

RHODOCOCCUS RUBER-8/4/1 SHTAMMI NITRILGIDRATAZA FERMENTINI GEL-FILTRATSIYA USULIDA TOZALASH**¹Murtozoyev A.K., ²Usmonov A.Sh., ³Sharifov M.R., ⁴Maxsumxanov A.A.**^{1,2,3,4}O‘zR FA Mikrobiologiya instituti, Toshkent sh., O‘zbekistonE-mail: payzilloyevazizjon@gmail.com<https://doi.org/10.5281/zenodo.8361838>

Annotatsiya. Nitrilgidrataza fermentini *Rhodococcus ruber-8/4/1* shtammi hujayrasidan ajratib olish va tozalash uchun pepton tutuvchi (PS) ozuqa muhitda o‘stirilgan, biomassasi yig‘ib olingan, ultratovush bilan ishlov berilgan va hujayra lizati olingan. Hujayra lizati TSK Gel HW 55F va Sephacryl S-100 HR gellarida gel-filtratsiya qilingan. *Rhodococcus ruber-8/4/1* shtammi nitrilgidrataza fermentini tozalash uchun Sephacryl S-100 HR gelida gel-filtratsiya qilish optimal ekanligi aniqlangan.

Kalit so‘zlar: *Rhodococcus ruber-8/4/1*, nitrilgidrataza, ferment, faollik, gel-filtratsiya, ozuqa muhiti, akrilamid, akrilonitril.

Аннотация. Для выделения и очистки фермента нитрилгидратазы из биомассы штамма *Rhodococcus ruber-8/4/1*, клетки выращенные на пептон содержащей (ПС) среде были отцентрифугированы, собраны, разрушены ультразвуком и получен клеточный лизат. Клеточный лизат пропущен через гели TSK Gel HW 55F и Sephacryl S-100 HR. Установлено, что гель-фильтрация на геле Sephacryl S-100 HR является оптимальной для очистки фермента нитрилгидратазы штамма *Rhodococcus ruber-8/4/1*.

Ключевые слова: *Rhodococcus Ruber-8/4/1*, нитрилгидратаза, фермент, активность, гель-фильтрация, питательная среда, акриламид, акрилонитрил.

Abstract. For isolation and purification of nitrile hydratase from biomass of *Rhodococcus ruber-8/4/1* strain, cells grown in peptone containing (PS) medium were centrifuged, collected, disintegrated by ultrasound and cell lysate have been obtained. Cell lysate was applied for gel-filtration on TSK Gel HW 55F and Sephacryl S-100 HR column. Gel filtration on Sephacryl S-100 HR was found to be optimal for purification of nitrile hydratase enzyme of *Rhodococcus ruber-8/4/1* strain.

Keywords: *Rhodococcus ruber-8/4/1*, nitrile hydratase, enzyme, activity, gel filtration, nutrient medium, acrylamide, acrylonitrile.

Hozirgi vaqtda turli ishlab chiqarish sohalarida yirik molekulari moddalar, ya’ni polimer va sopolimerlarga bo‘lgan talabning ortishi natijasida xalq xo‘jaligining barcha jabhalarida atrof-muhitga zarar yetkazmaydigan, energiya tejovchi, kam xarajatli va yuqori mahsuldorlikga ega bo‘lgan biotexnologik ishlanmalarni ishlab chiqishga e’tibor qaratilmoqda. Bugungi kunda suv xo‘jaligi, tog‘-kon sanoati, oziq-ovqat sohasi, qog‘oz tayyorlash va uglevodorodlar ishlab chiqarishda akrilamid polimerlariga bo‘lgan talab tobora ortib bormoqda. Global poliakrilamid bozorining hajmi 2018 yilda 4,5 milliard dollarga baholanib, 2019 yildan 2025 yilgacha akrilamid ishlab chiqarishga bo‘lgan talab 6,2%ga ortishi va ishlab chiqarish hajmi 2,5 million tonnani tashkil etishi kutilmoqda [1].

Akrilamid olishning biologik usuli mikroorganizmlarning nitrilgidrataza fermenti ishtirokida o‘tadigan biotransformatsiya jarayoni bilan bog‘liq. Reaksiya davomida akrilonitrilning akrilamidga biotransformatsiyasi darajasi 100% ni tashkil etadi. Biokonversiya

jarayoni yengil sharoitda, yuqori katalitik samaradorlikda kechadi va atrof-muhitga zarar yetkazuvchi qo'shimcha moddalar hosil bo'lmagani kabi qator afzalliklarga ega [2].

Nitrilgidrataza (NHase, EC 4.2.1.84) - ko'plab mikroorganizmlarda nitril metabolizmining asosiy fermentlaridan biri bo'lib, nitrillarning tegishli amidlariga gidratlanishini katalizlaydigan va kimyo sanoatida akrilamid, nikotinamid, pirazinamid, tiofenamid va boshqalarni ishlab chiqarish uchun muvaffaqiyatli qo'llanilayotgan metalloenzimdir. Nitrilgidrataza birinchi marta 1980-yil Asano va boshqa olimlar tomonidan *Arthrobacter sp.* J1 shtamida o'rganilgan [3]. Keyinchalik Chen J., Zheng R.-C. va boshqa olimlar nitrillarning amidlarga biotransformatsiyasida nitrilgidrataza fermentining muhim ahamiyatga ega ekanligini ko'rsatishgan [4].

Adabiyotlar tahlilidan shu narsa ma'lumki chet el olimlari tomonidan yuqori faollikka ega bo'lgan *R. rhodochrous PA-34*, *Rhodococcus sp. YH3-3*, *Brevibacterium R312*, *Pseudomonas chlororaphis B23* kabi shtammlaridan nitrilgidrataza fermentini ammoniy sulfat bilan cho'ktirish, ion almashinuvi va gel-filtrlash xromatografiyasi usullari orqali toza holatda ajratib olishgan [5-8].

Ushbu tadqiqot ishining maqsadi *Rhodococcus ruber* – 8/4/1 shtammi nitrilgidrataza fermentini tozalash sharoitlarini optimallashtirishdan iborat.

Tadqiqot materiallari va usullari

Yuqori nitrilgidrataza faolligiga ega bo'lgan *Rhodococcus ruber* – 8/4/1 shtammini o'stirishda PS ozuqa muhitidan foydalanildi [9]. Umumiy hajmi 1000 ml bo'lgan Erlenmeyer kolbalariga 500 ml ozuqa-muhiti solib, 1 atm. 20 daqiqa davomida sterilizatsiya qilinadi. Sterilizatsiya qilingan ozuqa-muhitiga *Rhodococcus ruber* – 8/4/1 shtammi ekilib, tebranma aylantirgichli inkubatorida 150 ayl/daq. tezlikda va 30 °C haroratda 72 soat davomida o'stirildi.

Hujayra quruq biomassasini aniqlash uchun suyuq ozuqa muhitida o'sgan bakteriya biomassaning absolyut quruq vaznini aniqlash uchun avvaldan boshlang'ich og'irligi o'lgangan 2 ml-li Eppendorf probirkalarga 1 ml dan kultural suyuqlik quyilib, 12000 ayl/daq. tezlikda 7 daqiqa davomida sentrifuga qilinadi. Cho'kma 2 marta fosfat buferida yuviladi. Cho'kma quritgich shkafda 105 °C haroratda doimiy o'zgarmas vaznigacha quritiladi [10].

Nitrilgidrataza faolligini aniqlash uchun 1 ml kultura suyuqligini 12000 ayl/daq. 7 daqiqa davomida setrifuga qilinib, supernatant to'kib tashlandi. Qolgan cho'kmani 10 mM pH 7,5 ga teng bo'lgan fosfat buferi bilan hajmi 1 ml ga yetkazilib, yuvib olindi. Qolgan cho'kmani yana 1 ml bufer bilan suspenziya holatiga keltirib, 15 ml akrilonitril bilan 20° C da tekshirildi. Reaksiya 10 daqiqadan so'ng 0,1 ml 1 N HCl qo'shib to'xtatildi va reaksiya davomida akrilamid hosil bo'lishi YSSX yordamida aniqlandi. Solishtirma ferment faolligi sifatida 1 daqiqada 1 mkmol akrilamid hosil bo'lishini katalizlovchi hujayraning 1 mg quruq og'irligidagi miqdori qabul qilingan (mkM amid/mg x min).

Rhodococcus ruber – 8/4/1 hujayrasiz ekstraktini tayyorlash uchun PS ozuqa muhitida o'stirilgan shtammining 3 kunlik biomassasi sentrifugada yig'ib qilindi. Yig'ib olingan biomassani 20 ml 10 mM pH 7,5 bo'lgan kaliy fosfat buferi bilan suspenziya holatiga keltirib 2 marta yuvib olindi. So'ngra yana 20 ml fosfat buferi bilan suspenziya qilindi. 30 soniya ish 30 soniya dam olish sikli bilan 10 marta 0,7 A va 35 KHz chastota bilan ultratovush qurilmasida hujayra qobig'i yorib olindi. Suspenziyani 11400 ayl/daq. 20 daqiqa davomida sentrifuga qilib supernatant (lizat) ajratib olindi.

Shtamning nitrilgidrataza fermentini gel filtratsiya usuli bilan tozalash uchun hujayra lizati Sephacryl S-100 HR va TSK Gel HW-55F gellari bilan to'ldirilgan shisha ustunchalar (20x600 mm) yordamida bir nechta yuvuvchi buferlardan foydalanish orqali tozalash jarayoni olib borildi. Yuvuvchi bufer sifatida 0,1 M NH_4HCO_3 va 0,1 M kaliy fosfat buferlaridan foydalanildi. Gel-filtratsiya uchun past bosimli Biologic LP xromatografidan (Bio-Rad, AQSh) foydalanildi, oqsil miqdori UV-detektorning 280 nm to'liq uzunligida 4 ml hajmli fraksiyalarga yig'ib olindi. Alohida oqsil pikini bergan fraksiyalarda ferment faolligi va oqsil miqdori aniqlandi.

Natijalar va ularning muhokamasi

Umumiy 1 litr PS ozuqa muhitida *Rhodococcus ruber-8/4/1* shtammi 72 soat o'stirilgandan so'ng, ferment faolligi va biomassa miqdori aniqlandi. Bunda ferment faolligi 3,91 bir./mg ni, biomassa esa 5,6 mg/ml ni tashkil etdi. Hosil bo'lgan biomassa 11400 ayl./daq. tezlikda 20 daqiqa davomida sentrifuga qilinib yig'ib olindi. Yig'ilgan biomassa 20 ml 0,1M kaliy fosfat buferi bilan suspenziya holiga keltirib, 2 marta yuvib olindi so'ngra ultratovush qurilmasi yordamida lizis qilindi. Ajratib olingan lizatning nitrilgidrataza faolligi 10,05 bir./ml ni tashkil etdi.

3 ml lizat oldindan to'ldirilgan TSK Gel HW-55F va Sephacryl S-100 HR gel filtratsiya ustunchalariga alohida 0,1M NH_4HCO_3 (pH=7,5) buferi bilan 1ml/min oqim tezligida alohida oqsil fraksiyalariga ajratish uchun yuborildi. Fraksiyalardagi nitrilgidrataza faolligi aniqlandi (1-jadval). Bunda 0,1M NH_4HCO_3 buferi bilan TSK Gel HW-55F gel-filtratsiya ustunchasi orqali o'tkazilganda nitrilgidrataza fermentining yuqori faolligi 19, 20 va 21-fraksiyalarda kuzatilgan bo'lsa, Sephacryl S-100 HR geli bilan to'ldirilgan ustuncha orqali o'tkazilganda esa ferment faolligi 11, 12 va 13-fraksiyalarda, yani elutsiyaning nisbatan oldingi vaqtlarida chiqqanligi aniqlandi.

1-jadval

Rhodococcus ruber-8/4/1 shtammi hujayra lizatini 0,1M NH_4HCO_3 buferidagi gel-filtratsiyasi

TSK Gel HW 55 F gel		Sephacryl S-100 HR	
Fraksiya nomi	Faollik (bir./ml)	Fraksiya nomi	Faollik (bir./ml)
<i>R. ruber-8/4/1</i> (biomassa)	3,91	<i>R. ruber-8/4/1</i> (biomassa)	3,91
<i>R. ruber-8/4/1</i> (lizat)	10,05	<i>R. ruber-8/4/1</i> (lizat)	10,05
19-f	4,47	11-f	3,86
20-f	6,25	12-f	11,03
21-f	4,91	13-f	9,38

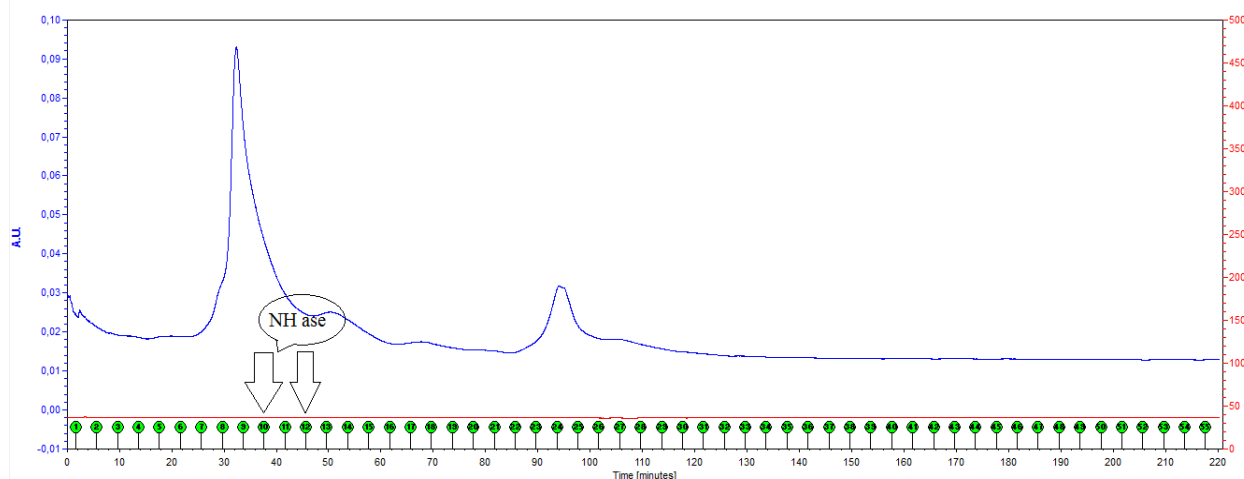
Shundan keyin yuvchi faza 0,1M kaliy fosfat buferiga almashtirildi va TSK Gel HW-55F va Sephacryl S-100 HR gellari bilan to'ldirilgan ustunchalarda 3 ml dan lizat yuborilib gel-filtratsiya qilindi. Natijada nitrilgidrataza faolligi TSK Gel HW-55F gelida 24, 25 va 26-fraksiyalarda chiqqani hamda ferment faolligining 3 na fraksiyalarga bo'linib ketganligi kuzatildi. Lekin Sephacryl S-100 HR gelida esa nitrilgidrataza fermentining faolligi 1-pikning tushish qismida 10, 11 va 12-fraksiyalarga bo'lingani aniqlandi (1-rasm).

2-jadval

Rhodococcus ruber-8/4/1 shtammi hujayra lizatini 0,1M Kaliy fosfat buferidagi gel-filtratsiyasi

TSK Gel HW 55 F gel		Sephacryl S-100 HR	
Fraksiya nomi	Faollik (bir./ml)	Fraksiya nomi	Faollik (bir./ml)

<i>R. ruber</i> -8/4/1 (biomassa)	3,91	<i>R. ruber</i> -8/4/1 (biomassa)	<i>R. ruber</i> -8/4/1 (biomassa)
<i>R. ruber</i> -8/4/1 (lizat)	10,05	<i>R. ruber</i> -8/4/1 (lizat)	10,05
24-f	5,63	10-f	14,52
25-f	5	11-f	11,16
26-f	4,38	12-f	11,16



1-rasm. *Rhodococcus ruber*-8/4/1 shtammi hujayra lizati oqsillarining Sephacryl S-100 HR gelida 0,1M kaliy fosfat buferi bilan yuvilishi.

Rhodococcus ruber-8/4/1 shtammi hujayra lizati oqsillarining Sephacryl S-100 HR gelida 0,1M kaliy fosfat buferi bilan elyutsiya qilishda nitrilgidratazaning bir nechta fraksiyalarga bo'linishi, katta ehtimol bilan lizatda fermentning dimer, tetramer yoki oktamer holatlarda bo'lishi bilan ushutilishi mumkin. Chunki adabiyotlarda keltirilishicha, *Rhodococcus* avlodiga mansub bakteriyalarning nitrilgidrataza fermentlari aksariyat xollarda bir nechta subbirliklardan iborat bo'lishi keltirilgan [5-7].

Shunday qilib, yuqorida bajarilgan tajribalardan xulosa qiladigan bo'lsak, nitrilgidrataza fermentining faol protsudenti bo'lgan *Rhodococcus ruber*-8/4/1 shtammidan nitrilgidrataza fermentini tozalash uchun Sephacryl S-100 HR gelidan foydalanish mumkin va 0,1M kaliy fosfat yuvuvchi buferi optimal ekanligi aniqlandi. Lekin, kelajakda ushbu sharoitda elyutsiya qilishdan oldin, fermentning faolligini yo'qotmagan xolda subbirliklaridan monomer holatiga o'tkazib, keyin gel-filtratsiya usulini qo'llab ko'rish maqsadga muvofiq deb hisoblaymiz.

REFERENCES

1. Global poliakrilamid bozor hajmi va ulushi. Sanoat hisoboti 2019–2025. *Bozor tahlili* hisobotida ; Grand View Research: San-Fransisko, CA, AQSh, 2019 yil aprel.
2. Yamada X., Kobayashi M. (1996). "Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide". *Biosci Biotechnol Biochem.* 1996 Sep;60(9):1391-400. doi: 10.1271/bbb.60.1391. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Asano Y., Tani Y., "New Enzyme "Nitrile Hydratase" which Degrades Acetonitrile in Combination with Amidase." *Agricultural and biological chemistry*, 44 (9), 2251-2252, 1980 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)].
4. Chen J., Zheng R.-C., Zheng Y.-G., Shen Y.-C. (2009). " Microbial transformation of nitriles to high-value acids or amides" *Adv Biochem Engin/Biotechnol* DOI: 10.1007/10_2008_25 [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].

5. Prasad S, Raj J, Bhalla TC (2009) "Purification of a hyperactive nitrile hydratase from resting cells of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34." *Indian J Microbiol* 49:237–242
6. Kato Y, Tsuda T, Asano Y (1999) "Nitrile hydratase involved in aldoxime metabolism from *Rhodococcus* sp. strain YH3-3 purification and characterization. " *Eur J Biochem* 263:662–670
7. Nagasawa T, Ryuno K, Yamada H (1986) "Nitrile hydratase of *Brevibacterium* R312-purification and characterization." *Biochem Biophys Res Comm* 139:1304–1312
8. Nagasawa T, Nanba H, Ryuno K, Takeuchi K, Yamada H (1987) "Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23-purification and characterization." *Eur J Biochem* 162:691–698
9. Қамбаралиева М.И., Усмонов А.Ш., Шарипов М.Р., Саидова И.М., Муртозоев А.К., Алимова Б.Х., Пўлатова О.М., Махсумханов А.А., "Влияние компонентов питательной среды на активность нитрилгидратазы штамма *R. ruber*-8/4/1" *Узбекский Биологический Журнал* 5/2022, С.35-40
10. Bezborodov A., Zagustina N. (2016). Enzymatic biocatalysis in chemical synthesis of pharmaceuticals. *Appl. Biochem. Microbiol.* 52. P. 237–249.