MIKROORGANIZMLARDAN AMILOLITIK FERMENTLARNI AJRATIB OLISH VA TOZALASHNING BIOTEXNOLOGIK USULLARINI TAKOMILLASHTIRISH

Ismoilov Muslima Saydullo qizi
Toshkent kimyo texnologiya instituti,
mustaqil izlanuvchi
ismoilovamuslima41@gmail.com
Tel.: +998930472375
https://orcid.org/0009-0001-7569-5914
https://doi.org/10.5281/zenodo.23344775

Annotatsiya. Mazkur maqolada mikroorganizmlardan amilolitik fermentlarni ajratib olish va tozalashning biotexnologik usullari hamda ularning samaradorligini oshirish imkoniyatlari tadqiq etilgan. Aspergillus oryzae zamburug‘i asosida α-amilaza fermentini ajratib olishda ammoniy sulfat bilan fraksiyalash, ion almashinish, biospetsifik va gel xromatografiyasi usullarining texnologik xususiyatlari tahlil qilingan. Ferment preparatlarining katalitik faolligi, tozalanish darajasi va proteolitik aralashmalardan xalos etilish jarayonlari baholangan. Fermentlarni tozalash bosqichlarini o‘zaro muvofiqlashtirish yuqori faollikka ega biopreparatlar olishning muhim texnologik sharti ekanligi asoslangan.

Kalit so‘zlar: biotexnologiya, mikroorganizmlar, amilolitik fermentlar, α-amilaza, Aspergillus oryzae, biospetsifik xromatografiya, ion almashinish xromatografiyasi, gel filtratsiyasi, katalitik faollik, fermentlarni tozalash.

KIRISH

Zamonaviy biotexnologiyada mikroorganizmlar asosida yuqori katalitik faollikka ega ferment preparatlarini olish sanoat jarayonlarining texnologik samaradorligini oshirishning ustuvor yo‘nalishlaridan biri hisoblanadi. Amilolitik fermentlar kraxmalning fermentativ gidrolizini katalizlash orqali oziq-ovqat, farmatsevtika va bioyoqilg‘i sanoatida muhim ahamiyat kasb etadi. Mikroorganizmlarning biosintetik salohiyati, ferment hosildorligini boshqarish va biokatalitik jarayonlarni optimallashtirish imkoniyatlari ularni sanoat fermentlari ishlab chiqarishning istiqbolli biologik manbalariga aylantiradi. [1] Ayniqsa, Aspergillus oryzae zamburug‘idan olinadigan α-amilaza fermenti yuqori amilolitik faollikka ega biopreparatlar ishlab chiqarishda muhim ahamiyatga ega.

Amilolitik fermentlarni ajratib olishning asosiy ilmiy-texnologik muammosi ularning katalitik faolligini saqlagan holda yuqori tozalik darajasiga erishishdan iborat. Kultural suyuqlik tarkibidagi proteolitik fermentlar va begona oqsillar α-amilazaning barqarorligi hamda yakuniy preparat sifatiga salbiy ta’sir ko‘rsatishi mumkin. [2] Shu sababli fermentlarni selektiv ajratish, proteolitik aralashmalardan tozalash va biologik faolligini saqlashga yo‘naltirilgan biotexnologik yondashuvlarni takomillashtirish dolzarb ilmiy vazifa hisoblanadi.

Fermentlarni tozalashda fraksion cho‘ktirish, ion almashinish, affin xromatografiyasi va gel filtratsiyasi usullarining o‘zaro muvofiqlashtirilishi texnologik samaradorlikni belgilovchi muhim omildir. Mazkur jarayonlarda fermentning solishtirma katalitik faolligi, tozalanish koeffitsiyenti va umumiy faollik chiqimi asosiy baholash mezonlari hisoblanadi. [3] Shu jihatdan, amilolitik fermentlarni ajratib olish va tozalash bosqichlarini optimallashtirish yuqori faollikka ega ferment preparatlarini olishning ilmiy-metodologik asoslarini takomillashtirishga xizmat qiladi.

Mazkur muammoni hal etishda fermentlarni tozalashning alohida usullarini qo‘llashdan ko‘ra, ularning selektivligi va texnologik o‘zaro bog‘liqligiga asoslangan kompleks yondashuv muhim ahamiyatga ega. [4] Xususan, Aspergillus oryzae zamburug‘i kultural suyuqligidan α-amilazani ajratib olishda proteolitik aralashmalarni dastlabki bosqichlarda kamaytirish keyingi xromatografik jarayonlarning samaradorligini oshirish imkonini beradi. Bunda fermentning tozalanish darajasi bilan bir qatorda uning katalitik faolligi va umumiy chiqimini saqlash texnologik optimallashtirishning asosiy mezoni sifatida qaralishi lozim. [5] Shu asosda biospetsifik sorbsiya va xromatografik ajratish usullarini integratsiyalash yuqori tozalikdagi ferment preparatlarini olish uchun istiqbolli biotexnologik yondashuv hisoblanadi.

MAVZUGA OID ADABIYOTLAR TAHLILI

Mikroorganizmlardan amilolitik fermentlarni ajratib olish va tozalashga oid tadqiqotlar fermentlarning biosintetik salohiyati, katalitik xususiyatlari va texnologik samaradorligini oshirishga qaratilgan. Mazkur yo‘nalishda fermentlarni selektiv ajratish, proteolitik aralashmalardan tozalash va biologik faolligini saqlash muhim ilmiy muammolar hisoblanadi.

R. Gupta va hammualliflar mikroorganizmlardan olinadigan α-amilazalarning biotexnologik xususiyatlari, biosintez sharoitlari va sanoatda qo‘llanilishini tizimli tahlil qilgan. Tadqiqotda mikrobial fermentlarning yuqori katalitik faolligi va texnologik moslashuvchanligi ularning sanoat ahamiyatini belgilashi asoslangan. [6] Biroq ferment hosildorligining yuqoriligi yakuniy preparatning tozaligi va barqarorligini kafolatlamaydi. Bu fermentlarni ajratish va tozalash jarayonlarini mustaqil texnologik bosqich sifatida optimallashtirish zarurligini ko‘rsatadi.

R.J. Whitehurst va M. Van Oort tomonidan fermentlarning oziq-ovqat biotexnologiyasidagi funksional xususiyatlari, substratga ta’sir mexanizmlari va texnologik qo‘llanilishi yoritilgan. Mualliflar fermentativ jarayonlar samaradorligining substrat tarkibi, muhit parametrlari va ferment barqarorligiga bog‘liqligini ko‘rsatgan. [7] Ushbu yondashuv amilolitik fermentlarni tozalashda oqsilning yuqori tozaligiga erishish bilan birga uning funksional faolligini saqlash zarurligini asoslaydi.

E. Leveque va hammualliflar termofil mikroorganizmlarning amilolitik fermentlarida katalitik mexanizm, substrat spetsifikligi va barqarorlik o‘rtasidagi bog‘liqlikni o‘rgangan. Tadqiqotda fermentlarning molekulyar xususiyatlari ularning fizik-kimyoviy sharoitlarga chidamliligini belgilashi yoritilgan. [8] Mazkur natijalar tozalash jarayonida harorat, pH va ion kuchini fermentning biologik xususiyatlariga moslashtirish zarurligini ko‘rsatadi. Biroq termofil fermentlarga xos sharoitlarni Aspergillus oryzae fermentlariga bevosita tatbiq etish mumkin emas.

X.D. Liu va Y. Xu Bacillus sp. YX-1 shtammidan α-amilazani ajratib olish va tavsiflash jarayonlarini tadqiq etgan. Fermentni tozalashda fraksion cho‘ktirish va xromatografik usullardan foydalanilib, uning molekulyar massasi 56 kDa deb aniqlangan. [9] Tadqiqot ko‘p bosqichli tozalashning amaliy imkoniyatlarini ko‘rsatsa-da, texnologik samaradorlikni baholashda tozalanish darajasi bilan bir qatorda ferment faolligining umumiy chiqimini hisobga olish zarur.

N. Božić va hammualliflar Bacillus licheniformis ATCC 9945a shtammidan α-amilaza olish va uning katalitik xususiyatlarini o‘rgangan. Tadqiqotda fermentning solishtirma faolligi 6 barobar oshirilgan, umumiy faollik chiqimi esa 38 foizni tashkil etgan. [10] Ushbu natijalar tozalash darajasining oshishi fermentning umumiy faolligi yo‘qotilishi bilan kechishi mumkinligini ko‘rsatadi. Demak, tozalash texnologiyasini optimallashtirishda mahsulot sifati va chiqimi o‘rtasidagi muvozanat muhim hisoblanadi.

S. Bano va hammualliflar Bacillus subtilis KIBGE HAS shtammidan α-amilazani ultrafiltratsiya, ammoniy sulfat bilan cho‘ktirish va gel filtratsiyasi yordamida tozalagan. Natijada fermentning

tozalanish darajasi 96,3 barobarga, solishtirma faolligi esa 13 011 birlik/mg ga yetkazilgan. [11] Mazkur tadqiqot membranali va xromatografik usullar integratsiyasi yuqori faollikka ega ferment preparatlarini olishda istiqbolli ekanligini ko‘rsatadi.

E. Demirkan Bacillus subtilis va uning mutant shtammlarida α-amilaza biosintezi, tozalanishi va katalitik xususiyatlarini qiyosiy o‘rgangan. Tadqiqotda ferment hosildorligi mikroorganizmning fiziologik xususiyatlari va ozuqa muhiti tarkibiga bog‘liqligi aniqlangan. [12] Ushbu natijalar fermentlarni ajratib olish texnologiyasini takomillashtirishda biosintez va tozalash jarayonlarini o‘zaro bog‘liq tizim sifatida baholash zarurligini asoslaydi.

R.K. Scopes oqsillarni ajratish va tozalashning nazariy-metodologik asoslarini ishlab chiqib, fraksiyalash, cho‘ktirish va xromatografik usullarning samaradorligini baholash mezonlarini tizimlashtirgan. Muallif fermentning solishtirma faolligi, tozalanish koeffitsiyenti va umumiy faollik chiqimini asosiy ko‘rsatkichlar sifatida tavsiflagan. [13] Ushbu metodologiya fermentning yuqori tozalik darajasi har doim ham texnologik samaradorlikning oshishini anglatmasligini ko‘rsatadi.

K. Wilson va J. Walker tahriridagi ilmiy asarda oqsillarni xromatografik ajratish, elektroforetik identifikatsiyalash va biokimyoviy tahlil qilish usullari yoritilgan. [14] Mazkur yondashuv ferment preparatlarining molekulyar xususiyatlari, tozalik darajasi va katalitik faolligini kompleks baholash uchun metodologik asos yaratadi.

Tahlil qilingan ilmiy tadqiqotlar amilolitik fermentlarni tozalash samaradorligi mikroorganizmning biosintetik xususiyatlari, fermentning fizik-kimyoviy barqarorligi va ajratish usullarining selektivligiga bog‘liqligini ko‘rsatadi [15]. Asosiy ilmiy muammo yuqori tozalik darajasiga erishish bilan bir vaqtda fermentning umumiy katalitik faolligi va mahsulot chiqimini saqlashdan iborat. Shu jihatdan, Aspergillus oryzae kultural suyuqligidan α-amilazani ajratishda biospetsifik sorbsiya, ion almashinish va gel xromatografiyasi usullarini integratsiyalashning samaradorligini baholash alohida ilmiy ahamiyatga ega.

TADQIQOT METODOLOGIYASI

Tadqiqotda Aspergillus oryzae zamburug‘i kultural suyuqligidan α-amilaza fermentini ajratib olish va tozalashning eksperimental-biokimyoviy usullari qo‘llanildi. Dastlab ferment preparati ammoniy sulfatning 20–80 foizlik to‘yinish darajasida fraksion cho‘ktirilib, dializ yordamida tuzsizlantirildi. Proteolitik aralashmalarni kamaytirish uchun biospetsifik sorbsiya, fermentni selektiv ajratishda DEAE-sellyuloza DE-52 asosidagi ion almashinish xromatografiyasi hamda AcA-54 gel xromatografiyasi usullaridan foydalanildi.

Ajratilgan fraksiyalardagi oqsil miqdori Louri va spektrofotometrik, α-amilazaning katalitik faolligi yodometrik, proteolitik faollik esa modifikatsiyalangan Anson usullari orqali aniqlandi. Ferment preparatining elektroforetik bir xilligi SDS-PAGE usulida baholandi. Tozalash samaradorligi solishtirma katalitik faollik, tozalanish koeffitsiyenti va proteolitik faollikning kamayishi asosida qiyosiy tahlil qilindi.

TAHLIL VA NATIJALAR

Mikroorganizmlardan amilolitik fermentlarni ajratib olish va tozalashning biotexnologik samaradorligi ferment preparatining katalitik faolligi, tozalanish darajasi, proteolitik aralashmalardan xalos etilishi hamda texnologik bosqichlarning o‘zaro muvofiqligi bilan belgilanadi. Tadqiqotda Aspergillus oryzae zamburug‘i kultural suyuqligidan α-amilaza fermentini ajratib olishda biospetsifik sorbsiya, ammoniy sulfat bilan fraksion cho‘ktirish, ion almashinish va gel xromatografiyasi usullarining natijalari tahlil qilindi. Asosiy e’tibor fermentning solishtirma faolligini oshirish bilan bir vaqtda proteolitik aralashmalarni kamaytirish imkoniyatlarini baholashga qaratildi.

Dastlabki bosqichda kultural suyuqlik tarkibidagi proteolitik komponentlarni kamaytirish maqsadida polietilentereftalat asosidagi biospetsifik sorbentdan foydalanilgan. Keyingi bosqichlarda ammoniy sulfat yordamida fraksion cho‘ktirish, DEAE-sellyuloza DE-52 asosidagi ion almashinish xromatografiyasi va AcA-54 ultragelida gel xromatografiyasi amalga oshirilgan. Ushbu jarayonlarning ferment faolligi va tozalanish darajasiga ta’siri 1-jadvalda umumlashtirilgan.

1-jadval.

α-amilaza fermentini tozalash bosqichlarining biotexnologik samaradorligi

Tozalash bosqichi	Umumiy oqsil, mg	Amilaza faolligi, birlik/g	Proteaza faolligi, birlik/g	Tozalanish darajasi, marta
Boshlang‘ich kultural suyuqlik	870,0	2 400	195	1,0
Biospetsifik sorbsiya	440,0	8 300	62,3	3,5
Tuz bilan cho‘ktirish	140,0	17 800	7,9	7,4
Ion almashinish xromatografiyasi	8,4	289 000	0,065	120
Gel xromatografiyasi	4,0	700 000	0,03	290

Manba: muallif ishlanmasi

Jadval ma’lumotlariga ko‘ra, boshlang‘ich kultural suyuqlikda α-amilaza faolligi 2 400 birlik/g, proteaza faolligi esa 195 birlik/g ni tashkil etgan. Biospetsifik sorbsiya bosqichidan keyin amilaza faolligi 8 300 birlik/g gacha oshgan, proteaza faolligi esa 62,3 birlik/g gacha kamaygan. Bu dastlabki sorbsiya jarayonining proteolitik aralashmalarni kamaytirish va amilolitik komponentni nisbatan boyitishdagi ahamiyatini ko‘rsatadi. Ammoniy sulfat bilan fraksion cho‘ktirishdan keyin ferment faolligi 17 800 birlik/g ga, tozalanish darajasi esa 7,4 martaga yetgan.

Ion almashinish xromatografiyasi jarayonida amilaza faolligining 289 000 birlik/g gacha oshishi kuzatilgan. Ushbu bosqichda proteaza faolligi 0,065 birlik/g gacha kamayib, tozalanish darajasi 120 martani tashkil etgan. Yakuniy gel xromatografiyasi natijasida ferment faolligi 700 000 birlik/g ga yetgan va tozalanish darajasi 290 martagacha oshgan. Bunda proteaza faolligining 0,03 birlik/g darajasida qayd etilishi proteolitik aralashmalar sezilarli kamayganligini ko‘rsatadi. Biroq mazkur qiymatni proteazalarning mutlaq yo‘qligi sifatida talqin qilish mumkin emas.

Ferment faolligining tozalash bosqichlari bo‘yicha o‘zgarishini grafik jihatdan ifodalash texnologik jarayonning qaysi bosqichida yuqori natijaga erishilganligini aniqlash imkonini beradi.

Grafikdan ko‘rinadiki, α-amilaza faolligining eng katta mutlaq ortishi ion almashinish va gel xromatografiyasi bosqichlariga to‘g‘ri keladi. Xususan, ion almashinish bosqichida ferment faolligi oldingi bosqichga nisbatan taxminan 16,2 marta, gel xromatografiyasida esa 2,42 marta oshgan. Mazkur natijalar xromatografik ajratish usullarining ferment preparatini boyitishdagi muhim rolini tasdiqlaydi. Shu bilan birga, umumiy oqsil miqdorining 870,0 mg dan 4,0 mg gacha kamayishi tozalash davomida oqsil fraksiyalarining sezilarli qismi ajratilganligini ko‘rsatadi. Bu jarayonning umumiy faol ferment chiqimiga ta’sirini baholash uchun esa har bir bosqichdagi umumiy fermentativ faollik haqidagi qo‘shimcha ma’lumotlar zarur.

Amilolitik fermentlarni ajratib olish jarayonining keyingi muhim tarkibiy qismi ammoniy sulfat yordamida fraksion cho‘ktirish va dializ orqali tuzsizlantirish hisoblanadi. Tadqiqotda dastlabki kultural suyuqlik hajmi 93 ml bo‘lib, ammoniy sulfatning to‘yinish darajasi bosqichma-bosqich 20 foizdan 80 foizgacha oshirilgan. Olingan fraksiyalar sentrifugalash orqali ajratilgan va dializ yordamida past molekulyar komponentlardan tozalangan. Ushbu jarayonning asosiy texnologik parametrlari 2-jadvalda keltirilgan.

2-jadval.

α-amilaza fermentini fraksion cho‘ktirish va tuzsizlantirish jarayonining texnologik parametrlari

Texnologik ko‘rsatkich	Tadqiqotda qo‘llanilgan qiymat
Boshlang‘ich kultural suyuqlik	93 ml
Ammoniy sulfatning dastlabki to‘yinish darajasi	20%
Dastlab qo‘shilgan ammoniy sulfat	10,509 g
Keyingi bosqichdagi suyuqlik hajmi	83 ml
Ikkinchi bosqichdagi to‘yinish darajasi	20–80%
Ikkinchi bosqichda qo‘shilgan ammoniy sulfat	34,9 g
Fraksion cho‘ktirish harorati	4°C
Dastlabki sentrifugalash	6 000 ayl/min, 30 daqiqa
Dializ muhiti	0,025 M Tris-HCl buferi
Dializ davomiyligi	2 kun

Manba: muallif ishlanmasi

Jadvalda keltirilgan parametrlar fraksion cho‘ktirishning ketma-ket bosqichlarda amalga oshirilganligini ko‘rsatadi. Ammoniy sulfat konsentratsiyasini bosqichma-bosqich oshirish oqsil komponentlarini eruvchanlik xususiyatlariga ko‘ra fraksiyalash imkonini bergan. Keyingi dializ jarayoni esa ferment eritmasidagi tuzlarni kamaytirish va uni xromatografik ajratish uchun tayyorlash vazifasini bajargan. Mazkur bosqichning ahamiyati shundaki, oqsil aralashmasining ion tarkibini boshqarish keyingi ion almashinish xromatografiyasida adsorbsiya va elyutsiya jarayonlarining barqarorligiga ta’sir ko‘rsatadi.

Fermentni selektiv ajratishning asosiy bosqichlaridan biri DEAE-sellyuloza DE-52 sorbenti asosidagi ion almashinish xromatografiyasi bo‘lgan. Tadqiqotda 2,5 × 20 sm o‘lchamdagi kolonkadan foydalanilib, 0,05 M Tris-HCl buferi (pH 8,3) bilan muvozanatlashtirilgan. Ferment fraksiyalarini elyutsiya qilishda NaCl konsentratsiyasining 0–0,5 M oralig‘idagi chiziqli gradienti qo‘llanilgan. Elyutsiya tezligi 50 ml/soat, yig‘ilgan fraksiyalar hajmi esa 10 ml ni tashkil etgan. Amilolitik faollik kraxmal-yod reaksiyasi yordamida baholanib, 4–8-raqamli fraksiyalarda ferment faolligi aniqlangan.

Keyingi gel xromatografiyasi bosqichida faol fraksiyalar AcA-54 ultrageli yordamida qo‘shimcha tozalangan. Jarayon 0,05 M ammoniy bikarbonat buferida, pH 8,1 sharoitida, 35 ml/soat elyutsiya tezligida amalga oshirilgan. Tadqiqotning alohida eksperimental bayonida ushbu jarayondan so‘ng 610 000 birlik/g faollikka va 277 martalik tozalanish darajasiga ega α-amilaza preparati olingani ko‘rsatilgan. Bu ko‘rsatkichlar 1-jadvaldagi yakuniy natijalardan farq qilgani sababli ularni bir xil tajribaning o‘zaro tasdiqlangan natijalari sifatida birlashtirish ilmiy jihatdan to‘g‘ri bo‘lmaydi.

Amilolitik fermentlarni tozalash texnologiyasining yana bir muhim natijasi proteolitik faollikning kamayishidir. Proteazalar ferment preparatining saqlanish barqarorligi va keyingi biotexnologik qo‘llanilishiga ta’sir ko‘rsatishi mumkin. Shu sababli fermentning amilolitik faolligini oshirish bilan bir vaqtda proteolitik komponentlarni kamaytirish tozalash texnologiyasining asosiy mezonlaridan biri sifatida baholandi.

Tahlil natijalariga ko‘ra, proteaza faolligi boshlang‘ich 195 birlik/g dan biospetsifik sorbsiya bosqichida 62,3 birlik/g gacha, fraksion cho‘ktirishdan keyin 7,9 birlik/g gacha kamaygan. Ion almashinish xromatografiyasida ushbu ko‘rsatkich 0,065 birlik/g, yakuniy gel xromatografiyasida esa 0,03 birlik/g ni tashkil etgan. Dastlabki va yakuniy qiymatlar o‘rtasidagi farq proteolitik faollikning taxminan 6 500 marta kamayganligini ko‘rsatadi. Biroq bu nisbat fermentning umumiy proteaza miqdori emas, balki jadvalda keltirilgan birlik/g ko‘rsatkichlarining o‘zaro nisbatidir.

Tadqiqotda ajratib olingan α-amilazaning fizik-kimyoviy xususiyatlari ham baholangan. Xususan, fermentning katalitik faolligiga harorat, muhitning pH ko‘rsatkichi va ayrim metall tuzlarining ta’siri

o‘rganilgan. Dissertatsiyada tozalangan α-amilaza uchun optimal harorat 50°C, optimal pH esa 5,0 deb qayd etilgan. Metall tuzlari ta’sirini baholashda nazorat namunasi 100% deb qabul qilingan va unga nisbatan ferment faolligidagi o‘zgarishlar aniqlangan.

3-jadval.

Metall tuzlarining α-amilaza fermenti nisbiy faolligiga ta’siri

Tajriba sharoiti	Nisbiy faollik, %	Nazoratga nisbatan o‘zgarish
Nazorat	100	0
$CuSO_4$	20	−80 foiz punkt
$CaCl_2$	90	−10 foiz punkt
$FeCl_2$	105	+5 foiz punkt
$MgSO_4$	110	+10 foiz punkt

Manba: muallif ishlanmasi

Jadval natijalariga ko‘ra, $CuSO_4$ ta’sirida α-amilaza faolligi nazoratga nisbatan 80 foiz punktga kamaygan. $CaCl_2$ qo‘llanilganda ferment faolligi 90% ni tashkil etgan. Aksincha, $FeCl_2$ va $MgSO_4$ ishtirokida faollik mos ravishda 105% va 110% darajasida qayd etilgan. Ushbu natijalar fermentning katalitik xususiyatlari muhitdagi ionlar tarkibiga sezgir ekanligini ko‘rsatadi. Biroq metall tuzlarining konsentratsiyalari va tajriba takrorlari to‘liq keltirilmaganligi sababli ularning ta’sirini miqdoriy kinetik model asosida baholash imkoniyati cheklangan.

O‘tkazilgan tahlillar amilolitik fermentlarni tozalash texnologiyasida dastlabki biospetsifik sorbsiya, fraksion cho‘ktirish va keyingi xromatografik ajratish bosqichlarining o‘zaro bog‘liqligini ko‘rsatadi. Ferment faolligining oshishi bilan proteolitik faollikning kamayishi yuqori tozalikdagi α-amilaza preparatini olish imkoniyatlarini asoslaydi. Shu bilan birga, texnologiyaning sanoat miqyosidagi samaradorligini baholash uchun umumiy ferment chiqimi, reagentlar sarfi, takroriy tajribalar va iqtisodiy ko‘rsatkichlar bo‘yicha qo‘shimcha ma’lumotlar talab etiladi.

Natijalarni ilmiy talqin qilishdagi cheklovlar. Taqdim etilgan manbalarda yakuniy ferment faolligi 700 000 va 610 000 birlik/g, tozalanish darajasi esa 290 va 277 marta sifatida ikki xil qayd etilgan. Shuningdek, ayrim oqsil konsentratsiyasi birliklari, molekulyar massa ifodasi va gel xromatografiyasida qo‘llangan sorbentlar tavsifida aniqlashtirish talab etiladigan jihatlar mavjud. Shu sababli maqolada ushbu qiymatlar asl manbalardagi ko‘rinishida ajratib berildi; ularning farqi yangi tajriba natijasi sifatida talqin qilinmadi.

XULOSA

Mikroorganizmlardan amilolitik fermentlarni ajratib olish va tozalashning biotexnologik usullarini tadqiq etish natijalari ferment preparatlarining katalitik faolligi, tozalanish darajasi va proteolitik aralashmalardan xalos etilishi o‘rtasida uzviy texnologik bog‘liqlik mavjudligini ko‘rsatdi. Aspergillus oryzae zamburug‘i kultural suyuqligidan α-amilaza fermentini ajratib olishda biospetsifik sorbsiya, fraksion cho‘ktirish, ion almashinish va gel xromatografiyasi usullarining ketma-ket qo‘llanilishi yuqori faollikka ega ferment preparatlarini olish imkoniyatlarini asoslaydi. Olingan eksperimental natijalar va ularning qiyosiy tahlili asosida quyidagi ilmiy xulosalar hamda amaliy tavsiyalar ishlab chiqildi.

Birinchidan, α-amilaza fermentini ko‘p bosqichli tozalash natijasida uning katalitik faolligi boshlang‘ich 2 400 birlik/g dan 700 000 birlik/g gacha oshgani, tozalanish darajasi esa 290 martani tashkil etgani aniqlangan. Biospetsifik sorbsiya bosqichida ferment faolligi 8 300 birlik/g, fraksion cho‘ktirishdan keyin 17 800 birlik/g, ion almashinish xromatografiyasida 289 000 birlik/g darajasiga

yetgan. Ushbu natijalar tozalash bosqichlarining ketma-ket qo‘llanilishi ferment preparatining solishtirma katalitik faolligini oshirishda muhim ahamiyatga ega ekanligini ko‘rsatadi.

Ikkinchidan, ferment preparatini proteolitik aralashmalardan tozalash jarayonida proteaza faolligi boshlang‘ich 195 birlik/g dan 0,03 birlik/g gacha kamaygani kuzatilgan. Xususan, biospetsifik sorbsiyadan keyin proteaza faolligi 62,3 birlik/g, fraksion cho‘ktirishdan so‘ng 7,9 birlik/g, ion almashinish xromatografiyasida esa 0,065 birlik/g ni tashkil etgan. Dastlabki va yakuniy ko‘rsatkichlar o‘rtasidagi nisbat proteolitik faollikning 6 500 marta kamayganligini ifodalaydi. Mazkur natijalar fermentlarni tozalashning dastlabki bosqichlarida proteolitik komponentlarni selektiv ajratish muhimligini asoslaydi.

Uchinchidan, α-amilaza fermentining katalitik faolligi fizik-kimyoviy sharoitlarga sezilarli darajada bog‘liqligi aniqlangan. Tadqiqotda fermentning optimal faolligi 50°C harorat va pH 5,0 sharoitida kuzatilgan. Metall tuzlari ta’sirida $MgSO_4$ va $FeCl_2$ ishtirokida fermentning nisbiy faolligi mos ravishda 110% va 105% ni, $CaCl_2$ ta’sirida 90% ni, $CuSO_4$ ishtirokida esa 20% ni tashkil etgan. Ushbu natijalar ferment preparatlarining katalitik xususiyatlarini saqlashda muhitning harorati, kislotalilik darajasi va ion tarkibini boshqarish zarurligini ko‘rsatadi.

To‘rtinchidan, amilolitik fermentlarni ajratib olish va tozalash texnologiyasining samaradorligini baholashda faqat yakuniy ferment faolligi yoki tozalanish koeffitsiyentiga tayanish yetarli emasligi asoslandi. Texnologik jarayonning natijadorligi fermentning umumiy faollik chiqimi, solishtirma katalitik faolligi, oqsil miqdori, proteolitik aralashmalar darajasi va reagentlar sarfini o‘zaro bog‘liq holda baholashni talab etadi. Shu munosabat bilan fermentlarni tozalashning har bir bosqichida moddiy balansni shakllantirish, umumiy fermentativ faollikning saqlanish ulushini hisoblash va texnologik yo‘qotishlarni aniqlashga asoslangan kompleks baholash tizimini joriy etish taklif qilinadi.

Beshinchidan, biospetsifik sorbsiya, ion almashinish va gel xromatografiyasi usullarining integratsiyalashuvi α-amilaza fermentini yuqori tozalik darajasida ajratib olishning istiqbolli biotexnologik yo‘nalishi ekanligi aniqlandi. Biroq mazkur texnologiyani sanoat miqyosida qo‘llash uchun laboratoriya natijalarining takrorlanuvchanligi, sorbentlarning ekspluatatsion barqarorligi, ferment chiqimi va ishlab chiqarish xarajatlari bo‘yicha qo‘shimcha tadqiqotlar zarur.

Oltinchidan, mikroorganizmlardan amilolitik fermentlarni ajratib olish va tozalash texnologiyalarini takomillashtirishning ustuvor yo‘nalishi yuqori katalitik faollik, ferment barqarorligi va texnologik samaradorlik o‘rtasidagi muvozanatni ta’minlashdan iborat ekanligi belgilandi. Tadqiqotda keltirilgan yakuniy ferment faolligi va tozalanish darajasiga oid ayrim ko‘rsatkichlar o‘rtasidagi tafovutlar birlamchi eksperimental ma’lumotlar asosida aniqlashtirilishi zarur. Kelgusida fermentlarni tozalash jarayonlarini optimallashtirish uchun ko‘p omilli eksperimental loyihalash, fermentativ faollikning kinetik tahlili va texnologik jarayonlarning iqtisodiy baholash usullaridan foydalanish maqsadga muvofiqdir.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR

1. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B. Microbial α-amylases: A biotechnological perspective. Process Biochemistry. Elsevier, 2003. Vol. 38, No. 11. P. 1599–1616. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00053-0.
2. de Souza P.M., Magalhães P.O. Application of microbial α-amylase in industry – A review. Brazilian Journal of Microbiology. 2010. Vol. 41, No. 4. P. 850–861. DOI: 10.1590/S1517-83822010000400004.
3. Scopes R.K. Protein Purification: Principles and Practice. 3rd edition. New York: Springer-Verlag, 1994. 380 p. DOI: 10.1007/978-1-4757-2333-5.

4. Scopes R.K. Protein Purification: Principles and Practice. 3rd edition. New York: Springer-Verlag, 1994. 380 p.
5. Janson J.C., Rydén L. (Eds.). Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications. 2nd edition. New York: Wiley-VCH, 1998.
6. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B. Microbial α-amylases: A biotechnological perspective. Process Biochemistry. Elsevier, 2003. Vol. 38, No. 11. P. 1599–1616.
7. Whitehurst R.J., Van Oort M. (Eds.). Enzymes in Food Technology. 2nd edition. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009.
8. Leveque E., Janecek S., Haye B., Belarbi A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes: Catalytic mechanism, substrate specificity and stability. Enzyme and Microbial Technology. Elsevier, 2000. Vol. 26. P. 3–14.
9. Liu X.D., Xu Y. A novel raw starch digesting α-amylase from a newly isolated Bacillus sp. YX-1: Purification and characterization. Bioresource Technology. Elsevier, 2008. Vol. 99, No. 10. P. 4315–4320.
10. Božić N., Ruiz J., López-Santín J., Vujčić Z. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α-amylase from a Bacillus licheniformis ATCC 9945a. Biochemical Engineering Journal. Elsevier, 2011. Vol. 53, No. 2. P. 203–209.
11. Bano S., Qader S.A.U., Aman A., Syed M.N., Azhar A. Purification and characterization of novel α-amylase from Bacillus subtilis KIBGE HAS. AAPS PharmSciTech. Springer, 2011. Vol. 12, No. 1. P. 255–261.
12. Demirkan E. Production, purification, and characterization of α-amylase by Bacillus subtilis and its mutant derivates. Turkish Journal of Biology. TÜBİTAK, 2011. Vol. 35, No. 6. P. 705–712.
13. Scopes R.K. Protein Purification: Principles and Practice. 3rd edition. New York: Springer-Verlag, 1994. 380 p.
14. Wilson K., Walker J. (Eds.). Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 7th edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
15. Advances in Science and Technology (Международная научно- практическая конференция) “Очистка α- амилазы из гриба Aspergillus oryzae” Канжигитова М.Ж., Есимова А.М., Журабоева М.С., Ташмухаммедов М.С. // Moscow-2020. Ст-24