

Maxsumxanova Mubina
Abduraximova A'lonurxon
Sayliyev Mirshod
Raxmonov Rustam
Pulatova Ozoda
Alimova Barno
Sa'dullayev Shohruh
O'zR FA Mikrobiologiya instituti, Toshkent, O'zbekiston
Ismoilov Muhammadjon
O'zbekiston Milliy Universiteti 2-bosqich magistranti
E-mail: shohruhsadullayev95@gmail.com

RENNIN MUQOBILI BO'LGAN SUT IVITUVCHI FERMENT SINTEZ QILUVCHI ZAMBURUG'NI AJRATISH VA TANLASH

Annotatsiya: Ushbu tadqiqotda turli manbalardan olingan o'nta zamburug' izolyatlari ajratilib, an'anaviy sut ivitish fermenti o'rniga xizmat qila oladigan proteaza produsentlarini izlash maqsad qilingan. Izolyatlar tovuq go'ngi bilan ifloslangan tuproq va sifati buzilgan qatiq mahsulotlaridan olingan. Barcha namunalar orasida №13 izolyat eng yuqori sut ivitish faolligini ko'rsatdi: uning sut ivitish faolligi 60 SB/ml ni tashkil etdi va sutni ivitish faolligini proteolitik faollikka nisbati 8-ga teng bo'ldi.

Kalit so'zlar: zamburug'lar, sutni ivitish faolligi, proteaza faolligi, ferment, izolyat, skrining, ozuqa-muhiti.

Максумханова Мубина
Абдурахимова Алонурхон
Сайлиев Миршод
Рахмонов Рустам
Пулатова Озода
Алимова Барно
Садуллаев Шохрух
Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент,
Узбекистан
Исмаилов Мухаммаджон
Магистрант 2 курса Национального университета Узбекистана
E-mail: shohruhsadullayev95@gmail.com

ВЫДЕЛЕНИЕ И СКРИНИНГ ГРИБА, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ РЕННИНУ

Аннотация: В ходе данного исследования было выделено десять изолятов грибов из различных источников с целью поиска продуцентов протеаз, способных заменить традиционные молокосвертывающие ферменты. Изоляты были получены из почвы, загрязнённой куриным помётом, а также из испорченных йогуртовых продуктов. Среди всех образцов изолят №13 проявил наибольшую молокосвёртывающую активность 60 ед. Сокслета/мл и соотношение молокосвёртывающей к протеолитической активности 8.

Ключевые слова: грибы, молокосвертывающая активность, протеазная активность, фермент, изолят, скрининг, питательная среда.

Maksumkhanova Mubina
Abdurakhimova Alonurkhon

Sailiev Mirshod

Rakhmonov Rustam

Pulatova Ozodakhon

Alimova Barno

Sadullaev Shokhrukh

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Tashkent, Uzbekistan

Ismoilov Mukhammadjon

2nd-year Master's Student, National University of Uzbekistan

E-mail: shohruhsadullayev95@gmail.com

ISOLATION AND SCREENING OF A FUNGUS PRODUCING MILK - CLOTTING ENZYME AS AN ALTERNATIVE

Annotation: In this study, ten fungal isolates from various sources were obtained with the aim of identifying protease producers that could potentially substitute traditional milk-curdling enzymes. The isolates were collected from soil contaminated with chicken manure and from spoiled yogurt products. Among all the samples, strain №13 exhibited the highest milk-clotting activity of 60 SU/mL and a milk - clotting to proteolytic activity ratio of 8.

Keywords: fungi, milk-curdling activity, protease activity, enzyme, isolate, screening, culture medium.

KIRISH

So‘nggi yillarda fermentativ jarayonlar oziq-ovqat sanoatida, ayniqsa sut mahsulotlarini qayta ishlashda juda katta ahamiyat kasb etmoqda. An‘anaviy usulda hayvonlardan olinadigan rennin o‘rniga mikroba manbalaridan olinadigan fermentlarni qo‘llash biologik xavfsizlik, iqtisodiy samaradorlik va ekologik jihatdan afzalliklarga ega. Ayniqsa, proteolitik fermentlar, jumladan mikroblar tomonidan sintez qilinadigan kislotali proteazalar sutni parchalash va koagulyatsiya qilishda keng qo‘llanilmoqda [1].

Kislotali proteazalar – bu pH ko‘rsatkichi 5 dan past bo‘lgan muhitda eng yuqori faollikka ega bo‘lgan fermentlar bo‘lib, ular mikroskopik zamburug‘lar va ba‘zi bakteriyalar tomonidan sintez qilinadi [2]. Ular sut oqsillarini parchalaydi va kazeinni koagulyatsiya qila oladi, shu bilan an‘anaviy koagulyantlarga muqobil sifatida pishloq ishlab chiqarishda foydalanish mumkin. Hozirgi kunda ko‘plab sutni qayta ishlash korxonalari bunday fermentlarni import qilmoqda, ammo ularni mahalliy mikroorganizmlardan ajratib olish va ishlab chiqarish iqtisodiy va texnologik jihatdan muhim hisoblanadi.

Adabiyotlar taxlili

Ilk olib borilgan tadqiqotlar an‘anaviy hayvon shirdoni fermentini mikroba kislotali proteazalari bilan almashtirish imkoniyatini tasdiqladi. Bu fermentlar mikroba koagulyantlari deb nomlanib, xalqaro kompaniyalar ularni turli savdo belgilar ostida tezda ishlab chiqarish va sotishni boshladi. [3,4]. Proteazalar – turli sohalarda, jumladan oziq-ovqat sanoatida keng qo‘llaniladigan fermentlar bo‘lib, ularni pishloq ishlab chiqarish, go‘shni yumshatish, shirinliklar va boshqa mahsulotlar ishlab chiqarishda foydalanishadi [5]. Proteazalar umumiy fermentlar ishlab chiqarishda 50% dan ko‘prog‘ini tashkil etadi, asosan ular mikroorganizmlar hisobiga bo‘lib, yillik ishlab chiqarish hajmi taxminan 500 tonnadir [6]. Mikroba nordon proteazalari, ayniqsa, shirdon fermentiga juda o‘xshash xususiyatlarga ega bo‘lgan ximozin (buzoq shirdoni fermentiga 88–98% o‘xshash) katta ahamiyatga ega. Kislotali proteazalar muayyan talab va standartlarga javob berishi shart [7,8].

Rhizomucor miehei va *Rhizomucor pusillus* kabi ba‘zi zamburug‘ turlari mikroba koagulyantlari ishlab chiqarishda shirdon fermenti renninining muqobili sifatida qo‘llaniladi. Shu bilan birga bu turlar *Rhizomucor oryzae* turiga o‘xshab shartli patogen emas, bu esa oziq-ovqat sanoatida ular yoki ularning metabolitlaridan foydalanish imkonini beradi [9].

Ushbu tadqiqot ishining maqsadi tabiiy manbalardan yuqori faollikka ega kislotali proteaza ishlab chiqaruvchi zamburug‘ izolyatlarini ajratish, skrining qilish va sut oqsilini koagulyatsiya qilishini o‘rganish

Tadqiqot materiallari va usullari

Mikroorganizmlarni ajratish uchun tovuqxona tuprog‘i, sifati buzilgan tvorog va pishloq namunalari foydalanildi.

Ozuqa muhitlari:

- (PDA) (kartoshka-dekstroza agari): kartoshka bulyoni - 1 l, glyukoza - 20 g/l, agar agar- 15 g/l, pH 5,6.
- Chapek-Doks agari (CZA): saxaroza, tuzlar va antibiotiklarni (penitsillin 20 000 IU/l va streptomitsin 0,5 g/l) o'z ichiga oladi.
- Yog'sizlantirilgan sut-agari (SMA): 15 g agar 800 ml suvda eritiladi, sterilizatsiya qilinadi, so'ngra 200 ml sterilizatsiya qilingan yog'siz sut bilan aralashtiriladi.
- Fermentatsiya uchun ozuqa-muhiti: bug'doy kepagi (10 g), 30 ml suv, pH 6,4.

Izolyatlarni toza holda ajratib olish 40°C da, kislotali (PDA) suyuq ozuqa muhitida 3–7 kun inkubatsiyadan so'ng qattiq ozuqa muhitida qayta ekish natijasida toza izolyatlar ajratib olindi.

Dastlabki skrining: Sut-agar muhitiga mikrobiologik igna bilan ekildi Shaffof zonalar hosil qilgan izolyatlar keyingi skrining uchun tanlandi.

Ferment faolligini aniqlash: Izolyatlar (SMA) qattiq ozuqa muhitiga ekildi. Inkubatsiyadan so'ng gidroliz zonalarini o'lchandi, eng katta zona berganlarida sutni ivitishi (koagulyatsiya) aniqlandi.

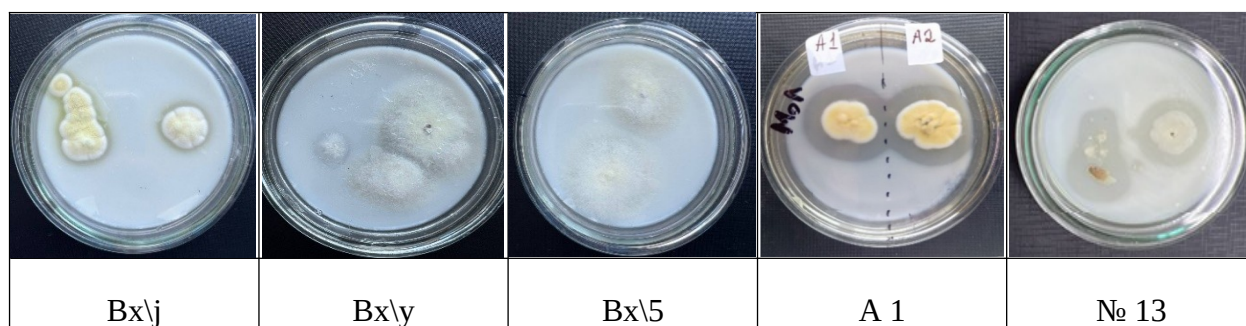
Ferment faolligi bo'yicha skrining qilish: Izolyatlarning sutni ivitish faolligi (SIF) Sokslet birligida aniqlandi, ya'ni ferment eritmasi (0,1-1 ml) 0,01M CaCl_2 qo'shilgan 10 ml sutga qo'shib, 35 °C da inkubatsiya qilindi, (koagulyatsiya) vaqti qayd etiladi.

Izolyatlar 28-30 °C da 24, 48 va 72 soat davomida ikki xil ozuqa muhitida o'stirildi. Ozuqa-muhitlarning tarkibi:

1. Glyukoza – 10; Pepton – 2,5; Achitqi ekstrakti – 2; MgSO_4 – 0,5; KH_2PO_4 – 1; NaCl – 0,5; CaCl_2 – 0,05; FeSO_4 – 0,005; ZnSO_4 – 0,001; pH – 6,0.
2. Glyukoza – 5; Pepton – 0,5; Achitqi ekstrakti – 0,5; MgSO_4 – 1; K_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 1; CaCl_2 – 0,5; pH – 6,0.

Taxlil va natijalar

Mikroskopik zamburug' izolyatlarini dastlabki skriningi: Organik chiqindi bilan ifloslangan tuproq, sifati buzilgan tvorog va pishloq namunalaridan 10 ta zamburug' izolyatlari toza holda ajratib olindi №13 izolyati sutli agar muhitida eng yuqori proteolitik faollikni nomoyon qildi (1-rasm).

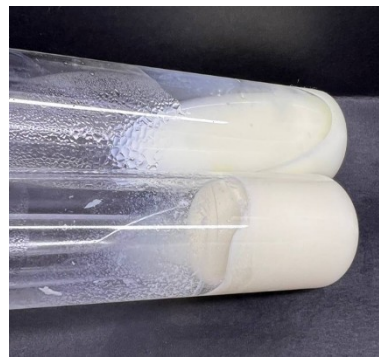


Koagulyatsiya faolligi: №13 izolyati 2 xil ozuqa muhitida 24, 48 va 72 soat davomida inkubatsiya qilindi. Olingan kultural suyuqliklar sutni ivitish (koagulyatsiya) aniqlandi. Eng yuqori koagulyatsiya faolligi 72 soat o'stirilganda kuzatildi, ayniqsa 40°C haroratda №13 izolyatining kultural suyuqligi 10 ml steril yog'siz sutni 10 daqiqa ichida ivitdi. Bu natija kultural suyuqlikda fermentning yetarli darajada to'planganligini va sut oqsillari (kazein)ga nisbatan yuqori faollikka ega ekanligi kuzatildi (2-rasm).

Shuningdek, 35°C va 40°C haroratda koagulyatsiya faolligi solishtirilib o'rganildi, har ikkala haroratda ham ferment faolligi kuzatildi, biroq 40°C da sutning ivish vaqti ancha qisqaroq bo'ldi. Jumladan, 35 °C da sut 15 daqiqada ivigan bo'lsa, 40 °C da bu jarayon 10 daqiqada sodir bo'ldi, bu natija 40°C harorat ferment faolligi uchun qulayroq sharoit yaratishini ko'rsatadi. Ivish vaqtlaridagi farq 16,7% ni tashkil etdi, fermentatsiya tezligining haroratga bog'liqligi aniqlandi.



A



B

2-rasm 72 soat o'stirilgandan so'ng №13 izolyatining qattiq ozuqa muhitida koloniyasini ko'rinishi (A); №13 izolyat sutni ivitish (koagulyatsiya) faolligi (B).

Ferment faolligini aniqlash. Kislotali proteaza faolligi (PF) kazeinni koagulyatsiyasi natijasida aniqlandi. Fermentning faolligi 7.5 Bir./ml ga teng bo'lib, bu ko'rsatkich zamburug' kelib chiqishi kislotali proteazalar bo'yicha adabiyotlarda keltirilgan qiymatlar bilan teng yoki ulardan yuqori hisoblanadi. Masalan, Silva va hammualliflar tomonidan olib borilgan tadqiqotda *Thermomucor indicae-seudaticae* №31 zamburug'idan rennin fermentini olish (suyuq muhitdagi) fermentatsiya usuli orqali o'rganilgan. Fermentning eng yuqori biosintez tarkibida 4 % bug'doy kepagi (otrub) substrat sifatida va 0,3 % tuzli eritma bo'lgan fermentatsiya muhitida, 45°C harorat va 150 ob/min tezlikda 72 soat davomida amalga oshirildi. Olingan fermentning sutni koagulyatsiya qilish faolligi (MCA) 60,5 birlik/ml ni tashkil etgan, MCA/PA (sut koagulyatsiya faolligi / proteolitik faollik) nisbati esa 5,1 ga teng bo'lgan. Shunday qilib, olingan 60

Bir./ml faollik ko'rsatkichi adabiyotda qayd etilgan *T. indicae-seudaticae* №31 fermentining faolligiga teng bo'lib, ushbu izolyatdan ajratilgan kislotali proteaza sut koagulyanti sifatida istiqbolli ekanligini tasdiqlaydi [10].

Ozuqa-muhitini optimallashtirish. Ozuqa muhitini optimallashtirish uchun uch xil ozuqa muhitidan foydalanib №13 izolyati ekildi (1-jadval)

Ozuqa muhiti tarkibining Sut ivitish faolligi ta'siri

1-jadval

№	Muhit tarkibi (asosiy komponentlar)	Harorat , °C	Sutning koagulyatsiya vaqti, daqiqa	Sut ivitish faolligi, SB/ml
1	Na ₂ HPO ₄ (2 g/l), pH 6,0 (nazorat)	40	60	10
2	Saxaroza (40 g/l) + Na ₂ HPO ₄ (2 g/l)	40	30	25
3	Bug'doy kepagi (18 g/100 ml) + saxaroza (40 g/l) + yog'siz quruq sut (20 g/l) + Na ₂ HPO ₄ (2 g/l), pH 6,0	40	10	60

Tadqiqot natijasiga ko'ra ozuqa muhitining tarkibi ferment faolligi va sutning koagulyatsiyasiga sezilarli ta'sir ko'rsatdi. Eng yuqori faollik №3 ozuqa muhitida kuzatildi va mikroblar proteazasi uchun uglevod va azotning kompleks manbai muhimligini asosladi. Ushbu sharoitda 40°C da sutning koagulyatsiyasi 10 daqiqada sodir bo'lib, sut ivitish faolligi esa 60 SB/ml ga yetdi. SIF/PF ko'rsatkichi 8:1 nisbatni tashkil etdi (2-jadval).

Ba'zi zamburuq' izolyatlarining ferment faolliklari 96 soat inkubatsiyadan keyingi natijalar

2-jadval

Zamburug' izolyatlari	Oqsil, mg/ml	Sut ivitish faolligi, SB/ml	Proteaza faolligi, Bir/ml	SIF/PF
Bx\j	2	10	15,88	0,63:1
Bx\y	2,5	4,5	5,6	0,8:1
Bx\5	1,32	5	4,8	1,04:1
A1	2,92	15	5,4	2,8:1
№13	2,8	60	7,5	8:1

Ushbu natijalar Silva, B. L., Gerales, F. M., Murari, C. S., Gomes, E., & Da-Silva, R. tomonidan o'tkazilgan tadqiqot natijalariga mos keladi. Ular *Thermomucor indicae-seudaticae* №31 zamburug'ining maksimal fermentativ faolligi uglevod va oqsillarga boy muhitda kuzatilganini aniqlagan. 96 soat inkubatsiyadan so'ng oqsil miqdori va ferment faolligi (2,8 mg/ml oqsil va 7,5 Bir./ml proteaza) boshqa tadqiqotlar bilan solishtirilganda ham yuqori ekanligini ko'rishimiz mumkin. Masalan, Murthy, S.K., & Rajagopalan, R. hamda Gupta, R., & Beg, Q.K. [11,12] tadqiqotlarida ferment faolligi ozuqa muhitini optimallashtirish orqali sezilarli darajada oshgani qayd etishgan.

Ajratilgan izolyatlar orasida №13 izolyati eng yuqori sut ivitish xususiyatini ko'rsatdi. Fermentning yuqori faolligi va SIF/PF ko'rsatkichi sanoat miqyosida pishloq ishlab chiqarishda №13 izolyati yuqori samarador produtsent ekanligini aniqlandi. Ozuqa muhitini optimallashtirish ferment faolligini sezilarli darajada oshirishga imkon berdi va sutni koagulyatsiya qilish tezligi odatdagiga nisbatan 5–6 barobar tezlashdi. 96 soat inkubatsiyadan so'ng oqsil miqdori 2,8 mg/ml ni, ferment faolligi 7,5 birlik/ml va sut ivitish faolligi esa 60 SB/ml ni tashkil etdi. 40°C haroratdagi sutning koagulyatsiya jarayoni 35°C dagiga nisbatan tezlashdi. Bunday harorat sanoat sharoitlari uchun qulay bo'lib, fermentning biologik faolligini saqlash imkonini beradi.

Adabiyotlar ro'yxati

1. Wiśniewski, P., Małkowska-K., A. Łobacz, A. Zadernowska & J. Żulewska (2025). “Invited review: Milk-clotting enzymes of microbial origin and their role in cheesemaking—A review.” *Journal of Dairy Science*, 108(10), 10427-10446. <https://doi.org/10.3168/jds.2025-26973>
2. Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., & Kot, A. M. (2021). Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(7), 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>.
3. Islam MA, Basunia MHK, Rahman A, Bari MS, Rahman MF, Mannan MA, Datta TK. Effect of coagulants on the chemical and microbial quality of fresh cheese. *Bangladesh Journal of Animal Science*. 2021; 50:73-79.
4. Martău GA, Unger P, Schneider R, Venus J, Vodnar DC, López-Gómez JP. Integration of solid-state and submerged fermentations for the valorization of organic municipal solid waste. *Journal of Fungi*. 2021; 7:766.
5. Singh R, Singh A, Sachan S. Enzymes used in the food industry: Friends or foes. In: *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press; 2019. p. 827-843.
6. Patel AK, Dong CD, Chen CW, Pandey A, Singhania RR. Production, purification, and application of microbial enzymes. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press; 2023. p. 25-57.
7. Aktayeva S, Akishev ZH, Khassenov B. Proteolytic enzymes in cheese making. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. 2018; 1:1-9.
8. Nicosia FD, Puglisi I, Pino A, Caggia C, Randazzo CL. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. *Foods*. 2022; 11:871.
9. Ghosh B, Ray RR. Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: a review. *Journal of Applied Sciences*. 2011; 11:2470-2486.

10. Silva, B. L., Geraldes, F. M., Murari, C. S., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2014). Production and Characterization of a Milk-Clotting Protease Produced in Submerged Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Technology and Biotechnology*, 52(4), 482–489. <https://doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3626>
11. Murthy, S. K., & Rajagopalan, R. (2015). Production of microbial rennet using *Bacillus subtilis* and its application in cheese making. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 1016–1022. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-0662-2>
12. Gupta, R., & Beg, Q. K. (2017). Microbial rennet: Production and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(5), 656–667. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1182487>