



Farangiz NABIYEVA,
Samarqand davlat tibbiyot universiteti katta o'qituvchisi
E-mail:nabievafarangiz294@gmail.com
Gavhar DUSHANOVA,
SamDU, Biokimyo instituti dotsenti, b.f.n
Zebo KUDRATOVA,
Samarqand davlat tibbiyot universiteti dosenti v.b., PhD
Lola ISOMADINOVA,
Samarqand davlat tibbiyot universiteti assistenti

SamDVMCHBU dotsenti, b.f.n N.Xodjayeva taqrizi asosida

ISOLATION OF A BIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE FROM THE FUNGUS SACCHAROMYCES CEREVISIAE AND STUDY OF ITS AMINO ACID COMPOSITION

Annotation

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is used in the food industry, especially in fermentation and baking processes. However, its uses are not limited to these areas. In recent decades, the fungus *Saccharomyces cerevisiae* has been widely used in protein biotechnology due to its diverse and unique properties of proteins and enzymes and is of great importance in synthetic biology.

ВЫДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПОЛИПЕПТИДА ИЗ ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES CEREVISIAE И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА

Аннотация

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* используются в пищевой промышленности, особенно в процессах ферментации и выпечки. Однако их применение не ограничивается этими областями. В последние десятилетия гриб *Saccharomyces cerevisiae* широко используется в биотехнологии белков благодаря разнообразным и уникальным свойствам его белков и ферментов и имеет большое значение в синтетической биологии.

SACCHAROMYCES CEREVISIAE ZAMBURUG'IDAN BIOLOGIK FAOL POLIPEPTIDNI AJRATISH VA AMINOKISLOTALAR TARKIBINI O'RGANISH

Annotatsiya

Saccharomyces cerevisiae achitqi zamburug'i oziq-ovqat sanoatida, ayniqsa fermentatsiya va non pishirish jarayonlarida qo'llaniladi. Biroq, ulardan foydalanish faqat ushbu sohalar bilan cheklanmaydi. So'nggi o'n yilliklarda *Saccharomyces cerevisiae* zamburug'ining oqsillar va fermentlarning turli tumaligi va o'ziga xos xususiyatlari tufayli oqsillar biotexnologiyasida keng qo'llanilishi amalga oshirilmoqda va sintetik biologiyada katta ahamiyatga egadir.

Kalit so'zlar: *Saccharomyces cerevisiae*, elektroforez, polipeptid, aminokislota.

Kirish. *Saccharomyces cerevisiae* eukariot mikroorganizm bo'lib, genetik jihatdan bakteriyalarga qaraganda ancha murakkab organizm hisoblanadi. Achitqi hujayrasi *Escherichia coli* hujayrasiga nisbatan 3,5 baravar ko'p DNKni o'z ichiga oladi. Shu bilan birga, eksperimental obyekt sifatida achitqilar prokariotlar va viruslarga nisbatan, achitqilar molekulyar genetikasi tez rivojlanishini ta'minlaydigan ko'plab texnik afzalliklarga ega [2,3,7]. Ularning tez ko'payish qobiliyati, individual achitqi hujayralarini manipulyatsiya qilish imkoniyati, bir vaqtning o'zida bir necha kulturani selektiv muhitga o'tkazish va mutantlarni ajratish qulayligi, achitqini genetik tizim sifatida batafsil o'rganilganligi, ehtimol, eng muhimi, achitqining genetik transformatsiyasi tizimidan ko'p qirrali foydalanish imkoniyati shular jumlasidandir [5,6,8]. Ko'pgina mikroorganizmlardan farqli o'laroq, achitqi hujayralari genotipida bir nechta genetik nishon mavjud bo'lishi uning hayotchanligini saqlab qolish imkonini beradi. Achitqi patogen emas, shuning uchun u bilan ishlash ehtiyot choralarni talab qilmaydi [1,4,9].

Tadqiqot maqsadi. *Saccharomyces cerevisiae* zamburug'idan faol biologik modda- oqsilni ajratish va aminokislotalar tarkibini o'rganish.

Tahlil va natijalar. Tadqiqot objekti- S288c *Saccharomyces cerevisiae* shtammi tanlab olindi. S288c *Saccharomyces cerevisiae* shtammi Saburo ozuqaviy muhitida o'stirildi. Ushbu muhitning asosi zamburug'li suvdur. Zamburug'li suv tayyorlash uchun 70-100 g yangi presslangan zamburug' (7-10 g quruq zamburug') 1 litr distillangan suvda 20-30 daqiqa qaynatiladi va sovuq haroratda baland silindrda 12 soat davomida qoldiriladi. Tindirilgan suyuqlik dekantatsiya qilinadi, yana 1 litr suv qo'shiladi, 30 daqiqa qaynatiladi, filtrlanadi va pH kerakli qiymatga o'rnatiladi. Tayyorlangan muhit 2-3 kun davomida 20 daqiqalik bosqichlarda sterilizatsiya qilinadi. 100 ml steril zamburug'li suvga 1% pepton, 2% agar, agar erigandan so'ng 4% glyukoza yoki maltoza qo'shiladi, filtrlanadi, probirkalarga quyiladi va 0,05 MPa da 20 daqiqa davomida sterilizatsiya qilinadi. Muhit oddiy 1% peptonli suv yordamida ham tayyorlanishi mumkin.

O'rganilayotgan obyektidagi oqsil miqdorini aniqlashdan oldin namuna sulfat kislota bilan mineralizatsiya qilindi, so'ngra Nessler reaktivi bilan oqsil azotini aniqlandi. Tayyorlangan namunalardan tortib olingan namunalar issiqqa chidamli kolbalarga olindi, konsentrlangan sulfat kislota H_2SO_4 (1,84 g/sm) qo'shildi va kuchli qaynab ketmasdan, qum hammomida parchalandi. Mineralizatsiya jarayonining so'nggida mutlaqo shaffof, rangsiz eritma olindi. Tayyorlangan namunalarda oqsil miqdori V-5000

Metash spektrofotometrida 400 nm to'lqin uzunligida, Nessler reaktivi yordamida kolorimetrik usulda aniqlandi. Tajriba ikki marta takrorlangandan keyin olingan natijalar 1-jadvalda keltirilgan.

1- Jadval

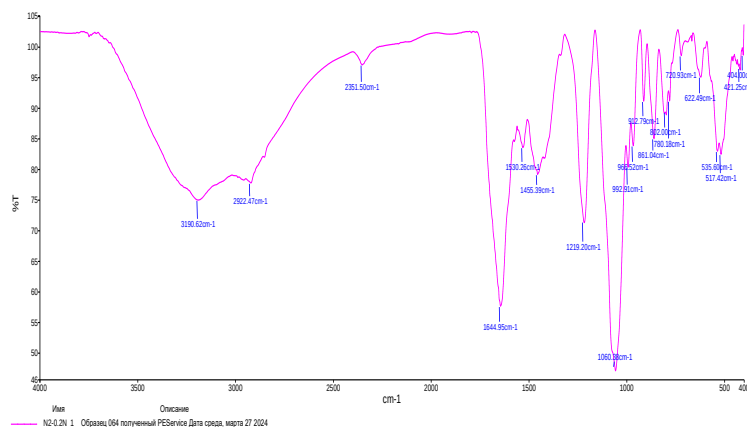
Oqsil tarkibini miqdoriy tahlil qilish natijalari

Tadqiqot ob'ekti	Namuna, G	Alikvot, ml	400 nm	Oqsil, %	Azot, %
Zamburug'	0,287	0,2	0,578	44,8	7,16

Keyinchalik, oqsillarni ekstraksiya qilish uchun optimal sharoitlar ishlab chiqildi. Ekstraksiya 0,05 Tris HCl (pH 8,5), 2% Na₂CO₃, 0,2% NaOH bilan amalga oshirildi. Hidromodul tanlandi (1:5, 1:10, 1:15) va ekstraksiya vaqti 60-120-180-240 daqiqa bo'lib, hujayralarni to'liq yo'q qilish uchun gomogenat 34 kGs tebranish chastotasida ultratovush bilan ishlov berildi. Ekstraksiyadan so'ng, 8000 aylanish tezligida/daq 30 daqiqa davomida sentrifugada aylantirish amalga oshirildi. Tozalashning keyingi bosqichida quruq ammoniy sulfat bilan fraksiyalash qo'llanildi. Yuqori molekulyar og'irlikdagi polipeptidlarni olish uchun ammoniy sulfat 80% cho'ktirishda ishlatildi. 80% cho'kma ekstrakti sentrifuga qilindi va hosil bo'lgan past molekulyar og'irlikdagi polipeptidlarning cho'kmasi Sephadex G25 kolonkasida tuzsizlantirildi. Sephadex G25 da gel filtrlash 4 ml elyuat yig'ish bilan amalga oshirildi. Olingan tuzsizlantirilgan oqsil fraksiyalarining konsentratsiyasi Cary 60 spektrofotometrida (Germaniya) 280 va 260 nm to'lqin uzunliklarida aniqlandi. Ajratilgan oqsil fraksiyasi yig'ib olindi va CHRIST Alpha 2-4 LSCbasic qurilmasida (Germaniya) yuqori vakuumda (-870 C) muzlatib quritildi. Tozalangan polipeptidlar 5,7% ni tashkil etdi.

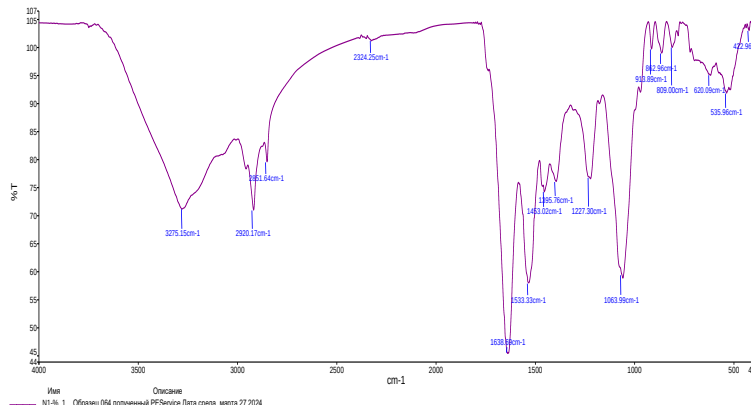
Funksional guruhlarni aniqlash uchun polipeptidlarda IQ spektral tahlil o'tkazildi. Tekshirilayotgan birikmalarning geometriyasi MaSK dasturi yordamida tuzildi va B3LYP1/6-31G (d, p) usuli yordamida optimallashtirildi.

Hisoblashlar Firefly 8.0.1 dasturiy paketida KBr bo'lgan planshetlarda o'rganilgan oligopeptidlarning IQ spektrlari Perkin-Elmer System 2000 IR Furey spektrofotometrida qayd etildi. IQ spektrlari chastotalarning optik zichlikka (Absorbance) bog'liqligi sifatida ifodalanadi. Natijalar 1-2-rasmda ko'rsatilgan.



Rasm 1. 0,2n NaOH ekstragenti bilan olingan polipeptid

IQ spektr (KBr, $\nu_{\max}$, cm^{-1}): 3196 (NH), 3034 (CH₃), 1646 (C=O), 1403 aromatik halqaga xos signallar, 1240, 1049 (-C-O-C-), 704 aromatik halqadagi (C-H), 602 sm^{-1} (C-SH) guruhlari xos yutilish chiziqlarini namoyon etgan.



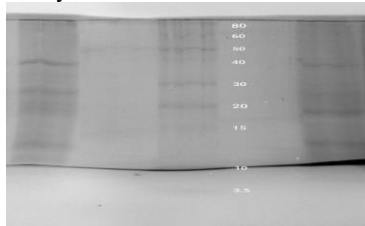
Rasm 2. 0,2% li ekstragent bilan olingan polipeptid

IQ spektr (KBr, $\nu_{\max}$, sm^{-1}): 3275 (NH), 2920, 2852 (CH₂), 1639 (C=O), 1533, 1453 aromatik halqaga xos signallar, 1396 (CH₃), 1227, 1064 (-C-O-C-), 863, 809 aromatik halqadagi (C-H), 620, 536 sm^{-1} (C-SH, -C-S-C-) guruhlari xos yutilish chiziqlarini namoyon etgan.

Saccharomyces cerevisiae zamburug'idan ajratilgan polipeptidlarning elektroforetik harakatchanligini poliakrilamid gelida (PAAG) tekshirish

Tozalangan polipeptidlarning xarakteristikasi 10% PAAG da elektroforez yordamida amalga oshirildi. Fraksiyalar 10% poliakrilamid gelda elektroforez yordamida tahlil qilindi. Marker (nishon) sifatida Novex™ Sharp pre-stained Protein Ladder (Invitrogen) standart oqsil to'plami ishlatildi. Elektroforez denaturatsiya sharoitida amalga oshirildi. Namunalar har bir lunkaga 20 mkl dan solindi. Konsentratsiyalash gelida (6%) namunalarning migratsiya paytida kuchlanish 50V darajasida saqlandi. Gelda oqsillar harakati 10% ga oshganda, kuchlash 80Voltgacha yetadi.

Geldan bromfenol ko'k ajralib chiqmaguncha elektroforez amalga oshirildi. 0,25% li Coomassie G250 (Sigma, USA) eritmasining suv bilan aralashmasi bilan Gellar bo'yaldi: etanol: sirka kislotasi: suv (1:1:2). (3- rasm)



1) 0,2% NaOH 2) Nishonlar 3) 0,2N NaOH

Rasm 3. *Saccharomyces cerevisiae* polipeptidlarining elektroferogrammasi

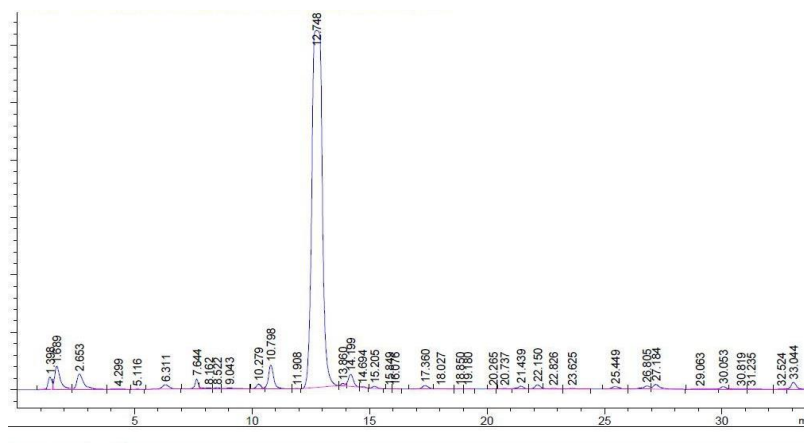
Elektroforezga natijalariga ko'ra, tozalangan polipeptidlar molekulyar og'irligi 8 kDa dan 40 kDa gacha bo'lgan bir xil fraktsion tarkibga ega (4-rasm).



Rasm 4. *Saccharomyces cerevisiae* polipeptidining liofilizatsiya jarayoni

Polipeptidlarning aminokislotlar tarkibini tekshirish

Erkin aminokislotlarni ajratish. Namunalarning suvli ekstraktidan oqsillar va peptidlarni cho'ktirish sentrifugali stakanlarda amalga oshirildi. Buning uchun 1 ml tajriba namunasiga 1 ml (aniq hajmda) 20% UXSK qo'shildi. 10 daqiqadan so'ng cho'kma 15 daqqa davomida 8000 ay.tez/daq. da santrifugalash orqali ajratildi. 0,1 ml cho'kmausti suyuqlikni ajratish, liofilizatsiya qilib quritildi. Hidrolizat bug'landi, quruq qoldiq trietilamin-atsetonitril-suv (1:7:1) aralashmasida eritildi va quritildi. Kislotani neytrallashtirish uchun bu jarayon ikki marta takrorlandi. Stiven A., Koen Daviel usuli bo'yicha feniltioizosianat bilan reaksiya o'tkazildi, aminokislotlarning feniltiokarbamil- hosilalari olindi.



Rasm 5. Yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi usuli yordamida aminokislotlarni aniqlash

Aminokislota hosilalarini identifikatsiyalash yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi usuli orqali amalga oshirildi (5-rasm). YUSSX sharoitlari: DAD detektorli xromatograf Agilent Technologies 1200, 75X4,6 mm Discovery HS C18 kolonalarida. A eritmasi: 0,14M. CH₃COONa + 0,05% TEA pH 6,4, B:CH₃CN

Oqim tezligi 1,2 ml/min, yutilish 269 nm. Gradient % /daq: 1-6%/0-2.5 daq; 6-30% /2.51-40 daq; 30-60%/40,1-45 daq; 60-60%/45,1-50 daq; 60-0%/50,1-55 daq (2- jadval). 2- jadvaldagi ma'lumotlarga ko'ra, polipeptidning 305, 2645 namunalarda aminokislotlarning eng yuqori miqdori (mg/g) gli va arg uchun, aminokislotlar kamroq asp, glu, val, gis, ley, ser, tir, iso, lis.

2- Jadval

Polipeptid aminokislotlar tarkibi

№	Aminokislotlarning nomenklaturasi	Aminokislota tarkibi mg/g	FASTA Nomenklaturasi	100 ta aminokislota qoldig'iga oqsillar tarkibi
1	Asp	21.18344	D	7
2	Glu	24.64502	E	8
3	Ser	15.31665	S	5
4	Gli	46.67304	G	25
5	Asp	0	N	0
6	Glu	0	Q	0
7	Cis	2.940984	C	1
8	Trn	5.240469	T	2
9	Arg	44.39112	R	11
10	Ala	1.088789	A	1
11	Pro	9.861871	P	4
12	Tir	15.83588	Y	5
13	Val	23.9325	V	8
14	Met	2.827883	M	1
15	Gis	27.41822	H	8
16	Iso	14.51658	I	5
17	Ley	24.88968	L	8
18	Trp	0	W	0
19	Phe	6.89199	F	2
20	Lis	17.61042	K	5
Jami		305.2645		

Xulosalar:

1. *Saccharomyces cerevisiae* S288c shtammi molekulyar og'irligi 8 dan 40 kDa gacha bo'lgan polipeptidlarning boy manbai ekanligi aniqlandi. Elektroforez tahlillar shuni ko'rsatdiki, oqsil fraktsiyalari yuqori darajadagi tozalikka ega.

2. *Saccharomyces cerevisiae* S288c shtamm zamburug'idan ajratilgan polipeptid aminokislota tarkibini o'rganish lizinning yuqori miqdorini ko'rsatdi, bu esa bu polipeptidlarni qoramol albumini (BSA) bilan konyugatsiyasining muhim ko'rsatgichi hisoblanadi.

ADABIYOTLAR

- Maria Parapouli¹, Anastasios Vasileiadis¹, Amalia-Sofia Afendr and Efstathios Hatziloukas¹. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*. 2020; 6(1): 1–31. <http://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- Patist A., Bates D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, V. 9, № 2, 2008, p. 147-154. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.004>
- Vilkhu K., Mawson R., Simons L., Bates D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, V. 9, № 2, 2008, p. 161-169. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>
- Ye C, Xu N, Gao C, Liu G, Xu J, Zhang W, Chen X, Nielsen J, Liu L Comprehensive understanding of *Saccharomyces cerevisiae* phenotypes with whole-cell model WM_S288C. *Biotechnol Bioeng*. 2020 May;117(5):1562-1574. <http://doi.org/10.1002/bit.27298>. Epub 2020 Feb 13. PMID:32022245
- Belda I, Ruiz J, Santos A, Van Wyk N, Pretorius IS. *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Genet*. 2019 Dec;35(12):956-957. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2019.08.009>. Epub 2019 Oct 17.
- Gapoyan O. G., Krasnoshtanova A. A. Isolation of protein isolates from *Saccharomyces cerevisiae* yeast under complex processing conditions // *Advances in Chemistry and Chemical Technology*. - 2020. - Vol. 34. - No. 11 (234). - P. 10-12.
- Ivankin A. N. et al. Potential resources for obtaining food protein // *Modern biotechnology: current issues, innovations and achievements*. - 2020. - P. 75-77.
- Islammagomedova E. A., Khalilova E. A., Abakarova A. A. Some biochemical and morphological properties of *Saccharomyces cerevisiae* yeast under stress conditions (review) // *News of higher educational institutions. North Caucasian region. Natural sciences*. - 2022. - No. 3 (215). - P. 129-138.
- Karakhanova M. Industrially valuable races of *Saccharomycetes* // *Science and innovation*. - 2023. - Vol. 2. - No. Special issue 8. - P. 1101-1107.