб чиқишга тадбиқ қилинмаган эди.

2. ТАДҚИҚОТЛАРДА ҚўЛЛАНИЛГАН УСЛУБ ВА АШЁЛАР

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

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

Реагентлар: Этанол, сирка кислота, натрий ацетати, қуш асосли калий фосфат, глюкоза, сахароза, (“Реахим”). Фермент фаоллигини аниқлашда субстрат сифатида сахарозадан фойдаланилди. (х.ч., “Реахим”).

Фойдаланилган мухитлар :

1-мухит: Баян ширей узум навидан олинган узум шарбати (Ташкент, 2005):

2.1. Ачитқини культивациялаш усули

Культивациялаш 1 литр озика мухитда 5-12 сутка давомида 26, 22, 6°C да олиб борилди.

2.2. Инвертазанинг фаоллигини ачитки культивациялаш даврида аниқлаш

Культивация даврида инвертаза активлигини қуйдаги аралашмада олиб борилди:

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

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

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

Инкубация 37°C температурада 2 соат давомида олиб борилади. Инкубациядан сўнг ўрганилаётган ва солиштирма аралашмасида инверт шакрлар микдорлари фаркланади. Солиштирма аралашмани инактивация қилиш мақсадида 1 соат давомида (с обратнўм холодильником) қайнатилади. Инкубацион аралашмалардаги инвертланган шакрлар микдори Бертран усули бўйича аниқланди. Инвертазанинг актив бирлиги деб 1мкМ сахароза 1л ўрганилаётган аралашмада (вино) 1мин давомида парчаланишига айтилади. Берилган шароитда инвертаза активлиги қўйидаги формула билан ҳисобланади:

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

бунда:

A – инвертаза активлиги;

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

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

a– титрлашга олинган ўрганилаётган аралашмадаги инверт шакрлар микдори, мг;

в– титрлашга олинган солиштирма аралашмадаги инверт шакрлар микдори, мг;

120-инкубация вақти, дақиқада;

0,3423-мкМ сахароза;

1000- 1литр винога ўтказиш коэффициенти;

0,95- инвертланган шакрларни сахарозага ўтказиш коэффициенти.

Эслатма; Бертран усули бўйича ўрганилинаётган аралашма ҳажми ундаги инвертланган шакрлар микдорига боғлиқ.

2.3. Бертран усули ёрдамида глюкозани микдорини аниқлаш

Реактивлар:

1. Феллинг суюқлиги. Бевосита ишланишидан олдин қуйидаги икки суюқликни бир хил микдорда қушишдан тайерланади.

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

- Б) сигнет тузи эритмаси. 1л дистилянган сувда 200г сигнет тузи еки 150г NaOH эритилади
2. Темир сульфат эритмаси. 1л дистилянган сувда 50г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ва 200г H_2SO_4 ($\rho=1.84$) эритилади. Эритилган эритма KMnO_4 ни кайтармаслиги керак. Шунинг учун тайерланган эритма (FeSO_4 оксидлаш учун тугридан тугри иштирок этади) кучсиз еришгунча калий перманганат эритмаси оз-оздан томчилатиб солинади.
- Темир сульфат урнига темир аммоний квасцидан ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times 24\text{H}_2\text{O}$) фойдаланиш мумкин. Бунда эритма тайерлаш учун 1л улчамли колбага дистилянган сувга 86г темир аммоний квасци ва 108 мл сульфат кислотаси ($\rho=1.84$) эритилади.
3. 0.1н калий перманганат эритмаси. Бу эритманинг 1мл 6.36мг мисга жавоб беради.

Аниқлаш усули. 200-250мл хажимли колбага 20мл дан аникланувчи суюқлик, SiSO_4 , ва сегнет тузи эритмалари солинади ва тезда қайнагунча истилади. Аралашма 3 мин қайнатилинади. Кейин қайнаш тўхтатилади ва бир неча секунд кутилади, SiO чўкмага тушгунча. Ажралган тиниқ иссиқ суюқлик сувли ёки вакуумли насос ёрдамида фильтр- трубка оркали Бунзен колбасига ўтказилинади. Филтрат етарли даражада интенсив кўк рангда булиши керак. Филтратнинг оч шаворанг рангда бўлиши имкон қуйиб бўлмайдиган даражада шакар тутишини билдиради (100мг дан ортик), бу эса нотугри натижаларга олиб келади.

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

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

Хисоблаш. Титрлаш вақтида сарфланган калий перманганат миқдорини аниқлаш учун уни мис титири буйича купайтирамиз. Агар калий перманганат эритмаси аниқ 0,1н бўлса унда миснинг титри 0,00636 бўлади ва титирлашга кетган b мл шу эритмага чуқкан мис оксиди x булади:

$$X = 6,36 b \text{ мг}$$

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

2.4. Ачитки биомассасининг намлигини аниқлаш

Культура суюқлиги (культуральная жидкость) центрифугалангандан кейин биомасса доимий оғирликка етгунча (60°C да 1 соат давомида) центрифуга пробиркасида куритилади. Намлик қуйидаги формула буйича хисобланади:

$$V = \frac{g - g_1}{g - g_0} * 100\%$$

V – биомассанинг намлиги (%да);

g – куритилишгача булган бюкснинг биомасса билан биргаликда массаси;

g_1 -қуритилгандан кейин булган бюкснинг биомасса билан биргаликда массаси;
 g_0 —бўш бюкснинг массаси.

3. ТАДКИКОТ НАТИЖАЛАРИ ВА УЛАРНИНГ ТАЛКИНИ

3.1. Культивациялаш давридаги натижалар

Бизга малумки вино тайёрлашда ачитқилардан фойдаланилади. Узум шарбати ачитилиб вино олинади. Адабиётлардаги маълумотларга кўра (Абдуразакова С.Х., 1990), ачитқилар чекланган шароитда узлуксиз усулда культивациялаш жараёнида турли ферментлар (инвертаза, липаза, протеаза, эстераза) экзо ҳолатда юкори микдорда синтезланиши кузатилади.

Шунинг учун биз иккита гидролитик ферментларни, инвертазани ва эстеразани, фаоллигини температураси чегараланган шароитларда кузатишни маўсад ўилиб қўйдик.

Бу ишда инвертаза ва эстераза ферментларини активлигини бижғиш жараёнида кузатилди, нега деса бу ферментлар озиқ овқат саноатида кенг микёсида ишлатилади.

Ишда *Saccharomyces cerevisiae* ачитқисини Ркацители 6 расадан фойдаландик.

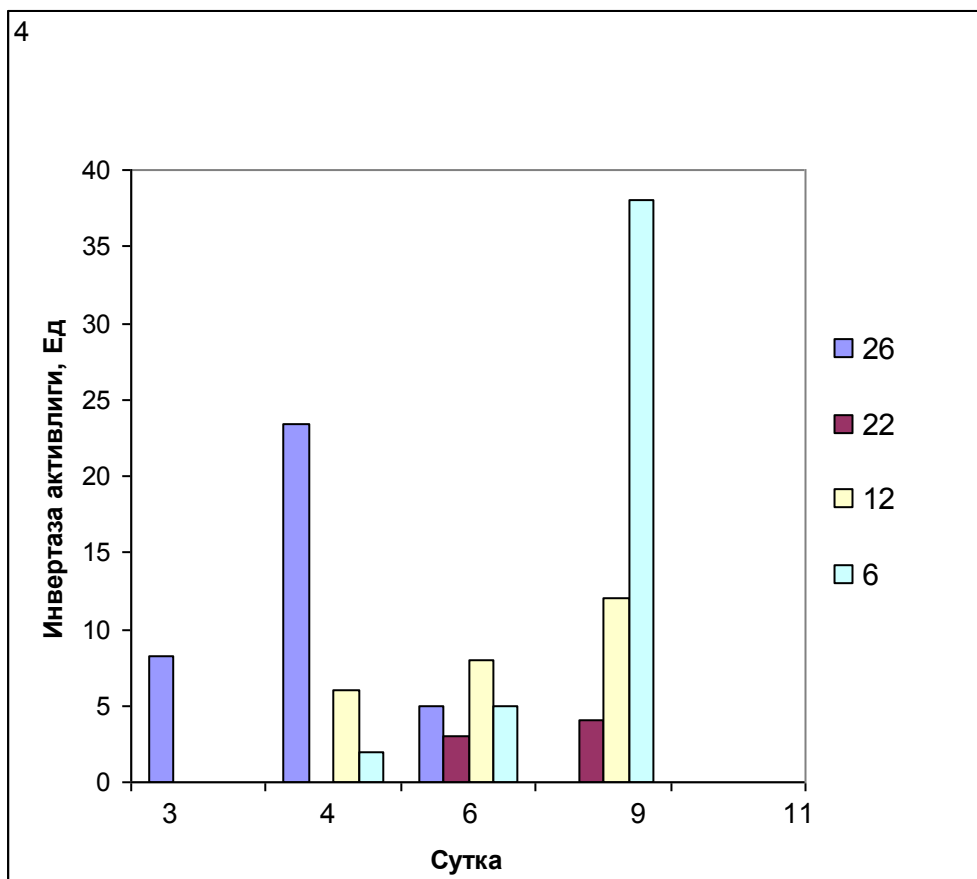
Озиқа мухит сифатида баян ширей навли узум шарбатидан фойдаланилди. Бунда биз узум шарбатини икки баробар дистилланган сув билан суёлтирдик. Нега деса глюкозанинг кўп микдори катаболик репрессияга олиб келиши мумкин. Узум шарбати оқ вино олиш технологияси бўйича бижгитилди. Культивация 11 сутка 1 литрли озиқа мухитда олиб борилди. Бижғиш жараёни 2 кун давомида 26⁰С олиб борилди ва ундан кейин шароитлар ўзгартирилган ҳолда ўтказилди. Бунда шароитлар фақатгина температура билан фарқ қилди: 26⁰С, 22⁰С, 12⁰С, 6⁰С. Бунда бижғиш жараёни куйидаги критериялар бўйича кузатиб борилди:

- купчиш жадаллиги,
- биомасса микдори,
- умумий инвертаза фаоллиги
- умумий эстераза фаоллиги.

3.2. Бижғиш жараёнида инвертазани активлигини кузатиш натижалари

Бижғиш жараёнида кузатилган инвертаза активлиги 1 расмда келтирилган. Расмдан маълумки, бижғиш 26⁰С да олиб борилганда бижғиш жараёни 5 сутка давом этди. Инвертазанинг фаоллиги 3 суткадан бошлаб кузатилди ва ўзининг максимал кўрсаткичини (23 Ед) 4 суткада намоён қилди.

22⁰С эса бижғиш жараёни 9 сутка давом этди. Инвертазанинг фаоллиги ўрта ҳолда кузатилди ва унинг фаоллиги 4 Ед ташкил этди.



1 Расм. Бижғиш жараёнида инвертазани активлиги

12 °C да бижғиш жараёни 11 сутка давом этди. Бунда инвертазанинг фаоллиги оз кўтарилди ва 10 суткада 12 Ед кўрсатди.

6 °C бижғиш 15 дан ортиқ сутка давом этди ва инвертазанинг фаоллиги 9 суткада 38 Ед ни ташкил этди. Бу ходиса юқоридаги маълумотларни (Абдуразакова С.Х., 1990) тугрилигини тасдиқлайди. Бунда температура ва шакарни миқдорини чегараланган икки босқичли бижғиш жараёнида фаол гидролитик ферментлар синтези кузатилади. Шундай қилиб 6 °C олиб борилган бижғиш жараёнида инвертазанинг фаоллиги ошган холи кузатилди.

3.3. Бижғиш жараёнида эстеразани активлигини кузатиш натижалари

Эстераза ферменти бижғиш жараёнида ўзини трансфераз фаоллиги намоён қилади. Бунда у спиртлар билан бирга кислоталар бирикади ва эфирлар хосил бўлади.

Ферментни трансфераз фаоллигини аниқлашга келсак, этил эфир хосил бўлиши учун сарф бўлган сирка кислотаси билан хисобланади.

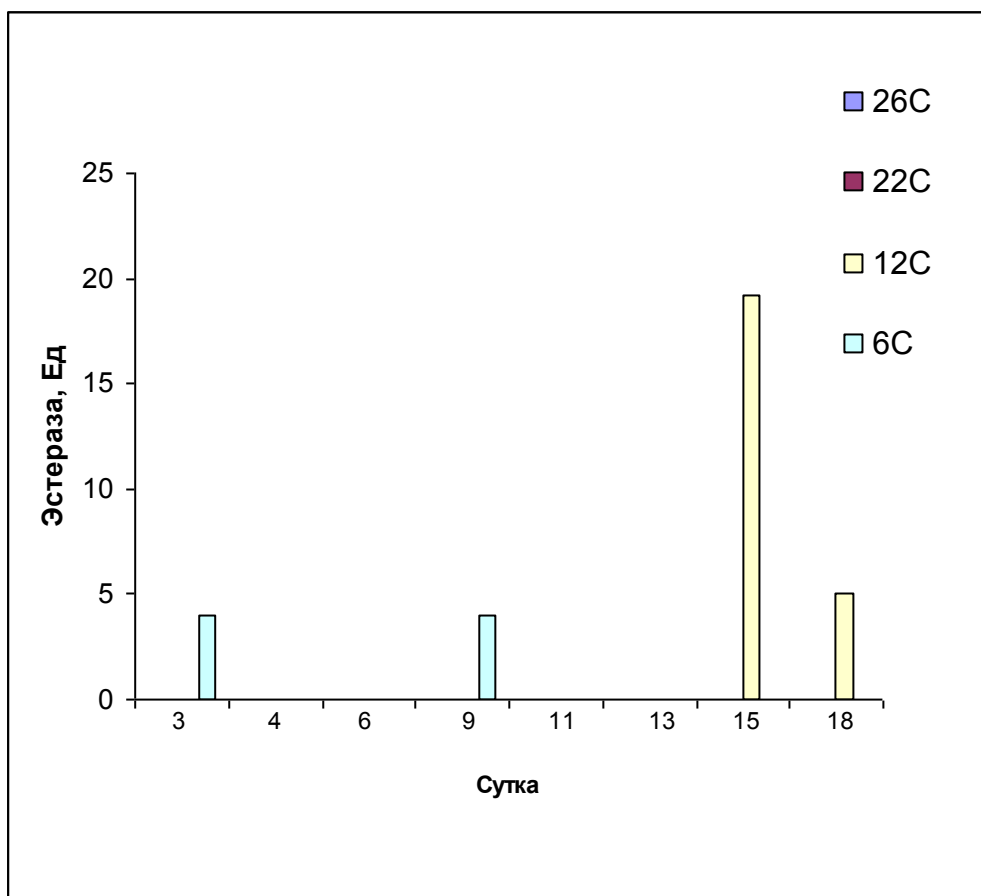
Эстераза ферментини активлиги ҳам бижғиш жараёнида кузатилди. Натижалар 2 расмда кўрсатилган. Бунда бижғиш жараёни 26 °C да 6 сутка давом этди. Эстеразанинг трансфераз фаоллиги шу вақт ичида кузатилмади.

22 °C эса бижғиш жараёни 9 сутка давом этди. Бу шароитда ҳам эстеразанинг трансфераз фаоллиги кузатилмади.

12 °C да бижғиш жараёни 20 сутка давом этди. Бунда эстераза узини энг юқори фаоллик натижасини 15 суткада намоён қилди ва унинг фаоллиги 22 Ед ташкил этди.

6 °C да бижғиш жараёни 20 сутка давом этди. Курсатгичлар 11 суткагача булган бижғиш жараёнида олинди. Бунда эстераза узининг фаоллигини жуда паст даражада 3 ва 9 суткаларда (4 Ед) ташкил қилди.

Шундай қилиб, эстераза ферментини олиш мақсадида бижғиш жараёни 12 °C да олиб бориш тавсия этилади.



2 Расм. Бижғиш жараёнида эстеразани активлиги

Олинган натижалар фақатгина бижғиш жараёнини контроллаш ва такомиллаштириш эмас, балки ачитқилар экзо ферментлари олишда қўлланилиши мумкин. Олинган ачитқи экзо ферментларини тан нархи арзонроқ бўлиб ва экологик тоза бўлганлигини ҳисобга олиб, уларни озиқ-овқат саноатида қўллаш мумкин.

ХУЛОСАЛАР

1. *Ркацители-6* ачитқиси 4 хил температураси чегараланган шароитларда ўстирилди;
2. Ачитқиниг эркин холдаги инвертазасини олиш учун бижғиш жараёнини 6⁰С да олиб бориш тавсия этилади;
3. Ачитқи эркин холдаги эстеразасини олиш учун бижғиш жараёнини 12⁰С да олиб бориш тавсия этилади.

АДАБИЕТЛАР РУЙХАТИ

1. Абдуразакова С.Х. Совершенствование технологии бродительных производств на основе стимулирования биокаталических процессов. Ташкент :Фан. 1990. 140 с.
2. Голубев.И. Расў Виннўх Дрожжей Всероссийской Коллекции Микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН).Прикладная биохимия и микробиология. 2005. том 41. № 5. с. 592-595.
3. Ильченко А.П., Чернявская О.Г., Финогонова Т.В. Метаболизм этанола у дрожжей *Yarrowia* и *Torulopsis*. Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Том 41. №5. с. 487-494.
4. Катаева А.А., Базр И.И., Мендельсон Л.П., Омарова А.И. Способ получения фермента инвертазў и его применения .М: ДНИИТЭИПищепром. 1966. 44с
5. Коваленко Г. А., Перминова Л. В. , Плаксин Г. В., Комова О. В. , Чуенко Т. В., Рудина Н. А. Имобилизованнўе дрожжевўе мембранў как биокатализаторў процесса инверсии сахарозў. Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Том 41. № 4. с. 454-459.
6. Мазур П.Я., Столярова Л.И и др. Снижение сахараёмкости булочнўх и сдобнўх изделий. Хлебопекарная и кондитерская промўшленность. 1987. Вўп 3. с.341-344
7. Мирзарахметова Д.Т. Разработка научнўх основ использования иммобилизованной β-фруктофуранозидазў в технологии производства коньяка и ликеро-водочнўх изделий. Автореферат диссертации на соискание степени к.т.н. Ташкент -2001
8. Мирзарахметова Д.Т., Рахимов М.М., Абдуразакова С.Х., Ахмедова З.Р. Ферментативная конверсия субстратов инвертазў в вводно-органической среде. Прикладная биохимия и микробиология (Россия). 2006. №2. с.
9. Наумов Д.Г, Дорощенко В.Г Инвертазў: новое суперсемейство гликозилгидролаз. Молекулярная биология.1998. 32. №5. с.902-907
10. Наумова Е.С., Иванникова Ю.В., Наумов Г.И. Генетическая дифференциация хереснўх дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Том 41. № 6. с. 656-661.
11. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Хмеленина В.Н. Биотехнологический потенциал аэробнўх метилотрофнўх бактерий: настоящее и будущее (обзор). Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Том 41. № 5. с. 495-503.
12. Финогонова Т.В., Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Чернявская О.Г. Перспективў производства органических кислот дрожжами *Yarrowia lipolytica* (обзор). Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Том 41. №5. с.

- 13.Юркевич В.В Закономерности формирования ферментного аппарата у микроорганизмов. Доклад по совокупности опубликованных работ на соискание учёной степени д.б.н. Москва. 1972. 56с
- 14.Abrams M. Hackel R, Mirunago T., Lampen I.O. Relationship of large and small invertases in *Saccharomyces*: mutant selectively deficient in small invertase. J Bacteriol. 1978. V.135. №3. p.809-817
- 15.Basser A., Shall S . Properties of the internal invertase of yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochim. Biophys. Acta. 1971. V.250. p.192-202
- 16.Basser A., Shall S. The enzymes synthesis of fructosides using purified external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. Intern. Biochim. 1971. N2. p. 503
- 17.Berggen B. Studies on yeast invertase. XXV. Isoenzymes of invertase, studies with isoelectric focusing. Arkiv for kemi. 1970. V.32. N2. p.143-150
- 18.Beteta P., Gascon S. Localization of invertase in yeast vacuoles. FEBS Letters. 1971. V.13. N5 p.297-303
- 19.Ceregyino G.P., Scheffler I.E. Genetic analysis of glyucose regulation in *Saccharomyces cerevisiae* : Control of transcription versys m RNA turnover. EMBO J. 1996. V.15. N2. p.363-374
- 20.Duneset J., Smits H.P., Olsson L., Nielsen J. Carbonate catabolite repression of invertase during batch cultivations of *sacchoromyces cerevisiae* : the role of glucoseŷ fructose and mannose Appl. Microbiol. Biotech. 1998. V..50.N5. p.579-582
- 21.Friis J., Ottolenghi P. Localization of melibiaze in a strain of yeast. Compt Rend. Trav.Lab.Carlsberg. 1959. N31. p.272-281
- 22.Lampen J.O External enzymes of yeast : their nature and formation. J. of Microbiology and Serology. 1968. V.34. N1.p.1-18
- 23.Larate V. Belda F. Characterization of the heterologous invertase prodused by *Schizosacchoromyces pombe* from the SUC 2 gene of *sacchoromyces cerevisiae*. J. Appl. Bacteriol. 1996. V.80. p.45-52
- 24.Lowry O.M., Rosenbryl N.J., Farr A.L. Protein measurement with the folin phend reagent. J. Biol.Chem.1954. V.193. p.265-275
- 25.Molellan V., Lampen I.O The acid phosphotase of yeast localization and secretion by protoplaste. Biochim . Biophys . Acta . 1963. V.67. p.324-326
- 26.Nakajima H., Hirata A., Ogawa Y., Yonehara Y. Yoda K., Yamasaki M.A. Cytoskeleton-related gene usolation is required for intracellular protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell. Biol. 1991. 113(2). p.245-260

- 27.Reddy A., Gibbs B.S., Liu Y.L., Coward J.K., Changchien L.M., Naley F. Glycosylation of the overlapping sequins in yeast external invertase: effect of amino acid variation on site selectivity in vivo and in vitro // Glycobiology.-1999. 303.p.468-479
- 28.Rodrigues L.,Ruiz T. Metablitic relationship between invertase and acid phosphatase isoenzymes in *Sacchoromyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta . 1980. N3. p.445-454
- 29.Rudd P.M., Dwek R.A. Rapid, sensitive sequencing of oligosaccharide from glycoproteins. Curr. Opinion. Biotechnol. 1997. V.8. N4. p.488-497
- 30.Sund Marie Louise. Regulation of synthesis of invertase in Str. Mitis. J. Gen. Microbiol. 1980. N1. p.85-94
- 31.Verostek M.F. Atkinson P.H. Trimble Glycoprotein biosynthesis in the alg3 *Sacchoromyces cerevisiae* mutant. I.Role of glucose in the initial glycosylation of invertase in the endoplasmic reticulum. J.Biol.Chem.1993. 268(16). p.12095-12103
- 32.Wang C. Eufemi M. Turano C. Giartosio A. Influence of the carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. Biochim.1996. V.35. N23. p.7299-7307

Илова 1

Мис , мг	Инвертланган шакарлар, мг	Мис , мг	Инвертланган шакарлар, мг	Мис , мг	Инвертланган шакарлар, мг	Мис , мг	Инвертланган шакарлар, мг
10	4,8	39	19,3	68	34,7	96	50,3
11	5,3	40	19,8	69	35,3	97	50,9
12	5,8	41	20,3	70	35,8	98	51,5
13	6,3	42	20,9	71	36,4	99	52,1
14	6,8	43	21,4	72	36,9	100	52,7
15	7,3	44	21,9	73	37,5	101	53,2
16	7,7	45	22,4	74	38,0	102	53,8
17	8,2	46	22,9	75	38,5	103	54,4
18	8,7	47	23,5	76	39,1	104	55,0
19	9,2	48	24,0	77	39,6	105	55,5
20	9,7	49	24,5	78	40,2	106	56,1
21	10,2	50	25,1	79	40,7	107	56,7
22	10,7	51	25,6	80	41,3	108	57,3
23	11,2	52	26,1	81	41,9	109	57,8
24	11,7	53	26,7	82	42,4	110	58,4
25	12,2	54	27,2	83	43,0	111	59,0
26	12,8	55	27,8	84	43,5	112	59,6
27	13,3	56	28,3	85	44,1	113	60,2
28	13,8	57	28,8	86	44,7	114	60,8
29	14,3	58	29,3	87	45,2	115	61,4
30	14,8	59	29,8	88	45,8	116	62,0
31	15,3	60	30,4	89	46,3	117	62,6
32	15,8	61	30,9	90	46,9	118	63,2
33	16,3	62	31,4	91	47,5	119	63,8
34	16,8	63	32,0	92	48,1	120	64,4
35	17,3	64	32,5	93	48,7	121	65,1
36	17,8	65	33,1	94	49,2	122	65,7
37	18,3	66	33,6	95	49,8	123	66,3
Мис , мг	Инвертланган шакарлар, мг	Мис , мг	Инвертланган шакарлар, мг	Мис , мг	Инвертланган шакарлар, мг	Мис , мг	Инвертланган шакарлар, мг
124	66,9	154	85,5	184	105,1	214	125,6
125	67,6	155	86,1	185	105,8	215	126,3
126	68,1	156	86,7	186	106,4	216	127,0
127	68,7	157	87,3	187	107,1	217	127,7
128	69,3	158	88,0	188	107,8	218	128,4
129	69,9	159	88,6	189	108,4	219	129,1
130	70,5	160	89,3	190	109,1	220	129,8
131	71,1	161	89,9	191	109,8	221	130,5
132	71,7	162	90,6	192	110,5	222	131,2
133	72,3	163	91,2	193	111,2	223	131,9
134	73,0	164	91,9	194	111,8	224	132,6
135	73,6	165	92,5	195	112,5	225	133,4
136	74,2	166	93,2	196	113,2	226	134,1

137	74,8	167	93,8	197	113,8	227	134,8
138	75,4	168	94,5	198	114,5	228	135,5
139	76,0	169	95,1	199	115,2	229	136,2
140	76,7	170	95,8	200	115,9	230	139,9
141	77,3	171	96,4	201	116,6		
142	77,9	172	97,0	202	117,3		
143	78,6	173	97,7	203	118,0		
144	79,2	174	98,3	204	118,7		
145	79,8	175	99,0	205	119,3		
146	80,5	176	99,7	206	120,0		
147	81,1	177	100,3	207	120,7		
148	81,7	178	101,0	208	121,4		
149	82,3	179	101,7	209	122,1		
150	83,0	180	102,4	210	122,8		
151	83,6	181	103,1	211	123,5		
152	84,2	182	103,8	212	124,2		
153	84,8	183	104,4	213	124,9		