

AZƏRBAYCAN RESPUBLİKASI

Əlyazması hüququnda

AZƏRBAYCAN TORPAQLARINDAN AYRILMIŞ *ASPERGİLLUS* VƏ *PENİCİLLİUM* CİNSİ GÖBƏLƏKLƏRİNDƏ TURŞ PROTEAZALARIN AKTİVLİYİ

İxtisas: 2414.01 – Mikrobiologiya

Elm sahəsi: Biologiya

İddiaçı: **Səfərova Aytən Xanlar qızı**

Fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi almaq
üçün təqdim olunan dissertasiyanın

AVTOREFERATI

Bakı – 2023

Dissertasiya işi Odlar Yurdu Universitetinin «Kimya, biologiya və ekologiya» kafedrasında və Bakı Dövlət Universitetinin «Mikrobiologiya və Virusologiya» elmi-tədqiqat laboratoriyasında yerinə yetirilmişdir.

Elmi rəhbər: biologiya elmləri doktoru, professor
Qənbərov Xudaverdi Qənbər oğlu


Rəsmi opponentlər: biologiya elmləri doktoru, professor
Mirmusa Miriş oğlu Cəfərov





biologiya elmləri doktoru, professor
Fəridə Xosrov qızı Qəhrəmanova

biologiya üzrə fəlsəfə doktoru
Mehriban Rauf qızı Yusifova

Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Ali Attestasiya Komissiyasının ARETN-nin Mikrobiologiya İnstitutunun nəzdində fəaliyyət göstərən FD 1.07 Dissertasiya şurası

Dissertasiya şurasının sədri: Biologiya elmləri doktoru, professor,
AMEA-nın müxbir üzvü

Pənah Zülfüqar oğlu Muradov

Dissertasiya şurasının elmi katibi:
Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru, dosent

Günəl Əli qızı Qasımova

Elmi seminarın sədri:
Biologiya elmləri doktoru, professor

Könül Fərrux qızı Baxşəliyeva

GİRİŞ

Mövzunun aktuallığı və işlənmə dərəcəsi. Proteolitik enzimlər toxuma, hüceyrə və molekulyar səviyyədə gedən müxtəlif bioloji proseslərin tənzimlənməsində mühüm rol oynayırlar. Bu enzimlərin əsas funksiyası zülalları hidroliz etməkdən ibarət olub «*insanın, heyvanların, bitkilərin və mikroorqanizmlərin həyatında çox müstəsna əhəmiyyətə malikdirlər*»¹.

Proteazaların öyrənilməsi enzimologiyada mərkəzi yerlərdən birini tutur. Bu, onların həm orqanizmdə oynadıqları fizioloji rol ilə, həm də xalq təsərrüfatında və elmi-tədqiqat işlərində geniş tətbiq olunması ilə bağlıdır. Hal-hazırda sənayedə və təbabətdə «*tətbiq olunan enzimlərin 60%-ni proteazalar*»² təşkil edir. Qida sənayesində turş proteazalar çörəkbişirmədə, pendirin yetişmə prosesinin sürətlənməsində və onun dadının və ətrinin formalaşmasında, süddən qıvcırma məhsullarının alınmasında, ətin keyfiyyətinin yaxşılaşdırılmasında və zülali hidrolizatın alınmasında, istifadə olunur.

Müalicə məqsədilə «*həzmin yaxşılaşdırılmasında və orqanizmdə hemostaz sistemi zülallarının aktivatoru kimi*»³ proteazalar əvəzsiz preparatlara çevrilmişlər. Orqanizmdə əmələ gələn «*törəmələrin (müxtəlif xassəli şişlərin) müalicəsində*»⁴ proteazaların tətbiqi istiqamətində böyük perspektivlər açılır. Proteolitik enzimlər qan damarlarında «*trombların müalicəsində, fibrinlərin və fibrinogenlərin arıdılmasında*»⁵ səmərəli vasitə kimi təklif olunur.

Heyvan və bitkilərdən proteazaların alınması iqlimdən asılılığa, enzimin çıxımının azlığına, külli miqdarda canlı materialın tələb olunmasına və etik məsələlərə görə məhdudlaşır. Buna görə də, sənayedə

¹ Jarocki, V.M., Tacehi, J.L., Djordjevic, S.P. Nonproteolytic functions of microbial proteases increase pathological complexity // *Proteom*, – 2015, – V.15 (5-6), – P.1075-1088.

² Tavano, O.L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food Biotechnology // *Jour. Molec. Catal. B Enzyme*, – 2013, – V.90, – P.1-11.

³ Mane, P., Tale, V. Overview of microbial therapeutical enzymes // *Inter. Jour. Current Microbiol Appl. Sciences*, – 2015, – V.4, – P.17-26.

⁴ Patel, Y., Naraian, R., Singh, V. Medicinal properties of *Pleurotus* species: a review // *World Journal of fungal and Plant Biology*, – 2012, – V.3, – N1, – P.1-12.

⁵ Achta, T., Hoq, M., Madrid, A. Bacterial proteases as thrombolytics and Fibrinolytics // *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, – 2017, – V.16 (2), – P.255-269.

geniş miqdarda tətbiq olunan proteazalar mikroorqanizmlərdən (göbələk və bakteriyalardan) alınır. Bu, ilk növbədə onların nisbətən asan əldə olunması, «*yüksek böyümə sürətinə və fasiləsiz enzim sintez etmə qabiliyyətinə malik olması*»⁶ ilə bağlıdır. Heyvan və bitkilərdən alınan proteaza preparatlarını artıq bakteriya və göbələklərdən alınan preparatlar əvəz edir. Məsələn, süddən pendir istehsalında istifadə edilən, buzovların mədəsindən alınan qurşaq enzimi əvəzinə bakteriyalar və göbələklərdən alınan proteazalar istifadə olunur. Bakteriyalar içərisində proteazaların produsentləri kimi ən çox öyrənilən *Bacillus* cinsli bakteriyalardır. Qeyd etmək lazımdır ki, bakteriyaların sintez etdikləri proteazalar, kiçik müstəsna hallardan başqa, dar turşuluq (pH 7-9,5) diapazonunda səmərəli aktivlik göstərə bilirlər. Göbələklərin sintez etdikləri «*proteazalar həm davamlıdır, həm də geniş turşuluq (pH 2,5-9,0) diapazonunda*»⁷ səmərəli fəaliyyət göstərirlər. Proteazaların produsentləri kimi bazidiumlu göbələklər, maya göbələkləri və kif göbələkləri tədqiq edilmişdir. Kif göbələkləri geniş pH diapazonunda (turş, neytral və qələvi) proteazalar sintez etmək qabiliyyətinə malik olduqları üçün daha geniş öyrənilmişdir. Turş proteazaların, «*maksimum aktivliyi pH 2,5-5,5 diapazonunda özünü göstərir*»⁸ və qida sənayesində geniş tətbiq olunur. Kif göbələklərinin sintez etdikləri turş proteazalar 2 növdür: pepsinəbənzər və renninəbənzər proteazalar. Pepsin həzm şirəsində olan proteazadır, rennin isə gövsəyən heyvanların maddəsinin qurşaq hissəsində sintez olunan proteazadır. Sənaye miqyasında pepsinəbənzər proteaza *Aspergillus* cinsli göbələklərin müxtəlif növlərindən, renninəbənzər proteaza isə *Mucor* cinsli göbələk növlərindən alınır. Turş proteazalar sintez edən *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. hennebergii*, *A. tamari*, *Penicillium bilaiae*, *P. caseicolum*, *P. griseoroseum*, *Mucor circinellai*des, *Rhizopus oryzae* kimi göbələr

⁶ Madhu, P., Pallan, N. Production of Bacterial acid Protease by submerged fermentation using *Aeromonas caviae* from dairy effluent // Jour. Biotechnol. Bioengineering, – 2018, – V.2, – N1, – P.1-7.

⁷ Huang, Y., Wang, Y., Xu, Y. Purification and characterization of an acid protease from the *Aspergillus hennebergii* HX08 and its potential in traditional fermentation // Jour. Institute of Brewing., – 2017, – V.123, – P.432-441.

⁸ Чубанова, С.В., Семенчукова, Е.А., Валентович, Л.Н. Протеолитические ферменты, применяемые в сыроделии // – Минск: Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты, – 2018. Т. 10, – с. 403-437.

növləri ətraflı öyrənilib.

Qeyd etmək lazımdır ki, proteazaların produsenti kimi sənayedə istifadə olunan kif göbələklərinin istismar dövründə məhsuldarlığı tədricən azalır və minimuma düşə bilər. Buna görə də proteaza sintez edə bilən yüksək aktivliyə malik yeni produsentlərin axtarışına və əldə olunmasına həmişə ehtiyac duyulur.

Tədqiqatın obyektı və predmeti. Tədqiqatın obyektı Azərbaycan torpaqlarından ayrılmış *Aspergillus clavatus* BDU-11, *A. clavatus* BDU-32, *A. clavatus* BDU-91, *Aspergillus flavus* BDU-12, *A. flavus* BDU-44, *Aspergillus fumigatus* BDU-2, *A. fumigatus* BDU-8, *A. fumigatus* BDU-48, *Aspergillus niger* BDU-6, *A. niger* BDU-15, *A. niger* BDU-28, *A. niger* BDU-42, *Aspergillus terreus* BDU-18, *A. terreus* BDU-38, *A. terreus* BDU-64, *Aspergillus versicolor* BDU-16, *A. versicolor* BDU-21, *A. versicolor* BDU-42, *Penicillium albo-roseum* BDU-A2, *P. albo-roseum* BDU-16, *P. albo-roseum* BDU-LK22, *Penicillium chrysogenum* BDU-A22, *Penicillium corelueum* BDU-A18, *P. corelueum* BDU-L11, *Penicillium lividum* BDU-M6, *P. lividum* BDU-LK14, *Penicillium notatum* BDU-M5, *Penicillium olivaceum* BDU-A21, *P. olivaceum* BDU-LK-17, *P. olivaceum* BDU-M8, *Penicillium ramosum* BDU-A19, *P. ramosum* BDU-LK27, *P. ramosum* BDU-M5, *Penicillium spinolosum* BDU-L34, *P. spinolosum* BDU-M132, *Penicillium subcinereum* BDU-L16, *P. subcinereum* BDU-M21, *Penicillium turbatum* BDU-A117, *P. turbatum* BDU-M35, *Penicillium vinaceum* BDU-A13, *P. vinaceum* BDU-L15, *P. vinaceum* BDU-M20 göbələk ştamlları olmuşdur.

Tədqiqatın predmeti kif göbələklərinin proteolitik aktivliyini üzə çıxarmaq və onları turş pH 2,5, turş pH 5,5, neytral (pH 7,2) və qələvi (pH 9,5) proteazaların produsentləri kimi xarakterizə etmək olmuşdur.

Tədqiqatın məqsəd və vəzifələri. Dissertasiya işinin məqsədi Azərbaycan ərazisində yayılmış turş proteaza aktivliyinə malik kif göbələklərin skriningini aparmaq və yüksək aktivliyə malik produsentlər əldə etmək olmuşdur.

Göstərilən məqsədə çatmaq üçün qarşıya aşağıdakı vəzifələr qoyulmuşdur:

1. Azərbaycan ərazisindən götürülmüş torpaq və bitki nümunələrindən kif göbələklərinin təmiz kulturalarını almaq və onları böyümə sürətinə görə qiymətləndirmək;

2. Yüksək böyümə əmsalına malik kif göbələklərini ümumi proteolitik aktivliyinə əsasən qiymətləndirmək və aktiv produsentləri seçmək;

3. Seçilmiş aktiv produsentləri turş (pH 2,5 və pH 5,5), neytral və qələvi proteazaların aktivliyinə görə qiymətləndirmək və onların identifikasiyasını aparmaq;

4. Yüksək turş proteaza aktivliyinə malik göbələk ştamlarında enzimin sintezinə mühit amillərinin təsirini öyrənmək;

5. Yüksək aktivlik göstərən göbələk ştamlarından nisbi təmizlənmiş turş proteaza preparatlarını almaq;

6. Alınmış turş proteaza preparatlarının bəzi biotexnoloji xassələrini (temperatur və pH optimumu, termostabiliyi, turşuya davamlığı) öyrənmək.

Tədqiqatın metodları. Kif göbələklərinin torpaq və bitki nümunələrindən ayrılması, təmiz kulturaların əldə olunması, onların böyümə əmsalına görə qiymətləndirilməsi ümumi qəbul olunmuş mikrobioloji metodlarla aparılmışdır. Göbələk ştamlarının identifikasiyası müvafiq təyinedicilər əsasında həyata keçirilmişdir. Seçilmiş ştamların ümumi proteolitik aktivliyi viskozimetrik metodla təyin olunmuş, kapillyarın diametri 0,8 mm olan Osvald viskozimetrindən və substrat kimi jelatindən istifadə olunmuşdur. Yüksək proteolitik aktivlik göstərən ştamlarda turş (pH 2,5 və pH 5,5), neytral (pH 7,2) və qələvi (pH 9,5) proteazaların aktivliyi modifikasiya olunmuş Anson metodu ilə təyin olunmuş və substrat kimi kazein istifadə olunmuşdur. Nisbi təmiz proteaza preparatları göbələyin kultural mayesindən aseton, etanol və $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vasitəsilə çökdürməklə alınmışdır. Turş proteaza preparatlarının optimum temperaturu və turşuluğu, termostabiliyi və turşuya davamlığı ümumi qəbul olunmuş metodlarla təyin olunmuşdur. Bütün təcrübələr 4 təkrarda aparılmış və alınmış faktiki rəqəmlər statistik işlənmişdir.

Müdafiyyə çıxarılan əsas müddəalar:

1. Yüksək inkişaf sürətinə malik kif göbələyi ştamları yüksək proteolitik aktivlik göstərilər. Aktiv produsentlər kimi seçilmiş *Aspergillus* və *Penicillium* cinsli göbələklərdə turş (pH 5,5) proteaza aktivliyi neytral və qələvi proteazaların aktivliyindən xeyli yüksəkdir;

2. Tədqiq olunan *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 göbələk ştamlarında proteazalar birincili metabolit kimi eksponensial fazada konstitutiv yolla sintez olunurlar;

3. Yüksək proteolitik aktivliyə malik *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarında turş proteazanın optimal biosintez şəraiti fərqlidir;

4. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tədqiq olunmuş kif göbələyi ştamlarından nisbi təmiz proteaza preparatlarını almaq üçün optimal çökdürücü agentdir;

5. *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarından alınmış turş proteaza preparatları temperatura və turşuluğa münasibətə görə fərqlidirlər.

Tədqiqatın elmi yeniliyi. Azərbaycan ərazisindən ayrılmış, yüksək proteolitik aktivliyə malik olan *Aspergillus* və *Penicillium* cinsli göbələklər pH 2,5 və pH 5,5 turş, neytral (pH 7,2) və qələvi (pH 9,5) proteazalar sintez etmək qabiliyyətinə malik olmuşlar. Turş (pH 5,5) proteazanın aktivliyi neytral və qələvi proteazaların aktivliyindən əhəmiyyətli dərəcədə çox olmuşdur.

Müəyyən edilmişdir ki, *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarında proteazalar aktiv sürətdə eksponensial fazada birincili metabolit kimi konstitutiv olaraq sintez olunurlar.

Göstərilmişdir ki, *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamında turş proteazaların optimal biosintez temperaturu (35°C) göbələyin optimal inkişaf temperaturundan (30°C) fərqlidir, lakin *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamında turş proteazaların optimal biosintez temperaturu (30°C) göbələyin optimal inkişaf temperaturu (30°C) ilə üst-üstə düşür.

Müəyyən edilmişdir ki, aktiv produsentlərdən alınmış turş proteazalar temperatura və turşuluğa münasibətə görə fərqlidirlər. Belə ki, *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınmış turş (pH 5,5) proteazanın maksimum aktivliyi 60°C temperaturda və pH 4,5 turşuluqda qeydə alınmış, enzim 3 saat müddətində 40-60°C temperatura və pH 3,5-6,5 turşuluğa davamlı olmuşdur. *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamından alınmış turş proteazanın optimum aktivliyi 55°C və pH 5,0 göstəricilərində müşahidə olunmuş, enzim 3 saat müddətində 40-50°C temperatura və pH 3,5-5,5 turşuluğa davamlıq göstərmişdir.

Tədqiqatın nəzəri və praktiki əhəmiyyəti. *Aspergillus* və *Penicillium* cinsli göbələklərin proteolitik aktivliyi ilə bağlı əldə olunmuş nəticələr bu göbələklərin enzimatik xassələri haqqında olan bilikləri zənginləşdirir. Turş (pH 5,5) proteaza preparatlarının temperatura və turşuluğa münasibətinə aid əldə olunmuş elmi nəticələr proteolitik enzimlərin mənşəyindən asılı olaraq biotexnoloji xassələrinin çox fərqli ola bildiyini göstərir.

Turş proteazaların biosintez prosesinin optimallaşdırılması nəticəsində *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamında enzimin xüsusi aktivliyi 115 vahiddən 142 vahidə qədər, *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamında isə – 226 vahiddən 277 vahidə qədər artmışdır. Alınan nəticələr bu göbələklərdən turş proteazaların produsentləri kimi istifadə etmək imkanı verir.

Müəyyən edilmişdir ki, turş proteazaların kultural mühitdən (NH₄)₂SO₄ və asetonla çökdürülməsi zamanı, onların aktivliyi kultural mühitlə müqayisədə, müvafiq olaraq, 2,2-2,3 və 1,7-1,8 dəfə artmış, etanol çökdürücü amil kimi səmərəsiz olmuş, hətta enzimlərin aktivliyini, kultural mühitlə müqayisədə 1,3-1,5 dəfə azaltmışdır. Əldə olunan bu nəticələr, kif göbələklərindən turş proteaza preparatlarının alınmasında çökdürücü agentlərin düzgün seçilməsi üçün istifadə oluna bilər.

Göbələklərdən alınmış turş proteaza preparatlarının aktivliyinin optimum temperaturu, optimum turşuluğu (pH), termostabilliyi və turşuluğa davamlığı kimi biotexnoloji xassələrinin öyrənilməsi onlardan müxtəlif məqsədlə tətbiq olunmasına yol açır.

Dissertasiyanın aprobasiyası və tətbiqi. Dissertasiya mövzusunə aid 7 məqalə və 8 tezis çap olunmuşdur. Dissertasiyanın materialları Azərbaycan xalqının böyük oğlu, Ulu öndər Heydər Əliyevin anadan olmasının 94-cü ildönümünə həsr olunmuş gənc alimlərin və tədqiqatçıların «Müasir biologiyanın innovasiya problemləri» mövzusunda VII Beynəlxalq elmi konfransda (Bakı, 27-28 aprel, 2017), «Heydər Əliyev irsi: Müasir dövrdə islam həmrəyliyi» mövzusunda Beynəlxalq elmi-praktiki konfransda (Bakı, 10 may, 2017), akademik Həsən Əliyevin 110 illik yubileyinə həsr olunmuş «Ekologiya: təbiət və cəmiyyət problemləri» III Beynəlxalq elmi konfransda (Bakı, 26-27 dekabr, 2017), Azərbaycan xalqının böyük oğlu, ulu öndər Heydər Əliyevin anadan olmasının 95-ci ildönümünə həsr olunmuş gənc alimlərin və tədqiqatçıların «Müasir biologiyada innovativ yanaşmalar» mövzusunda VIII Beynəlxalq elmi konfransda (Bakı, 27-28 aprel, 2018), «Müasir dövrdə Heydər Əliyev dövlətçilik modeli: reallıqlar və faktlar» mövzusunda Beynəlxalq elmi-praktiki konfransda (Bakı, 8 may, 2018), Bakı Dövlət Universitetinin 100 illiyinə həsr olunmuş «Müasir Biologiyada innovativ yanaşmalar» mövzusunda IX Beynəlxalq elmi konfransda (Bakı, 24-25 may, 2019), professor Y.K. Fomiçova həsr olunmuş «Биотехнология микроорганизмов» adlı Beynəlxalq elmi-praktiki konfransda (Minsk, 27-29 noyabr, 2019), «Modern Science: Innovations and Prospects» adlı I Beynəlxalq elmi və praktiki konfransda (Stockholm, 10-12 oktyabr, 2020) məruzə edilmişdir.

Dissertasiya işinin yerinə yetirildiyi təşkilatın adı. Odlar Yurdu Universitetinin «Kimya, biologiya və ekologiya» kafedrası, Bakı Dövlət Universitetinin «Mikrobiologiya və virusologiya» elmi-tədqiqat laboratoriyası.

Dissertasiyanın quruluşu və işarə ilə götürülmüş ümumi həcmi. Dissertasiya işi girişdən və 5 fəsildən, nəticələrin yekun təhlilindən, nəticələrdən və istifadə olunmuş ədəbiyyat siyahısından ibarətdir. Dissertasiya cədvəllər, qrafiklər və ədəbiyyat siyahısı da daxil olmaqla 160 səhifədən ibarətdir ki, bu da ümumilikdə 251937 işarə təşkil edir.

DİSSERTASIYANIN QISA MƏZMUNU

I FƏSİL

MİKROORQANİZMLƏRİN PROTEOLİTİK AKTİVLİYİ

Dissertasiyanın 1.1-ci bölməsində proteolitik enzimlərin funksiyaları, təsnifatı və sənayedə, biotexnologiyada, təbabətdə əhəmiyyəti barədə ümumi məlumat verilir. Dissertasiyanın 1.2-ci bölməsində bakteriyaların proteolitik aktivliyi, neytral və qələvi proteazaların əsas produsentləri kimi bakteriyaların xarakteristikası; 1.3-cü bölməsində bazidiumlu göbələklərin proteolitik aktivliyi və onların sintez etdikləri proteazaların xarakteristikası; 1.4-cü bölməsində maya göbələklərinin proteolitik aktivliyi araşdırılır. Dissertasiyanın 1.5-ci bölməsində kif göbələklərinin proteolitik aktivliyi, onların sintez etdikləri qələvi, neytral və turş proteazaların biotexnoloji xarakteristikası, proteolitik enzim preparatların əsas produsentləri, proteazaların termostabilliyi və turşuluğa davamlığı kimi xüsusiyyətləri analiz edilir.

İŞİN MATERIAL VƏ METODLARI

II FƏSİL

2.1. Kif göbələklərinin təmiz kulturalarının təbiətdən ayrılması və onların identifikasiya metodları. Tədqiqatın əsas obyektini Azərbaycanın ərəzilərindən götürülmüş torpaqlardan və çürüməkdə olan bitki qalıqlarından ayrılmış kif göbələkləri olmuşdur. Göbələklərin təbii substratlardan ayrılması, təmiz kulturaya çıxarılması və onların morfo-kultural xassələrinin öyrənilməsi üçün standart maye və aqarlı səməni şirəsi qidalı mühitindən istifadə olunmuşdur. Kif göbələklərinin identifikasiyası üçün onların mikroskopda morfoloji əlamətləri: «*forması, ölçüsü, hiylərdə arakəsmənin olması, sporların forması və ölçüsü, spordaşıyıcıların forması, ölçüsü və rəngi*»⁹ qeyd olunmuşdur. Duru və bərk qidalı mühitlərdə kultural əlamətləri: koloniyanın rəngi, səthinin və kənarlarının forması, konsistensiyası və reverzumu, duru

⁹ Nagamani, A., Kanwar, I., Manoharachary, C. Hand book of soil fungi. – LK. International Pvt. Ltd, – 2006, – 386p.

qidalı mühitdə bitmə xarakteri öyrənilmişdir.

2.2. Göbələk kulturalarının inkişaf sürətinin təyin olunması üsulu. Göbələk kulturalarının ilkin qiymətləndirilməsi onların inkişaf sürətinə görə aparılmışdır. Bunun üçün göbələklərin, modifikasiya olunmuş aqarlı Çapek-Doks qidalı mühitində «böyümə əmsalı məlum düstur əsasında»¹⁰ təyin edilmişdir.

2.3. Göbələk kulturalarının ümumi proteolitik aktivliyinin təyini metodu. Kulturaların ümumi proteolitik aktivliyi viskozimetrik üsulla təyin edilmiş və «enzimin substratı kimi jelatinin 2,75%-li məhlulu»¹¹ istifadə olunmuşdur. Bu məqsədlə kapilyarının diametri 0,8 mm olan Osvald viskozimetrindən istifadə olunmuşdur. Jelatinin hidroliz dərəcəsi təcrübə variantında reaksiyon qarışıqın özlülüyünün azalmasına əsasən tapılmışdır. Enzimin aktivlik vahidi %/dəq/mq zülal (və ya V/mq zülal) kimi ifadə olunmuşdur.

2.4. Turş, neytral və qələvi proteazaların təyini metodları. Turş (pH 2,5 və pH 5,5), neytral (pH 7,2) və qələvi (pH 9,5) «proteazaların aktivliyi modifikasiya olunmuş Anson metodu»¹² ilə təyin olunmuşdur. Enzimin substratı kimi kazeinin (natrium kazeinatın) 2%-li məhlulu istifadə olunmuşdur. Aktivlik vahidi kimi enzimin elə miqdarı götürülmüşdür ki, 37°C temperaturda 1 dəq ərzində kazeini 1 mkmol tirozinə (0,181 mq) çevirə bilir. Enzidlərin aktivliyi mkmol/dəq/mq zülal (və ya V/mq zülal) kimi ifadə edilmişdir.

Proteazaların biosintezinə temperaturun, mühit turşuluğunun, karbon və azot mənbələrinin təsiri öyrənilməklə biosintez prosesi optimallaşdırılmışdır.

2.5. Nisbi təmizlənmiş proteazaların bəzi biotexnoloji xassələrinin təyini metodları. Proteazaların bəzi biotexnoloji xassələrini (temperatur optimumunu, termostabilliyini, pH optimumunu və

¹⁰Бухало, А.С. Высшие съедобные бизидиомицеты в чистой культуре / А.С.Бухало. – Киев: Наукова Думка, – 1988. – 143с.

¹¹Chopra, S., Mehta, P. Influence of various nitrogen and carbon sources on the production of pectolytic, cellulolytic and proteolytic enzymes by *Aspergillus niger* // Folia microbiol., – 1985. – V. 30, – N2, – P.117-125.

¹²Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов / И.В.Грачева, Ю.П.Грачев, М.С. Мосичев [и др.]. – Москва: Легкая и пищевая промышленность, – 1982. – 240с.

turşuluğa (pH) davamlığını) öyrənmək üçün nisbi təmizlənmiş enzimdən istifadə olunmuşdur. Bunun üçün proteazalar kultural mayedən etil spirti, aseton və $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ məhlulu ilə çökdürülmüşdür.

Bütün təcrübələr 4 təkrarda qoyulmuş və alınan nəticələr «statistik»¹³ işlənmişdir.

III FƏSİL

AZƏRBAYCAN TORPAQLARDAN KİF GÖBƏLƏKLƏRİN TƏMİZ KULTURALARININ ALINMASI VƏ ONLARIN PROTEOLİTİK AKTİVLİYİNİN QIYMƏTLƏNDİRİLMƏSİ

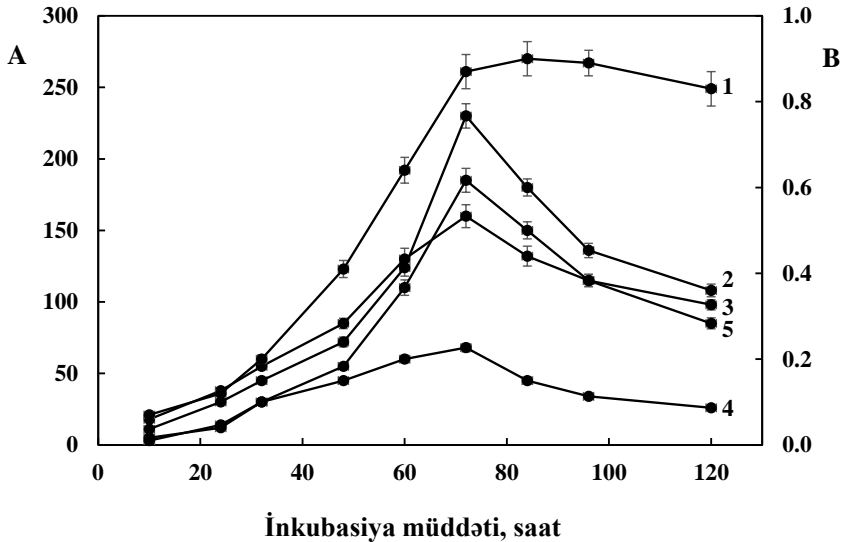
3.1. Kif göbələklərinin təmiz kulturalarının alınması və onların inkişaf sürətinə görə qiymətləndirilməsi. Azərbaycanın müxtəlif ərazilərindən 135 torpaq və 25 çürüməkdə olan bitki nümunələri götürülmüşdür, onlardan 142 kif göbələri ştamlarının təmiz kulturaları alınmış və kulturalar böyümə sürətinə (əmsalına) görə qiymətləndirilmişdir. Yüksək böyümə sürətinə malik olan ştamların cins və növ tərkibi müəyyən edilmiş, onların 18-i *Aspergillus* cinsinə (*A. clavatus* – 3 ştam, *A. flavus* – 2 ştam, *A. fumigatus* – 3 ştam, *A. niger* – 4 ştam, *A. terreus* – 3 ştam, *A. versicolor* – 3 ştam) 24-ü *Penicillium* cinsinə (*P. alba-roseum* – 3 ştam, *P. chrysogenum* – 1 ştam, *P. corelueum* – 2 ştam, *P. lividum* – 2 ştam, *P. notatum* – 1 ştam, *P. olivaceum* – 3 ştam, *P. ramosum* – 3 ştam, *P. spinulosum* – 2 ştam, *P. subcinereum* – 2 ştam, *P. turbatum* – 2 ştam, *P. vinaceum* – 3 ştam) aid olduğu müəyyən olunmuşdur. Sonrakı tədqiqatlar böyümə əmsalı 40-dan yuxarı olan bu ştamlarla davam etdirilmişdir.

3.2. *Aspergillus* və *Penicillium* cinsli göbələklərin proteolitik aktivliyinin qiymətləndirilməsi. Yüksək inkişaf sürətinə malik olan *Aspergillus* və *Penicillium* cinsli göbələklərin ümumi proteolitik aktivliyinə görə skriningi aparılmışdır. *Aspergillus* cinsli göbələklərin 6 növünə aid olan 18 ştamın ümumi proteolitik (jelatinaza) aktivliyi öyrənilmiş, *Aspergillus niger* BDU-15 və *A. flavus* BDU-44 ştamlarının maksimum ümumi proteolitik aktivliyə malik olması göstərilmişdir.

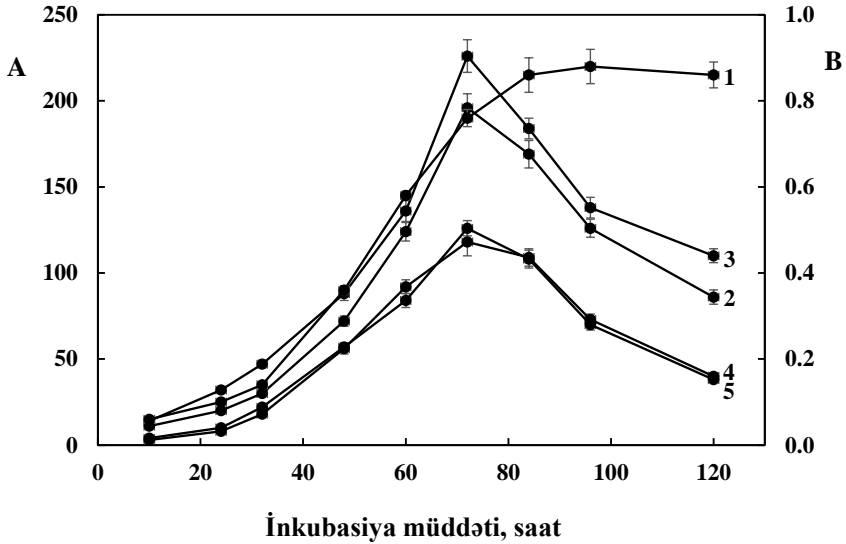
¹³ Кобзарь, А.И. Прикладная математическая статистика / А.И.Кобзарь, – Москва: ФИЗМАТЛИТ, – 2019. – 816с.

Yüksək inkişaf sürətinə malik olan *Penicillium* cinsli göbələklərin 11 növünə aid olan 24 ştamın ümumi proteolitik aktivliyi öyrənilmiş və *Penicillium notatum* BDU-M5 göbələyinin maksimum aktivliyə malik olması göstərilmişdir.

Həm yüksək böyümə sürətinə, həm də yüksək ümumi proteolitik aktivliyə malik *Aspergillus niger* BDU-15, *A. flavus* BDU-44 (qrafik 3.2.1) və *Penicillium notatum* BDU-M5 (qrafik 3.2.2) göbələklərində hüceyrəxarici turş (pH 2,5 və pH 5,5), neytral (pH 7,2) və qələvi (pH 9,5) proteazaların biosintez dinamikası öyrənilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, bütün ştamlarda proteazaların aktiv biosintezi göbələyin eksponensial fazasında – intensiv inkişaf fazasında gedir və maksimum aktivlik inkubasiyanın 72-ci saatında özünü göstərir. İnkubasiyanın 72-ci saatından sonra göbələyin inkişafı zəifləyir və stasionar fazaya keçir. Stasionar fazada enzimlərin aktivliyi kəskin azalır.



Qrafik 3.2.1. *Aspergillus flavus* BDU-44 göbələyində proteazaların biosintezinin dinamikası. A – proteaza aktivliyi, V/mq zülal; B – göbələyin biokütlesi, q/l; 1 – göbələyin inkişafı; 2 – turş proteaza (pH 5,5); 3 – turş proteaza (pH 2,5); 4 – neytral proteaza (pH 7,2); 5 – qələvi proteaza (pH 9,5)



Qrafik 3.2.2. *Penicillium notatum* BDU-M5 göbələyində proteazaların biosintezinin dinamikası. A – proteaza aktivliyi, V/mq zülal; B – göbələyin biokütləsi, q/l; 1 – göbələyin inkişafı; 2 – turş proteaza (pH 5,5); 3 – turş proteaza (pH 2,5); 4 – neytral proteaza (pH 7,2); 5 – qələvi proteaza (pH 9,5)

Qeyd etmək lazımdır ki, tədqiq olunan ştamlarda turş proteazaların aktivliyi neytral və qələvi proteazaların aktivliyindən yüksək olmuşdur. Məsələn, *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamında turş proteazaların aktivliyi neytral və qələvi proteazaların aktivliyindən, müvafiq olaraq, 3,4 və 1,5 dəfə, *A. niger* BDU-15 ştamında – 1,8 və 1,3 dəfə, *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamında – 1,8 və 1,9 dəfə çox olmuşdur. Deməli, seçilmiş ştamlarda turş proteazaların aktivliyi neytral və qələvi proteazaların aktivliyindən əhəmiyyətli dərəcədə yüksək olmuşdur. *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarında proteazaların aktivliyi *Aspergillus niger* BDU-15 ştamının proteazalarının aktivliyindən 1,7-3,2 dəfə çox olmuşdur. Bununla bağlı olaraq, sonrakı tədqiqatlar *A. flavus* BDU-44 və *P. notatum* BDU-M5 ştamları ilə davam etdirilmişdir.

IV FƏSİL

YÜKSƏK PROTEOLİTİK AKTİVLİYƏ MALİK GÖBƏLƏKLƏRDƏ TURŞ PROTEAZALARIN BİOSİNTEZİNƏ MÜHİT AMİLLƏRİNİN TƏSİRİ

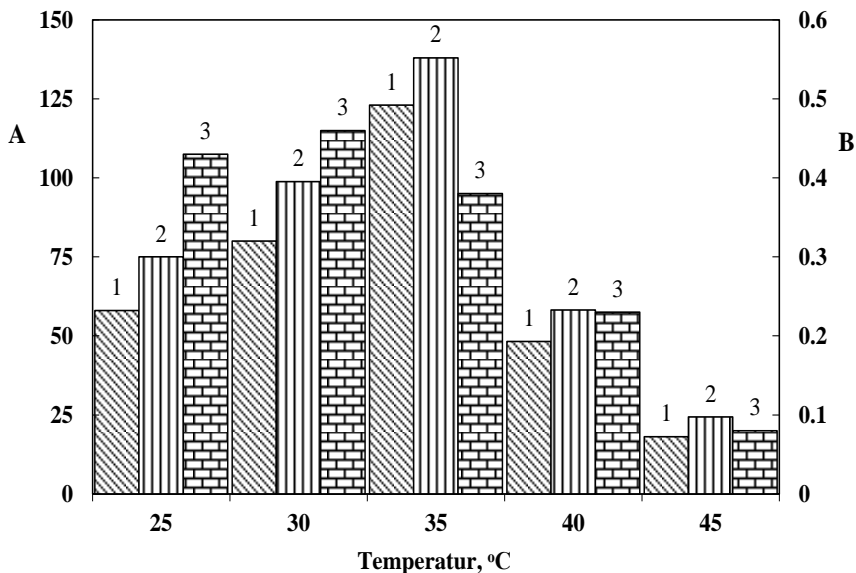
Üçüncü fəsildə təqdim olunan nəticələr göstərdi ki, yüksək proteolitik aktivliyə malik göbələklər turş, neytral və qələvi proteazaları sintez etmək qabiliyyətinə malik olsalar da, turş proteazaların aktivliyi neytral və qələvi proteazaların aktivliyindən əhəmiyyətli dərəcədə yüksəkdir. Buna görə də *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarında turş proteazaların biosintezinə mühit amillərinin (inkubasiya müddətinin, temperaturun, mühit turşuluğunun, karbon mənbələrinin, üzvi və qeyri-üzvi azot mənbələrinin) təsiri öyrənilmişdir.

Qeyd etmək lazımdır ki, *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarının böyümə əmsalı da tədqiq edilən digər ştamların böyümə əmsallarından xeyli dərəcədə yüksək olmuşdur.

4.1. *Aspergillus flavus* BDU-44 göbələyində turş proteazaların biosintezinə mühit amillərinin təsiri. *Aspergillus flavus* BDU-44 göbələyində turş proteazaların biosintezinə inkubasiya müddətinin təsiri öyrənilmiş və müəyyən edilmişdir ki, həm pH 2,5, həm də pH 5,5 turş proteazaların intensiv biosintezi inkubasiyanın 24-cü saatında başlayır və 72-ci saatında maksimuma çatır. Bu halda aktivlik 6,8 dəfə artmış olur. İnkubasiyanın 72-ci saatından sonra inkişafın stasionar fazası başlayır, enzimlərin biosintezi tədricən zəifləyir və 120-ci saatda enzimlərin aktivliyi 1,4-1,6 dəfə azalmış olur. İnkubasiyanın 24-cü saatında turş pH 5,5 proteazanın aktivliyi turş pH 2,5 proteazanın aktivliyindən 1,4 dəfə çox olmuşdur. Çox güman ki, birinci enzimin aktiv biosintezi ikinci enzimin sintezindən tez başlayır.

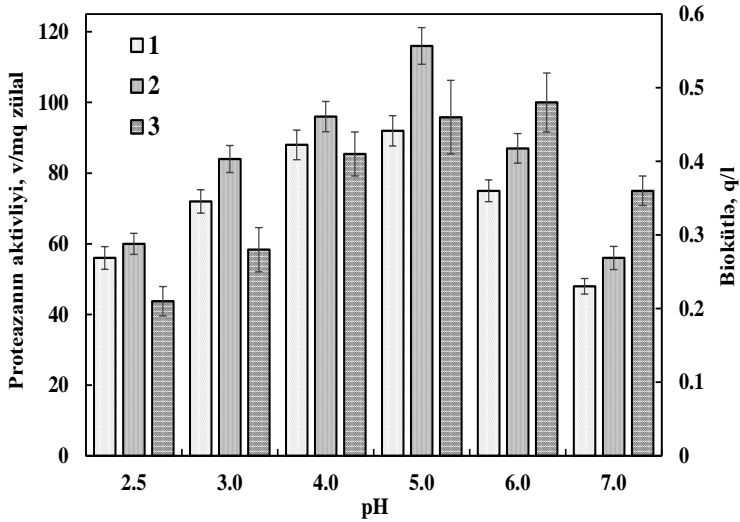
Aspergillus flavus BDU-44 ştamında turş proteazaların biosintezinə temperaturun təsirinin öyrənilməsi göstərdi ki, enzimlərin maksimum biosintezi 35°C temperaturda baş verir, baxmayaraq ki, göbələyin maksimum inkişafı 30°C temperaturda özünü göstərir (qrafik 4.1.1).

Temperatur 35°C həddindən yuxarı qalxdıqca enzimlərin aktivliyi kəskin azalır. Belə ki, 45°C temperaturda turş pH 2,5 və pH 5,5 proteazaların aktivliyi 35°C temperaturdakı aktivlikdən, müvafiq olaraq, 6,8 və 5,8 dəfə az olmuşdur. Deməli, *A. flavus* BDU-44 ştamında turş proteazaların maksimum biosintezi 35°C temperaturda müşahidə olunur və göbələyin optimum inkişaf temperaturu ilə üst-üstə düşür.



Qrafik 4.1.1. *Aspergillus flavus* BDU-44 göbələyində turş proteazaların biosintezinə temperaturun təsiri. A – proteaza aktivliyi, V/mq zülal; B – göbələyin biokütləsi, q/l; 1 – turş proteaza (pH 2,5); 2 – turş proteaza (pH 5,5); 3 – göbələyin inkişafı.

Mühit turşuluğunun *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamının inkişafına və turş proteazaları sintez etməsinə təsirinin öyrənilməsi göstərdi ki, enzimlərin yüksək aktivliyi pH 4,0-5,0 intervalında, maksimum aktivliyi isə pH 5,0 göstəricisində olmuşdur (qrafik 4.1.2). Turş pH 5,5 proteazanın maksimum aktivliyi, pH 2,5 proteazanın maksimum aktivliyindən 1,3 dəfə çox olmuşdur.

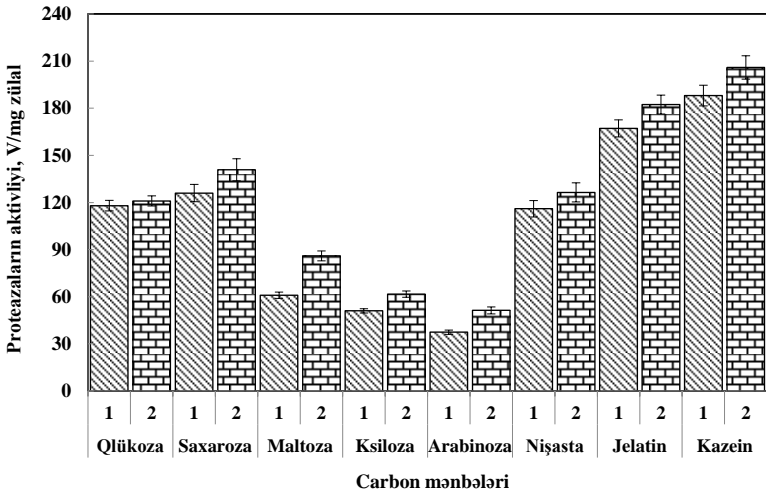


Qrafik 4.1.2. *Aspergillus flavus* BDU-44 göbələyində turş proteazaların biosintezinə mühit turşuluğunun (pH) təsiri. 1 – pH 2,5 turş proteaza, 2 – pH 5,5 turş proteaza, 3 – göbələyin inkişafı.

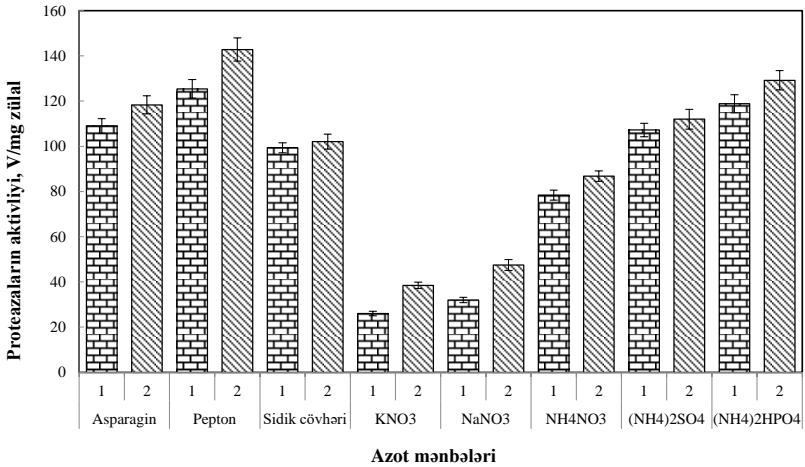
Aspergillus flavus BDU-44 ştamının turş proteazalar sintez etməsinə karbon mənbəyi kimi şəkərlərin, jelatinin və kazeinin təsiri öyrənilmişdir. Şəkərlərdən saxaroza və qlükoza olan mühitlərdə enzimlərin yüksək aktivliyi müşahidə olunmuş, lakin maksimum aktivlik saxaroza olan mühitdə qeydə alınmışdır (qrafik 4.1.3). Kazein və jelatin, proteazaların əsas substratları kimi şəkərlərə nisbətən enzimlərin aktivliyini, müvafiq olaraq, 1,4-4,0 və 1,3-3,6 dəfə artırma bilmişdir. Turş proteazaların tədqiq olunan bütün substratlarında biosintez olunması və onların mümkün induktorları (kazein və jelatin) olan mühitdə aktivliyin az miqdarda artması onu göstərir ki, bu enzimlərin biosintezi konstitutiv xarakter daşıyır.

Aspergillus BDU-44 ştamında azot mənbələrinin turş proteazaların biosintezinə təsirinin öyrənilməsi göstərdi ki, üzvi azot mənbələri (asparagin, pepton və sidik cövhəri) olan mühitdə enzimlərin aktivliyi yüksək olmuş, lakin maksimum aktivlik pepton olan mühitdə özünü büruzə vermişdir. Qeyri-üzvi azot mənbələrindən ammonium duzları yüksək aktivliyə səbəb olmuş və maksimum aktivlik $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ olan

mühitdə müşahidə olunmuşdur. KNO_3 və $NaNO_3$ olan mühitlərdə enzimlərin aktivliyi ammonium duzlarına nisbətən, müvafiq olaraq, 2,3 və 3,4 dəfə az olmuşdur (qrafik 4.1.4).

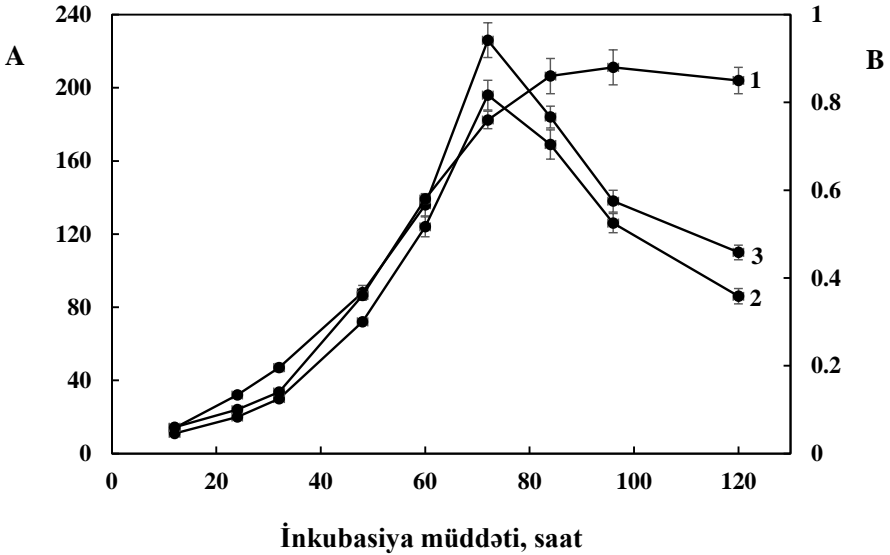


Qrafik 4.1.3. *Aspergillus flavus* BDU-44 göbələyində turş proteazaların biosintezinə karbon mənbələrinin təsiri: 1 – pH 2,5 turş proteaza, 2 – pH 5,5 turş proteaza.



Qrafik 4.1.4. *Aspergillus flavus* BDU-44 göbələyində turş proteazaların biosintezinə azot mənbələrinin təsiri: 1 – pH 2,5 turş proteaza; 2 – pH 5,5 turş proteaza.

4.2. *Penicillium notatum* BDU-M5 göbələyində turş proteazaların biosintezinə mühit amillərinin təsiri. *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamında turş proteazaların biosintezinə inkubasiya müddətinin təsiri göbələyin inkişaf dinamikası boyu öyrənilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, turş proteazaların intensiv biosintezi inkubasiyanın 36-cı saatında başlamış və 72-ci saatında maksimuma çatmışdır. Göbələyin intensiv inkişaf (eksponensial) fazası 84-cü saata qədər davam etməsinə baxmayaraq enzimlərin biosintez prosesi kəskin azalmış və 120-ci saatda 2,1 dəfə aşağı düşmüşdür (qrafik 4.2.1).



Qrafik 4.2.1. *Penicillium notatum* BDU-M5 göbələyində turş proteazaların biosintez dinamikası: A – proteaza aktivliyi, V/mq zülal; B – göbələyin biokütləsi, q/l; 1. göbələyin böyümə əyrisi; 2. pH 2,5 turş proteaza; 3. pH 5,5 turş proteaza.

Temperaturun *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamında turş proteazaların biosintezinə təsirinin öyrənilməsi göstərdi ki, enzimlərin maksimum biosintezi 30°C temperaturda, yəni göbələyin maksimum inkişaf temperaturunda baş verir.

Penicillium notatum BDU-M5 göbələyində turş proteazaların biosintezinə və göbələyin inkişafına turşuluğun pH 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 və 7,0 göstəricilərinin təsiri öyrənilmişdir. Turşuluğun bütün göstəricilərində göbələk inkişaf etmiş və enzimləri sintez etmişdir. Göbələyin maksimum biokütləsi pH 5,0 göstəricisində, enzimlərin maksimum biosintezi isə pH 6,0 göstəricisində müşahidə olunmuşdur.

Karbon mənbələrinin *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamında turş proteazaların biosintezinə təsiri tədqiq edilmiş, enzimin yüksək aktivliyi şəkərlərdən qlükoza və saxarozaya olan mühitdə qeydə alınsa da maksimum aktivlik qlükoza olan mühitdə özünü göstərmişdir. Proteazaların substratları olan kazein və jelatində enzimlərin aktivliyi yüksək olsa da şəkərlərdən əhəmiyyətli dərəcədə fərqlənməmişdir. Deməli, *P. notatum* BDU-M5 ştamında da turş proteazaların biosintezi konstitutiv yolla gedir.

Üzvi azot mənbələrindən pepton olan mühitdə, enzimlərin aktivliyi asparagin və sidik cövhərinə nisbətən, 2 dəfə çox olmuşdur. Qeyri-üzvi azot mənbələrinin *Penicillium notatum* ştamında turş proteazaların biosintezinə təsir xarakteri *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamındakı təsire (qrafik 4.1.4) oxşar olmuşdur. Belə ki, ammonium duzları olan mühitdə enzimlərin biosintezi yüksək olmuş və maksimum aktivlik isə $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ olan mühitdə qeydə alınmışdır.

Beləliklə, müəyyən edilmişdir ki, turş proteazaların maksimum biosintezi *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamında inkubasiyanın 72-ci saatında, 35°C temperaturda, turşuluğun pH 5,0 göstəricisində, karbon mənbəyi kimi saxarozada və azot mənbəyi kimi peptonda, *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamında – inkubasiyanın 72-ci saatında, 30°C temperaturda, pH 6,0 göstəricisində, karbon mənbəyi kimi qlükozada və azot mənbəyi kimi peptonda gedir. Deməli, turş proteazaların biosintezinin optimal parametrlərinə görə *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamları iki parametmə (inkubasiya müddətinə və azot mənbəyinə) görə oxşar olmuşlar, lakin optimal temperatura, mühit turşuluğuna və karbon mənbəyinə görə fərqlənmişlər.

V FƏSİL

GÖBƏLƏKLƏRİN KULTURAL MÜHİTİNDƏN ÇÖKDÜRMƏ METODU İLƏ ALINMIŞ TURŞ PROTEAZALARIN BIOTEXNOLOJİ XASSƏLƏRİ

5.1. Çökdürücü agentlərin proteaza aktivliyinə təsiri. Turş proteazaların biotexnoloji xassələrini öyrənmək üçün nisbi təmizlənmiş enzim preparatlarından istifadə olunmuş və bu məqsədlə proteazalar göbələyin kultural mayesindən aseton, etanol və $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilə çökdürülmüşdür. Çökmüş enzimlər kultural mayedən ayrılmış və enzim preparatı kimi istifadə olunmuşdur.

Aspergillus flavus BDU-44 ştamının kultural mayesindən çökdürülmüş enzim preparatında turş, neytral və qələvi proteazaların aktivliyi təyin edilmiş və kultural mayədə olan aktivliklə müqayisə olunmuşdur (cədvəl 5.1.1). Asetonla çökdürülmüş enzim preparatında turş proteazaların aktivliyi 1,7-1,8 dəfə, neytral və qələvi proteazaların aktivliyi isə 1,6-1,7 dəfə kultural mayədəki aktivlikdən çox olmuşdur. Ammonium sulfat ilə çökdürülmüş enzim preparatında turş proteazaların aktivliyi 2,2-2,3 dəfə, neytral və qələvi proteazaların aktivliyi isə 1,8 dəfə kultural mayədəki aktivlikdən yüksək olmuşdur. Eyni zamanda bu preparatda turş proteazaların aktivliyi asetonla çökdürülmüş preparatdakı aktivlikdən 1,2-1,4 dəfə çox olmuşdur. Etanol ilə çökdürmə enzimlərə mənfi təsir göstərmiş və alınmış preparatda proteazaların aktivliyi 1,2-1,5 dəfə kultural mayədəki aktivlikdən az olmuşdur. Deməli, *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamının kultural mayesindən nisbi təmizlənmiş proteazaların alınması üçün $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ən optimal çökdürücü olmuşdur. Bütün variantlarda turş pH 5,5 proteazanın aktivliyi turş pH 2,5, neytral və qələvi proteazaların aktivliyindən 1,5-2,5 dəfə çox olmuşdur.

Qeyd etmək lazımdır ki, *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamının kultural mayesindən asetonla çökdürmə zamanı proteazaların aktivliyi 1,9-2,3 dəfə, etanolla çökdürmədə – 1,5-1,7 dəfə, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilə çökdürmədə 1,2-1,3 dəfə kultural mayədəki aktivlikdən çox olmuşdur. Deməli, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ proteazaların ən səmərəli çökdürücüsü olmuş, etanol isə çökdürücü amil kimi enzimlərin aktivliyinə mənfi təsir göstərməmişdir.

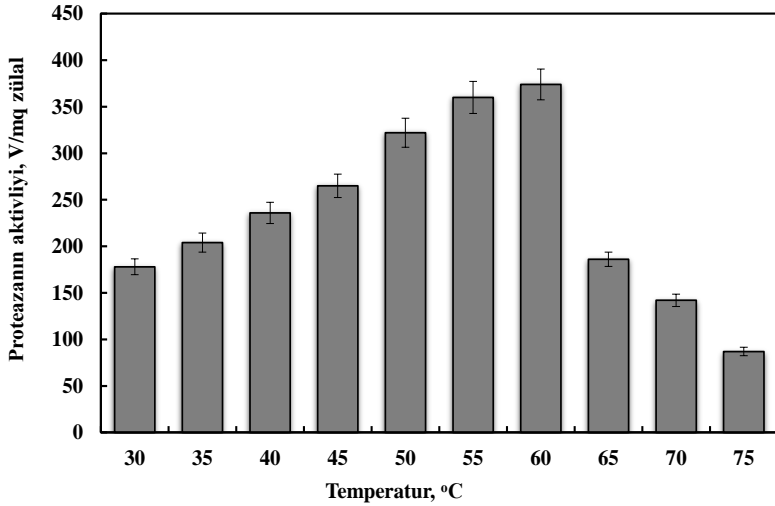
***Aspergillus flavus* BDU-44 göbələyindən
çökdürmə yolu ilə alınmış proteazaların aktivliyi**

Proteazalar	Proteazaların aktivliyi, V/mq zülal			
	Kultural maye	Asetonla çökdürmə	Etanol ilə çökdürmə	(NH ₄) ₂ SO ₄ ilə çökdürmə
pH 2,5 turş proteaza	56±2,4	98±4,2	38±1,5	122±8,2
pH 5,5 turş proteaza	86±3,3	146±56	68±2,0	198±9,4
Neytral proteaza (pH 7,2)	43±2,1	68±3,2	38±1,5	78±3,3
Qələvi proteaza (pH 9,5)	56±2,4	96±4,3	52±1,1	103±4,5

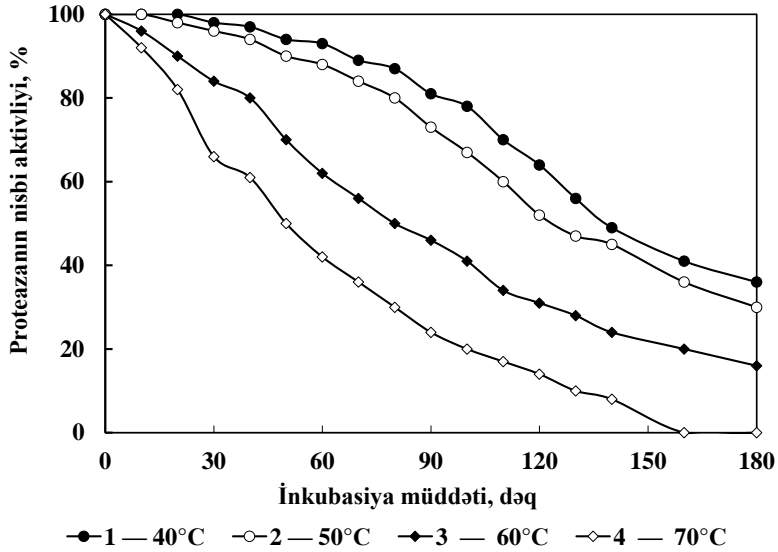
Beləliklə, *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 şamlarının kultural mayesindən nisbi təmizlənmiş proteazaların alınması üçün ən yaxşı çökdürücü (NH₄)₂SO₄ olmuşdur. Etanol *A. flavus* BDU-44 ştamında çökdürücü agent kimi proteazaların aktivliyinə mənfi təsir göstərmişdir.

5.2. *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınmış pH 5,5 turş proteazanın biotexnoloji xassələri *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınmış nisbi təmiz turş (pH 5,5) proteazanın bəzi texnoloji (optimum temperaturu, termostabilliyi, optimum turşuluğu və turşuya davamlığı) xassələri öyrənilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, enzimin yüksək aktivliyi 50-60°C temperaturda, maksimum aktivliyi isə 60°C temperaturda özünü göstərir. Temperatur 60°C-dən yuxarı qalxdıqda enzimin aktivliyi kəskin azalır (qrafik 5.2.1). Turş proteazanın termostabilliyi yüksək olmuş və 40-60°C temperaturda enzim aktivliyini 3 saat saxlaya bilmişdir (qrafik 5.2.2).

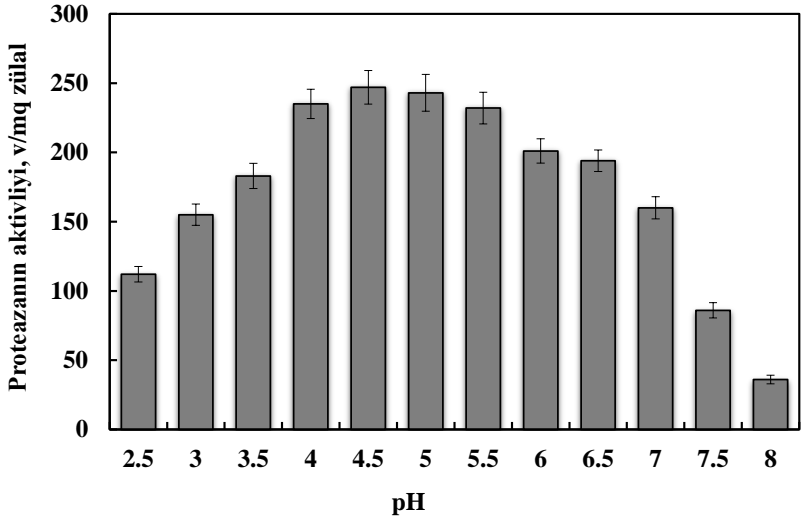
Turş proteazanın aktivliyinə mühit turşuluğunun (pH) təsiri pH 2,5-8,0 intervalında öyrənilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, enzimin yüksək aktivliyi pH 4,0-5,5 intervalında, maksimum aktivliyi isə pH 4,5-5,0 göstəricilərində özünü göstərir (qrafik 5.2.3). Enzim, pH 3,5-6,5 diapazonunda aktivliyini 3 saat müddətində saxlaya bilmişdir (qrafik 5.2.4).



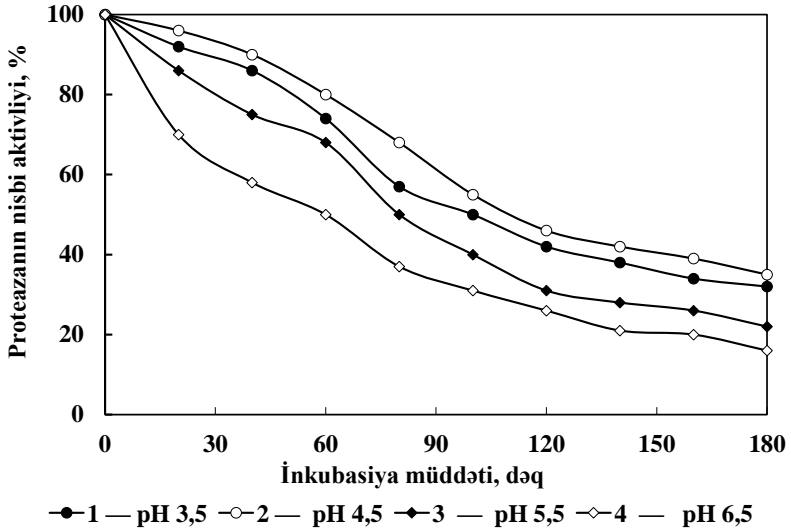
Qrafik 5.2.1. *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınmış turş proteazanın aktiviyinə temperaturun təsiri.



Qrafik 5.2.2. *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınmış turş proteazanın termostabilliyi. 1 — 40°C, 2 — 50°C, 3 — 60°C, 4 — 70°C



Qrafik 5.2.3. *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınmış turş proteazanın aktivliyinə turşuluğun (pH) təsiri

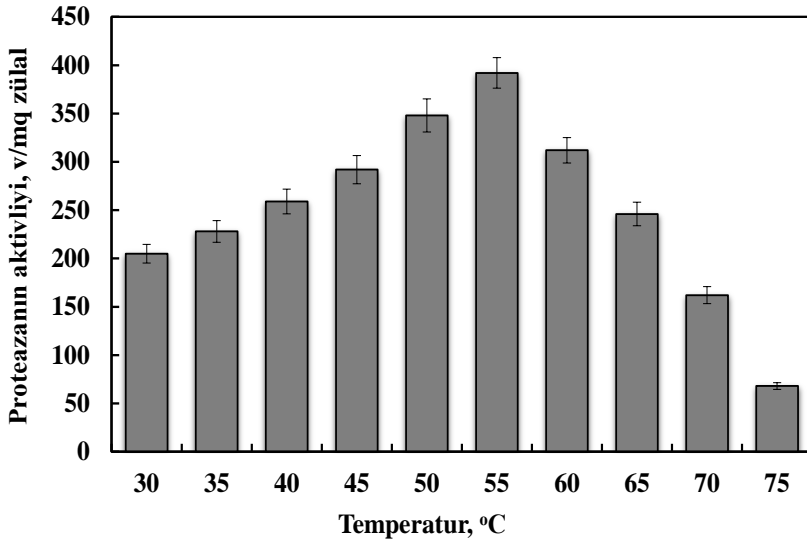


Qrafik 5.2.4. *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınmış turş proteazanın turşuluğa davamlığı. 1 – pH 3,5; 2 – pH 4,5; 3 – pH 5,5; 4 – pH 6,5

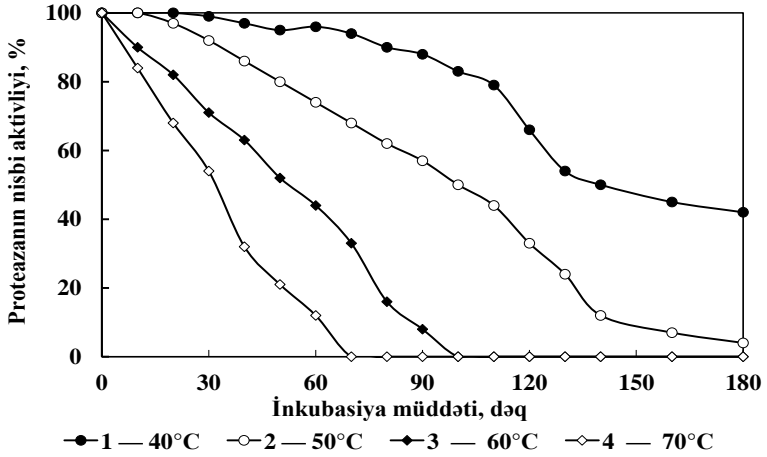
Beləliklə, müəyyən olunmuşdur ki, *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınmış turş proteaza 60°C temperaturda və pH 4,5-5,0 turşuluqda maksimum aktivliyə malik olur. Enzim 40-60°C temperaturda və pH 3.5-6.5 turşuluqda stabilliyini saxlaya bilər.

5.3. *Penicillium notatum* BDU-M5 göbələyindən alınmış turş proteazanın biotexnoloji xassələri. *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamından alınmış turş (pH 5,5) proteazanın temperatura münasibəti 30-75°C intervalında öyrənilmişdir. Enzim, yüksək aktivliyə 50-60°C intervalında, maksimum aktivliyə isə 55°C temperaturda malik olmuş (qrafik 5.3.1), stabilliyini 40-50°C temperaturda 3 saat müddətində saxlaya bilmişdir (qrafik 5.3.2).

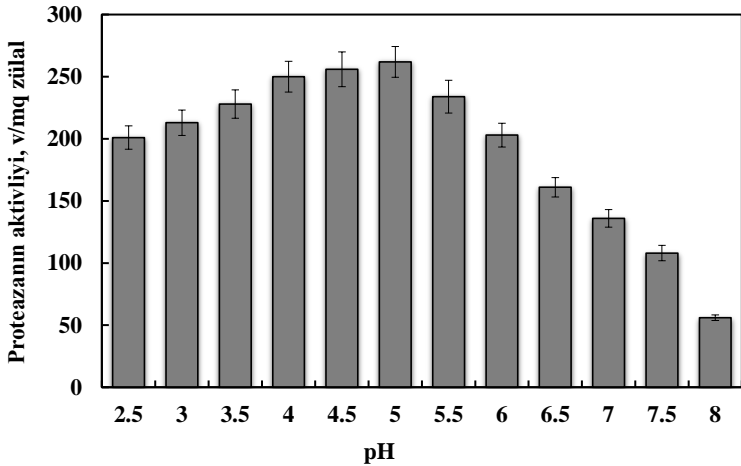
Turşuluğa münasibətinə gəldikdə, müəyyən edilmişdir ki, enzim, pH 3,5-5,5 göstəricilərində yüksək aktivliyə, pH 5,0 göstəricisində isə maksimum aktivliyə malikdir (qrafik 5.3.3). Turşuluğun pH 3,5; 4,5 və 5,5 göstəricilərində enzim aktivliyini saxlaya bilmişdir.



Qrafik 5.3.1. *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamından alınmış turş (pH 5,5) proteazanın aktivliyinə temperaturun təsiri



Qrafik 5.3.2. *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamından ayrılmış turş proteazanın termostabilliyi. 1 – 40°C, 2 – 50°C, 3 – 60°C, 4 – 70°C



Qrafik 5.3.3. *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamından alınmış turş proteazanın aktivliyinə turşuluğun təsiri

Beləliklə, *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamından alınmış turş proteaza maksimum aktivliyinə 55°C temperaturda və pH 5,0 turşuluqda malik olmuş, stabilliyini 40-50°C temperaturda və pH 3,5-5,5 turşuluqda saxlamışdır.

Qeyd etmək lazımdır ki, *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınmış proteaza *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamından alınmış proteazadan bəzi xassələrinə görə fərqlənmişdir. Belə ki, çökdürücü agent kimi etanol *A. flavus* BDU-44 ştamının proteazalarına neqativ təsir göstərərək onların aktivliyini 1,2-1,5 dəfə azaldır. *A. flavus* BDU-44 ştamından alınan turş proteazanın maksimum aktivliyi 60°C temperaturda və pH 4,5 turşuluqda, *P. notatum* BDU-M5 ştamından alınan proteazanın maksimum aktivliyi isə 55°C temperaturda və pH 5,0 turşuluqda müşahidə olunur. *A. flavus* BDU-44 ştamının turş proteazası 40-60°C temperaturda və pH 3,5-6,5 turşuluqda, *P. notatum* BDU-M5 ştamının turş proteazası isə 40-50°C temperaturda və pH 3,5-5,5 turşuluqda stabillik göstərir.

TƏDQIQATIN YEKUN TƏHLİLİ

Tədqiqatın obyektini kimi Azərbaycanın müxtəlif ərazilərindən götürülmüş 135 torpaq və 25 bitki nümunələri, onlardan ayrılmış 142 kif göbələyi ştamları olmuşdur.

Təmiz kultura şəklində alınmış ştamların inkişaf sürəti böyümə əmsalına görə təyin edilmiş və yüksək böyümə sürətinə malik 42 ştam seçilmişdir. Ştamlardan 18-i *Aspergillus* cinsinə, 24-ü isə *Penicillium* cinsinə aid olmuşdur. *Aspergillus* cinsi 6 növlə (*A. clavus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* və *A. versicolor*), *Penicillium* cinsi isə 11 növlə (*P. albo-roseum*, *P. chrysogenium*, *P. corebueum*, *P. Lividum*, *P. notatum*, *P. subcinereum*, *P. turbatum* və *P. vinaceum*) təmsil olunmuşlar.

Yüksək böyümə əmsalına malik göbələk ştamlarının ümumi proteolitik aktivliyinə görə skriningi aparılmışdır. *Aspergillus* cinsli göbələklər içərisindən yüksək proteolitik aktivliyə malik *A. flavus* BDU-44 və *A. niger* BDU-15 ştamları, *Penicillium* cinsli göbələklərdən isə *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamı seçilmişdir.

Yüksək proteolitik aktivlik göstərən *Aspergillus niger* BDU-15, *A. flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarında hüceyrəxarici turş (pH 2,5 və 5,5), neytral (pH 7,2) və qələvi (pH 9,5) proteazaların biosintez dinamikası öyrənilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, tədqiq olunan ştamlarda proteazaların aktiv biosintezi

göbələyin eksponensial inkişaf fazasında baş verir. *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarında proteazaların biosintezi inkubasiyanın 10-cu saatında, *A. niger* BDU-15 ştamında isə 32-ci saatında başlayır. Digər tərəfdən, *A. flavus* BDU-44 və *P. notatum* BDU-M5 ştamlarında turş proteazaların aktivliyi *A. niger* BDU-15 ştamının turş proteazalarının aktivliyindən 3,2-3,5 dəfə çox olmuşdur. Hər üç ştamda turş proteazaların aktivliyi neytral və qələvi proteazaların aktivliyindən çox yüksək olmuşdur. Deməli, bu göbələklərdə turş proteazalar neytral və qələvi proteazalara nisbətən daha aktiv sintez olunur.

Yüksək proteolitik aktivliyə malik *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarında turş proteazalar neytral və qələvi proteazalara nisbətən daha aktiv sintez olunduğu üçün bu ştamlarda turş proteazaların biosintezinə mühit amillərinin (inkubasiya müddətinin, temperaturun, mühit turşuluğunun, karbon və azot mənbələrinin) təsiri öyrənilmişdir. Müəyyən edilmişdir ki, hər iki ştamda turş proteazaların aktiv biosintezi eksponensial fazada baş verir və maksimum aktivlik inkubasiyanın 72-ci saatında üzə çıxır. Lakin *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamında proteazanın aktiv biosintezi inkubasiyanın 24-cü saatında, *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamında isə inkubasiyanın 36-cı saatında başlayır.

Tədqiq edilən *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarını müqayisə etdikdə aydın olur ki, *A. flavus* BDU-44 ştamında turş proteazaların maksimum biosintezi 35°C temperaturda gedir və göbələyin inkişafının optimal temperaturu ilə üst-üstə düşür. Lakin *P. notatum* BDU-M5 ştamında enzimin maksimum biosintezi 30°C temperaturda gedir və göbələyin maksimum inkişaf temperaturu ilə üst-üstə düşür. Bütövlükdə, turş proteazaların maksimum aktivliyi *A. flavus* BDU-44 ştamında inkubasiyanın 72-ci saatında, 35°C temperaturda, turşuluğun pH 5,0 göstəricisində, karbon mənbəyi kimi saxarozada və azot mənbəyi kimi peptonda, lakin *P. notatum* BDU-M5 ştamında – inkubasiyanın 72-ci saatında, 30°C temperaturda, pH 6,0 göstəricisində, karbon mənbəyi kimi qlükozada, azot mənbəyi kimi peptonda gedir. Deməli, turş proteazaların biosintezinin optimal parametrlərinə görə *A. flavus* BDU-44 və *P. notatum* BDU-M5 ştamları

iki əlamətə (inkubasiya müddətinə və azot mənbəyinə) görə oxşar olsalar da, optimal temperatura, turşuluğa və karbon mənbələrinə görə fərqlənmişlər. Hər iki göbələk ştamlarında turş proteazalar göbələyin intensiv inkişaf mərhələsində birinci metabolit kimi sintez olunur və sintez konstitutiv xarakter daşıyır.

Turş proteazaların biosintez şəraitinin optimallaşdırılması sayəsində *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamında enzimin aktivliyi 115 vahiddən 142 vahidə qədər, *Penicillium notatum* ştamında isə 226 vahiddən 277 vahidə qədər artmışdır.

Turş pH 5,5 proteazasının biotexnoloji xassələrini öyrənmək üçün kultural mayedən çökdürülmə yolu ilə nisbi təmizlənmiş enzim preparatları alınmışdır. Turş proteazaların çökdürülməsi üçün optimal çökdürücü amil $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ olmuşdur. *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınmış turş proteazanın maksimum aktivliyi 60°C temperaturda və pH 4,5-5,5 turşuluqda qeyd edilmiş, enzimin termostabilliyi 40-60°C temperaturda, turşuluğa davamlığı isə pH 3,5-6,5 göstəricilərində olmuşdur. *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamından alınmış proteazanın maksimum aktivliyi 55°C temperaturda və pH 6,0 göstəricisində müşahidə olunmuş, enzimin termostabilliyi 40-50°C temperaturda, turşuluğa davamlığı isə pH 3,5-5,5 göstəricilərində olmuşdur.

NƏTİCƏLƏR

1. Azərbaycanın müxtəlif ərazilərindən götürülmüş nümunələrdən ayrılmış 142 kif göbələyi ştamlarının proteolitik aktivliyi öyrənilmiş və yüksək aktivliyə malik *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamları seçilmişdir. Hər iki ştamda turş proteazanın aktivliyi neytral və qələvi proteazaların aktivliyindən 1,5-3,4 dəfə çox olmuşdur.
2. Müəyyən edilmişdir ki, *Aspergillus flavus* BDU-44 və *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamlarında turş (pH 5,5) proteaza birincili metabolit kimi və konstitutiv olaraq sintez olunur. Enzimin maksimum aktivliyi kulturaların inkişafının 72-ci saatında üzvi azot mənbəyi kimi pepton, qeyri-üzvi azot mənbəyi kimi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ olan mühidə özünü göstərmişdir. *A. flavus* BDU-44 ştamında maksimum proteaza aktivliyi 35°C, pH 5,0 və saxaroza,

P. notatum BDU-M5 ştamında isə – 30°C, pH 6,0 və qlükoza olan mühitdə müşahidə olunmuşdur.

3. Turş proteazanın biosintez şəraitinin optimallaşdırılması sayəsində *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamında enzimin aktivliyi 115 V/mq zülal-dan 142 V/mq zülal-a, *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamında isə 226 V/mq zülal-dan 277 V/mq zülal-a qədər artmışdır. *P. notatum* BDU-M5 ştamında turş (pH 5,5) proteazanın aktivliyi *A. flavus* BDU-44 ştamındakı turş proteaza aktivliyindən 2 dəfə çox olmuşdur.
4. Müəyyən edilmişdir ki, həm *Aspergillus flavus* BDU-44, həm də *Penicillium notatum* BDU-M5 göbələklərində nisbi təmiz turş proteaza preparatlarının alınması üçün $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ və aseton səmərəli çökdürücü agentlərdir. Lakin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilə çökdürülmüş preparatda turş proteazanın aktivliyi asetonla çökdürülmüş preparatdakı aktivlikdən 1,4 dəfə çox olmuşdur. Etanol çökdürücü agent kimi *A. flavus* BDU-44 ştamının turş proteazasının aktivliyinə mənfi təsir göstərmişdir.
5. *Aspergillus flavus* BDU-44 ştamından alınan turş proteazanın maksimum aktivliyi 60°C temperaturda və pH 4,5 turşuluqda müşahidə olunmuş və enzim 3 saat müddətində 40-60°C temperatura, pH 3,5-6,5 turşuluğa davamlıq göstərmişdir. *Penicillium notatum* BDU-M5 ştamından alınmış turş proteazanın maksimum aktivliyi 55°C temperatura və pH 5,0 turşuluqda müşahidə olunmuş və enzim 3 saat müddətində 40-50°C temperatura və pH 3,5-5,5 turşuluğa davamlı olmuşdur.

DİSSERTASIYANIN MÖVZUSUNA AİD DƏRC EDİLMİŞ ELMİ ƏSƏRLƏRİN SİYAHISI

1. Səfərova, A.X. Mikroorqanizmlərin proteolitik aktivliyinin öyrənilməsi barədə / Azərbaycan xalqının böyük oğlu, Ulu öndər Heydər Əliyevin anadan olmasının 94-cü ildönümünə həsr olunmuş gənc alimlərin və tədqiqatçıların «Müasir Biologiyanın İnnovasiya Problemləri» mövzusunda VII Beynəlxalq elmi konfransın materialları. Bakı – 2017, – s.134.
2. Səfərova, A.X., Əbdülhəmidova, S.M., Qənbərov, X.Q. Kif

- göbələklərinin təmiz kulturalarının alınması / «Heydər Əliyev irsi: Müasir dövrdə İslam Həmrəyliyi» mövzusunda Beynəlxalq elmi-praktiki konfransın materialları. Bakı – 2017, – s.227.
3. Səfərova, A.X., Şəfiyeva, S.M., Qənbərov, X.Q. Müxtəlif biotoplardan ayrılmış kif göbələklərinin jelatinaza aktivliyi / Akademik Həsən Əliyevin 110 illik yubileyinə həsr olunmuş «Ekologiya: təbiət və cəmiyyət problemləri» III Beynəlxalq elmi konfransın materialları. Bakı – 2017, – s.222-223.
 4. Ганбаров, Х.Г., Сафаров, А.Х., Шафиева, С.М. Протеолитическая активность грибов рода *Aspergillus*, выделенных из почв Азербайджана // Известия Уфимского научного центра РАН, – 2018, – №3 (1), – с. 80-84.
 5. Səfərova, A.X., Şəfiyeva, S.M., Babayeva, İ.T. *Aspergillus niger*-44 kif göbələyinin turş proteazaları / «Müasir dövrdə Heydər Əliyev dövlətçilik modeli: reallıqlar və faktlar» mövzusunda Beynəlxalq elmi-praktiki konfransın materialları. Bakı – 2018, – s.406.
 6. Səfərova, A.X. *Aspergillus* cinsli kif göbələklərin proteolitik aktivliyinin böyümə əmsalına görə təyin edilməsi / Azərbaycan xalqının böyük oğlu, Ulu öndər Heydər Əliyevin anadan olmasının 95-ci ildönümünə həsr olunmuş gənc alimlərin və tədqiqatçıların «Müasir biologiyada innovativ yanaşmaları» mövzusunda VIII Beynəlxalq elmi konfransın materialları. Bakı – 2018, – s.99.
 7. Səfərova, A.X., Şəfiyeva, S.M., Ağayeva, N.A., Qənbərov, X.Q. *Penicillium* cinsli göbələklərin proteolitik aktivliyi // AMEA-nın Mikrobiologiya İnstitutunun elmi əsərləri, – Bakı, – 2018, – c.16, №1, – s.48-53.
 8. Səfərova, A.X. Mineral azot mənbələrinin *Aspergillus flavus* BDU-44 kif göbələyinin proteolitik aktivliyinə təsiri / Bakı Dövlət Universitetinin 100 illiyinə həsr olunmuş «Müasir biologiyada innovativ yanaşmalar» mövzusunda IX Beynəlxalq elmi konfransın materialları. Bakı – 2019, – s.123.
 9. Səfərova, A.X., Qənbərov, X.Q. *Aspergillus flavus* BDU-44 kif göbələyinə karbon və azot mənbələrinin təsiri // Odlar Yurdu Universitetinin Elmi və Pedaqoji xəbərləri, – 2019, – №52, – s.155-158.
 10. Сафарова, А.Х., Ганбаров, Х.Г. Влияние источников углерода и

- азота на биосинтез кислой протеиназы у грибов *Penicillium notatum* BDU-M45 / Материалы Международной научно-практической конференции. Биотехнология микроорганизмов, посвященной профессору Ю.К.Фомичеву Минск, – 2019, – с.196-197.
11. Сафарова, А.Х. Условия Биосинтеза кислых протеаз у *Aspergillus flavus* // Advances in Biology and Earth Sciences – 2020, – N2, – p.160-166.
 12. Səfərova, A.X. *Aspergillus* və *Penicillium* cinsli göbələklərdə proteazaların biosintezinə temperaturun təsiri // Odlar Yurdu Universitetinin Elmi və Pedaqoji xəbərləri, – 2020, – №53, – s.42-46.
 13. Сафарова, А.Х., Ганбаров, Х.Г. Характеристика частично очищенной внеклеточной кислой протеазы гриба *Aspergillus flavus* BDU-44 / Современная наука: Актуальные проблемы теории и практики. Серия естественных и технических наук, – 2021, – №6, – с.41-46.
 14. Safarova A.X., Shafiyeva S.M., Ganbarov K.G. Influence of precipitators on the activity of proteolytic enzymes / Abstracts of international scientific and practical conference. Modern science: innovations and prospects. – Stockholm, – 2021, – p.12-13.
 15. Сафарова, А.Х., Ганбаров, Х.Г. Свойства частично очищенной внеклеточной кислой протеазы, полученной из *Penicillium notatum* BDU-M5 // Международный научно-исследовательский журнал, – 2022, – №2, – с.6-12.



Dissertasiyanın müdafiəsi "12" sentyabr 2023-cü il tarixində saat "11:00"-da ARETN-nın Mikrobiologiya İnstitutunun nəzdində fəaliyyət göstərən FD 1.07 Dissertasiya şurasının iclasında keçiriləcəkdir.

Ünvan: AZ1004, Bakı ş., M. Müşfiq küçəsi, 103.

Dissertasiya ilə ARETN-nın Mikrobiologiya İnstitutunun kitabxanasında tanış olmaq mümkündür.

Dissertasiya və avtoreferatın elektron versiyaları ARETN-nın Mikrobiologiya İnstitutunun rəsmi internet saytında yerləşdirilmişdir.

Avtoreferat "06" iyul 2023-cü il tarixində zəruri ünvanlara göndərilmişdir.

Çapa im 023

Kağızın 16

Həcm: 39217

Tiraj: 100