ახალი სპეციფიკური პროტეოლიზური ფერმენტების მიღება და მათი გამოყენება რძის პროდუქტების საგემოვნო თვისებების გაუმჯობესების მიზნით

ქრისტინე მუსელიანი

სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია
საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის
აგრარული მეცნიერებების საბჭოზე
აგრარულ მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:
ლალი ქუთათელაძე
ედიშერ კვესიტაძე

საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტი

თბილისი, 2024

დარგობრივი კომისიის რეკომენდაცია

დისერტანტი: ქრისტინე მუსელიანი

დისერტაციის სათაური: ახალი სპეციფიკური პროტეოლიზური ფერმენტების მიღება და მათი გამოყენება რძის პროდუქტების საგემოვნო თვისებების გაუმჯობესებისთვის

დისერტაციის დაცვის თარიღი: 16.02.2024

დისერტაციის დაცვის კომისია:

ოპონენტი 1: გია ხატისაშვილი

ოპონენტი 2: ზურაბ ცქიტიშვილი

რეკომენდებულია დაცვისათვის „სასურსათო ტექნოლოგიები“ სამეცნიერო მიმართულების კომისიის მიერ.

თავჯდომარე, /ვლადიმერ ელისაშვილი /: _____
(ხელმოწერა)

წევრი, / გია ხატისაშვილი/: _____
(ხელმოწერა)

წევრი /.ლალი ქუთათელაძე/: _____
(ხელმოწერა)

სადოქტორო სკოლის კოორდინატორი: _____ / ნატო კობახიძე/
(ხელმოწერა)

თარიღი: 10.01.2024

ჩემი დისერტაცია წარმოადგენს ორიგინალურ ნაშრომს და მასში სხვა ავტორების აქამდე გამოქვეყნებული, გამოსაქვეყნებლად მიღებული ან დასაცავად წარდგენილი მასალები გამოყენებულია ციტირების სათანადო წესების დაცვით."

ქრისტინე მუსელიანი

თარიღი: დეკემბერი, 2023 წ.

"როგორც წარმოდგენილი სადოქტორო დისერტაციის ავტორი, ვაცხადებ, რომ
ჩემი დისერტაცია წარმოადგენს ორიგინალურ ნაშრომს და მასში სხვა ავტორების აქამდე გამოქვეყნებული, გამოსაქვეყნებლად მიღებული ან დასაცავად წარდგენილი მასალები

აბსტრაქტი

ბიოაქტიური კომპონენტებით და ფუნქციური ინგრედიენტებით გამდიდრებულ საკვებზე მოსახლეობის გაზრდილი მოთხოვნებიდან გამომდინარე, განსაკუთრებულ აქტუალობას იძენს რძიდან ახალი, ფუნქციური პროდუქტების წარმოების ტექნოლოგიების შემუშავება. ამ ტიპის პროდუქტების პოტენციალი დღეს განიხილება, როგორც გლობალური ბაზარის განვითარების მრავალწლიანი და მდგრადი პერსპექტივა. ექსპერტების მონაცემებით, უახლოეს მომავალში აუცილებლად ვიხილავთ რძიდან დამზადებულ უამრავ, ახალ ფუნქციურ პროდუქტს, რომელიც განკუთვნილი იქნება მომხმარებელთა ფართო ჯგუფებისთვის. აღნიშნულ პრობლემას ეხება წინამდებარე სადოქტორო კვლევა, რომლის შედეგად მოიძებნა ახალი ტიპის ფერმენტი პროტეაზა, რომელიც რძეზე ზემოქმედების შედეგად იძლევა განსხვავებული ტიპის პროდუქტს, მიღებული პროდუქტი ხასიათდება ხაჭოს მსგავსი ფაქტურით და ცხიმთან ასოცირებული საგემოვნო თვისებებით.

კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან გამოყოფილია მიკროსკოპული სოკოების კულტურები. კულტურალურ- მორფოლოგიური თვისებების შესწავლის საფუძველზე განხორციელებული იდენტიფიკაციის შედეგად გამოყოფილი ასკომიცეტები მიეკუთვნა *Scopularipsis, Penicillium, Mucor*, *Fusarium* -ისა და *Geotrichum* -ის გვარებს.

სიღრმული ფერმენტაციის პირობებში გამოყოფილ კულტურებს შორის ჩატრებულია სკრინინგი, გამოვლენილია პროტეაზას სამი პროდუცენტი: *Mucor* spp. 2-3, *Penicillium candidum* 5-1 და *Penicillium camemberti* 7-3. შერჩეული შტამების ფიზიოლიგიურ-ბიოქიმიური მახასიათებლების შესწავლით, დადგინილია ნახშირბადის, აზოტისა და ფოსფორის საუკეთესო წყაროები. შერჩეულია ბუნებრივ სუბსტრატის შემადგენლობასთან მაქსიმალურად მიახლოებული საკვები არე- ლაქტოზას, კაზეინის და კალიუმის ფოსფატის შემცველობით. ნახშირბადის, აზოტის და ფოსფორის საუკეთესო წყაროების შერჩევის პროცესში, პროტეაზის პროდუცენტებს შორის გამოვლენილია მიკროსკოპული სოკო- *Penicillium candidum* 5-1, რომელიც

მაქსიმალური პროტეაზური აქტივობით გამოირჩეოდა, რის გამოც შემდგომი კვლევისთვის აღნიშნული შტამი იქნა შერჩეული. თანმიმდევრულად განხორციელებული ექსპერიმენტების შედეგად, *Penicillium candidum- 5-1*-ის საკვები არის შემადგენლობისა და კულტივირების პირობების ოპტიმიზაციის საფუძველზე შერჩეული შტამის პროტეაზური აქტივობა საწყისთან შედარებით 62.3%-ით არის გაზრდილი.

საწარმოო შტამისადმი კვების მრეწველობის მიერ წაყენებული მოთხოვნებიდან გამომდინარე, შტამი-*Penicillium candidum* 5-1 ექსპრეს-ტესტ მეთოდით, შემოწმებულია ტოქსიკურობაზე. აღნიშნული სახეობის სხვა წარმომადგენლების მსგავსად, არც შერჩეული შტამი აღმოჩნდა ტოქსიკური, რაც იძლეოდა საშუალებას დაწყებულიყო კვლევები რძის ახალი პროდუქტის მიღების მიმართულებით.

პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატის მისაღებად გამოყენებულ იქნა ოპტიმალურ საკვებ არეზე და ოპტიმალურ პირობებში კულტივირებული *Penicillium candidum* 5-1-ის კულტურალური სითხე, ყველაზე მაღალი პროტეაზური აქტივობა 60%-იანი ამონიუმის სულფატის გაჯერებით დალექილ ფერმენტულ ფრაქციას აღმოაჩნდა.

ძალზედ საინტერესო ფაქტი გამოვლინდა პრეპარატით რძეზე ზემოქმედების შედეგად: ხანმოკლე შედედების შემდეგ რძის აჭრას ჰქონდა ადგილი. აქედან გამომდინარე, შემდგომი კველევისთვის ზემოთაღნიშნული ფრაქცია შევარჩიეთ. ექსპერიმენტის მომდევნო ეტაპი ტექნიკური პრეპარატის შემდგომ გაწმენდას და გაწმენდილი ფერმენტის თვისებების შესწავლას დაეთმო, რაც წარმოადგენდა სამუშაოს მთავარ ლეიტმოტივს, რომლის მიზანიც იყო მოგვეძებნა და აგვეხსნა ახალი ტიპის პროტეაზის რძის აჭრის უნარი, რაც გვაძლევდა რძიდან ახალი პროდუქტის მიღების საშუალებას.

იონცვლადი ქრომოტოგრაფიით ტექნიკური პრეპარატიდან მინარევების სრული მოცილება გახდა შესაძლებელი, ხოლო ელექტროფორეზის საფუძველზე განისაზღვრა ფერმენტის მოლეკულური მასა, რომელიც შეადგენდა 18 kDa-ს. დადგინდა ფერმენტული პრეპარატის მოქმედების ტემპერატურული (35-40°C) და pH (6.5) ოპტიმუმები. ელექტროფორეზით მიღებულმა სურათმა ცხადად წარმოაჩინა ფერმენტის სპეციფიკურობა. კერძოდ, კაზეინების სუბერთეულებზე ზემოქმედების

შედეგად მიღებულმა ფერმენტმა სუბსტრატს მოაშორა ჰიდროფილური ფრაგმენტები და ვერ მოახერხა თავისი სპეციფიკურობიდან გამომდინარე მისი დაბალმოლეკულური, ჰიდროფობული ნაწილის ჰიდროლიზი. მნიშვნელოვანია, რომ გაწმენდილი ფერმენტისგან მიღებული პროდუქტი იყო განსხვავებული ფაქტურის. განსაკუთრებით უნდა აღინიშნოს, რომ ამ ფერმენტით აჭრილ უცხიმო რძით დამზადებულ მასას გააჩნდა რძის ცხიმთან ასოცირებული საგემოვნო თვისება. აღნიშნული ფაქტი მიუთითებს მიღებული ფერმენტის სპეციფიკურ ზემოქმედებას კაზეინზე.

კვლევის დასასრულს, გაწმენდილი ფერმენტული პრეპარატით რძეზე ზემოქმედების შედეგად მიღებულია ხაჭოს მსგავსი, ცხიმთან ასოცირებული გემოვნებითი თვისებების პროდუქტი, რომელიც ტექსტურით ხაჭოს მსგავსია.

სპეციფიკური პროტეაზას გამოყენებით დამზდებულმა პროდუქტმა, სტანდარტით გათვალისწინებული კვლევითი ეტაპების დასრულების შემდეგ, სავსებით რეალურია, შეავსოს რძის ინდუსტრიის ფუნქციური სურსათის სია.

საკვანძო სიტყვები: პროტეაზა, მიკროსკოპული სოკო, უცხიმო რძე, ფერმენტაცია, გაწმენდილი ფერმენტი, ფუნქციური საკვები

Isolation of new specific proteolytic enzymes and their application to improve dairy products

Abstract

Due to the increased demands of the population for food enriched with bioactive components and functional ingredients, the development of technologies for the production of new, functional products from milk is gaining special relevance. The potential of these types of products is considered today as a long-term and sustainable perspective for the development of the global market. According to experts, in the near future, we will definitely see many new functional products made from milk, which will be intended for wide groups of consumers. The present doctoral research addresses the mentioned problem, resulting in the discovery of a new type of protease enzyme. This enzyme, upon its impact on milk, yields a distinct type of product characterized by a curd-like texture and taste properties associated with fat.

Microscopic fungi cultures are isolated from unsuitable milk products, with identified strains belonging to the genera *Scopularipsis, Penicillium, Mucor, Fusarium, and Geotrichum*. Screening under deep fermentation conditions reveals three protease-producing strains: *Mucor spp. 2-3, Penicillium candidum 5-1,* and *Penicillium camemberti 7-3.* Optimal carbon, nitrogen, and phosphorus sources are determined, with Penicillium candidum 5-1 selected for further research due to its superior protease activity.

Through successive experiments, the protease activity of Penicillium candidum 5-1 is enhanced by 62.3%. Toxicity tests confirm the strain's safety, prompting exploration into a new milk product. The technical protease preparation is obtained from the culture fluid, and the highest activity is found in the fraction precipitated by 60% ammonium sulfate saturation. This fraction induces short-term coagulation in milk before cutting, motivating further investigation.

Ion exchange chromatography and electrophoresis facilitate the complete removal of impurities and determination of the enzyme's molecular mass (18 kDa). Optimal temperature

(35-40°C) and pH (6.5) for enzyme activity are established. Electrophoresis reveals the enzyme's specificity in removing hydrophilic fragments from casein subunits. Importantly, the product resulting from the enzyme's action on skimmed milk exhibits a unique texture and flavor is associated with milk fat.

The purified enzyme's impact on milk leads to a product with curd-like properties and a distinct fat-associated taste, Corresponds with the characteristics of functional dairy foods. The research, adhering to standard procedures, positions the product as a feasible addition to the roster of functional foods in the dairy industry.
Key words: protease, microscopic fungi, skim Milk, Fermentation, purified enzyme, functional food

მადლობა

სადოქტორო კვლევის ფარგლებში გაწეული დახმარებისთვის მინდა მადლობა გადავუხადო:

პროფესორ ედიშერ კვესიტაძეს საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი

პროფესორ ლალი ქუთათელაძეს საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტი

პროფესორ ვახტანგ ლეჟავას, საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის რექტორი;

პროფესორ ნატო კობახიძეს, საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის სკოლის კოორდინატორი;

დოქტორ თამრიკო ხობელიას „ბიომედ“ ცენტრის დირექტორის მოადგილე.

ნაშრომში წარმოდგენილი კვლევითი სამუშაო განხორციელდა ,,შოთა რუსთაველის საქართველოს ეროვნული სამეცნიერო ფონდის ფინანსური მხარდაჭერით, PHDF-22-654 სადოქტორო გრანტის ფარგლებში''. რისთვისაც დიდ მადლობას ვუხდი ფონდს.

სარჩევი

დარგობრივი კომისიის რეკომენდაცია ii

ავტორის დეკლარაცია ii

აბსტრაქტი iv

Abstract vii

მადლობა viii

ცხრილების სია xii

გრაფიკების სია xii

სურათების სია xiii

შესავალი 1

2. ლიტერატურული მიმოხილვა 5

2.1 რძისა და რძის პროდუქტების როგორც ფუნქციური სურსათის გამოყენების პოტენციალი 5

2.2 რძის მრეწველობაში გამოყენებული კოაგულანტები 13

2.2.1. კაზეინის სტრუქტურა და ფერმენტული კოაგულაცია 13

2.3 რძის ფერმენტების გლობალური ბაზრის მიმოხილვა 17

2.4 პროტეაზები 21

2.5. მიკრობული წარმოშობის პროტეაზები 24

2.6 პროტეაზას პროდუცენტი მიკროორგანიზმების კულტივირების პირობები 29

2.7 მიკრობული პროტეაზების გამოყენების პერსპექტივები კვების მრეწველობაში 34

3. მეთოდოლოგია 38

3.1 კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა 38

3.2 მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირება 39

3.3 პროტეაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების სკრინინგი 40

3.4 პროტეაზას პროდუცენტების საკვები არის შემადგენლობის ოპტიმიზაცია.....41

3.5 პროტეაზას პროდუცენტების კულტივირების ოპტიმალური პირობების დადგენა.....42

3.6 პროტეაზური აქტივობის განსაზღვრა.....42

3. 7 კულტურალურ სითხეში ცილის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით.....44

3.8 პროტეაზების ტექნიკური პრეპარატების მიღება.....45

3.9 რძის შემადედებელი აქტივობის ანალიზი (MCA) 46

3.10 შერჩეული შტამის ტოქსიკოლოგიური კვლევა 46

3.11 ფერმენტის გაწმენდა და ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების შესწავლა 47

3.11.1 იონცვლადი ქრომატოგრაფია 47

3.11.2 გელდიფუზიური მეთოდი.....47

3.11.3 ელექტროფორეზი.....48

3.11.4 ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული და pH ოპტიმუმების დადგენა.....49

3.12 გაწმენდილი ფერმენტით რძის აჭრა და პროდუქტების მიღების ტექნოლოგიური სქემის შემუშავება.....49

3. 12.1 მიღებულ პროდუქტში ცილის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით 50

3.12.2 მიღებულ პროდუქტში ცხიმების განსაზღვრა გერბერის მეთოდით 50

3. 12.3 მიღებულ პროდუქტში საერთო შაქრების განსაზღვრა 51

3.13 ახალი პროტეაზური ფერმენტის მიერ რძის აჭრის შედეგად მიღებული პროდუქტის სენსორული ანალიზი 52

3.14 სტატისტიკური ანალიზი.....52

4. ექსპერიმენტული შედეგები.....53

4.1 კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა 53

4.2 გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიკაცია 53

4. 3 პროტეაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების სკრინინგი.....57

4.4 პროტეაზას პროდუცენტების საკვები არის შემადგენლობის ოპტიმიზაცია 60

4.5 *Penicillium candidum*- 5-1-ის კულტივირების პირობების ოპტიმიზაცია 65

4.6 პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატის მიღება.....68

4.7 რძის შემადედებელი აქტივობის ანალიზი (MCA).....72

4.8 ფერმენტის გაწმენდა და ფიზიკურ -ქიმიური თვისებების შესწავლა.....72

4.8.1 იონცვლადი ქრომატოგრაფია 72

4.8.2 გელ-დიფუზიური მეთოდით პროტეაზური აქტივობის განსაზღვრა 74

4.8.3 ელექტროფორეზი.....75

4.9 გაწმენდილი ფერმენტის მოქმედების ოპტიმალური პირობების განსაზღვრა 76

4.10 მიღებული გაწმენდილი ფერმენტით რძის აჭრა და ტექნოლოგიური სქემის შემუშავება.....78

4.11 მიღებული სპეციფიკური პროტეაზას საშუალებით პროდუქტის დამზადების და ტრადიციული გზით ხაჭოს მიღების ზოგადი ტექნოლოგიური სქემა 79

4.12 მომხმარებლის მიერ ახალი პროტეაზური ფერმენტით მიღებული პროდუქტის სენსორული ანალიზი და მიმღებლობის დადგენა 82

5. შედეგების განხილვა 84

6. დასკვნები და რეკომენდაციები.....97

7. ბიბლიოგრაფია.....99

ცხრილების სია

ცხრილი 1. კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან გამოყოფილი სოკოების კულტურები.....56

ცხრილი 2. შერჩეული პროტეაზას პროდუცენტების ფერმენტული ინდექსის დადგენა 59

ცხრილი 3. პროტეაზას პრეპარატის მიღების ეტაპები 69

ცხრილი 4. რძის შემადედებელი აქტივობის ანალიზი (MCA) 72

ცხრილი 5. იონცვლადი ქრომატოგრაფიის შემდეგ მიღებული ფრაქციების შეფასება..... 75

ცხრილი 6. მიღებულ პროდუქტში ცილების, ცხიმების და ნახშირწყლების მაჩვენებელი.....80

ცხრილი 7. მომხარებლის მიერ ახალი პროტეაზური ფერმნტით რძის აჭრის შედეგად მიღებული პროდუქტის შეფასების მაჩვენებელი.....83

გრაფიკების სია

გრაფიკი 1. თიროზინის სტანდარტული საკალიბრო მრუდი.....44

გრაფიკი 2. ხარის შრატის ალბუმინის სტანდარტული საკალიბრო მრუდი 45

გრაფიკი 3. გლუკოზის სტანდრტული საკალიბრო მრუდი.....51

გრაფიკი 4. ნახშირბადის სხვადასხვა წყაროს გავლენა შერჩეული შტამების პროტეაზურ აქტივობაზე..... 62

გრაფიკი 5. აზოტის სხვადასხვა წყაროს გავლენა შერჩეული შტამების პროტეაზურ აქტივობაზე 62

გრაფიკი 6 . ფოსფორის სხვადასხვა წყაროს გავლენა შერჩეული შტამების პროტეაზურ აქტივობაზე..... 63

გრაფიკი 7. ლაქტოზის სხვადასხვა კონცენტრაციის გავლენა *P.candidum* 5-1-ის პროტეაზურ აქტივობაზე.....63

გრაფიკი 8. კაზეინის სხვადასხვა კონცენტრაციების გავლენა *P.candidum* 5-1-ის პროტეაზურაქტივობაზე.....64

გრაფიკი 9. KH_2PO_4-ის სხვადასხვა კონცენტრაციის გავლენა *P.candidum* 5-1-ის პროტეაზურ აქტივობაზე.....64

გრაფიკი 10. ტემპერატურის გავლენა *Penicillium candidum*- 5-1-ის პროტეაზურ აქტივობაზე.....66

გრაფიკი 11. საკვები არის საწყისი pH-ის გავლენა *Penicillium candidum*- 5-1-ის პროტეაზურ აქტივობაზე.....66

გრაფიკი 12. პროტეაზას სინთეზის დინამიკა *Penicillium candidum*- 5-1-ის კულტივირების ხანგრძლივობაზე დამოკიდებულებით 67

გრაფიკი 13. ტექნიკური პრეპარატის გაწმენდა იონცვლადი ქრომატოგრაფიით.....73

გრაფიკი 14. pH-ის გავლენა გაწმენდილი ფერმენტის პროტეოლიზურ აქტივობაზე.....77

გრაფიკი 15. ტემპერატურის გავლენა გაწმენდილი ფერმენტის პროტეოლიზურ აქტივობაზე.....77

გრაფიკი 16. მომხარებლის მიერ ახალი პროტეაზური ფერმენტით რძის აჭრის შედეგად მიღებული პროდუქტის შეფასება სხვადასხვა კრიტერიუმის მიხედვით.....82

სურათების სია

სურათი 1. Penicillium -ის გვარის სხვადასხვა სახეობები..... 53

სურათი 2. Mucor-ის გვარის სახეობა.....54

სურათი 3. Penicillium candidum 5-1.....54

სურათი 4. Penicillium camemberti 7-5 და Penicillium spp.8-3 55

სურათი 5. Geotrichum candidum spp. **9-1**.....55

სურათი 6. გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების ლიზისის ზონის დიამეტრი

.....58

სურათი 7. რძის შემადედებელი აქტივობა 70

სურათი 8. გელ-დიფუზიური მეთოდით მიღებული ფრაქციების პროტეაზური აქტივობის განსაზღვრა.....74

სურათი 9. *Penicillium candidum*- 5-1 დან გამოყოფილი პროტეაზას პოლიაკრილამიდის გელის (SDS-PAGE) ელექტროფორეზი. 76

სურათი 10. რძის აჭრა გაწმენდილი ფერმენტის საშუალებით.....78

სურათი 11. პოლიაკრილამიდის გელის (SDS-PAGE) ელექტროფორეზი..... 79

სქემა 1. ახალი სპეციფიკური პროტეაზას საშუალებით პროდუქტის მიღებისა და ტრადიციული გზით ხაჭოს მიღების ზოგადი ტექნოლოგიური სქემა.....81

შესავალი

რძის პროდუქტები ადამიანის საკვების მნიშვნელოვანი ნაწილია და მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში ოფიციალურად, დიეტური კვების რაციონში შედის. რძე და რძის პროდუქტები მდიდარია სასიცოცხლოდ აუცილებელი საკვები კომპონენტების ფართო სპექტრით, ამიტომ რეკომენდირებული დოზით მათი მიღება ორგანიზმს მეტაბოლიზმის ყველა ეტაპზე უზრუველყოფს საკვები ნივთიერებებით. რძის პროდუქტები შეიცავს სრულფასოვან ცილებს, ცხიმებს, ოლიგოსაქარიდებს, A, D, E, K ვიტამინებსა და ისეთ მიკრო და მაკროელემენტებს, როგორიცაა: Ca, Mg, P და Zn (Voronina et al., 2022). რძეში შემავალი ცილები შეიცავენ შეუცვლელ ამინომჟავებს და ხასიათდებიან მაღალი ბიოლოგიური ღირებულებით (Timon et al., 2020).

რძის პროდუქტების წარმოებაში ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი კომპონენტი პროტეაზური ფერმენტებია, რომლებიც განსაკუთრებულ როლს ასრულებენ ყველის ინდუსტრიაში, ანიჭებენ პროდუქტს გემოსა და სტრუქტურას. ისტორიულად, ყველის წარმოებაში გამოყენებული ფერმენტული პრეპარატების უმეტესობა ძუძუმწოვრების კუჭის ექსტრაქტებს წარმოადგენდა. მოგვიანებით, ამ პროცესის აქტიური ინგრედიენტები დადგინდა კერძოდ, პროტეოლიზური ფერმენტები- პეპსინი და ქიმოზინი, რომელიც დღეს უფრო ხშირად მოიხსენება რენინის სახელით (Liu et al., 2021). რძის შემადედებელი ფერმენტების ძირითადი გამოყოფის წყაროებია: ცხოველური, მცენარეული და მიკრობული (Mohsin, et. al., 2023; Khan et. al., 2023; Mozzon et al. 2020). ყველის დამზადების მიზნით, დღეს რძის კოაგულანტებს სამივე წყაროდან ღებულობენ, თუმცა მათი მიღება და გამოყენება მთელ რიგ სირთულეებთანაა დაკავშირებული: რელიგიური ფასეულობები (მაგ. ისლამი და იუდაიზმი), დიეტა (ვეგეტარიანელობა) და ხბოს რეკომბინანტული ქიმოზინის აკრძალვა (საფრანგეთში, გერმანიასა და ნიდერლანდებში), აღნიშნული ფაქტორები აუცილებელს ხდის რძის შედედებისთვის ალტერნატიული წყაროების ძიებას (Ahmed et al., 2016).

მთელ მსოფლიოში ყოველწლიურად იზრდება მოთხოვნა ყველის პროდუქციაზე, შესაბამისად საჭირო ხდება რძის შემადედებელი ფერმენტების წარმოების გაზრდა. მაჭიკის ფერმენტი საკმაოდ დეფიციტურია და ყველის წარმოებაში ერთ-ერთ მალიმიტირებელ კომპონენტს წარმოადგენს. სხვადასხვა ქვეყანაში მცენარეებიდან გამოყოფენ პროტეოლიზური ფერმენტების ექსტრაქტს, თუმცა წარმოების მაღალი ხარჯების გამო ისინი იშვიათად გამოიყენება ყველის წარმოებაში. აღნიშნული ფაქტორები აუცილებელს ხდის რძის შედედებისთვის ალტერნატიული წყაროების ძიებას. პროტეაზებზეა ასევე დამოკიდებული რძიდან მიღებული პროდუქტების საგემოვნო თვისებებიც(Ahmed et al., 2016). აღნიშნულმა ფაქტორებმა მაჭიკის ფერმენტის ალტერნატიული წყაროების ძიება განაპირობა. ამ დეფიციტის ფონზე მიკრობული წყარო წარმოადგენს ყველაზე მასშტაბურ და მრავალფეროვან ალტერნატივას, ცნობილია, რომ მიკრობულ წარმოშობის რძის შემადედებელ ფერმენტებს აქვთ რიგი უპირატესობები ცხოველური და მცენარეული წარმოშობის ფერმენტებთან შედარებით. მიკრობული წარმოშობის ფერმენტები არის შედარებით იაფი, ახასიათებს ბიოქიმიური მრავალფეროვნება, უსაფრთხოება, წარმოების სიმარტივე და ბოლოს, პროდუქტის გაუმჯობესებული საგემოვნო თვისებები (Abada, 2019). სტაბილური ფერმენტების მიღება ერთ-ერთი ყველაზე საკვანძო პრობლემაა ბიოტექნოლოგიასა და ფერმენტულ ტექნოლოგიაში. ცნობილია, რომ კომერციული ფერმენტების 90%-ზე მეტი მიკროორგანიზმებიდანაა მიიღებული. დღეს მიკრობული წარმოშობის ფერმენტები ფართოდ გამოიყენება მრეწველობის სხვადასხვა დარგებში (კვების, მსუბუქ და ქიმიურ მრეწველობასა და მედიცინაში), (Solanki et al., 2021). ამჟამად, მსოფლიო მასშტაბით ყველის 30% იწარმოება მიკრობული რენინის საშუალებით. მიკროორგანიზმების სხვადასხვა ტაქსონომიური ჯგუფის წარმომადგენლები ასინთეზებენ განსხვავებულ პროტეაზებს, რომლებიც თავის მხრივ წარმოქმნიან განსხვავებული ორგანოლეპტიკური თვისებების პროდუქტს (Vishwanatha et al., 2010; Sathya et al., 2009; Foda et al., 2012). ფერმენტ პროტეაზას წარმომქმნელი მიკროორგანიზმები ძირითადად ბაქტერიები, სოკოები და აქტინომიცეტები არიან (Agu et al., 2017; Ojiagu et al., 2018). რძის შემადედებელი ფერმენტების პროდუცენტებს შორის განსაკუთრებულ ყურადღებას იპყრობს

მიკროსკოპული სოკოები სწრაფი ზრდის, მაღალი პროდუქტიულობისა და კულტივაციისთვის საჭირო სუბსტრატების დაბალი ღირებულების გამო. (Agu et al., 2023; Kumar and Jain, 2017; Souza et al., 2015; Bhatia et al., 2021). სოკოებს ბაქტერიებთან შედარებით გარკვეული უპირატესობებიც გააჩნია, რაც მდგომარეობს: პოპულაციის სტაბილურობასა და მაღალ აქტივობაში, წყლის ნაკლებობისა და მჟავა პირობებში უპირატეს ზრდაში, სწრაფი ადაპტაციის უნარში, რის გამოც სოკოური წარმოშობის პროტეაზების გამოყენება სამრეწველო დანიშნულებით გაცილებით მომგებიანია. პროტეაზების ცნობილი პროდუცენტებია მიკროსკოპული სოკოების სახეობები- *Aspergillus oryzae, , Mucor circinelloides, Rhizomucor miehei* და სხვა. პროტეაზას პროდუცენტ - მიკროსკოპული სოკოების კულტურებს გამოყოფენ ძირითადად ნიადაგიდან და კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებდან (Bensmail et al., 2020; Sharma, 2019).

აღნიშნულიდან გამომდინარე, ნებისმიერი ახალი სამეცნიერო კვლევა, რომელიც მიმართულია პროტეაზების ახალი პროდუცენტების გამოვლენისკენ, მათი კულტივირების პირობების ოპტიმიზაციის საფუძველზე ფერმენტების სპეციფიკური ეფექტის გაძლერებისკენ და გაუმჯობესებული გემოვნებითი თვისებების პროდუქტის მიღებისკენ, ძალზედ მნიშვნელოვანი შეიძლება აღმოჩნდეს რძის პროდუქტების ასორტიმენტის გაფართოებისა და ფუნქციური საკვების ინდუსტრიის შემდგომი განვითარებისთვის.

კვლევის მიზნები და ამოცანები

წინამდებარე სადოქტორო კვლევის მიზანს შეადგენდა განსხვავებული სპეციფიკურობის პროტეაზის აღმოჩენა და მისი გამოყენებით რძის ახალი, გაუმჯობესებული თვისებების პროდუქტის მიღება.

დასახული მიზნის მისაღწევად დაიგეგმა შემდეგი ამოცანების განხორციელება:

- კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან (ხაჭო, ყველი) მიკროსკოპული სოკოების კულტურების გამოყოფა.
- გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიკაცია.
- იდენტიფიცირებულ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის პროტეაზას პროდუცენტი - შტამების სკრინინგი.

- სკრინინგის შედეგად შერჩეული პროტეაზას პროდუცენტი შტამებისათვის კულტივირების ოპტიმალური პირობების დადგენა და საკვები არის ოპტიმიზაცია, შტამის უვნებლობის დასადგენად ტოქსიკოლოგიური კვლევის ჩატარება.
- განსხვავებული სპეციფიკურობის მქონე პროტეაზას ფერმენტული (ტექნიკური) პრეპარატის მიღება და რძეზე ზემოქმედება
- სამრეწველო მნიშვნელობის პროტეაზას გაწმენდა და მისი ფიზიკურ–ქიმიური მახასიათებლების შესწავლა.
- გაწმენდილი სპეციფიკური ფერმენტის რძეზე ზემოქმედება, განსხვავებული პროდუქტის მიღების მიზნით.
- ბიოტექნოლოგიური სქემის შემუშავება.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და პრაქტიკული ღირებულება

სადისერტაციო ნაშრომის სიახლეს წარმოადგენს ახალი ფერმენტი - განსხვავებული, სპეციფიკურობის პროტეაზა, რომელიც ფართო სპეციფიკურობის პროტეაზებისგან განსხვავებით, ახორციელებს რძის აჭრას ხაჭოსებრ მასამდე და არ ახდენს მის სრულ ჰიდროლიზს, რაც მეტყველებს პროტეოლიზური ფერმენტის არა ფართო სპექტრზე, არამედ მის განსაკუთრებულ სპეციფიკურობაზე.

სპეციფიკური პროტეაზას გამოყენებით რძიდან მიღებულია პროდუქტი, რომელშიც მომატებულია არა ცხიმის შემცველობა, არამედ - ცხიმთან ასოცირებული გემოვნებითი თვისება. ყოველივე აღნიშნული პროდუქტს ანიჭებს განსხვავებულ საგემოვნო თვისებებს, ხაჭოს მსგავს კონსისტენციას და დიეტური კვების რაციონში მისი ჩართვის საშუალებას იძლევა. ამრიგად, რძის ინდუსტრიაში სპეციფიკური პროტეაზას გამოყენებას მნიშვნელოვანი პრაქტიკული ღირებულებაც ექნება, და ბოლოს, ნაშრომის მეცნიერულ სიახლეს წარმოადგენს ისიც, რომ კვლევის შედეგად შერჩეულია მიკროსკოპული სოკოს შტამი - განსხვავებული სპეციფიკურობის პროტეაზას ახალი პროდუცენტი.

განხორციელებული კვლევა ინტერდისციპლინურია. კვლევის პროცესში გამოყენებულია მიკრობიოლოგიური, ბიოქიმიური და ბიოტექნოლოგიური მეთოდები. მოსალოდნელი შედეგები მიეკუთვნება:

- მიკრობიოლოგიის სფეროს, რადგან განხორციელდა მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა საწყისი წყაროებიდან, სუფთა კულტურების მიღება და იდენტიფიკაცია. კულტივირების პირობების შერჩევა.
- ბიოქიმიის სფეროს- განხორცილედა ფერმენტის გაწმენდა, განისაზღვრა პროტეაზური აქტივობა, დადგინდა ფერმენტის მახასიათებლები და ფერმენტის მოქმედებისთვის ოპტიმალური პირობები.
- ბიოტექნოლოგიის სფეროს, რადგან შემუშავდა სპეციფიკური პროტეაზას გამოყენებაზე დაფუძნებული, რძის ახალი პროდუქტის მიღების ბიოტექნოლოგიური სქემა.

2. ლიტერატურული მიმოხილვა

2.1 რძისა და რძის პროდუქტების როგორც ფუნქციური სურსათის გამოყენების პოტენციალი

მსოფლიოში არსებული სურსათის დეფიციტი, მოსახლეობის ცხოვრების წესის ცვლილებები და სოციალურ-ეკონომიკური ტენდენციები - პირდაპირ მიუთითებს ადამიანისთვის ჯანსაღი და დაბალანსებული კვების რაციონის შექმნის აუცილებლობაზე (Tadesse and Emire 2020). დღეს, სურსათის თანამედროვე ბაზარზე განსაკუთრებით მაღალ მოთხოვნადი და პოპულარულია ბიოაქტიური ნაერთებით მდიდარი ფუნქციური საკვები პროდუქტები. ფუნქციურ საკვებ პროდუქტად მიიჩნევა ისეთი პროდუქტები, რომლებიც ორგანიზმის საკვები კომპონენტებით მომარაგების ძირითად ფუნქციასთან ერთად ფლობს ამა თუ იმ დაავადების პრევენციას ან ადამიანის ჯანმრთელობაზე დადებით მოქმედების ეფექტს (Alongi & Anese, 2021).

რძე და რძის პროდუქტები ჯანსაღი კვების მნიშვნელოვან ნაწილს შეადგენენ და განსაკუთრებულ როლს ასრულებენ ფუნქციური საკვების ინდუსტრიის განვითარებაში. მაგალითად, ევროპაში რძის პროდუქტები ფუნქციური სურსათის ბაზრის ძირითადი წყაროა და წარმოებული ფუნქციური საკვების თითქმის 60%-ს შეადგენს. ფერმენტირებული რძის პროდუქტები დღესაც განიხილება, როგორც ჯანმრთელობისთვის სასარგებლო. მომხმარებლი, რომელიც სულ უფრო მეტ ყურადღებას უთმობს საკუთარ ჯანმრთელობას, ბუნებრივია, ინტერესდება ფუნქციური საკვები პროდუქტებით, რაც რძის ფუნქციური პროდუქტების ბაზრების ჩამოყალიბებას უწყობს ხელს. აღნიშნულიდან გამომდინარე, რძის თანამედროვე ინდუსტრიაში ძალიან აქტუალურია პროდუქციის ასორტიმენტის გაფართოება ბიოაქტიური ნაერთებით მდიდარი, ჯანმრთელობისთვის ხელშემწყობი პროდუქტებით. ცნობილია, რომ რძის პროდუქტებიდან ძირითად ფუნქციურ საკვებს წარმოადგენ: რძე, ყველი, იოგურტი, კუმისი, კეფირი და არაჟანი (Varghese, et al., 2023). რძიდან დამზადებული პროდუქტების მრავალფეროვნებიდან გამომდინარე, მათი წარმოების ტექნოლოგიები და დამუშავების მეთოდები ძალიან განსხვავებულია. მსოფლიო ბაზარზე არსებული რძის პროდუქტების თითქმის 90% დაფუძნებულია ძროხის რძის გამოყენებაზე. გარდა ამისა, რძის პროდუქტების მნიშვნელოვანი რაოდენობა ასევე კამეჩის (ძირითადად ინდოეთში; მსოფლიოში ყველაზე დიდი რძის ბაზარი), თხის, ცხვრის და ზოგიერთი სხვა ძუძუმწოვრების რძეზე მოდის (Gerosa & Skoet, 2012).

ცხადია, რძის შემადგენლობა განსხვავდება მათი წყაროს მიხედვით. სხვადასხვა ძუძუმწოვრის რძისგან იწარმოება მრავალი პროდუქტი, რომელთაც განსხვავებული გემო და კონსისტენცია აქვთ.

ბუნებრივი შემადგენლობიდან გამომდინარე, რძე და რძის პროდუქტები რაციონალურ საკვებს წარმოადგენს ყველა ასაკობრივი ჯგუფისთვის (Michaelidou, 2008; Pereira, 2014).

რძე არის მრავალკომპონენტიანი ნაზავი, რომლის ძირითად კომპონენტებს შეადგენენ: ცილები, ცხიმები, ლაქტოზა, ვიტამინები და მინერალები (Górska-Warsewicz, et. al., 2019). რძის ცილები ძალზედ მნიშვნელოვანი და აუცილებელია ადამიანისთვის,

რადგან ისინი შეუცვლელი ამინომჟავების მთელ სპექტრს შეიცავენ. რძეში არსებული ცილის დაახლოებით 80% შედგება αs1-, αs2-, β- და κ-კაზეინისგან, ხოლო- დაახლოებით 20% კლასიფიცირდება, როგორც შრატის ცილები. ესენია, ძირითადად α-ლაქტალბუმინი, β-ლაქტოგლობულინი და შრატის ალბუმინი. რძის ცილების მონელების მაჩვენებელი პროცენტულად უფრო მაღალია 95% (გამონაკლისია კაზეინი, მონელობადობის ხარისხი- 94.1%) ვიდრე სოიოს, ბარდის, ხორბლის და რაფსის ცილების (84-91.5%). რაც მთავარია, რძის პროდუქტებში არსებული პეპტიდების უმრავლესობა ბიოაქტიურია (Tunick & Hekken, 2015; Mills and et. al., 2011).

შრატის ცილები საკმაოდ ჰგავს ჩონჩხის კუნთების ცილებს, ამიტომ ფიტნესით დაინტერესებული ადამიანები დიეტურ რაციონს ხშირად შრატის პროტეინით ავსებენ.

ცნობილია, რომ კაზეინი აადვილებს Ca-ისა და ფოსფატის შეწოვას მსხვილ ნაწლავში და ბიოაქტიური პეპტიდების სინთეზის ძირითად სუბსტრატს წარმოადგენს. აღნიშნული პეპტიდები რძის ფერმენტული დუღილის პროდუქტებია. ზოგიერთი ბიოაქტიური ნაერთი ლაქტოტრიპეპტიდს წარმოადგენს. მაგალითად, Ile-Pro-Pro და Val-Pro-Pro, რომლებიც გვხვდება შვეიცარიული ტიპის ყველებში, სადაც მათი შემცველობა 19-დან 182 მგ/კგ-მდე მერყეობს (Bütikofer, et al., 2008).

მრავალ სამეცნიერო სტატიაში აღნიშნავენ რძისა და რძის პროდუქტების კომპონენტების ბიოაქტიურ ფუნქციურ თვისებებს (Sharma, and et. al., 2023; Ali, et. al., 2022; dos Santos, et. al., 2022). რძისა და რძის პროდუქტების ბიოაქტიურ კომპონენტებს შორის ყველაზე კარგად შესწავლილია ბიოაქტიური პეპტიდები (BPs). კიტსის და ვეილერის მიერ BPs-ი განისაზღვრა, როგორც სპეციფიური ცილის ფრაგმენტები, რომლებსაც დადებითი გავლენა აქვთ ფიზიოლოგიურ და მეტაბოლურ ფუნქციებზე, ან -ორგანიზმის საერთო მდგომარეობაზე, ან -ზოგადად, ჯანმრთელობაზე (Kitts and Weiler, 2003). BPs-ი მომხმარებლებს შეიძლება მიეწოდოს როგორც დიეტურ დანამატებში, ასევე - ჩვეულებრივ ან სამედიცინო საკვებში. დადგენილია, რომ ფუნქციურ ბიოაქტიურ პეპტიდებს გააჩნია ძალიან მნიშვნელოვანი ბიოლოგიური აქტივობა და ფუნქციები, მათ შორის- ანტიმიკრობული, ანტიჰიპერტენზიული, ანტიოქსიდანტური, ანტიციტოტოქსიური, იმუნომოდულატორული, ოპიოიდური

აქტივობები, ისინი ასევე მინერალების მდიდარ წყაროს წარმოადგენენ. მკვლევართა სხვადასხვა ჯგუფის მიერ შესწავლილია დიეტური ცილებიდან მიღებული ბიოაქტიური პეპტიდები (Fitzgerald and Meisel, 2003; Guo, et al., 2023; Heydari, et al., 2023). დადგენილია, რომ ამგვარი ცილები BPs-ებს შეიცავს არააქტიური ფორმით და ისინი ცილებიდან შეიძლება გამოთავისუფლდნენ სამი გზით: საჭმლის მომნელებელი ფერმენტებით განხორციელებული ჰიდროლიზით, პროტეოლიზური აქტივობის მქონე მიკროორგანიზმების მიერ ცილების ჰიდროლიზით ან პროტეაზების ზემოქმდებით .

გობეტისა და სხვა მეცნიერების მიერ დადგენილია, რომ კაზეინიდან მიღებული ბიოაქტიური პეპტიდები აფერხებენ ბაქტერიების გამრავლებას და ამცირებენ კბილის მინანქრის დემინერალიზაციას. ამავე ავტორების მონაცემებით, ზოგიერთი პეპტიდი ფლობს ანტიმიკრობულ ეფექტს: მათ ბაქტერიის მემბრანის დაშლის უნარი შესწავთ, რის გამოც მემბრანა კარგავს გამტარებლობის მთავარ ფუნქციას და მიკროორგანიზმის სიკვდილის მიზეზი ხდება. რძის მთლიანი ანტიბაქტერიული ეფექტი აღემატება ცალკეული იმუნოგლობულინისა და არაიმუნოგლობულინის ჯამს, როგორიცაა ლაქტოფერინი, ლაქტოფერიცინები, ლაქტოპეროქსიდაზა, ლიზოციმი, ლაქტენინი და ა.შ. (Gobbetti et al., 2007; Singh et al., 2023). პეპტიდები, რომლებიც ავლენენ ანტიმიკრობულ აქტივობას, იზოლირებული და გაწმენდილია მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის რძის ცილის ჰიდროლიზატებიდან, საკვები მცენარეებიდან, თევზიდან და კვერცხიდან (Clare et al., 2003). ანტიმიკრობულ პეპტიდებს შორის ყველაზე მეტად შესწავლილია ლაქტოფერიცინები, რომლებიც მიიღება მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვისა და ადამიანის ლაქტოფერინიდან (Kitts and Weiler 2003; Wakabayashi et al., 2003). რიგი ავტორების მიერ ნაჩვენებია, რომ ლაქტოფერიცინებს აქვთ ანტიმიკრობული აქტივობა სხვადასხვა გრამდადებითი და გრამუარყოფითი ბაქტერიების, საფუარა და ძაფისებრი სოკოების მიმართ (Gruden & Poklar, 2021; Fernandes & Carter, 2017). ლაქტოფერიცინი არის ამფიპათიური, კათიონური პეპტიდი, ანტიმიკრობული და კიბოს საწინააღმდეგო თვისებებით. ლაქტოფერიცინი შეიძლება წარმოიქმნას პეპსინის ზემოქმედებით ლაქტოფერინის დაშლით. კვლევებმა აჩვენა, რომ რძის ცილას- ლაქტოფერინს აქვს კიბოს

საწინააღმდეგო თვისებები. თაგვებზე ჩატარებული კვლევებით დადგინდა, რომ ლაქტოფერინმა მნიშვნელოვნად შეამცირა ფილტვის კიბოს უჯრედების პროლიფერაცია და ფილტვის უჯრედების ანთებითი პროცესები. ლაქტოფერინი ამცირებს სიცოცხლისუნარიანობას ძუძუს კიბოს უჯრედების ხაზზეც (Tung, et al.,2013).

დადგენილია, რომ ანტითრომბოზული პეპტიდები ამცირებენ ან აფერხებენ სისხლის შედედების პროცესს. კაზეინომაკროპეპტიდი (CMP) არის პეპტიდი, რომელიც წარმოიქმნება ფერმენტ რენინით κ -კაზეინის კოაგულაციის შედეგად. აღნიშნულ კაზეინომაკროპეპტიდს აქვს თრომბოციტების აგრეგაციის და ადამიანის ფიბრინოგენის γ-ჯაჭვის დაკავშირების დათრგუნვის ფუნქცია თრომბოციტების ზედაპირის ფიბრინოგენის რეცეპტორებთან (Mehla, 2020). ცხვრის კაზეინებიდან მიღებული κ-კაზეინოგლიკოპეპტიდი ამცირებს თრომბინისა და კოლაგენით გამოწვეული თრომბოციტების აგრეგაციას (Bouroutzika, et al., 2021).

რძის ცილიდან მიღებულმა ბიოქტიურმა ნაერთებმა შეიძლება გამოყენება ჰპოვონ ნეიროფარმაკოლოგიაში. დადგენილია, რომ ერთ-ერთი აგონისტი- ნაერთი, რომელიც უკავშირდება ცილა- რეცეპტორს და მის გააქტიურებას იწვევს, არის β-კაზეინიდან მიღებული μ-ოპიოიდური პეპტიდი- β- კაზომორფინ-5 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly), რომელსაც დადებითი ეფექტი აქვს სწავლასა და მეხსიერების გაუმჯობესებაზე. გობეტის, მეისისა და სხვა მკვლევრების მიერ იდენტიფიცირებულია მრავალი ასეთი ოპიოიდური პეპტიდი (Gobbetti et al., 2007; Meisel and FitzGerald, 2007).

რძის კაზეინიდან და ძირითადი შრატის პროტეინებიდან წარმოქმნილი პეპტიდები და ცილოვანი ჰიდროლიზატები იმუნომოდულატორულ ეფექტს [იმუნური უჯრედების ფუნქციებს] ავლენენ, მათ შორის ლიმფოციტების პროლიფერაციის, ანტისხეულების და ციტოკინის სინთეზის რეგულირების უნარს (Minj and Anand, 2020). კაზეინის წარმოებული პეპტიდები წარმოიქმნება რძემჟავა ბაქტერიების მიერ რძის დუღილის პროცესში. ამ პეპტიდებმა განსაკუთრებული ინტერესი გამოიწვიეს მათი იმუნური უჯრედების მსგავსი ფუნქციების გამო. ნაჩვენებია, რომ ეს იმუნომოდულატორული პეპტიდები არეგულირებენ ადამიანის ლიმფოციტების პროლიფერაციას, ასტიმულირებენ მაკროფაგების ფაგოციტურ აქტივობას და

არეგულირებენ გარკვეული ციტოკინების წარმოებას (Korhonen and Pihlanto, 2003, 2007; Matar et al., 2003). რძისგან წარმოქმნილ იმუნომოდულატორ პეპტიდებს მიეკუთვნება αs1-CN f194-199 (αs1-იმუნოკასოკინინი) და β-CN f193-202, f63-68, f191-193 (იმუნოპეპტიდები), რომლებიც სინთეზირდება პეპსინ-ქიმოზინის მიერ რძის ჰიდროლიზით. კომერციული ბაქტერიული შტამებით განხორციელებული კაზეინის ჰიდროლიზით, იოგურტში შესაძლებელია წარმოიქმნას ისეთი ბიოაქტიური პეპტიდები, რომლებიც დადებით გავლენას ახდენენ მსხვილი ნაწლავის უჯრედებზე. ასევე დადგენილია, კაზეინოფოსფოპეპტიდების (CPPs) ციტომოდულატორული ეფექტი. კაზეინის ფრაქციებიდან მიღებულ ციტომოდულატორ პეპტიდებს შეუძლიათ დათრგუნონ კიბოს უჯრედების ზრდა ან გააქტიურონ იმუნოკომპეტენტური და ახალშობილთა ნაწლავის უჯრედები (Meisel and Fitzgerald, 2003). გობეტისა და მისი თანამშრომლების მიერ დადგენილია ლეიკემიის უჯრედების პროლიფერაციის შეფერხება გუდას ყველის ლიოფილიზებული ექსტრაქტიდან გამოყოფილი პეპტიდების ზემოქმედებით (Gobbetti et al., 2007)

ცნობილია,რომ რძის პროდუქტები შეიცავს მთელ რიგ მიკრო- და მაკროელემენტებს: Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se და Zn, რომლებიც აუცილებელია ორგანიზმის სასიცოცხლო ფუნქციების განხორციელებისთვის (Voronina, et al., 2022). მაგ., Ca-ის ადეკვატური მიღება ზრდის ძვლის სიმკვრივეს და ხელს უშლის ოსტეოპოროზის განვითარებას ხანდაზმულებში (Caroli, et al., 2011). კლინიკური კვლევების მონაცემებით, Ca-ის მიღება რძიდან 50-100%-ით უფრო ეფექტურია ვიდრე პრეპარატებიდან (Mills, et al., 2011). ცნობილია, რომ Ca ამცირებს ცხიმის შეწოვას ნაწლავში, ამიტომ რძის პროდუქტებიდან მიღებული Ca და სხვა მინერალები ამცირებენ სხეულში ცხიმის დაგროვებას და აჩქარებენ წონის კლებას დიეტის დროს (Soares, et al., 2012).

რძე არის თითქმის ყველა ვიტამინის წყარო. ის შეიცავს როგორც წყალში ხსნად, ასევე-ცხიმში ხსნად ვიტამინებს. მაგ. ძროხის რძეში საკმარისი რაოდენობითაა A, B1, B2, B6 და B12 ვიტამინი და ბიოტინი (Polzonetti, et al., 2020). რძეში C ვიტამინის მცირე რაოდენობა აიხსნება პასტერიზაციით დაშლის გამო. ვიტამინი A (რეტინოლი)

მნიშვნელოვანია მხედველობისთვის და მონაწილეობს იმუნურ ფუნქციაში, რეპროდუქციაში, უჯრედულ კომუნიკაციაში, დიფერენციაციასა და ზრდაში. ვიტამინი B1 (თიამინი) ხელს უწყობს განშტოებული ჯაჭვის ამინომჟავების, ნახშირწყლების და ცხიმოვანი მჟავების მეტაბოლიზმს. ვიტამინი B2 (რიბოფლავინი) მონაწილეობს ნახშირწყლების, ცხიმების და ცილების ცვლაში. ვიტამინი B3 (ნიაცინი) არის კოენზიმების (NAD და NADP) წინამორბედი, რომლებიც პასუხისმგებელნი არიან ალკოჰოლის კატაბოლიზმზე, ნახშირწყლების, ცხიმების და ცილების სინთეზზე. ვიტამინი B6 (პირიდოქსინი) ძირითადად დაკავშირებულია პროტეინის მეტაბოლიზმთან და მონაწილეობს კოგნიტურ განვითარებასა და იმუნურ სისტემაში. ვიტამინი B9 (ფოლატი) გამოიყენება დნმ-ის, რნმ-ის და ამინომჟავების სინთეზში. ვიტამინი B12 (კობალამინი) აუცილებელია დნმ-ის სინთეზისა და ჯანმრთელი ნერვული სისტემისთვის. მონაწილეობს სისხლის წითელი უჯრედების – ერითროციტების ფორმირებაში, რომლებიც ქსოვილებისთვის ჟანგბადის მიწოდებას უზრუველყოფენ. ვიტამინი D (კალციფეროლი) ხელს უწყობს Ca და ფოსფატის აბსორბციას, რომელიც მნიშვნელოვანია ძვლის ზრდისა და ფორმირებისათვის. ვიტამინი E (ტოკოფეროლი) არის ანტიოქსიდანტი, რომელიც ხელს უშლის უჯრედების დაზიანებას. ბაქტერიების მიერ ფერმენტირებულ რძის პროდუქტებში არსებული ვიტამინი K1 (ფილოქინონი) და ვიტამინი K2 (მენაკინონი) აუცილებელია სისხლის შედედებისთვის(Grażyna, et al., 2017).

ცნობილია, რომ რძე და რძის პროდუქტების ცხიმები შედგება 400-ზე მეტი განსხვავებული ცხიმოვანი მჟავისგან (Summer et al., 2017). რძის ცხიმში წარმოდგენილია მოკლე, საშუალო და გრძელ- ჯაჭვიანი ცხიმოვანი მჟავები, ასევე- განშტოებული ჯაჭვის ცხიმოვანი მჟავები, კონიუგირებული ლინოლის მჟავები (CLA), ტრანს ცხიმოვანი მჟავები (ვაქცენის მჟავა), n-3 და n-6 ცხიმოვანი მჟავები. ამ ნაერთებიდან ბევრი მნიშვნელოვანი რაოდენობით მხოლოდ რძის პროდუქტებიდან ხვდება ჩვენს დიეტაში (Kratz, et al., 2013). ამავე დროს, რძის ცხიმი არის ბუტირის მჟავის (C4:0), CLA-ის ცის- და ტრანს-პალმიტოლის მჟავის (C16:1), განშტოებული ჯაჭვის ცხიმოვანი მჟავისა და ფიტანის მჟავის(C20:0) მდიდარი წყარო. ზოგიერთი მათგანი რძის ცხიმში ძალიან მცირე რაოდენობით გვხვდება, მაგრამ ეს მცირე

რაოდენობაც კი ბიოლოგიურად ძალზედ მნიშვნელოვანი შეიძლება, აღმოჩნდეს (Kratz, et al., 2013).

ხშირ შემთხვევებში რძის ცხიმის მიღებას უკავშირებენ გულ-სისხლძარღვთა დაავადების ზრდას, თუმცა დაკვირვებითი კვლევების უმრავლესობამ არ დაადგინა კავშირი რძის ცხიმის მიღებასა და გულ-სისხლძარღვთა დაავადებებს შორის, ასევე გულის კორონარული დაავადების ან ინსულტის რისკს შორის. კლინიკური კვლევების უმეტესობამ აჩვენა, რომ ცხიმიანი ნატურალური ყველის მოხმარება მნიშვნელოვნად ამცირებს დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინებს (LDL ან „ცუდ ქოლესტერინს“) იგივე ცხიმის შემცველი კარაქის მოხმარებასთან შედარებით. ეს შედეგები შეიძლება, გამოწვეული იყოს Ca-ის მაღალი დონით ყველში, ასევე - ბაქტერიული დუღილით (Kennedy, et al., 2010).

კონიუგირებული ლინოლეინის მჟავა (CLA) აფერხებს კანცეროგენეზს ექსპერიმენტული ცხოველებში. in vivo და in vitro მოდელებზე განხორციელებული მრავალი კვლევით დამტკიცებულია, რომ CLA-ის შედარებით დაბალი დონე თრგუნავს მრავალსაფეხურიან კანცეროგენეზს სხვადასხვა ლოკაციებზე. CLA გავლენას ახდენს წონის კონტროლზე, სავარაუდოდ, ჰიპოთალამუსით მადის რეგულაციაზე ზემოქმედებით. აღსანშნავია,რომ CLA-ის ძირითად წყაროს წარმოადგენენ ისეთი რძის პროდუქტები, რომელებზეც არ მოქმედებს თერმული დამუშავება (Parodi, et al., 2006).

რძის ნახშირწყლების მნიშვნელოვანი კომპონენტია ლაქტოზა, რომელიც რძეში შემავალი შაქრების 99%-ზე მეტს შეადგენს. დადგენილია,რომ ლაქტოზა ასტიმულირებს ნაწლავში Ca-ის შეწოვის პროცესს(Crichton, et al., 2012). ის ნაწლავში ფერმენტულად ჰიდროლიზდება გალაქტოზის წარმოქმნით. ამ უკანასკნელს კი ადვილად იყენებენ ნაწლავის ბინადარი ბიფიდობაქტერიები, რაც თავის მხრივ, აუმჯობესებს საჭმლის მონელებას. ცნობილია,რომ მსოფლიოს მოსახლეობის 70% ვერ ითვისებს ლაქტოზას და მისი აუტანლობა აწუხებს (Li, et al., 2023). რძე , რომელშიც შემცირებულია ლაქტოზა მომხმარებლებს საშუალებას აძლევს მიიღონ ეს პროდუქტი. ყველში, იოგურტში და ფერმენტირებული რძის სხვა პროდუქტებში, ეს

პრობლემა ნაკლებადაა გამოხატული, ვინაიდან რძემჟავა ბაქტერიები ლაქტოზას შლიან გლუკოზასა და გალაქტოზას წარმოქმნით (Li, et al., 2023).

2.2 რძის მრეწველობაში გამოყენებული კოაგულანტები

რძის მრეწველობაში კომერციულად ყველაზე მნიშვნელოვან ფერმენტულ ჯგუფს წარმოადგენს კოაგულანტები, რომლებიც გამოიყენებიან სხვადასხვა სახეობის ყველის დასამზადებლად, მათი მომწიფების და არომატის ჩამოყალიბების პროცესში.

კოაგულანტები პროტეაზებია, ისინი ჭრიან κ-კაზეინის პეპტიდურ-კოვალენტურ ბმებს და ამით იწყებენ კაზეინის კოაგულაციას (Yegin & Dekker , 2013). არსებობს ყველის დამზადების პროცესის მრავალი ვარიაცია, რის გამოც ათასობით განსხვავებული სახეობის ყველის წარმოებაა შესაძლებელი(Bintsis & Papademas 2017). ცნობილია, რომ რძის მრეწველობაში გამოყენებული კოაგულანტები ასპარტიკული ენდოპროტეაზებია (EC 3.4.23.X), რომლებიც მსხვილფეხა რქოსანი საქონლის რძიდან - ყველის დამზადების პროცესში - მაღალ სპეციფიკურობას ავლენენ κ-კაზეინიში Phe-Met შორის არსებული ბმის მიმართ. ამ ბმების გახლეჩვას თან ახლავს κ-კაზეინის კარბოქსი- ტერმინალური ნაწილის განთავისუფლება (კაზეინი-გლიკომაკროპეპტიდი (cGMP) რძის შრატში). ამინო ჯგუფიანი დაბოლოება კი (პარა-κ-კაზეინი) რჩება კაზეინის მიცელებზე მიმაგრებული (Dekker, 2019).

2.2.1. კაზეინის სტრუქტურა და ფერმენტული კოაგულაცია

კაზეინი და შრატის ცილები რძეში არსებული ცილების ორი ჯგუფია. კაზეინი ძირითადად წარმოდგენილია მიცელის ფორმით, ხოლო შრატის ცილები - ხსნადი სახით. კაზეინი შედგება ოთხი ქვეფრაქციისგან, αS1 -, αS2-, β- და κ-კაზეინები, რომლებიც ხასიათდება როგორც ფოსფოპროტეინები მოლარული თანაფარდობით დაახლოებით 4:1:4:1 (De Kruif & Holt, 2003). ეს ოთხი ცილის ფრაქციები ამფიფილურია,

მოლეკულური მასით 19-25 kDa და საშუალო იზოელექტრული წერტილი 4.1-დან 5.3-მდე. αs-კაზეინის და β-კაზეინის კალციუმის მარილები თითქმის არ იხსნება წყალში, ხოლო κ-კაზეინის მარილები ადვილად ხსნადია. მიცელების ზედაპირზე κ-კაზეინის დომინანტური ლოკალიზაციის გამო, კალციუმის κ-კაზეინატის ხსნადობა ჭარბობს მიცელებში დანარჩენი ორი კაზეინის უხსნადობას და მთელი მიცელი ხსნადია როგორც კოლოიდი. აქ კალციუმს აქვს ქვემიცელების ინტეგრირების როლი, თუ კალციუმი ტოვებს მიცელებს, მიცელები დაიშლება ქვემიცელებად. მსხვილფეხა რქოსანი კაზეინის მიცელების მშრალი ნივთიერება შეადგენს დაახლოებით 94% ცილას და დაახლოებით 6% დაბალი მოლეკულური წონის ნაერთებს, რომლებიც ერთობლივად ცნობილია, როგორც კოლოიდური კალციუმის ფოსფატი (CaP). ხსნარში გადასვლისას ამფიფილური კაზეინის ბუნება აიძულებს მათ ადვილად შეიკრიბონ და წარმოქმნან სტაბილურ მიცელური სტრუქტურა, სადაც ზემოთ ხსენებული ოთხი ფოსფოპროტეინი მჭიდროდ არის ერთმანეთთან დაკავშირებული. ჰიდროფობული ურთიერთქმედებები და კოლოიდური CaP-ის წარმოქმნა კრიტიკულ როლს თამაშობს მიცელარული მთლიანობის შენარჩუნებაში (Elzoghby, et al.,2011).

რძის ფერმენტული კოაგულაცია არსებითად ორეტაპიანი პროცესია. კაზეინის მიცელი სტაბილიზირებულია κ-კაზეინის ფენით მიცელის ზედაპირზე. რძის შემადედებელი ფერმენტები ახდენენ κ-კაზეინის ჰიდროლიზს პარაკაზეინის მიცელების წარმოქმნით, შედეგად კაზეინის იზოელექტრული pH მიიღწევა (pH 4.6) და ხდება რძის კოაგულაცია (Troch et. al., 2017). κ-კაზეინის ჰიდროლიზს უწოდებენ რძის კოაგულაციის პირველად ფაზას, ხოლო პარაკაზეინის მიცელების აგრეგაციას კალციუმის თანაობისას ეწოდება რძის კოაგულაციის მეორადი ფაზა.

ამინომჟავის ჯაჭვი, რომელიც ქმნის κ-კაზეინის მოლეკულას, შედგება 169 ამინომჟავისგან. რენინის ფერმენტები მოქმედებენ კონკრეტულად ამ ამინომჟავის 105 (ფენილ ალანინი)-106 (მეთიონინი) ბმაზე, რითაც იყოფა ორ ნაწილად. ერთი ნაწილი შედგება 1-105 ამინომჟავებისგან, რომელსაც ეწოდება პარაკაზეინი. ეს ნაწილი უხსნადია და რჩება შედედებულ მასაში αs-თან და β-კაზეინთან ერთად. 106-169 ამინომჟავების მეორე ნაწილი ხსნადი ნაწილია. ამ ამინომჟავებში დომინირებს პოლარული ამინომჟავები, რაც ამ ნაწილს აძლევს ჰიდროფილურ თვისებებს. κ-

კაზეინის მოლეკულის ამ ნაწილს გლიკომაკრო-პეპტიდი ეწოდება და ყველის დამზადებისას შრატში გამოიყოფა.

შედედებული მასის წარმოქმნა განპირობებულია ჰიდროფილური მაკროპეპტიდების უეცარი მოცილებით და ამით გამოწვეული ინტერმოლეკულური ძალების დისბალანსით. ჰიდროფობურ უბნებს შორის კავშირები იწყებს განვითარებას და ძლიერდება კალციუმის ობლიგაციებით, რომლებიც ვითარდება მიცელებში წყლის მოლეკულების სტრუქტურის გასვლისას. ამ პროცესს ჩვეულებრივ უწოდებენ კოაგულაციისა და სინერეზის ფაზას. რენინის მოქმედების პირველადი ფაზის დროს κ-კაზეინის ჰიდროლიზი ათავისუფლებს κ-კაზეინის მაღალ დამუხტულ, ჰიდროფილურ C-ტერმინალურ სეგმენტს (მაკროპეპტიდი), რითაც ანადგურებს მიცელის სტაბილიზაციის ძირითად ფაქტორებს და მათ კოლოიდურ სტაბილურობას. როდესაც მთლიანი κ-კაზეინის დაახლოებით 85% ჰიდროლიზდება, მიცელების სტაბილურობა მცირდება იმდენად, რომ შეჯახებისას ისინი რჩებიან კონტაქტში და საბოლოოდ ქმნიან სამგანზომილებიან ქსელს, რომელსაც კოაგულუმი ეწოდება.

რენინით კოაგულაციის პირველად და მეორად ფაზაზე გავლენას ახდენს ზოგიერთი კომპოზიციური და გარემო ფაქტორები, როგორიცაა რძის შემადგენლობა, ტემპერატურა, pH, კალციუმის შემცველობა, რძის წინასწარი გაცხელება, რენინის კონცენტრაცია და ა.შ.

რძის შემადგენლობის ცვალებადობა ძირითადად გავლენას ახდენს კოაგულაციის სიჩქარეზე და შედედებული მასის სიმტკიცეზე. სწრაფი კოაგულაცია იწვევს უფრო მკვრივ ნადედს. შედედების სიჩქარე დიდწილად დამოკიდებულია კაზეინის მიცელების ბუნებაზე და წონასწორობაზე კალციუმის ფოსფატთან და კალციუმის იონებთან. ნადედის სიმტკიცეზე გავლენას ახდენს pH მნიშვნელობა, კალციუმის კონცენტრაცია, ტემპერატურა, ცხიმის შემცველობა და რენინის და კაზეინის თანაფარდობა. რძეში ცილის შემცველობა გავლენას ახდენს რენინის კოაგულაციის დროზე (RCT). კოაგულაციის დრო მცირდება ცილის შემცველობით 2-3%-ის ფარგლებში. ყველის დამზადებისას დაახლოებით 30-40 წუთში გელის მისაღებად საჭიროა ცილა მინიმალური შემცველობით- 2,5-3,0. ცხიმის შემცველობის ზრდა ასევე იწვევს RCT-ის შემცირებას.

რძის გაცხელება პასტერიზაციის ტემპერატურამდე დადებითად მოქმედებს კოაგულაციაზე კალციუმის ფოსფატის სითბური დალექვის და pH-ის შემცირების გამო. მაგრამ უფრო მაღალ ტემპერატურაზე გათბობა იწვევს სხვა ეფექტებს, რომლებიც კომბინაციაში დომინირებენ გათბობის დადებით ეფექტებზე პასტერიზაციამდე. ზოგიერთი ასეთი ეფექტია:

• შრატის ცილის დენატურაცია და დენატურირებული β-ლაქტოგლობულინის ურთიერთქმედება κ-კაზეინის მიცელებთან.

• სითბოს მიერ გამოწვეული უხსნადი კალციუმის ფოსფატის დეპონირება, რაც იწვევს ბუნებრივი მიცელარული კალციუმის ფოსფატის კონცენტრაციის შემცირებას. ეს მიცელარული კალციუმის ფოსფატი მნიშვნელოვანია პარა-κ-კაზეინის მიცელების ჯვარედინი კავშირისთვის და მათი აგრეგაციისთვის გელის წარმოქმნის დროს.

ფერმენტული კოაგულაციის სიჩქარე პირდაპირ კავშირშია ფერმენტის კონცენტრაციასთან. რენეტის კონცენტრაციის ზრდა ამცირებს ფერმენტული კოაგულაციის სიჩქარეს. ყველის დამზადების დროს რენეტს უმატებენ ისეთ კონცენტრაციას, რომ რძე 30-40 წუთის განმავლობაში შედედდეს. ფერმენტის მეტი კონცენტრაცია შეიძლება გამოყენებულ იქნას კოაგულაციის დროის შესამცირებლად, მაგრამ ეს იწვევს ნადედში მეტი რენინის შეკავებას, რაც მკვეთრად მოქმედებს ყველის მომწიფებაზე, განსაკუთრებით პროტეოლიზზე. რენინის გაზრდილი კონცენტრაციის გამოყენებამ შეიძლება საფრთხე შეუქმნას ნადედის გამკვრივების სიჩქარეს და ნადედის სიმტკიცეს.

კალციუმის იონების კონცენტრაცია ძირითადად გავლენას ახდენს ფერმენტული კოაგულაციის მეორად ფაზაზე. კალციუმის მომატებული კონცენტრაცია სასარგებლოა რძის კოაგულაციისთვის. ამ მიზეზით, ზოგჯერ $CaCl_2$-ს უმატებენ რძეს ყველის დამზადებამდე. ეს ხელს უწყობს კოლოიდური კალციუმის ფოსფატის კონცენტრაციის მატებას და pH-ის დაქვეითებას (CaCl2-ის დამატება 0,02%-მდე, ანუ 1,8 მილიმოლი Ca ამცირებს pH-ს ~ 0,05-0,1 ერთეულით, ცილის დონის მიხედვით).

რძის შემადედებელი ფერმენტები მნიშვნელოვანი კომპონენტია რძის პროდუქტების წარმოებაში. განსაკუთრებით წამყვან როლს კი ყველის წარმოების ინდუსტრიაში ასრულებენ, რადგან პროდუქტს ანიჭებენ გემოს და სტრუქტურას. კოაგულანტები,

ალბათ, ერთ-ერთი პირველი ფერმენტებია, რომლებიც ადამიანებმა გამოიყენეს საკვების დამზადების პროცესში. ყველის დამზადების ადრეული ცნობები მომდინარეობს გამოქვაბულების ნახატებიდან, რომელიც დაახლოებით ჩვენს წელთაღრიცხვამდე 5000 წლით თარიღდება. ისტორიულად, ყველის წარმოებაში გამოყენებული ფერმენტული პრეპარატების უმეტესობა წარმოადგენდა ძუძუმწოვრების კუჭის ექსტრაქტებს, სავარაუდოდ, პირველი ყველის მიღების ისტორიაც პირუტყვის კუჭიდან დამზადებულ სათავსოში რძის შედედებას უკავშირდება. მოგვიანებით აღმოჩენილ იქნა ამ პროცესის აქტიური ინგრედიენტები - პროტეოლიზური ფერმენტები- პეპსინი და ქიმოზინი, რომლებიც ცნობილია რენინის სახელით(Kindstedt, 2017)

ხბოს რენინი არ წარმოადგენს სუფთა ფერმენტულ პრეპარატს, ის შეიცავს რამდენიმე ასპარტინის პროტეაზას და ზოგჯერ ლიპაზებსაც კი. ასპარტინის პროტეაზები, რომლებიც ჩვეულებრივ გვხვდება ხბოს რენინში, არის ქიმოზინი (EC 3.4.23.4), პეპსინი (EC 3.4.23.1) და მცირე კომპონენტური გასტრიცინი (EC 3.4.23.3). პეპსინს გავლენა აქვს გემოს ფორმირებაში ყველის მომწიფების დროს. ქიმოზინი ძალიან სპეციფიკურია Phe105-Met106 ბმის მიმართ κ-კაზეინში. რაც შეეხება პეპსინს, ის ამ მხრივ ნაკლებად სპეციფიკურია (Dekker, 2019).

2.3 რძის ფერმენტების გლობალური ბაზრის მიმოხილვა

რძის პროდუქტებზე მზარდი მოთხოვნა, რძის ფერმენტების გლობალური ბაზრისთვის ერთ-ერთი მამოძრავებელი ფაქტორია, განსაკუთრებით განვითარებულ ქვეყნებში. ამ ქვეყნებში შემოსავალი მზარდია, მომხმარებლები უფრო მეტად ზრუნავენ ჯანმრთელობაზე და უპირატესობას ანიჭებენ რძის პროდუქტებს(Abada et al. 2019). ფერმენტები აუცილებელია რძის გადამუშავებისთვის, მათ შეუძლიათ გააუმჯობესონ პროდუქტის ხარისხი, შეამცირონ წარმოების დრო და ხარჯები და გაზარდონ გამოსავლიანობა. გარდა ამისა, ფერმენტების გამოყენებამ შეიძლება ხელი შეუწყოს ნარჩენების შემცირებას (Khan et al 2020; Chandrasekaran et al 2015) . უფრო მეტიც, ტექნოლოგიურმა წინსვლამ, რძის ფერმენტების მიმდინარე კვლევებმა და

განვითარებამ განაპირობა ახალი და ინოვაციური პროდუქტების დანერგვა. მაგალითად, სპეციფიკური ფუნქციონირების მქონე ფერმენტების შემუშავებამ საშუალება მისცა ლაქტოზასგან თავისუფალი ან დაბალი ლაქტოზის შემცველი რძის პროდუქტების წარმოებას, რომლებიც მარტივად ასათვისებელია ლაქტოზის აუტანლობის მქონე მომხმარებლებისთვის(Schulz & Rizvi, 2023). რძის პროდუქტებზე მზარდი მოთხოვნა, დიდი ალბათობით მომავალში რძის ფერმენტების გლობალური ბაზრის ზრდას განაპირობებს. რძის ფერმენტების გლობალური ბაზრის კიდევ ერთი მამოძრავებელი ფაქტორი არის მზარდი ტენდენცია სასმელებსა და საკვებ პროდუქტებში ბუნებრივი ინგრედიენტების შემცველობის მიმართ. მომხმარებლებს აწუხებთ მათ მიერ მოხმარებული საკვები პროდუქტების სიჯანსაღე, რის გამოც იზრდება მოთხოვნა ეკოლოგიურად სუფთა პროდუქტებზე, რომლებიც არ შეიცავენ ხელოვნურ დანამატებსა და კონსერვანტებს. ფერმენტები რძის პროდუქტების გადამუშავების ბუნებრივი აგენტებია, რადგან ისინი სინთეზდება ცოცხალი ორგანიზმების მიერ და წარმატებით შეიძლება გამოყენებული იქნან სინთეზური დანამატების შესაცვლელად ან შესამცირებლად. რძის პროდუქტების გადამუშავებაში ფერმენტების გამოყენება ხელს უწყობს საბოლოო პროდუქტის კვების ღირებულების გაუმჯობესებას, ასევე აძლიერებს მის გემოსა და ტექსტურას, ქიმიური დანამატების გარეშე (Chandrasekaran et al 2015, Hakim et al. 2023). ამავე დროს, ფერმენტები ეკოლოგიური თვალსაზრისით უფრო მისაღებია, ვიდრე -ქიმიური სინთეზით მიღებული დანამატები (Kamarudin et. al. 2017). აღნიშნულიდან გამომდინარე, რძის პროდუქტების მრავალი მწარმოებელი ფერმენტებს იყენებს ნატურალურ პროდუქტებზე მზარდი მოთხოვნის დასაკმაყოფილებლად. მაგალითად, ფერმენტების გამოყენება შესაძლებელია რძის პროდუქტების გადამუშავებაში მონაწილე ემულგატორების, სტაბილიზატორებისა და სხვა სინთეზური დანამატების ალტერნატივად ან მათ შესამცირებლად. ეს მწარმოებლებს საშუალებას აძლევს, უფრო მარტივად აწარმოონ პროდუქტი და მიაღწიონ სასურველ ფუნქციურ და სენსორულ თვისებებს(Chandrasekaran et al. 2015).

2022 წლის მონაცემებით(https://wemarketresearch.com/reports/dairy-enzymes-market/1030/), ფერმენტებს შორის ბაზარზე დომინირებდა ქიმოზინი, რომლის

წლიური ბრუნვა 208.99 მილიონ აშშ დოლარს შეადგენდა. ქიმოზინი რძის ფერმენტია, რომელიც გამოიყენება რძის კოაგულაციისთვის ყველის წარმოების დროს. ის ასევე ცნობილია, როგორც რენინი და ბუნებრივად სინთეზდება ახალგაზრდა ძუძუმწოვრების კუჭში. თუმცა, ქიმოზინი ასევე შეიძლება მიღებულ იქნას გენეტიკური ინჟინერიის ან მიკრობული ფერმენტაციის გზითაც(Akishev et al. 2023).

ყველი პოპულარული საკვები პროდუქტია, რომელიც მოიხმარება გლობალურად და მასზე მოთხოვნა ყოველწლიურად იზრდება. სწორედ ქიმოზინი არის ის ძირითადი ფერმენტი, რომელიც ყველის წარმოებაში გამოიყენება და ყველის მოთხოვნის მატებასთან ერთად, ქიმოზინის მოხმარებაც იზრდება. ტრადიციულად, ქიმოზინს ღებულობდნენ ახალგაზრდა ძუძუმწოვრების კუჭიდან, რაც ზოგიერთ შემთხვევაში მიუღებელი იყო ვეგეტარიანელებისთვის (ზოგიერთი ქვეყნისთვის კი რელიგური თვალსაზრისით) (Dekker, 2019; Qasim, et al. 2022). გენური ინჟინერიით მიღებული მიკრობული წარმოშობის ქიმოზინის წარმოების განვითარებამ ეს პრობლემა აღმოფხვრა, რამაც კიდევ უფრო გაზარდა მოთხოვნა აღნიშნულ ფერმენტზე. ფერმენტების წარმოების ტექნოლოგიის მიღწევებმა გააადვილა და უფრო მომგებიანი გახადა ქიმოზინის წარმოება, რამაც განაპირობა ამ ფერმენტის მასიური გამოყენება მრეწველობაში (Akishev et al. 2023).

2022 წლის მონაცემებით, ბაზარზე მიკრობული წარმოშობის ქიმოზინი დომინირებდა (8,437.12 ტონა წელიწადში) (https://wemarketresearch.com/reports/dairy-enzymes-market/1030/).

ცნობილია, რომ ისეთი ფერმენტები, როგორიცაა ლიპაზა, პროტეაზა და პეპტიდაზა, ფართოდ გამოიყენება ყველის გემოს გასაუმჯობესებლად. ლიპაზა წარმატებით შეიძლება იქნას გამოყენებული სხვადასხვა ტიპის ყველის უნიკალური და გამორჩეული არომატის შესაქმნელად, ხოლო პროტეაზა და პეპტიდაზა კი ხელს უწყობს ცილების დაშლას მოკლე პეპტიდებად და ამინომჟავებად, რაც აუმჯობესებს ყველის საერთო გემოს პროფილს (Gomes, et al. 2018). რძის ფერმენტების ბაზარზე გემოს გამაძლიერებელი სეგმენტის ზრდა განპირობებულია ისეთი ფაქტორებით, როგორიცაა უნიკალურ და დიფერენცირებულ საკვებ პროდუქტებზე მაღალი მოთხოვნა, ასევე ბუნებრივი და ორგანული საკვების მოხმარების მზარდი ტენდენცია.

რძის ფერმენტები, როგორიცაა ლაქტოპეროქსიდაზა და ლაქტოფერინი, გამოიყენება ყველის ხარისხისა და შენახვის ვადის შესანარჩუნებლად. ამ ფერმენტებს აქვთ ანტიმიკრობული თვისებები და შეუძლიათ ყველის დაცვა გაფუჭებისა და დაბინძურებისგან (Perraudin, 2020).

2022 წელს გლობალურ ბაზარზე რძის ფერმენტების წლიურმა წრებრუნვამ 621.40 მილიონი აშშ დოლარი შეადგინა . ექსპერტების პროგნოზით, ეს მაჩვენებელი კიდევ უფრო გაიზრდება და 2032 წლისთვის 1,234.82 მილიონ აშშ დოლარს მიაღწევს. რაოდენობის მიხედვით 2022 წელს რძის ფერმენტების მთლიანი მოხმარება შეადგენდა 11,505 ტონას და ვარაუდობენ, რომ 2033 წლისთვის 24,558 ტონას მიაღწევს (https://wemarketresearch.com/reports/dairy-enzymes-market/1030/).

რეგიონების მიხედვით 2022 წლის მონაცემებით, რძის ფერმენტების წარმოების მიხედვით დომინირებს ჩრდილოეთ ამერიკა, რომლის წილი საერთო რაოდენობის 39.1%-ს შეადგენს (https://wemarketresearch.com/reports/dairy-enzymes-market/1030/).

რძის ფერმენტების ძირითადი ბაზარი შეერთებული შტატებია, რომელიც ყოველწლიურად მნიშვნელოვან ზრდას განიცდის. ეს ფაქტი განპირობებულია რამდენიმე ფაქტორით, კერძოდ, რძის პროდუქტებზე მოთხოვნის ზრდით, ასევე - რძის ფერმენტების სარგებლობის შესახებ მომხმარებელთა მეტი ინფორმირებულობით და ფერმენტული წარმოების ტექნოლოგიური მიღწევებით. აშშ-ში რძის ფერმენტების ბაზრის ზრდის ერთ-ერთი მთავარი ფაქტორი რძის პროდუქტებზე მზარდი მოთხოვნაა. ქვეყანაში ფართოდ მოიხმარება რძის ისეთი პროდუქტს, როგორიცაა ყველი. ამერიკელები წელიწადში საშუალოდ 646 ფუნტ რძის პროდუქტს მოიხმარენ. რძის პროდუქტებზე მნიშვნელოვანად მზარდი ტენდეცია შეინიშნება კანადაშიც, სადაც რძის ფერმენტების ბაზრის ზრდის ერთ-ერთი მთავარი ფაქტორი ფუნქციურ საკვებსა და სასმელებზე მზარდი მოთხოვნაა.

რასაკვირველია, კიდევ ერთი მნიშვნელოვანი ფაქტორი, რომელიც რძის ფერმენტების ბაზრის ზრდას იწვევს, კონკურენტების არსებობაა რეგიონში.

ცხრილი 1.რძის ფერმენტების წარმოება ქვეყნების მიხედვით(ტონა)

ქვეყნები	2019	2020	2021	2022

ა.შ.შ	4185	4012	4261	4529
კანადა	539	515	545	577
მექსიკა	126	119	126	133
გერმანია	1075	1031	1097	1168
საფრანგეთი	764	738	791	847
გაერთიანებული სამეფო	514	496	530	566

წყარო: We Market Rsearch Analysis

2.4 პროტეაზები

პროტეაზები წარმოადგენენ ფერმენტების ფართო ჯგუფს, რომლებიც მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურ ფუნქციას ასრულებენ როგორც ანაბოლიზმში, ასევე- კატაბოლიზმში. პროტეაზები მოქმედებენ ცილებზე ან პეპტიდებზე, ჭრიან მათ, რაც იწვევს უფრო მოკლე პეპტიდების და ამინომჟავების წარმოქმნას (Razzaq et al. 2019). მოქმედების ადგილიდან გამომდინარე, ეს ფერმენტები შეიძლება კლასიფიცირდეს როგორც ენდოპეპტიდაზა და ეგზოპეპტიდაზა. პირველი ახდენს არატერმინალური პეპტიდური ბმების ჰიდროლიზს, რაც იწვევს უფრო მოკლე პეპტიდების წარმოქმნას, ხოლო ეგზოპეპტიდაზები მოქმედებენ იმ პეპტიდურ ბმებზე, რომლებიც მდებარეობს სუბსტრატის ბოლოებზე. ასევე, იმ ბოლოებიდან გამომდინარე, რომლებზეც კონკრეტული ეგზოპეპტიდაზა უპირატესად მოქმედებს, ეგზოპეპტიდაზები შემდგომში იყოფა ამინოპეპტიდაზებად ან კარბოქსიპეპტიდაზებად, იმისდა მიხედვით, მოქმედებენ ისინი N-ტერმინალზე თუ C-ტერმინალზე (Naveed et al. 2021). ეგზოპეპტიდაზები ათავისუფლებენ დიპეპტიდებს, ტრიპეპტიდებს ან ამინომჟავებს. პროტეაზას აქტიური საიტის ამინომჟავური თანმიმდევრობის ბუნებიდან და ასევე პეპტიდური ბმის გაწყვეტის მექანიზმიდან გამომდინარე, განასხვავებენ პროტეზების შემდეგ ჯგუფებს: ცისტეინ, სერინ, ასპარტატ და მეტალოპროტეაზებს(de Souza et al. 2020).

სერინის პროტეაზების კლასიფიცირება განპირობებულია სერინის ჯგუფის არსებობით მათ აქტიურ საიტზე. ეს პროტეაზები წარმოდგენილია ვირუსებში, ბაქტერიებსა და ეუკარიოტებში. სერინის პროტეაზები გვხვდება ეგზოპეპტიდაზას, ენდოპეპტიდაზას, ოლიგოპეპტიდაზასა და ომეგაპეპტიდაზას ჯგუფებში (Mamo & Assefa, 2018). ნეიტრალური და ტუტე სერინის პროტეაზების უმეტესობა, მიიღება ბაქტერიებისგან, კერძოდ, *Bacillus*-ის გვარის წარმომადგენლებიდან. მსგავსი ფერმენტები ასევე შეიძლება პროდუცირდეს სხვა სახეობის ბაქტერიების მიერ: *Thermus caldophilus* და *Desulfurococcus mucosus, Streptomyces, Aeromonas* და *Escherichia coli*, ასევე მიკროსკოპული სოკოების ისეთი სახეობის მიერ, როგორიცაა *Aspergillus oryzae*. აღნიშნული კულტურა ანალოგიურად წარმოქმნის რამდენიმე სერინის პროტეაზას(Barredo & Barredo 2005).

ცისტეინის პროტეაზები გვხვდება როგორც პროკარიოტებში, ასევე- ეუკარიოტებში. აღნიშნული ფერმენტის დაახლოებით 20 ჯგუფია ცნობილი. ყველა ცისტეინის პროტეაზას აქტივობა განისაზღვრება კატალიზური წყვილით, რომელიც შედგება ცისტეინისა და ჰისტიდინისგან. ცისტეინის პროტეაზები იყოფა სხვადასხვა ჯგუფებად მათი გვერდითი ჯაჭვის სპეციფიკიდან გამომდინარე: (i) პაპაინის მსგავსი, (ii) ტრიპსინის მსგავსი, (iii) გლუტამინის მჟავის მიმართ სპეციფიკური და სხვა.

პაპაინის ცისტეინის პროტეაზების აქტივობის pH- ოპტიმუმი ნეიტრალურია, ხოლო ლიზოსომური პროტეაზები მაქსიმალურ აქტივობას მჟავე pH-ზე ავლენენ. ისინი მგრძნობიარენი არიან სულფჰიდრილის მიმართ და პროტეაზის სხვა ჯგუფებთან შედარებით ნაკლებადაა გავრცელებულია(Mamo & Assefa, 2018).

ასპარტის პროტეაზები არიან ენდოპეპტიდაზები, რომლებსაც აქვთ ორი ასპარტის მჟავას ნარჩენი, ეს არის მათი აქტიური საიტი, რომელიც სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანია მათი კატალიზური აქტივობისთვის. აღნიშნული პროტეაზები საყოველთაოდ ცნობილია, როგორც მჟავე პროტეაზები. ისინი იყოფა სამ ჯგუფად : პეპსინი (A1), რეტროპეპსინი (A2) და ფერმენტები პარარეტროვირუსებისგან (A3). ასპარტინის პროტეაზების უმეტესობა (Aps) საუკეთესოს აქტივობას ავლენს დაბალ pH-ზე (pH 3-დან 4-მდე) და აქვს იზოელექტრული წერტილები pH 3-დან 4,5-მდე დიაპაზონში(Mamo & Assefa, 2018)..

ასპარტის პროტეაზას ფერმენტები ძირითადად მიკრობული წარმოშობისაა და იყოფა ორ ჯგუფად: (1) პეპსინის მსგავსი ფერმენტები, რომლებიც წარმოიქმნება *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus*-ის და *Neirospora* -ს გვარის სახეობების მიერ, და (2) რენინის მსგავსი ფერმენტები რომელთა პროდუცენტებს *Mucor miehei, M. pusillus* და *Endothia parasitica* წარმოადგენენ (Mamo & Assefa, 2018).

მეტალოპროტეაზები (EC 3.4.24) პროტეაზების მაღალ დივერსიფიცირებული ტიპია. ისინი მოიცავენ სხვადასხვა წარმოშობის ფერმენტებს: უმაღლესი ორგანიზმების მიერ პროდუცირებული კოლაგენაზები, ასევე- გველის შხამებიდან მიღებული ჰემორაგიული ტოქსინები და ბაქტერიული თერმოლიზინი. აღნიშნული ფერმენტები ფუნქციონირებისთვის მოითხოვენ ორვალენტიანი ლითონის იონს. ცნობილია მეტალოპროტეაზებ**ის** 30-მდე ჯგუფი, რომელთაგან 17 შეიცავს მხოლოდ ენდოპეპტიდაზებს, 12- შეიცავს მხოლოდ ეგზოპეპტიდაზებს და 1 (M3) შეიცავს როგორც ენდო- ისე ეგზოპეპტიდაზებს (Mamo & Assefa, 2018). .

ჰიდროლიზური ბუნების ფერმენტები ყველგან გვხვდება, ისინი აღმოჩენილია სიცოცხლის ყველა ფორმაში - მცენარეებში, ცხოველებში, სოკოებში, პროტისტებში, აგრეთვე ბაქტერიებსა და არქეებში. ცნობილია რამდენიმე ვირუსი, რომელთა გენომში კოდირებულია საკუთარი პროტეაზები (Rodamilans et al. 2018).

მრავალფეროვანია პროტეაზების როლი ცოცხალი ორგანიზმების ფიზიოლოგიასა და მეტაბოლიზმში. ცილებისა და პეპტიდების დაშლის გარდა, ეს ფერმენტები ასევე მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ფართო სპექტრის ფიზიოლოგიური პროცესების რეგულირებაში ცილის სინთეზში ჩართული სხვადასხვა ეტაპების კონტროლით, გენის აქტივაცია-ინაქტივაციაში, სიგნალების გადაცემასა და ა.შ. პროტეაზები გადამწყვეტ როლს ასრულებენ სიმსივნის ბლოკირებაში (Dudani et al. 2018). ისინი გამოიყენება მედიცინის მრავალ სფეროში, გულ-სისხლძარღვთა დაავადებების კონტროლში, საჭმლის მომნელებელი სისტემის მკურნალობაში, ანთებითი პროცესების, აგრეთვე ქსოვილების აღდგენის სტიმულაციაში - დამწვრობის, მოტეხილობების, შემთხვევითი ან ქირურგიული ტრავმების სამკურნალოდ და ა.შ. (Kumar & Jain, 2018; Bonds 2019).

პროტეაზების სამრეწველო გამოყენების კლასიკური მაგალითია სარეცხ დეტერგენტებში მათი დამატება, ისინი ასევე გამოიყენება კონტაქტური ლინზების გამწმენდ ხსნარებში და ა.შ. (Salwan and Sharma 2019; Singh and Bajaj 2017; Lam et al. 2018). პროტეაზას სხვადასხვა მიზნებისთვის იყენებს საფეიქრო მრეწველობა. კერძოდ, აბრეშუმის გაწმენდა, მატყლის ბიოპოლირება, (Chatha et al. 2017; Mamo and Assefa 2018). პროტეაზები ქიმიკატების ალტერნატივად გამოიყენება ტყავის მრეწველობაში, ტყავის დამუშავების სხვადასხვა ეტაპზე, რაც პროდუქტს უფრო ნაზსს და ხარისხიანს ხდის. (Fang et al. 2017). მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენს კერატინის შემცველი ნარჩენები (ბუმბული,რქები, ჩლიქები და ა.შ.), რომლებიც წარმოიქმნება ფრინველებისა და რქოსანი პირუტყვის სასაკლაოებზე. ამ ტიპის ნარჩენების მართვა რთულია და იწვევს ისეთ უამრავ ლოკალურ, ეკოლოგიურ პრობლემას, როგორიცაა ნიადაგისა და წყლის დაბინძურება, ესთეტიკური მხარე, სანიაღვრეების გადაკეტვა, დაავადებების გავრცელება და ა.შ. (Kamarudin et. al. 2017). სწორედ პროტეაზები, განსაკუთრებით კი კერატინაზები და კოლაგენაზები ასრულებენ გადამწყვეტ როლს გარემოზე ამ ტიპის ნარჩენების რაოდენობის შემცირებაში (Bhagwat and Dange 2018; Yusuf et al. 2019).

2.5. მიკრობული წარმოშობის პროტეაზები

უძველეს ფერმენტებს შორის, რომელიც აღმოაჩინეს და შეისწავლეს, ერთ-ერთია პროტეაზები. ცხოველური წარმოშობის რამდენიმე პროტეაზა, როგორიცაა პეპსინი, ტრიფსინი და მცენარეული წარმოშობის პროტეაზა- პაპაინი, აღმოჩენილი და დახასიათებული იყო ჯერ კიდევ 1800-იან წლებში და 1900-იანი წლების ადრეულ ათწლეულებში (Bonds 2019). შემდგომში, ყურადღების ცენტრში მიკრობული პროტეაზებიც მოექცა და სწრაფად გახდა პოპულარული და მოთხოვნადი (Singh et al. 2016). ცნობილია, რომ მიკრობული პროტეაზები უძველესი დროიდან გამოიყენება ფერმენტირებული საკვები პროდუქტების მისაღებად. მიკროორგანიზმები, როგორც პროტეაზების პროდუცენტები, ფლობენ რამოდენიმე უპირატესობას მცენარეებთან და ცხოველებთან შედარებით: გამოირჩევიან სწრაფი ზრდის ტემპით, არ

ექვემდებარებიან კლიმატური ფაქტორების ზემოქმედებას, მოსაშენებლად არ საჭიროებენ სახნავ-სათესი სავარგულების დიდ ფართობებს (Bhatia et al. 2021). უფრო მეტიც, მიკროორგანიზმთა საბინადრო გარემოს მრავალფეროვნებიდან გამომდინარე, საკმაოდ ადვილია სასურველი მახასიათებლების მქონე ფერმენტების პროდუცენტის მიკროორგანიზმის შერჩევა(Putatunda et al. 2019). თაობის ხანმოკლე დროისა და შედარებით მარტივი გენეტიკური აპარატის წყალობით, მიკროორგანიზმებზე გენეტიკური მანიპულაციების ჩატარება გაცილებით ადვილი განსახორციელებელია (Ali et al. 2016). ის ეთიკური პრობლემები, რომლებიც თან ახლავს ცხოველური წარმოშობის პროტეაზებთან მუშაობას, არ არსებობს მიკრობული წარმოშობის პროტეაზების გამოყენებისას (da Silva et al. 2016a, b,). მიკრობების უნარი, გამოიმუშავონ უჯრედგარე პროტეაზები, კიდევ უფრო აადვილებს მათი წარმოების პროცესს ენდოფერმენტების მიღებასთან შედარებით (Razzaq et al. 2019). და ბოლოს, მიკროორგანიზმთა უნარი გაიზარდონ მაქსიმალურად იაფ სუბსტრატებზე ან ნარჩენ ნედლეულებზე, პროცესს უფრო ეკონომიურს ხდის (Hamza 2017; Limkar et al. 2019).

პროტეაზას პროდუცენტები გვხვდება მიკროორგანიზმთა ყველა ტაქსონომიურ ჯგუფში - ბაქტერიებში, სოკოებსა და აქტინომიცეტებში. პროტეაზას პროდუცენტი ცნობილი ბაქტერიული შტამებია: *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis, Bacillus lentus, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus circulans, Geobacillus SBS-4S, Bacillus alkaloophilus, Bacillus alkaloophilus, Bacillus fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus circulans. , Bacillus licheniformis* და *Bacillus safensis* (Briki et al. 2016; Ahmad et al. 2020; Alves et al. 2016; Contesini et al. 2018). პროტეაზას პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოებია: *Aspergillus terreus, Aspergillus niger, Aspergillus clavatus ES1, Fusarium sp. Aspergillus niger KIBGE-IB36, Penicillium chrysogenium X5, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigates, Aspergillus nidulans HA-10, Aspergillus oryzae, Penicillium chrysogenum, Mucor sp., Triphalosporium* sp. და სხვ (Abu-Tahon et al. 2020; de Castro et al. 2015; Benmrad et al. 2018; Sattar et al. 2019; Naveed et al. 2021)). სამრეწველო მასშტაბით პროტეაზების წარმოებაში პროდუცენტებად გამოიყენება *Aspergillus, Penicillium* და *Trichoderma* -ას გვარის შტამები. პროტეაზების მწარმოებლები გვხვდება აქტინომიცეტების ტაქსონშიც.

კომერციული თვალსაზრისით, განსაკუთრებული ყურადღება მიიპყრო ბაქტერიული და სოკოური წარმოშობის პროტეაზებმა, რის გამოც ინტენსიური სამეცნიერო კვლევის ობიექტი გახდა (Gurumallesh et al. 2019), მიკრობული პროტეაზები წარმოადგენენ ფერმენტულ ინდუსტრიებში გამოყენებული პროტეაზების ორ მესამედს. ყველაზე მოთხოვნადია ბაქტერიული ტუტე პროტეაზები და სოკოური წარმოშობის მჟავე პროტეაზები.

რძის შემადედებელი ფერმენტების წარმოება წარმატებით იყენებს მიკროორგანიზმთა სხვადასხვა შტამებს. მაგ. სოკოური წარმოშობის რენინმა, როგორც ცხოველური წარმოშობის ქიმოზინის ალტერნატივამ, ფართო გამოყენება ჰპოვა რძის მრეწველობაში. მიკროსკოპული სოკოები: *Rhizomucor pusillus, Rhizomucor miehei* და *Cryphonectria parasitica* ინდუსტრიული რენინის ძირითადი წყაროა. აღსანიშნავია, რომ პირველი თაობის რენინი (სოკოური წარმოშობის) მხოლოდ ნაწილობრივ აკმაყოფილებდა ყველის დამზადების ტექნოლოგიას გადაჭარბებული აქტივობისა და მაღალი თერმოსტაბილურობის გამო. *Rhizomucor* sp-დან მიღებული პირველი თაობის რენინის გამოყენების მთავარი შეზღუდვა იყო მისი მაღალი თერმული სტაბილურობა, რაც მდგომარეობდა იმაში, რომ ფერმენტი აქტივობას ინარჩუნებდა პასტერიზაციის შემდეგაც. ეს თავის მხრივ არასასურველ პროტეოლიზს იწვევდა ყველის შრატში, რის გამოც იკარგებოდა ცილა და იცვლებოდა საგემოვნო მახასიათებლები. აქედან გამომდინარე, *Rhizomucor* sp.-იდან მიღებული პირველი თაობის რენინი ძირითადად გამოიყენებოდა ახალი ყველის წარმოებაში. აღნიშნული შეზღუდვის აღმოფხვრის მიზნით მკვლევრებმა სცადეს *Rhizomucor* sp-ის რენეტის პრეპარატების თერმოსტაბილურობის შემცირება სხვადასხვა მიდგომით. მაგ., ქიმიური ზემოქმედებით და გენური ინჟინერიის ტექნოლოგიით. კომერციულად ხელმისაწვდომი სოკოური წარმოშობის რენინის პრეპარატების გაუმჯობესებასთან ერთად ჩატარდა მრავალი კვლევა ისეთი ახალი მიკრობული შტამების გამოსავლენად, რომლებიც ფლობდნენ რძის შედედების უფრო მაღალ თანაფარდობას პროტეოლიზურ აქტივობასთან და დაბალ თერმოსტაბილურობას. რძის შემადედებელი, მიკრობული წარმოშობის ისეთი ფერმენტების აღმოჩენა, რომლებიც უფრო თერმოლაბილურია და აქვს რძის შედედების უფრო მაღალი თანაფარდობა

პროტეოლიზთან, დღემდე წარმოადგენს მნიშვნელოვან გამოწვევას , რადგან მხოლოდ ამის შემდეგ იქნება შესაძლებელი ქიმოზინს სრულად ჩანაცვლება. 2012 წელს იეგინისა და მკვლევრების მიერ განხორციელებული ექსპერიმენტებით დადგინდა, რომ (Yegin, et al. 2012) *M. mucedo* DSM 8090-ის მიერ პროდუცირებული რძის შემადედებელი ფერმენტი ფლობდა ძალზედ საინტერესო ტექნოლოგიურ თვისებებს, კერძოდ, რძის შედედების უფრო მაღალ თანაფარდობას მთლიან პროტეოლიზთან, რაც საკვანძო საკითხია ყველის ინდუსტრიაში (Vishwanatha et al. 2010) ანალოგიური შედეგები მიღებულია მკვლევართა სხვა ჯგუფის მიერ, რომლებმაც *Aspergillus oryzae* MTCC 5341-დან გამოყვეს რძის შედედების მაღალი ხარისხისა და დაბალი თერმული სტაბილურობის პროტეაზა. მსგავსი მახასიათებლების პროტეაზა გამოყოფილია ბაქტერიების წარმომადგენლებიდანაც: *Bacillus* sp.; Myxococcus sp. (Poza et al. 2003) და Nocardiopsis sp. (Cavalcanti et al. 2005).

სხვადასხვა კომერციული მიზნებისთვის გამოყენებული ბაქტერიული პროტეაზები, ზოგადად, მიეკუთვნება ტუტე და ნეიტრალური პროტეაზების კატეგორიებს. *Bacillus*-ის გვარის წარმომადგენლებიდან მიიღებული ტუტე პროტეაზები უჯრედგარე ფერმენტებია და როგორც წესი, სერინის პროტეაზებს წარმოადგენენ. *Bacillus*-ის გვარის ბაქტერიების მიერ პროდუცირებული ფერმენტები უკვე დიდი ხანია გამოიყენება მრეწველობაში (Pathak and Rathod 2018) , აქედან გამომდინარე, ლიტერატურაში მრავლადაა ინფორმაცია მათი აქტივობის, ზომის, სტრუქტურის და სხვა მახასიათებლების შესახებ (Contesini et al. 2017). პროტეაზების კომერციული პროდუცენტი *B. subtilis*-ის და მისი მონათესავე *Bacillus*-ის გვარის სხვა კულტურები, დღეს განიხილება, როგორც GRAS (ზოგადად აღიარებული, როგორც უსაფრთხო) (Zhang et al. 2019). პროტეაზების პროდუცენტი *Bacillus* გვარის ბაქტერიების გარდა ლიტერატურაში გვხვდება მონაცემები აღნიშნული ფერმენტის პროდუცენტი სხვა გვარის ბაქტერიების, შესახებაც, მაგ. რძის პროდუქტებიდან გამოყოფილ *Enterococcus hirae*-სა და *Pseudomonas aeruginosa* -ს ასევე აღმოაჩნდათ ტუტე პროტეაზების სინთეზის უნარი (Al-Dhabi et al. 2020; Masi et al 2017). ტუტე პროტეაზების პროდუცენტები გამოვლენიალია მიცელიურ სოკოებს შორისაც (Sharma et al 2019; Meshram et al. 2016). მეშარმასა და მისი თანამშრომლების მიერ დადგენილია, რომ

ენდოფიტური სოკოს *Xylaria curta*-ს მიერ პროდუცირებულ მეტალოპროტეაზას (8.0 pH), გააჩნია შესამჩნევი ფიბრინოლიზური თვისებები და თერაპიული მიზნებისთვის გამოყენების პოტენციალი. ბაქტერიულ ტუტე პროტეაზების pH -ოპტიმუმი 8-დან 12 -მდე დიაპაზონშია. ამ ფერმენტებიდან ბევრი ასევე ავლენს მაღალ თერმოსტაბილურობას და აქტივობას მაღალ ტემპერატურაზე (Naveed et al. 2021). გამომდინარე, რომ ტუტე პროტეაზები აქტივობას ავლენენ ტუტე pH -ის დიაპაზონში, ისინი ძალიან ხშირად გამოიყენება, როგორც სარეცხი საშუალებების დანამატი, ლაქების მოცილების თვისებების გასაუმჯობესებლად (Guleria et al. 2016a; Asha and Palaniswamy 2018). სარეცხი ფხვნილების წარმოების მსგავსად, ტყავის დამუშავებაც ხორციელდება მაღალ pH-ზე, შესაბამისად, ტუტე პროტეაზებს შეუძლიათ იმოქმედონ შესაფერისი მთრიმლავი დანამატის ეფექტით (Hussain et al. 2017; Hakim et al. 2018).

მჟავა პროტეაზები, როგორც თავად სახელი მიუთითებს, აქტივობას ავლენენ მჟავა pH-ის დიაპაზონში, ძირითადად pH 3.8-დან 5.6-მდე. მათი მოქმედების ოპტიმალური pH არის 3-4, იზოელექტრული წერტილი 3-დან 4.5-მდე. აღნიშნული ფერმენტები ასპარტინის პროტეაზების ჯგუფს მიეკუთვნება. (Machado et al. 2016; Razzaq et al. 2019). მიკრობული მჟავა პროტეაზები მრავალრიცხოვან ჯგუფად იყოფა პეპსინის და რენინის მსგავსებად (Razzaq et al. 2019). ტუტე პროტეაზებისგან განსხვავებით, რომლებიც ძირითადად წარმოიქმნება ბაქტერიების მიერ, მჟავა პროტეაზების პროდუცენტები მიკროსკოპული სოკოებია, ყველაზე ხშირად გამოიყენება *Aspergillus*-ის , *Penicillium-ის* , *Endothia-ის* , *Mucor* -ის გვარების წარმომადგენლებიდან მიღებული პროტეაზები (Mammo and Assefa 2018). ლიტერატურაში გვხვდება მონაცემები მჟავა პროტეაზების ახალი პროდუცენტი ობის სოკოების, აგრეთვე ზოგიერთი საფუარის შესახებ (Mandujano-González et al. 2016). ხორცის დარბილების მიზნით ჩვეულებრივ გამოიყენებდნენ მცენარეული წარმოშობის პროტეაზას-პაპაინს. მეცნიერებმა მოახდინეს ასპარტიული პროტეაზას გენის გამოყოფა *Rhizomucor miehei*-დან და მისი კლონირება საფუარ *Pichia pastoris*-ში, შედეგად გენმოდიფიცირებულმა საფუარმა სოკომ წარმოქმნა პროტეაზა, რომელიც გაცილებით უკეთ არბილებდა ხორცს, ვიდრე- მცენარეული წარმოშობის პაპაინი. დღეს მჟავა პროტეაზები წარმატებით გამოიყენება კვების და სასმელების ინდუსტრიაში.

ნეიტრალური პროტეოლიზური ფერმენტები აქტივობას ავლენენ ნეიტრალურ, ოდნავ ტუტე ან ოდნავ მჟავე pH-ზე, მაქსიმალურ აქტივობას ამჟღავნებენ pH 5დან -8 -მდე დიაპაზონში (Razzaq et al 2019). ტუტე პროტეაზების მსგავსად, ნეიტრალურ პროტეაზებს ასევე წარმოქმნის *Bacillus*-ის გვარის წარმომადგენლები (Contesini et al. 2017; Razzaq et al. 2019). ნეიტრალური პროტეაზების უმრავლესობა მიეკუთვნება მეტალოპროტეაზას კატეგორიას და ნორმალური ფუნქციონირებისთვის საჭიროებენ ორვალენტიან დადებითად დამუხტულ იონს . დღეს ნეიტრალური პროტეაზები ფართოდ გამოიყენება ლუდის ხარშვისას და ცხობაში (Razzaq et al. 2019; Aissaoui, et al. 2017) მიკროსიკოპულ სოკოებს შორის ნეიტრალური პროტეაზების პროდუცენტებს წარმოადგენენ *Trichoderma harzianum*-ი (Ao et al. 2018) *Aspergillus oryzae* Y1 და *Moorella speciosa* (de Oliveira et al. 2020) და სხვა. გენური ინჟენერიით მიღებულია რეკომბინანტული ნეიტრალური პროტეაზა rNpI, რომელიც გამოიყენება როგორც თევზის საკვები დანამატი, რაც მნიშვნელოვანია ცილების დაშლისა და თევზის ზრდის გასაუმჯობესებლად (Deng et al. 2021). და ბოლოს, რეაქციის საშუალო სიჩქარის წყალობით, ნეიტრალური პროტეაზები ნაკლებ სიმწარეს წარმოქმნიან საკვების ცილების ჰიდროლიზის პროცესში, რის გამოც ისინი უფრო ღირებულად ითვლებიან კვების მრეწველობაში.

2.6 პროტეაზას პროდუცენტი მიკროორგანიზმების კულტივირების პირობები

მიკროორანიზმთა ზრდა-განვითარება, სიცოცხლისუნარიანობა და ზოგადად, მეტაბოლიზმი მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული მათ კულტივირების პირობებსა და საკვები არის შემადგენლობაზე. საწარმოო შტამის ბიოპოტენციალის სრულად გამოსავლენად, კონკრეტული მიკროორგანიზმისთვის აუცილებელია კულტივირების ოპტიმალური პატრამეტრების, კერძოდ, კულტივირების ტემპერატურის, ხანგრძლივობის, საკვები არის pH-ის, აერაციის და ა.შ. დადგენა (Abidi et al., 2011). აღნიშნული ფაქტორების ოპტიმალური მნიშვნელობების შერჩევა ფერმენტების წარმატებული სინთეზის საწინდარია.

გუფტას და მისი თანამშრომლების მიერ დადგენილია, რომ პროტეაზას პროდუცენტის კულტივირებისთვის ზუსტად შერჩეული მეთოდებით შედარებით მოკლე დროში პროტეაზების მაქსიმალური სინთეზია შესაძლებელია (Gupta et al., 2002).

ზოგადად, მიკროორგანიზმები წარმოქმნიან როგორც უჯრედგარე, ასევე- უჯრედშიდა პროტეაზებს. ცნობილია, რომ ენდოგენური პროტეაზები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ უჯრედში მიმდინარე მეტაბოლურ პროცესებში, სპორულაციაში და დიფერენციაციაში, ცილების გარდაქმნაში, ფერმენტების და ჰორმონების სინთეზის სტიმულაციაში, უჯრედული ცილის მარაგის შენარჩუნებასა და სხვა მრავალ სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვან პროცესებში. რაც შეეხება უჯრედგარე პროტეაზებს, როგორც საპროფიტული კვების დამახასიათებელ ფერმენტებს, გამოიყოფიან რა უჯრედიდან გარემოში, ახდენენ ცილის ჰიდროლიზს და საშუალებას აძლევენ უჯრედს, აითვისოს და გამოიყენოს ჰიდროლიზის პროდუქტები-ამინომჟავები (Gupta et al., 2002). სამრეწველო მასშტაბით უჯრედგარე პროტაზების მიღება გაცილებით მომგებიანია ენდოგენურ პროტეაზებთან შედარებით, რადგან უჯრედიდან ფერმენტის გამონთავისუფლება უჯრდის დეზინტეგრაციას მოითხოვს.

ეგზოპროტეაზების პროდუცენტების სამრეწველო მასშტაბით კულტივირების მიზნით გამოიყენება გლუკოზის და სხვა ძვირადღირებული სუბსტრატების შემცველი კომპლექსური საკვები არეები. პროტეაზას, ისევე როგორც მრავალი ფერმენტის სინთეზზე, არსებით გავლენას ახდენენ აზოტისა და ნახშირბადის ოპტიმალური წყაროების შერჩევა და მათი თანაფარდობის დადგენა (C/N). გუფთასა და მისი ჯგუფის მიერ დადგენილია, რომ პროტეაზას სინთეზზე მასტიმულირებელი გავლენა აქვს აზოტის ადვილად მეტაბოლიზებად წყაროებს- ამინომჟავებს (Gupta et al., 2002). საწინააღმდეგო მონაცემებს აქვეყნებენ კუმარი და მისი თანამშრომლები, რომ აზოტის ადვილად მეტაბოლიზირებადი წყაროები (ამინომჟავები) ან ამონიუმის იონები პროტეაზების სინთეზის ინჰიბირებას იწვევენ (Kumar & Takagi, 1999). პროტეაზების პროდუცენტების კულტივირების მიზნით სამრეწველო მასშტაბით აზოტის რთულ წყაროებსაც იყენებენ. რასაკვირველია, კონკრეტული შტამისთვის აუცილებელია აზოტის სპეციფიკური წყაროს და მისი ოპტიმალური კონცენტრაციის

შერჩევა. ზოგადად, სოკოები პროტეოლიზურ ფერმენტებს - რთული ცილოვანი ბუნების აზოტის წყაროებზე - უფრო მეტი რაოდენობით წარმოქმნიან, დაბალ მოლეკულურ და არაორგანული აზოტის წყაროებთან შედარებით (Kucera, 1981).

ბლიევას და ავტორების მიერ, ნაჩვენებია შტამის - *Streptomyces globisporus* 1/68 პროტეაზული აქტივობის ცვლილება ნახშირბადისა და აზოტის წყაროზე დამოკიდებულებით, შედარებულია აზოტის არაორგანული და ორგანული წყაროს გავლენა წარმოქმნილი ფერმენტის რაოდენობაზე. შერჩეულია ნახშირბადისა და აზოტის ოპტიმალური წყაროები. პროტეაზას მაქსიმალური სინთეზი მიღწეულია საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროდ გალაქტოზას (1.2 U/ml) თანობისას. *Streptomyces globisporus* 1/68 -ის ზრდასა და ფერმენტულ აქტივობაზე მასტიმულირებელი გავლენა აღმოაჩნდა აზოტის არაორგანულ წყაროს-ამონიუმის დიჰიდროფოსფატს ($NH_4H_2PO_4$).საკვებ არეში აზოტის ორგანული წყაროების დამატებას გავლენა არ ჰქონდა პროტეაზას ბიოსინთეზზე(Blieva et al., 2021).

ცნობილია, რომ მიკროორგანიზმების კულტივირების მეთოდი არსებითად განსაზღვრავს მათ მორფოლოგიას და უზარმაზარ გავლენას ახდენს ბიომასის ზრდასა და მეტაბოლიტების წარმოებაზე, სიღრმული და მყარფაზოვანი კულტივირება მიკრობების ზრდისა და მათი მეტაბოლური პროდუქტების წარმოების ორი ძირითადი მეთოდია (Manan, et al., 2017). კულტივირების თითოეულ მეთოდს აქვს განსაკუთრებული უპირატესობები (Sandhya et al., 2005; Sun and Xu, 2009). მაგალითად, სიღრმულისგან განსხვავებით, მყარფაზოვანი ფერმენტაცია (SSF) მიკროორგანიზმთა ზრდის ბუნებრივი პირობების მსგავსია. რის გამოც მცენარეული წარმოშობის სუბსტრატების პირდაპირი ტრანსფორმაციის საშუალებას იძლევა. ამავე დროს მყარფაზოვანი ფერმენტაცია არ საჭიროებს განსაკუთრებული ტიპის ბიორეაქტორებს, აერაციასა და მასთან დაკავშირებულ ენერგეტიკულ ხარჯებს; შესაბამისად, ეკონომიკურადაც ეფექტურია. მყარფაზოვანი კულტივირების მეთოდი განსაკუთრებით ხელსაყრელია მიცელიური სოკოების ზრდისთვის, რომლებიც, როგორც წესი, ბუნებაში იზრდება მყარ სუბსტრატებზე. რაც მთავარია, მყარი ფაზის დაბალი ტენიანობა ამცირებს ბაქტერიული დაბინძურების რისკს (Germano et al., 2003;Das and Mukherjee, 2007; Sun and Xu, 2009). სიღრმული კულტივირების (SMF)

მთავარი უპირატესობა ფერმენტაციის პროცესის კონტროლის შესაძლებლობაში მდგომარეობს, თუმცა აღნიშნულ პირობებში წარმოქმნილი პროდუქტები ნაკლებად სტაბილური შეიძლება აღმოჩნდეს მყარფაზოვანთან შედარებით. სიღრმული კულტივირების დროს, თხევად ფაზაში ტემპერატურის, ჟანგბადის კონცენტრაციისა და საკვები ნივთიერებების ცვალებადობა კონტროლირებადია (Biesebeke et al., 2002).

ბოლო წლებში უამრავი კვლევა მიეძღვნა კულტივირების პირობებისა და საკვები არის შემადგენლობის გავლენის შესწავლას მიკროსკოპული სოკოების პროტეაზულ აქტივობაზე. ობის სოკოების სხვადასხვა გვარის წარმომადგენლებს შორის ჩატარებულია პროტეაზების აქტიური პროდუცენტების სკრინინგი. განსაკუთრებით მაღალი აქტივობა გამოავლინეს *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, Mucor, Humicola, Thermoascus, Thermomyces* -ის გვარის შტამებმა. დახასიათებულია შესწავლილი შტამების მიერ პროდუცირებული პროტეაზას ფიზიკური და ქიმიური პარამეტრები. გამოკვლეული უამრავი ნახშირბადის წყაროდან, პროტეაზების ბიოსინთეზის თვალსაზრისით საუკეთესო აღმოჩნდა ხორბლის ქატო.

დეტალურად იქნა შესწავლილია *Aspergillus*-ის გვარის სხვადასხვა სახეობის პროტეაზული აქტივობები. ზოგადად, აღნიშნული გვარის წარმომადგენლები მაღალი პროტეოლიზური აქტივობით გამოირჩევა. უკვე ათწლეულებია, რაც მათ მიერ სეკრეტირებული ფერმენტებიდან, რამდენიმე წარმატებით გამოიყენება კვებისა და სასმელების ინდუსტრიაში, სადაც ფართომასშტაბიანი ფერმენტაცია მიმდინარეობს სიღრმული კულტივირების მეთოდით (Wu et al., 2006). მრეწველობაში გამოყენებული შტამებიდან აღსანიშნავია *Aspergillus flavus* (Kranthi et al., 2012; Macchione et al., 2008), *Aspergillus niger* (O'Donnell et al., 2001; Vishwanatha et al., 2010a; Vishwanatha et al., 2009).

პროტეაზას აქტიურ პროდუცენტს *Aspergillus* oryzae-ს , რომელიც მრავალი მნიშვნელოვანი ტექნოლოგიური პარამეტრით გამოირჩევა, ინდუსტრიული გამოყენების ხანგრძლივი ისტორია აქვს. საწარმოო შტამის მოთხოვნიდან გამომდინარე, *A. oryzae* არატოქსიკური და არაპათოგენურია, იზრდება ისეთ მყარი სუბსტრატებზე, როგორიცაა ორთქლზე მოხარშული ბრინჯი, დაფქული სოია ან სოფლის მეურნეობის მცენარეული წარმოშობის ნარჩენები- ხორბლის ქატო, ბრინჯის

ქატო, და მრავალი სხვა სუბსტრატი. აღნიშნული ლიგნოცელულოზური ნედლეულები მცირე რაოდენობით შეიცავს ამინომჟავებსა და ადვილად მეტაბოლიზებად შაქრებს (Vishwanatha et al., 2009). იკრამ უი ჰაკისისა და მუხტას (kram-Ul-Haq and Mukhtar, 2007) მიერ დეტალურად იქნა შესწავლილი ასპერგილუსის გვარის სხვადასხვა სახეობის პროტეაზული აქტივობები. მყარფაზოვანი კულტივირების პირობებში ტუტე პროტეაზების სინთეზის უნარი შტამებმა -*A. flavus* და *A. oryzae* - გამოავლინეს. ამავე ავტორების მონაცემებით, პენიცილიუმის გვარის სახეობებს- *Penicillium* sp., *P.camemberti*, *P. citrinum, P. griseoroseum, P. limited* და *P. Roqueforti* - პროტეაზებისა და სხვა ფერმენტების სინთეზის მაღალი ბიოტექნოლოგიური პოტენციალი აქვთ. პენიცილიუმის გვარის სახეობებმა ყურადღება მიიპყრო ტუტე პროტეაზების წარმოქმნის უნარით როგორც სიღრმულ, ასევე- მფფ პირობებში. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ შტამები- *P. griseoroseum* და *P. camemberti* მჟავა პროტეაზას ასინთეზებენ ორივე კულტივირების პირობებში. მაგ. ხორბლის ქატოსა და სოიოს ფქვილის მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში *P. griseoroseum* IH-02-ის ახალმა შტამმა მაღალი პროტეაზული აქტივობა გამოავლინა. (kram-Ul-Haq and Mukhtar, 2007). სხვა მკვლევარების მიერ შესწავლილია მუკორის გვარის ორი სახეობა-*M. pusillus* და *M. miehei*, რომლებიც ავლენდნენ ასპარტატ პროტეაზას სინთეზის უნარს. ზოგადად, მუკორის გვარი ცნობილია, როგორც რენინის მსგავსი ფერმენტების პროდუცენტი. ამ ტიპის ფერმენტებს აქვთ რძის შედედების მაღალი უნარი და დაბალი პროტეოლიზური აქტივობა, რაც ყველის ინდუსტრიაში რენინის შემცვლელად მათი გამოყენების საშუალებას იძლევა (Andrade et al., 2002). სამწუხაროდ, მუკორის გვარიდან მიღებულ რენინის მსგავს ფერმენტებს მაღალი თერმოსტაბილობა აღმოაჩნდა. ეს არასასურველი მახასიათებელია, რადგან თერმოსტაბილური ფერმენტი პასტერიზაციის შემდეგაც აგრძელებს მოქმედებას, რაც აფუჭებს ყველის გემოს ხანგრძლივი მომწიფების პროცესში (Maheshwari et al., 2000). ზოგადად, თერმოფილური სოკოები ასინთეზებენ ძალზედ მნიშვნელოვანი ტექნოლოგიური მახასიათებლების ჰიდროლაზებს, რადგან ისინი გამოირჩევიან თერმოსტაბილობით, ოპტიმალურ აქტივობას ავლენენ მაღალ ტემპერატურაზე და ინარჩუნებენ ჰიდროლიზის მაღალ სიჩქარეს. ამგვარი თერმოსტაბილური

პროტეაზები ცილებს ამინომჟავებად და პეპტიდებად გარდაქმნიან 65-85 °C ტემპერატურულ დიაპაზონში და წარმატებით გამოიყენებიან ცხობაში, სარეცხი საშუალებებსა და ტყავის ინდუსტრიაში (Haki and Rakshit, 2003; Merheb et al., 2007). თერმოსტაბილური მჟავა პროტეაზების ცნობილი პროდუცენტებია -*Thermoascus aurantiacus , Thermomyces lanuginosus* და *Thermomyces aurantiacus.* აღნიშნული კულტურები მაქსიმალურ პროტეაზულ აქტივობას ავლენდენენ ხორბლის ქატოს მყარფაზოვანი ფერმენტაციის პირობებში, 60 °C ტემპერატურაზე (Merheb et al., 2007). მსგავსი შედეგები იქნა მიღებული 45 °C - დან 70°C -მდე დიაპაზონში *Thermomyces lanuginosus*-ის კულტივირებისას (Jensen et al., 2002; Macchione et al., 2008 წ.), ხოლო *Thermomucor indicae-seudaticae* მაღალ პროტეაზულ აქტივობას 70 °C- ზე ავლენდა (Merheb-Dini et al., 2010). რაც შეეხება მეზოფილურ შტამებს-*Aspergillus oryzae*-სა (Vishwanatha et al., 2010a; Vishwanatha et al., 2009) და *Penicillium* sp.-ს (Germano et al., 2003), ისინი მაღალ პროტეაზულ აქტივობას შედარებით დაბალ ტემპერატურაზე (55 °C და 45 °C) ავლენდნენ.

ლიტერატურული მონაცემების ანალიზი ცხადყოფს, რომ ფერმენტების ბიოსინთეზის რეგულირება უნდა განვიხილოთ, როგორც სასურველი თვისების ფერმენტული პრეპარატების მიღების საფუძველი, ასვე - მათი წარმოების გაფართოების რეალური შესაძლებლობა. სამრეწველო ფერმენტების ღირებულების დაახლოებით 30% დამოკიდებულია საკვები არის ღირებულებაზე. სწორედ ამიტომ სამრეწველო ფერმენტების გამოყენების ფუნდამენტური კვლევის მთავარი მიზანია, მაქსიმალურად შემცირდეს მათი წარმოების ხარჯები კულტივირების პირობებისა და საკვები არის შემადგენლობის ოპტიმიზაციის გზით.

2.7 მიკრობული პროტეაზების გამოყენების პერსპექტივები კვების მრეწველობაში

მრავალმხრივი გამოყენების გამო პროტეაზები ფერმენტების ერთ-ერთ ყველაზე მნიშვნელოვან ჯგუფადაა მიჩნეული მრეწველობაში: მათ იყენებენ საფეიქრო, ტყავისა და კვების მრეწველობაში, სარეცხი საშუალებების, მთელი რიგი ფარმაცევტული

პროდუქტების წარმოებაში და ა.შ (Mandujano-González et al., 2016; Biškauskaitė, et al 2021).

პროტეაზების არსებულ პროდუცენტებს შორის პრიორიტეტი მიკროორგანიზმებს ენიჭებათ, რაც განპირობებულია მათ მიერ პროდუცირებული ფერმენტების მაღალი სტაბილურობით მცენარეული და ცხოველური წარმოშობის ფერმენტებთან შედარებით. აქედან გამომდინარე, მიკრობული წარმოშობის ფერმენტების გამოყენების არეალი მნიშვნელოვნად ფართოა.

კვების მრეწველობაში მიკრობული ფერმენტები გამოიყენება სხვადასხვა მიზნით: მაგალითად, როგორც ხორცის დამარბილებელი საშუალება, რძის კოაგულაციის მთავარი აგენტი და საჭმლის მონელების დამხმარე პრეპარატი (Liu et. al., 2023; Patel et. al., 2023). პროტეაზები წარმატებით გამოიყენება საკვების ცილების გემოს, კვებითი ღირებულების, ხსნადობისა და მონელების გასაუმჯობესებლად, აგრეთვე მათი ფუნქციური თვისებების შესაცვლელად (Aruna et al., 2014). პროტეაზები მნიშვნელოვანი კომპონენტია საცხობის ინდუსტრიაში: პურის, სხვადასხვა ტიპის გამომცხვარი საკვების და ვაფლის წარმოებაში. მათ იყენებენ ცომის კონსისტენციის და ერთგვაროვნების გაუმჯობესების მიზნით, პურში გლუტენის სიძლიერის დასარეგულირებლად, ცომის ტექსტურისა და გემოს გასაუმჯობესებლად. პროტეაზების ძირითადი გამოყენება გამოცხობისას მდგომარეობს ცომის ვიზოელასტიური თვისებების შეცვლასა და ცილის ჰიდროლიზატების წარმოებაში (Miguel et al., 2013). მიკროსკოპული სოკო-*Aspergillus oryzae*-დან მიღებული ენდო- და ეგზოპროტეინაზები ხორბლის გლუტენის შესაცვლელად გამოიყენება ცხობის პროცესებში. დადგენილია, რომ პროტეაზების დამატება ამცირებს ცომის აფუების დროს და იწვევს პურის მოცულობის გაზრდას (Rao et al., 1998). *Aspergillus usamii*-დან მიღებული მჟავა პროტეაზა წარმატებით იქნა გამოყენებული ხორბლის გლუტენის ფუნქციური თვისებების გასაუმჯობესებლად (Deng et al., 2016). სოკოური წარმოშობის მჟავა პროტეაზები გამოიყენება ლუდის დუღილის გასაუმჯობესებლად, რადგან ისინი ეფექტურია დაბალ pH-ზეც კი (Raveendran et al., 2018). პროტეაზების ჰიდროლიზური თვისება გამოიყენება ხილის წვენებსა და ალკოჰოლურ სასმელებში პროტეინის დუღილის შედეგად წარმოქმნილი მღვრიე კომპლექსის მოსაცილებლად,

ცილით მდიდარი საკვების ხარისხის გასაუმჯობესებლად - სოიოს ცილის, ჟელატინის, კაზეინისა და შრატის ცილის ჰიდროლიზით (Mamo et al., 2018). გარდა ამისა, პროტეაზები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ხორცის (განსაკუთრებით საქონლის) დარბილებაში, რადგან მათ გააჩნიათ შემაერთებელი ქსოვილის (ხრტილებისა და მყესების) ცილების ჰიდროლიზის უნარი (Mamo et al., 2018). სოკოური წარმოშობის ტუტე და ნეიტრალური პროტეაზები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ სოიოს სოუსისა და სოიოს სხვა პროდუქტების გადამუშავებაში. პროტეაზებით დამუშავების შედეგად მიიღება მაღალი ხსნადობის ჰიდროლიზატები, ცილის მაღალი გამოსავლიანობითა და დაბალი სიმწარით. კაზეინიდან, შრატისა და სოიოს პროტეინიდან პროტეაზების გამოყენებით მიღებული ჰიდროლიზატები გამოიყენება როგორც დიეტური და ჯანმრთელობის პროდუქტების შემადგენელი კომპონენტი ჩვილ ბავშვთა კვებაში, კლინიკური კვების დანამატებში, ორსული/მეძუძური ქალებისთვის რეკომენდებულ სასმელებში, რძის ცილებზე ალერგიული ადამიანებისთვის და ასევე, როგორც არომატიზატორები (Philipps-Wiemann, 2018; Rao et al., 1998).

მიკრობული პროტეაზების ძირითადი გამოყენება რძის მრეწველობაში უკავშირდება ყველის წარმოებას, სადაც აღნიშნული ფერმენტის მთავარი ფუნქციაა სპეციფიკური პეპტიდური ბმის გახლეჩვა კაზეინისა და მაკროპეპტიდების წარმოქმნის მიზნით (Britten et al., 2022; Oštarić, et al., 2022). მიკროსკოპული სოკოების-*Mucor michei* და *Endothia parasitica* მიერ პროდუცირებული პროტეაზები თანდათან ანაცვლებენ ცხოველურ რენინს ყველის წარმოებაში და მნიშვნელოვნად აუმჯობესებენ ყველის საგემოვნო მახასიათებლებს. ისინი გამოიყენება ყველის სიმწიფის დასაჩქარებლად, ფუნქციური თვისებების შესაცვლელად და რძის პროდუქტების ალერგენული თვისებების შესამცირებლად (Raveendran et al., 2018).

ყველის წარმოებაში ძირითადად მიკრობული წარმოშობის მჟავა პროტეაზები გამოიყენება. მიკრობული რძის კოაგულაციის პროტეაზები მიეკუთვნებიან მჟავა ასპარტატის პროტეაზების კლასს (Solanki et al., 2021;). მჟავა პროტეაზების მთავარი როლი ყველის წარმოებაში არის სპეციფიკური პეპტიდური ბმის (Phe105-Met106 ბმა) ჰიდროლიზება პარა-K-კაზეინისა და მაკროპეპტიდების წარმოქმნის მიზნით. რძის

კოაგულანტებს შორის უპირატესობა ქიმოზინს ენიჭება კაზეინის მიმართ მაღალი სპეციფიკურობის გამო, რაც განაპირობებს აღნიშნული ფერმენტის განსაკუთრებულ ეფექტურობას ყველის წარმოებაში (Sakovich, 2020). *Rhizomucor miehei* NRRL 2034-დან მიღებული რენინით (1 მლ სოკოური რენინი/100 მლ რძე) თეთრი რბილი ყველის დამზადებისას ლაბორატორიულ პირობებში დადგენილია დიდი მსგავსება ხბოს რენინით დამზადებულ ყველთან. ეს უკანასკნელი გამოიყენებოდა როგორც კონტროლი. სოკური რენინით წარმოებულმა ყველმა ხსნადი აზოტის (SN), მთლიანი აქროლადი ცხიმოვანი მჟავების (TVFAs), თიროზინის და ტრიპტოფანის უკეთესი მაჩვენებლები გამოავლინა საკონტროლო ყველთან შედარებით. უფრო მეტიც, სოკოური რენინით დამზადებულ ყველზე ჩატარებულმა სენსორულმა გამოკვლევამ აჩვენა, რომ ექსპერიმენტულ ყველს ჰქონდა რბილი და გლუვი ტექსტურა და სასურველი გემო, ცივი შენახვისას ორი თვის განმავლობაში (Abbas et al., 2013; Food, 2015).

უკანასკნელ წლებში ფენომენალურად იზრდება ფერმენტების, როგორც სამრეწველო კატალიზატორების გამოყენების პერსპექტივა. პროტეაზები (EC 3:4, 11-19, 20-24, 99) (სინონიმი, როგორც პეპტიდაზა ან პროტეინაზა) წარმოადგენენ ფერმენტების ძალიან დიდ და რთულ ჯგუფს, რომლებიც ფართოდ გამოიყენებიან მრეწველობის სხვადასხვა დარგში. პროტეაზები შეადგენენ მსოფლიოში გაყიდვადი ფერმენტების დაახლოებით 60%-ს (Sandhya at al., 2005). ისინი განსხვავდებიან ისეთი თვისებებით, როგორიცაა სუბსტრატის სპეციფიკურობა, აქტიური ცენტრი და კატალიზური მექანიზმი, ტემპერატურული და pH ოპტიმუმები. ამდენად, ამ ფერმენტების პროდუცენტი –მიკროორგანიზმების გამოვლენა და შესაბამისად მათ მიერ პროდუცირებული პროტეაზების თვისებების შესწავლა კვლავ აქტუალურია, როგორც სამეცნიერო, ასევე პრაქტიკული თვალსაზრისით, ვინაიდან მიღებული პროტეაზები შეიძლება ხასიათდებოდნენ ბიოტექნოლოგიური თვალსაზრისით საინტერესო ახალი თვისებებით.

შესაბამისად ეს იძლევა საშუალებას წარმატებით იქნენ გამოყენებული მრეწველობის სხვადასხვა დარგებში.

3. მეთოდოლოგია

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები.

3.1 კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა

მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფის მიზნით, კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან (ყველი, ხაჭო) აღებული იქნა 9 ნიმუში. ცალკეულ ნიმუშს სხვადასხვა ადგილიდან ეჭრებოდა მცირე ზომის ფრაგმენტები, რომლებიც სტერილდებოდა სპირტქურის ალზე რამდენჯერმე გატარებით, შემთხვევით მოხვედრილი სოკოების სპორებისა და ბაქტერიების მოსაცილებლად. ამგვარად დამუშავებული ნიმუშის ფრაგმენტი თავსდებოდა სტერილურ პეტრის თასზე, სადაც ჩამოსხმული იყო განსხვავებული შემადგენლობის შემდეგი საკვები არეები:

- უნივერსალური არე - (1ლ-ზე): 0,5ლ ლუდის ბადაგი 7^0B, 0,5ლ ონკანის წყალი, 20,0გ აგარ-აგარი. (pH 5.5-6.0).
- ჩაპეკის მოდიფიცირებული არე (%) : $NaNO_3$-0,91, KH_2PO_4-0,1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-0,05, KCl-0,05, $FeSO_4 \cdot H_2O$-0,002, გლუკოზა-2,0, აგარ-აგარი-2,0. (pH 6.0-6.5).
- საბუროს საკვები არე -%: : გლუკოზა - 4%, კაზეინი -4%, პეპტონი -0.5%, აგარი-2%, (pH 6.0-6.5).

გამოყოფის პროცესი მიმდინარეობდა სტანდარტული წესით: თავდაპირველად ნიმუშებიდან ხორციელდებოდა პირველადი ჩანათესების, ხოლო შემდეგ-სუფთა კულტურების მიღება. პირველადი მიკოფლორის ინკუბაცია მიმდინარეობდა თერმოსტატში, 25-30^{0}C-ზე, ერთი თვის მანძილზე.

მიკროორგანიზმთა ნაზრდების დათვალიერება იწყებოდა ინკუბაციის მე-3 დღიდან. პირველადი ჩანათესების ცალკეული კოლონიიდან მარყუჟის მოხრილი წვერით მიცელიუმის მცირე ნაწილის ფრთხილად გადატანა ხდებოდა წინასწარ გასტერილებულ საკვებ არეზე. ეს პროცედურა მეორდებოდა მანამ, სანამ თასზე არ

მიიღებოდა სუფთა კულტურა. სუფთა კულტურები ინახებოდა მაცივარში, 4C^{0}ზე, დაცერებულ აგარიზებულ საკვებ არეებზე, მიკრობიოლოგიურ სინჯარებში.

3.2 მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირება

გამოყოფილი კულტურების კულტურალურ-მორფოლოგიური თვისებების შესწავლა ხორციელდებოდა მაკრომორფოლოგიური და მიკროსკოპული კვლევის მეთოდებით. მიცელიური სოკოების იდენტიფიკაცია ემყარებოდა საკვლევი კულტურის მაკრო- და მიკროსკოპული თვისებების შეჯერებას უკვე ცნობილი სოკოების ადრე აღწერილ თვისებებთან. ცალკეული კულტურის მორფოლოგიური კვლევა ითვალისწინებდა კოლონიის დიამეტრის, ზედაპირის ფორმის, ფერისა და ზრდის სიჩქარის დადგენას. რაც განეკუთვნებოდა მაკროსკოპულ თვისებებს. იდენტიფიკაციის მომდევნო ეტაპი გულისხმობდა რეპროდუქციული ორგანოების დახასიათებასა და მათი პრეპარატების დამზადებას.

თავდაპირველად ხდებოდა მსხვილი ტაქსონომიური ერთეულის დადგენა (კლასი, რიგი). ეს ერთეული განისაზღვრებოდა რეპროდუქციული ორგანოებისა და აღნაგობის თავისებურებებით.

კულტურების კულტურალურ- მორფოლოგიური თვისებების დასახასიათებლად ხდებოდა კულტურების- პირადპირ პეტრის თასზე, მიკროსკოპის მცირე გადიდებით დათვალიერება, შემდეგ კი მზადდებოდა პრეპარატები.

პირველ შემთხვევაში დგინდებოდა შერწყმული სპორების (სპორაშერწყმულობა) მიერთების ხასიათი (ტიპი), საჰაერო ან სუბსტრატულ მიცელიუმთან, სპორანგიმატარებლობისა და კონიდიამატარებლობის დატოტვა, სპორებისა და კონიდიების (ერთეული, ჯგუფური) მიერთების უნარი და ა.შ. მოკლედ ყველა ის თვისება, რომელთა დადგენა არ ხდება პრეპარატის საშუალებით.

მიკროსკოპული პრეპარატის დასამზადებლად, გასტერილებული მარყუჟის წვერით იჭრებოდა სოკოების კოლონიების ნაწილი, რამდენადაც შესაძლებელია საკვები არის აგარის გარეშე, თავსდებოდა წყლის წვეთში, რომელშიც იხსნებოდა მიცელიები. ვინაიდან სოკოს ზოგიერთი ელემენტი, ძირითადად სპორები და კონიდიები არ

სველდება წყლით, წყალს ემატებოდა ეთილის სპირტი 1:1 ან კონცენტრირებული ძმარმჟავა.

მზა პრეპარატის კვლევა ხდებოდა მშრალი ოპტიკური სისტემით. მიკროსკოპული სოკოების კულტურალურ-მორფოლოგიური თვისებების აღწერა ხორციელდებოდა სქემით, რომელიც შეიცავს ზოგიერთ ვარიაციას, დამოკიდებულებით- რა სისტემატიკურ მდებარეობაშია შესწავლილი სახეობა (ტაქსონომიური ჯგუფი).

მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიცირებისათვის გამოყენებული იქნა საკვლევები: პიდოპლიჩკო, მილკო, ბილაი, კოვალი, ლიტვინოვი, მალოჩი, სატონი, ბუთი, კლიჩი, დუნკანი და ა.შ (Pidoplichko and Milko, 1971;Bilai and Koval, 1988; Litvinov, 1967; Malloch et al., 1981; Саттон, 2001; Dugan, 2006). შტამის გვარამდე იდენტიფიცირების შემდეგ სახეობამდე იდენტიფიცირებისათვის დამატებით გამოიყენებოდა შესაბამისი მეთოდები (Pitt J.I. 1991; C.M. Visagie and J. Houbraken, 2014; Саттон, 2001).

3.3 პროტეაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების სკრინინგი

პროტეაზას პროდუცენტების პირველადი სკრინინგი მიმდინარეობდა უცხიმო რძის აგარიზებულ საკვებ არეზე. ამ მიზნით, 25 გრ. უცხიმო მშრალ რძეს ემატებოდა 250 მლ გამოხდილ წყალი. მორევის შემდეგ სუსპენზია სტერილდებოდა ავტოკლავში 15 წუთის განმავლობაში, 121°C-ზე. ამავე პირობებში სტერილდებოდა 2.5% აგარის სუსპენზიაც. სტერილიზაციის შემდეგ უცხიმო რძე და აგარის ხსნარი თავსდებოდა წყლის აბაზანაში 50°C ტემპერატურაზე, რის შემდეგაც ხდებოდა ამ ორი სუსპენზიის შერევა (1:1), ბაქტერიების ზრდის შეზღუდვის მიზნით, საკვებ არეს ემატებოდა 1 მგ/1000 მლ ამპიცილინი. (Maitig et. al.,2018; Zhang et al.,2021; Vijayaraghavan & Vincent, 2013; Niranjana & Bavithara 2020). მიკროსკოპული სოკოების კულტივირება მიმდინარეობდა ზემოთაღწერილი მეთოდით დამზადებულ, საკვებ არიან პეტრის თასებზე, ოთახის ტემპერატურაზე (27°C), ოთხი დღის განმავლობაში. კოლონიის ირგვლივ ლიზისის ზონის წარმოქმნა შტამის პროტეაზურ აქტივობაზე მიუთითებდა. ლიზისის ზონების დიამეტრი იზომებოდა მმ-ში, ფერმენტული ინდექსი (EI) გამოითვლებოდა შეფარდებით: R/r, სადაც R იყო დეგრადაციის ზონის დიამეტრი და

r - კოლონიის დიამეტრი. სოკოს შტამი, რომელიც ავლენდა მაქსიმალურ მკაფიო ლიზისის ზონას, შეირჩეოდა შემდგომი კვლევისთვის.

3.4 პროტეაზას პროდუცენტების საკვები არის შემადგენლობის ოპტიმიზაცია

პროტეაზას შერჩეული პროდუცენტების სიღრმული კულტივირება საწყის ეტაპზე მიმდინარეობდა ერლენმეიერის 250 მლ-იან კონუსურ კოლბებში, თერმოსტატირებულ სანჯღრეველაზე, 180-200ბრ/წთ , 30°C-ზე, 6 დღის მანძილზე, საკვებ არეზე, რომელიც შეიცავდა 2% კაზეინსა და MgSO4- 0.1%-ის ოდენობით.

ნახშირბადის ოპტიმალური წყაროს შერჩევის მიზნით, აღნიშნულ საკვებ არეში შეგვქონდა გლუკოზა, ან ფრუქტოზა, ან-ლაქტოზა 2%-ის ოდენობით. ჩასათეს მასალას წარმოადგენდა 10 დღიანი კულტურის კონიდიების სუსპენზია. ოპტიმალურად მიიჩნეოდა ის ნახშირბადის წყარო, რომელზეც კულტურა ავლენდა მაქსიმალურ პროტეაზურ აქტივობას.

ანალოგიური მიდგომით მიმდინარეობდა აზოტის ოპტიმალური წყაროს შერჩევა, ზემოთაღწერილ საკვებ არეზე, რომელშიც შეგვქონდა ნახშირბადის შერჩეული წყარო და აზოტის შემდეგი წყაროები: -საფუვრის ექსტრაქტი, ან- შარდოვანა ან-კაზეინი-2%-ის ოდენობით.

ფოსფორის წყაროს შერჩევის მიზნით, ნახშირბადისა და აზოტის ოპტიმალური წყაროების შემცველ საკვებ არეში 0.2%-ის ოდენობით შეგვქონდა შემდეგი მარილები: ერთჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა ნატრიუმი, ან- ერთჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმი, ან-ორჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმი .

აზოტის წყაროს ოპტიმალური კონცენტრაციის დადგენის მიზნით, ზემოთაღწერილი შემადგენლობის საკვებ არეში შეგვქონდა კაზეინის სხვადასხვა კონცენტრაციები: 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2,5%.

მსგავსი მიდგომით მიმდინარეობდა შერჩეული ნახშირბადის წყაროს (ლაქტოზას) ოპტიმალური კონცენტრაციის დადგენა: აზოტის შერჩეული წყაროს ოპტიმალური კონცენტრაციის შემცველ საკვებ არეში შეგვქონდა ლაქტოზას განსხვავებული კონცენტრაციები (1%, 2%, 3%, 4%, 5%);

ანალოგიური პრინციპით მიმდინარეობად ფოსფორის საუკეთესო წყაროს ოპტიმალური კონცენტრაციის დადგენა: უკვე ოპტიმიზირებულ საკვებ არეზე შეგვქონდა ორჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმის სხვადასხვა კონცენტრაციები : 0.05%, 0.1%,0,5%, 1%.

3.5 პროტეაზას პროდუცენტების კულტივირების ოპტიმალური პირობების დადგენა

შერჩეული შტამის კულტივირების ოპტიმალური ტემპერატურის დადგენა მიმდინარეობდა ოპტიმალური შემადგენლობის საკვებ არეზე, ერლენმეიერის 250 მლ-იან კონუსურ კოლბებში, თერმოსტატირებულ სანჯღრეველაზე, 180-200ბრ/წთ, 30°C-ზე, ტემპერატურის ფართო დიაპაზონში-- 25-დან 40^{0}C -მდე, 5^{0}C-ის ინტერვალით. თითოეულ კოლბაში შეგვქონდა 50 მლ საკვები არე.

საკვები არის ოპტიმალური pH-ის დადგენის მიზნით, შერჩეული შტამის კულტივირება მიმდინარეობდა განსხვავებული pH-ის საკვებ არეზე. (pH -ის მნიშვნელობა იცვლებოდა 5.0-დან 9.0-მდე, 0.5 -იანი ინტერვალით.)

კულტივირების ოპტიმალური ხანგრძლივობის დადგენის მიზნით, შერჩეული შტამის სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა ოპტიმალური შემადგენლობის საკვებ არეზე, ოპტიმალურ პირობებში, 8 დღის განმავლობაში. კულტივირების ყოველ მეორე დღეს ისაზღვრებოდა შტამის პროტეაზური აქტივობა.

3.6 პროტეაზური აქტივობის განსაზღვრა

შტამის კულტივირების დასრულების შემდეგ, კოლბის შიგთავსს ვაცენტრიფუგირებდით (Biobase) 4000ბრ, 5 წთ-ის განმავლობაში. მიღებულ სუპერნატანტში ვსაზღვრავდით პროტეაზურ აქტივობას მოდიფიცირებული სიგმას მეთოდით (Cupp-Enyard, 2008), ამ მიზნით, 15 მლ-იან ორ სინჯარაში ვასხამდით 5 მლ 0.65% კაზეინის ხსნარს. ვაყოვნებდით, წყლის აბაზანაზე, 37°C ტემპერატურაზე , დაახლოებით 5 წუთის განმავლობაში. რის შემდეგაც პირველ სინჯარას ემატებოდა 1 მლ კულტურალური ხსნარი, მეორე სინჯარა წარმოადგენდა კონტროლს. ინკუბაცია

მიმდინარეობდა თერმოსტატში 37°C-ზე, ჯნღრევის პირობებში, ათი წუთის განმავლობაში, რის შემდეგაც თითოეულ სინჯარაში ემატებოდა 5 მლ (110 mM) სამქლორძმარმჟავა.

მესამე სინჯარაში შეგვქონდა მხოლოდ კულტურალური ხსნარის 1მლ. ეს სინჯარაც თავსდებოდა საინკუბაციოდ ზემოთ აღწერილ პირობებში. ინკუბაციის შემდეგ სინჯები იფილტრებოდა 0.45 მიკრონის მემბრანული ფილტრით.

მიღებულ 2 მოცულობა საკვლევ ხსნარს ემატებოდა 5 მოცულობა 20% Na_2CO_3 და 1 მოცულობა ფოლინ-ჩიკოლტეს (0.5 mM) რეაგენტი. სინჯები თავსდებოდა საინკუბაციოდ თერმოსტატში 37°C-ზე სიბნელეში, 30 წუთის განმავლობაში. ინკუბაციის შემდეგ სინჯები იფილტრებოდა 0.45 მიკრონის მემბრანული ფილტრით და იზომებოდა სპექტროფოტომეტრზე (პერკინ ელმერი) 660 ნმ-ზე.

პროტეაზური აქტივობის გამოთვლა (U/MG) ხდებოდა ფორმულისა და თიროზინის სხვადასხვა კონცენტრაციების მიმართ აგებული საკალიბრო მრუდის მიხედვით (გრაფიკი 1).

$$\text{Units/ml (ფერმენტი)} = \frac{\text{თიროზინი(მიკრომოლი)} \times 11}{(1) \times (10) \times (1)}$$

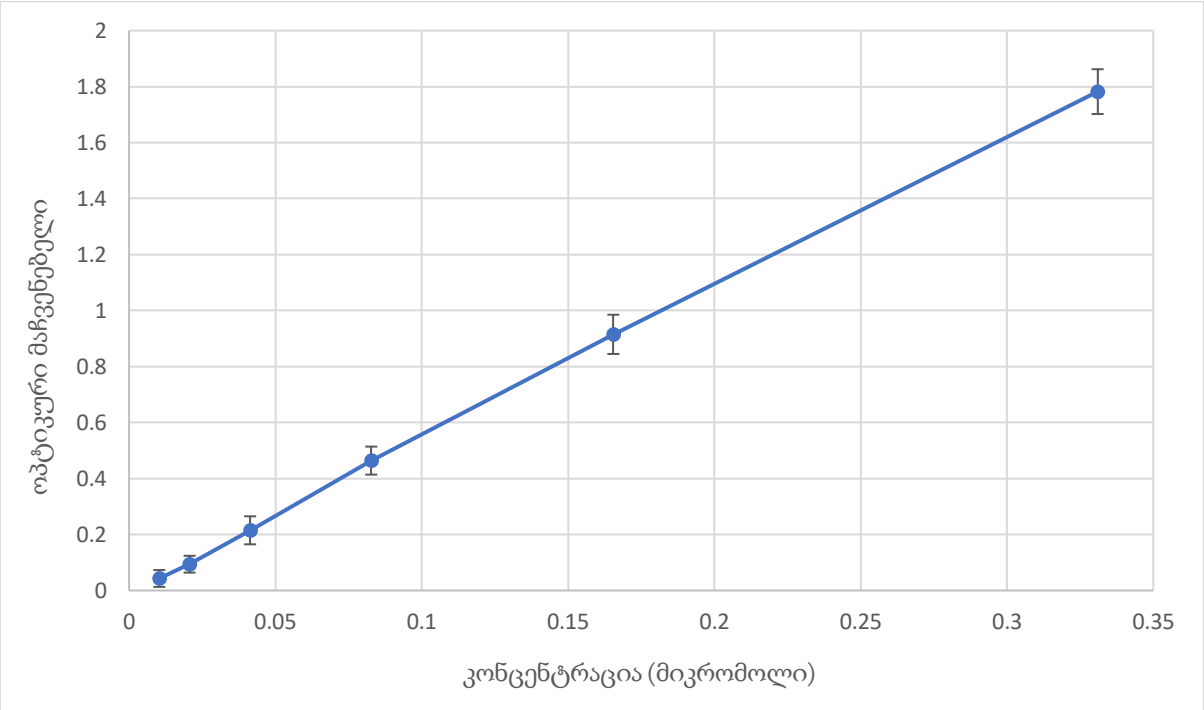
11- სარეაქციო არის მთლიანი მოცულობა(მლ)

10- ანალიზის დრო (წუთებში)

1- ფერმენტის მოცულობა (მლ)

1- კოლორიმეტრულად განსაზღვრისთვის საჭირო ხსნარის მოცულობა (მლ)

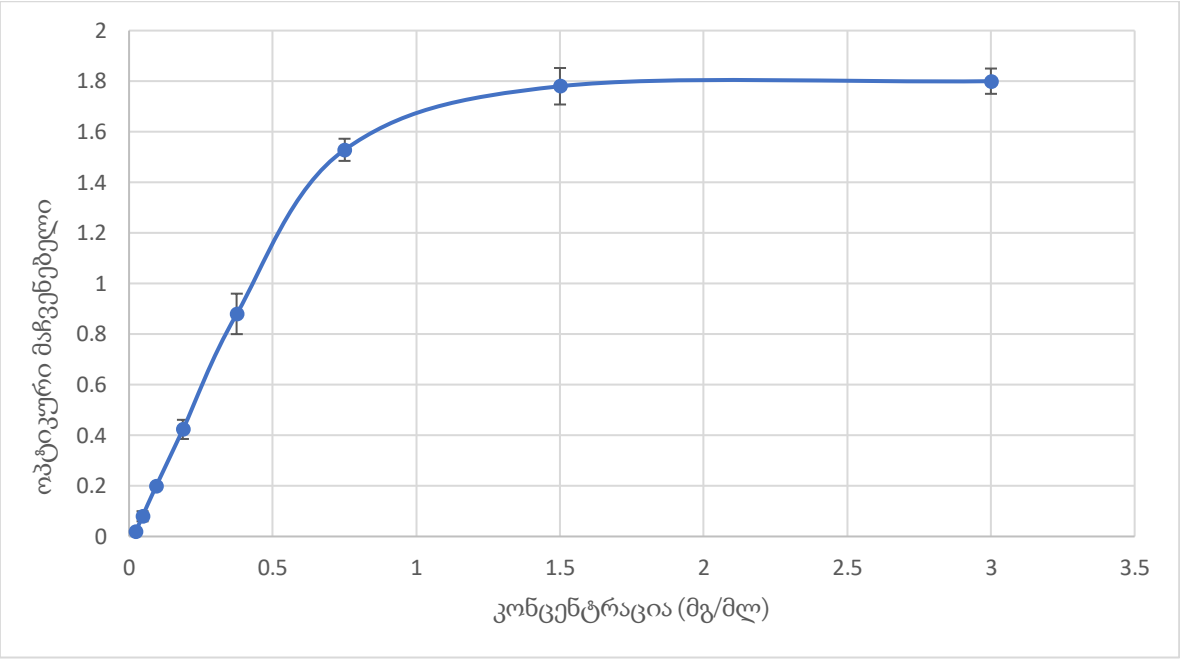
$$\text{Units/mg} = \frac{\text{U/ml (ფერმენტი)}}{\text{mg / ml (ცილა)}}$$



გრაფიკი 1. თიროზინის სტანდარტული საკალიბრო მრუდი

3. 7 კულტურალურ სითხეში ცილის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით

საკვლევ სინჯებში ცილის გაზომვისთვის გამოყენებული იყო ბრედფორდის მეთოდი. კვლევის ფარგლებში 1 მლ ბრედფორდის რეაგენტს დაემატა 100 მკლ საანალიზო ხსნარი, სინჯები მოთავსდა საინკუბაციოდ თერმოსტატში 25^{0}C-ზე 10 წუთის განმავლობაში. ინკუბაციის დასრულების შემდგომ სინჯები გაიზომა 578 ნმ-ზე სპექტომეტრის (პერკინ ელმერი) საშუალებით საკონტროლო ხსნარის მიმართ. ცილის კონცენტრაცია განისაზღვრა ხარის შრატის ალბუმინის სტანდარტული ხსნარებით (3, 1.5, 0.75, 0.37, 0.187, 0.09, 0.046, 0.023 მგ/მლ) აგებულ საკალიბრო მრუდზე (გრაფიკი 2).



გრაფიკი 2. ხარის შრატის ალბუმინის სტანდარტული საკალიბრო მრუდი

3.8 პროტეაზების ტექნიკური პრეპარატების მიღება

ფერმენტული პრეპარატის მისაღებად კულტურალური სითხე ცენტრიფუგირების საშუალებით განვაცალკევეთ ბიომასისგან. კულტურალური სითხის ნაწილს დაემატა გაციებული სპირტი (-15°C), თანაფართობით 1:4 და მეორე ნაწილს თანაფართობით 1:8. ხსნარი მაცივარში დავაყოვნეთ 4 საათის განმავლობაში (2°C), ნალექის გამოსაყოფად დავაცენტრიფუგირეთ (6000 ბრ /წთ 20 წთ). მიღებული ფერმენტული პრეპარატი გავაშრეთ ლიოფილური საშრობით.

ფერმენტული პრეპარატის მიღება ასევე განხორციელდა გამომარილების მეთოდის საშუალებითაც: ამონიუმის სულფატი კულტურალურ სითხეს დაემატა 20%, 40%, 60%, 80% -იანი გაჯერებით (ყოველ მომდევნო ფრაქციას წინა ფრაქცია შორდებოდა ცენტრიფუგირების საშუალებით). ხსნარები დავაყოვნეთ 4 საათით მაცივარში (2°C), ცენტრიფუგირების შემდგომ (6000 ბრ /წთ 20 წთ), დიალიზის მეთოდის საშუალებით მიღებულ ნალექის ხსნარს მოვაშორეთ მარილები და გავაშრეთ ლიოფილურად (Green, et. al 1955). ფერმენტულ პრეპარატებში გავზომეთ პროტეაზური აქტივობა და რძის შემადედებელი აქტივობა.

3.9 რძის შემადედებელი აქტივობის ანალიზი (MCA)

რძის შემადედებელი აქტივობის განსაზღვრისთვის 0,5 მლ ფერმენტის ხსნარს ემატებოდა 5 მლ 10 %-იანი აღდგენილი უცხიმო რძე, რომელიც წინასწარ იყო ინკუბირებული 35 °C-ზე 10 წუთის განმავლობაში. უცხიმო რძის ხსნარს ემატებოდა 0,01M $CaCl_2$. რძის შედედების აქტივობა იქნა შეფასებული სოქსლეტის ერთეულში (SU) შემდეგი ფორმულის მიხედვით: SU=(2400∗5∗D)/(T∗0.5), სადაც T არის შედედების დრო (s) და D არის ფერმენტის განზავება. ერთი SU გამოიხატება, როგორც ფერმენტის ის რაოდენობა, რომელიც საჭიროა 1 მლ ხსნარის შედედებისთვის, რომელიც შეიცავს 0,1 გ უცხიმო რძის ფხვნილს და 0,01 M კალციუმის ქლორიდს 35 °C -ზე, 40 წუთის განმავლობაში (Arima et al. 1970).

3.10 შერჩეული შტამის ტოქსიკოლოგიური კვლევა

შერჩეული შტამის ტოქსიკურობას ვამოწმებდით ექსპრეს-ტესტ მეთოდით, *Paramecium caudatum* -ის გამოყენებით. ინფუზორიების კულტურები მოგვაწოდა საქართველოს ზოოლოგიის ინსტიტუტმა. ამ მიზნით, სოკოს 10 დღიანი სიღრმული კულტივირებით მიღებული კულტურალური სითხიდან ვამზადებდით 10^{-1} და 10^{-2} განზავებებს და განუზავებელ ხსნარებს. ამგვარი სუსპენზიების 2 წვეთს ვაწვეთებდით სასაგნე მინაზე და ვუმატებდით *P. candatum-ის* ექსტრაქტის ერთ წვეთს, ვურევდით წკირით და გადარჩენილი ინფუზორიების რაოდენობას ვითვლიდით მიკროსკოპის (Biobase) მცირე გადიდების გამოყენებით 1 სთ-ის განმავლობაში, კონტროლად ვიყენებდით დექლორირებულ ონკანის წყალს ინფუზორიებით. მგრძნობელობის განსაზღვრის კრიტერიუმად ითვლებოდა დრო, საკვლევი ექსტრაქტის ზემოქმედების დაწყებიდან *P. candatum* ის დაღუპვამდე. შტამი, რომლის სუსპენზიაც პარამეციების 50%-ის დაღუპვას იწვევს 3 წთ-ის განმავლობაში ძლიერ ტოქსიურად ითვლება, 8-10 წუთის განმავლობაში– ტოქსიკურად, 20 წუთიდან 24 საათის განმავლობაში- დაბალ ტოქსიკურებად, უფრო ნაკლები კი-არა ტოქსიკურად (Гурьянов, И. Д., & Юсупова, Д. В. (2008). გამოყენებული

ტესტი ტოქსიკურობის განსაზღვრის ერთ-ერთ ყველაზე ადექვატურ მეთოდად არის მიჩნეული, რომელიც ეფექტურია ტოქსინის უმცირესი დოზების აღმოსაჩენადაც.

3.11 ფერმენტის გაწმენდა და ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების შესწავლა

3.11.1 იონცვლადი ქრომატოგრაფია

პროტეოლიზური ფერმენტის გაწმენდა განხორციელდა იონცვლადი ქრომატოგრაფიის გამოყენებით (JIANGXI AIYI TRADE), აღნიშნული ტიპის ქრომატოგრაფია ეფექტურია ცილების გასაწმენდად, რაც ხდება იზოელექტრული წერტილის (pI) საფუძველზე (Siegel, et al. 1997). მყარ ფაზად შერჩეულ იქნა ანიონცვლადი DEAE-ცელულოზა(alpha), რომელიც შეტანილ იქნა სვეტში (20სმx1.5სმ), სვეტი გაირეცხა ფოსფატური ბუფერით pH 8 (0.5 M); დატანილი სინჯის მოცულობა იყო 20 მლ (ცილა 1.2 მგ/მლ), სინჯის დატანის შემდეგ ფოსფატური ბუფერის საშუალებით ელუცირდა მოცულობა (ცილოვანი ფრაქცია), რომელიც არ ადსორბირდა სვეტზე, ადსორბირებული ცილის ელუცია ვაწარმოეთ 1 მოლარული ნატრიუმის ქლორიდის გრადიენტის საშუალებით, სვეტიდან გამოსული სინჯის ყოველი 5 მლ გროვდებოდა ფრაქციული კოლექტორის გამოყენებით (JIANGXI AIYI TRADE).

ცილის ელუცია საფეხურებრივად მიმდინარეობდა მარილის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად. ყველა ეტაპი ჩატარდა ცივ ოთახში, ფერმენტების დენატურაციის თავიდან ასაცილებლად. მიღებული ნიმუშებიდან მარილების მოშორება განხორციელდა დიალიზის მეთოდით (3500D-14000D) 24 საათის განმავლობაში.

3.11.2 გელდიფუზიური მეთოდი

გელდიფუზიური მეთოდით პროტეოლიზური აქტივობის განსაზღვრა განხორციელდა კაზეინის გამოყენებით, ეს მეთოდი საშუალებას იძლევა

განისაზღვროს პროტეოლიზური აქტივობა სხვადასხვა ტიპის ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთებში. მეთოდის მთავარი პრინციპია აგარში ჩაპოლიმერიზდეს სუბსტრატი რომელზეც იმოქმედებს ფერმენტი. კაზეინი, რძის მთავარი ცილა, არის მაკრომოლეკულა, რომელიც შედგება პეპტიდური ბმებით (CO—NH) დაკავშირებული ამინომჟავებისგან. პროტეოლიზურ ფერმენტებს შესწევთ უნარი გახლიჩონ მოცემული ტიპის ბმები და მივიღოთ პოლიპეპტიდები დიპეპტიდები ან ამინომჟავები. აგარზე წარმოქმნილი პროტეოლიზური (გამჭვირვალე) ზონა ფერმენტული აქტივობის დამადასტურებელია.

ფერმენტის საწყის მოცულობაში და იონცვლადი ქრომატოგრაფიის შემდეგ მიღებულ ფრაქციებში გაიზომა ცილები და საწყის ეტაპზე გელ-დიფუზიური მეთოდით შემოწმდა პროტეოლიზური ფერმენტების აქტივობა. ამისთვის სუბსტრატად აღებულ იქნა 1 % კაზეინი, აღნიშნული სუბსტრატები ჩაპოლიმერიზდა 1 % აგაროზის გელში (პეტრის ფინჯნებში). გელის გამყარების შემდგომ ამოჭრილ იქნა რგოლები დიამეტრით 3 მმ და შეტანილ იქნა 10 მკლ საკვლევი ხსნარები. პეტრის ფინჯნები 18 საათის განმავლობაში საინკუბაციოდ მოთავსდა 37°C-ზე (Zhang, et. al 2021).

3.11.3 ელექტროფორეზი

ცილების შესასწავლად გამოყენებულ იქნა ნატრიუმის დოდეცილსულფატ-პოლიაკრილამიდის გელის ელექტროფორეზი (SDS-PAGE). ცილების მოლეკულური მასები ვიზუალიზებული იყო SDS-PAGE-ში დენატურირების პირობებში. პროცესის მიმდინარეობა: დამყოფი გელი (12%) შედგებოდა Tris-HCl (1.5 M; pH 8.8; 2.5 მლ), დეიონიზებული წყალი (4.17 მლ), აკრილამიდი: ბისაკრილამიდი (3.3 მლ; 29.2: 0.8) SDS (10%; 0.1 მლ) ამონიუმი პერსულფატი (APS) (10%; 50 μl) და N, N,N', N'-ტეტრამეთილეთილენდიამინი (TEMED) (20 μl) დამატებული ამ თანმიმდევრობით. მაკონცენტრირებელი გელი შედგებოდა Tris-HCl (1,5 M; pH 6.8; 2,5 მლ), გამოხდილი წყალი (6,1 მლ), აკრილამიდი: ბის (1,3 მლ; 29,2:0,8), SDS (10%; 0,1 მლ), ამონიუმი პერსულფატი 10 %; 50 μl) და TEMED (20 μl) დამატებულია ამ თანმიმდევრობით. ნიმუშის ბუფერი მომზადდა გამოხდილი წყლის (6.8 მლ), ტრის-HCl (0.5 M; pH 6.8; 1.2 მლ), გლიცეროლის (1.0 მლ), SDS (10%; 2.0 მლ) და ბრომფენოლის ლურჯის (0.5%;

0.5მლ) შერევით. პროტეაზა შერეული იყო ნიმუშის ბუფერთან 1:1 თანაფარდობით, ნიმუშების გაცხელება ხდებოდა წყლის აბაზანაში 2 წუთის განმავლობაში 90^{0}C ტემპერატურაზე. ნიმუშებს ვაციებდით ოთახის ტემპერატურაზე პოლიაკრილამიდის გელში ჩატვირთვამდე. ელექტრონული ბუფერად აღებულ იქნა Tris- გლიცინი (1.5 M; pH 8.8;), ელექტროფორეზის პროცედურის დასრულების შემდეგ, გელი შეიღება Coomassie Blue G-250-ს გამოყენებით (Laemmli, et. al 1970).

3.11.4 ფერმენტული პრეპარატების მოქმედების ტემპერატურული და pH ოპტიმუმების დადგენა

გაწმენდილი ფერმენტის მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმების დასადგენად ფერმენტი იხსნებოდა 0,05 M ფოსფატურ ბუფერში (pH 6) . პროტეაზური აქტივობა იზომებოდა 25-45^{0}C-ზე, 5^{0}C-ინტერვალით. ფერმენტების მოქმედების pH ოპტიმუმების დასადგენად საინკუბაციო არის pH იცვლებოდა pH 4.0-დან – pH 9.0-მდე, 0,5 ის ინტერვალით. აქტივობები ისაზღვრებოდა სიგმას მეთოდით (Cupp-Enyard 2008).

3.12 გაწმენდილი ფერმენტით რძის აჭრა და პროდუქტების მიღების ტექნოლოგიური სქემის შემუშავება

გაწმენდილი ფერმენტით რძის აჭრა განხორციელდა ლაბორატორიულ პირობებში, ცდისთვის გამოყენებულ იქნა 100 მლ უცხიმო რძის ფხვნილი კონცენტრაციით 20 გრ/100 მლ რომელსაც დაემატა 1.5% ფერმენტული ხსნარი (3 U/mg), კონტროლად აღებულ იქნა იმავე მოცულობის უცხიმო რძის ფხვნილი ფერმენტის გარეშე. რეაქცია მიმდინარეობდა 40^{0}C-ზე 20 წუთის განმავლობაში, რძის აჭრის შემდეგ განხორციელდა მისი შრატისგან განცალკევება. ახალი ფერმენტით მიღებული ხაჭოსებური მასის მიღების ტექნოლოგია შედარდა ხაჭოს მიღების ტექნოლოგიას (Липатов, Н. Н. 1972). მიღებული(ყოველი 100კგ) პროდუქტის ფაქტობრივი გამოსავლიანობა გამოითვლება ფორმულით: გამოსავლიანობა(%)=მზა პროდუქტი(კგ)/ნედლეული(კგ)x 100 (Голубева, Л. В., & Долматова, О. И. (2010)).

3. 12.1 მიღებულ პროდუქტში ცილის განსაზღვრა ბრედფორდის მეთოდით

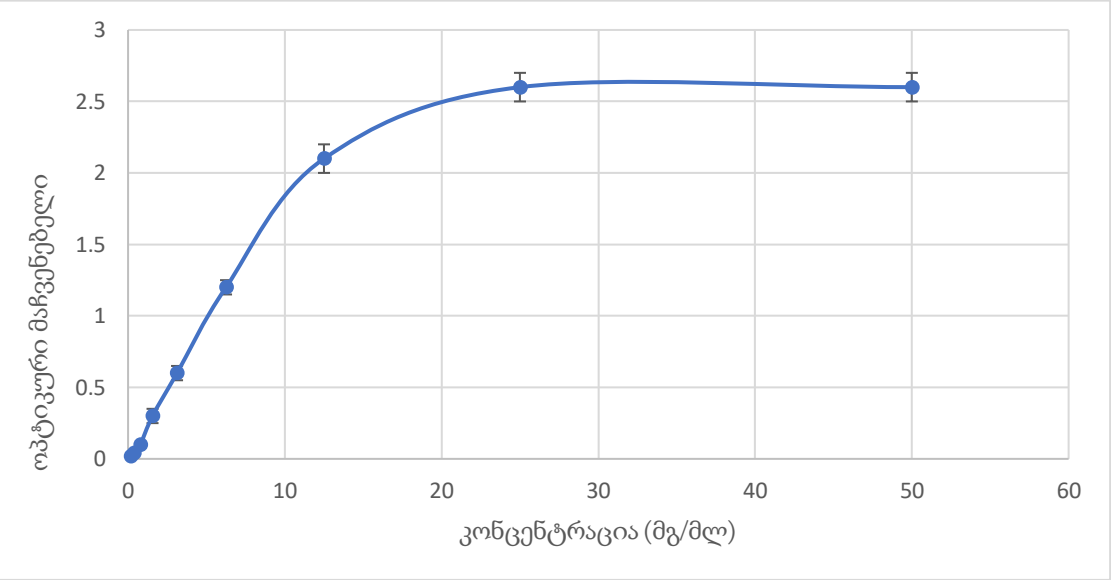
კვლევის ფარგლებში 1 მლ ბრედფორდის რეაგენტს დაემატა 100 მკლ საანალიზო ხსნარი, სინჯები მოთავსდა საინკუბაციოდ თერმოსტატში 25^{0}C-ზე 10 წუთის განმავლობაში. ინკუბაციის დასრულების შემდგომ სინჯები გაიზომა UV/VIS სპექტოფოტომეტრზე (perkinelmer) (578 ნმ) საკონტროლო ხსნარის მიმართ. ცილის კონცენტრაცია განისაზღვრა ხარის შრატის ალბუმინის სტანდარტული ხსნარებით (3, 1.5, 0.75, 0.37, 0.187, 0.09, 0.046, 0.023 მგ/მლ) აგებულ საკალიბრო მრუდზე (გრაფიკი 1)(Kielkopf et al., 2020).

3.12.2 მიღებულ პროდუქტში ცხიმების განსაზღვრა გერბერის მეთოდით

მიღებულ პროდუქტში ცხიმი განისაზღვრა გერბერის მეთოდით (Kleyn, D. H.,et. Al. 2001), ცხიმების განსაზღვრისთვის შეირჩა 40 %-ანი ბუტირომეტრი. მიღებული პროდუქტის 5 გრამი ნიმუში მოთავსდა ბუტირომეტრში, ნიმუშს დაემატა 5 მლ გამოხდილ წყალი და 10 მლ გოგირდმჟავა (სიმკვრივე 1810-1820 კგ/მ^3), შემდეგ დაემატა 1 სმ^3 იზოამილის სპირტი. ცხიმმზომებს მჭიდროდ ეფარებოდა საცობი (დაფარების დროს გამოიყენებოდა ცარცის ფხვნილი) და გადაბრუნება-გადმობრუნებით 5-ჯერ მაინც ერეოდა სინჯი ერთმანეთში. ბუტირომეტრი საცობით ქვემოთ თავსდებოდა წყლის აბაზანაში 5 წუთით, 65 ^{0}C-ზე, ინკუბაციის გასვლის შემდეგ ცხიმმზომები დაიფუგა 5 წუთის განმავლობაში, ქმედება განმეორდა სამჯერ, რეზინის საცობის ფრთხილი მოძრაობით ცხიმის დონე დაყვანილ იქნა ბოლოდან პირველ დანაყოფამდე, ისე რომ ცხიმი საბოლოოდ განთავსდა გრადურიებულ ნაწილში. შესაბამისად აითვალა დანაყოფები და გამოითვალა პროდუქტის ცხიმიანობა პროცენტებში (ერთი დანაყოფი ერთ პროცენტს უდრიდა).

3. 12.3 მიღებულ პროდუქტში საერთო შაქრების განსაზღვრა

საერთო შაქრების განსაზღვრისთვის გამოყენებულ იქნა DNS-ის მეთოდი (Miller et al. 1959), 0.2 მლ სინჯს ემატება 0.4 მლ DNS-ის ხსნარი, საკონტროლო სინჯარას - 0.2 მლ გამოხდილი წყალი. სინჯარები თავსდებოდა მდუღარე წყლის აბაზანაში 5 წუთის განმავლობაში. გაციების შემდეგ თითოეულ სინჯარაში მოცულობა აგვყავდა 5 მლ-მდე გამოხდილი წყლით. სინჯები გაიზომა სპექტოფოტომეტრზე (546 ნმ) საკონტროლო ხსნარის მიმართ. საერთო ნახშირწყლების კონცენტრაცია განისაზღვრა გლუკოზის სტანდარტული ხსნარებით (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78,0.39,0.19, 0.09 მგ/მლ) აგებულ საკალიბრო მრუდზე (გრაფიკი 3).



გრაფიკი 3. გლუკოზის სტანდრტული საკალიბრო მრუდი

3.13 ახალი პროტეაზური ფერმენტის მიერ რძის აჭრის შედეგად მიღებული პროდუქტის სენსორული ანალიზი

სენსორული ანალიზი მოიცავდა ახალი პროტეაზური ფერმენტის მიერ რძის აჭრის შედეგად მიღებული პროდუქტის შეფასებას. მიღებული პროდუქტი მოთავსებული იქნა უსუნო, ერთჯერად ჭურჭელში ოთახის ტემპერატურაზე. შეფასებაში მონაწილე თითოეულმა (შერჩეულ იქნა 10 მომხმარებელი) პირმა დააკმაყოფილა ყველა საკვალიფიკაციო მოთხოვნა. მათ შეაფასეს მიღებული პროდუქტი: ფერის, გემოს, ტექსტურის, სუნისა და არომატის მიხედვით. თითოეული მახასიათებლის მოწონების დონის აღსანიშნად გამოყენებული იყო ხუთბალიანი ჰედონური შკალა, რომელიც მერყეობდა ძალიან კარგიდან ძალიან ცუდამდე (1 - ძალიან კარგი, 2 - კარგი, 3 - არც კარგი, არც ცუდი, 4 - ცუდი, 5 - ძალიან ცუდი(Muchiri et al., 2020).

3.14 სტატისტიკური ანალიზი

რაოდენობრივი მონაცემები წარმოდგენილია საშუალოს და სტანდარტული გადახრის სახით. რაოდენობრივი ცვლადები დამუშავდა One-way ANOVA გამოყენებით. One-way დისპერსიული ანალიზი (ANOVA) გაკეთდა ექსპერიმენტულ ნიმუშებს შორის საშუალო ცვალებადობის გასაანალიზებლად. ანალიზი გაკეთდა XLSTAT-ის გამოყენებით (Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA). სტატისტიკური დამუშავებისას სხვადასხვა ჯგუფისათვის მიღებული იქნა სარწმუნოების კოეფიციენტი (p). $p<0.05$ მიჩნეულ იქნა, როგორც სტატისტიკურად სარწმუნო.

4. ექსპერიმენტული შედეგები

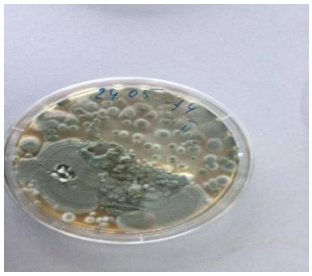
4.1 კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა

პროტეაზების პროდუცენტების გამოვლენის მიზნით, კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან სტანდარტული მიდგომით განხორციელდა მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა. მიკრობიოლოგიური კვლევის საფუძველზე გამოყოფილი და გასუფთავებულია მიკროსკოპული სოკოს 17 კულტურა, რომელთაც იდენტიფიცირებამდე პირობითად, მიენიჭათ რიგითი ნომრები.

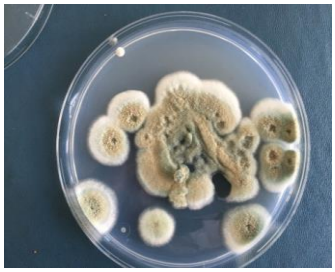
4.2 გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების იდენტიფიკაცია

იდენტიფიცირების პროცესის დასაწყისშივე გამოიკვეთა, რომ რძის გაფუჭებული პროდუქტებიდან გამოყოფილი მიკოფლორა დიდი მრავალფეროვნებით არ გამოირჩევა. გამოყოფილი კულტურების უმრავლესობა მიეკუთვნება მიკროსკოპული სოკოების ერთსა და იმავე გვარს- *Penicillium* -ს, პირველი, მესამე და მეოთხე ნიმუშიდან გამოყოფილ იქნა *Penicillium* , *Scopularipsis* და *Fusarium* -ის გვარის სახეობები.

Penicillium spp.1-1



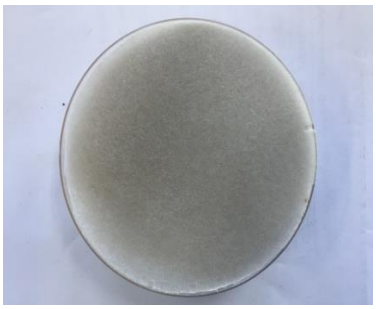
Penicillium spp.3-3

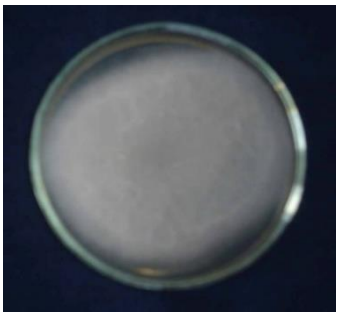


Penicillium spp.4-1

სურათი.1 *Penicillium* -ის გვარის სხვადასხვა სახეობები

მეორე და მეექვსე ნიმუშიდან მხოლოდ *Mucor*-ის გვარის სოკოების გამოყოფა მოხერხდა (სურათი 2). ამ ფაქტის ახსნა შეიძლება იმით, რომ აღნიშნული გვარის წარმომადგენლები არიან ძალიან სწრაფად მზარდი, ჰიფებით სწრაფად ფარავენ პეტრის თასის ზედაპირს და თრგუნავენ სხვა გვარის სოკოების განვითარებას.

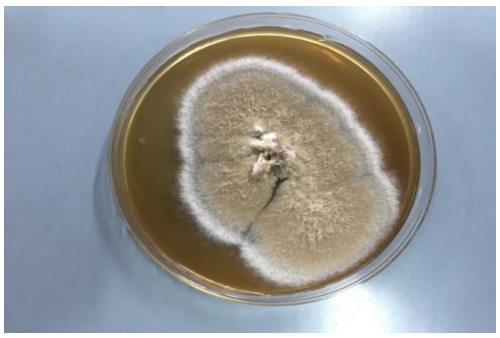




spp. 2-3 *Mucor*- spp. 6-3

سورათი 2. *Mucor*-ის გვარის სახეობები

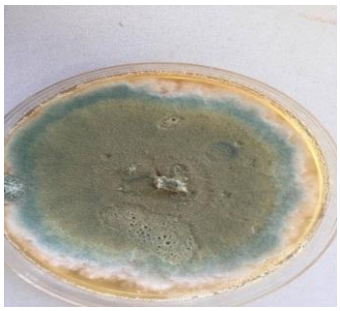
მხოლოდ მე-5 ნიმუშიდან გამოიყო *Penicillium candidum*



.

სურათი 3. Penicillium candidum 5-1

ყველის დამზადების პროცესში მონაწილე ძირითადი აგენტი- *Penicillium camemberti* მეშვიდე ნიმუშიდან იქნა გამოყოფილი. ხოლო მეცხრე ნიმუშიდან გამოიყო *Geotrichum candidum*-ი, რომელიც ასვე მნიშვნელოვან კულტურას წარმოადგენს ყველის დამზადებაში.



სურათი 4. Penicillium camemberti 7-5 და Penicillium spp.8-3

სურათი 5. Geotrichum candidum **9-1**

ამრიგად, განხორციელებული იდენტიფიკაციის საფუძველზე რძის გაფუჭებული პროდუქტებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები მიეკუვნა *Scopularipsis, Penicillium, Mucor, Fusarium -ისა და Geotrichum* -ის გვარებს (ცხრილი 1) .

ცხრილი 1.

კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები

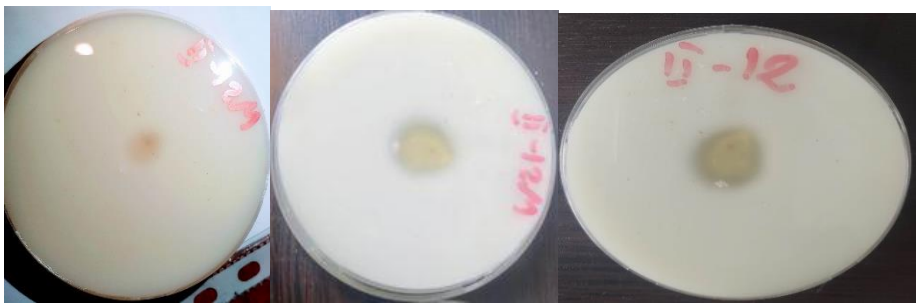
	გამოყოფილი კულტურები	ნიმუშები
1	Scopularipsis spp.1-1	1
2	Penicillium spp.1-2	
3	*Mucor* spp. 2-3	2
4	Penicillium spp. 3-3	3
5	*Fusarium* spp. 3-4	
6	Scopularipsis spp. 4-1	4
7	Scopularipsis spp. 4-4	
8	Penicillium candidum 5-1	5
9	Penicillium spp. 5-6	
10	*Mucor* spp. 6-3	6
11	Penicillium spp. 7-1	7
12	Penicillium spp. 7-3	
13	Penicillium camemberti **spp. 7-5**	
14	Penicillium spp.8-2	8
15	Penicillium spp. 8-3	
16	Geotrichum candidum spp. 9-1	9
17	Geotrichum candidum spp. 9- 2	

4. 3 პროტეაზების პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების სკრინინგი

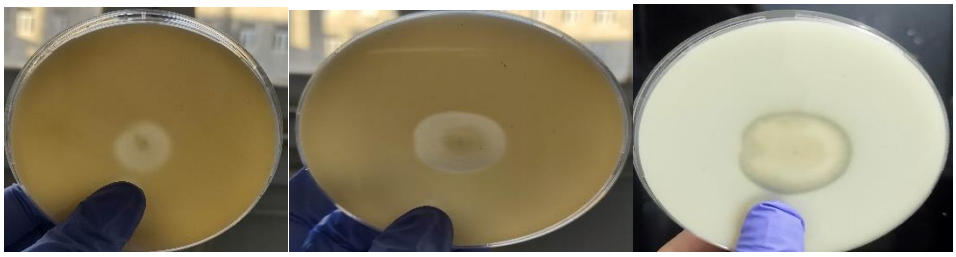
იდენტიფიცირებული შტამების მიერ პროტეაზას პროდუცირების უნარი შემოწმდა მათი ზრდით უცხიმო რძის აგარზე. როგორც სურათი 6 -დან ჩანს, აღნიშნული ფერმენტის სინთეზის უნარი 17 შტამიდან გამოავლინა 3 შტამმა: *Mucor* spp. 2-3 ; *Penicillium camemberti* 7-5 და *Penicillium candidum* 5-1. მაქსიმალური პროტეაზური აქტივობა 96 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ აღმოაჩნდა *Penicillium candidum* spp.5-1 -ს (2.54±0.01).

ფერმენტული ინდექსის გამოთვლით მიღებული შედეგებით მაქსიმალური ინდექსი *Penicillium candidum* 5-1-ის შემთხვევაში დაფიქსირდა; მაღალი ფერმენტული ინდექსით ასევე გამოირჩეოდა *Mucor* spp. 2-3 და *Penicillium camemberti* 7-5, რის გამოც კვლევის შემდგომი მიზნებისთვის ეს სამი შტამი იქნა შერჩეული (ცხრილი 2) .

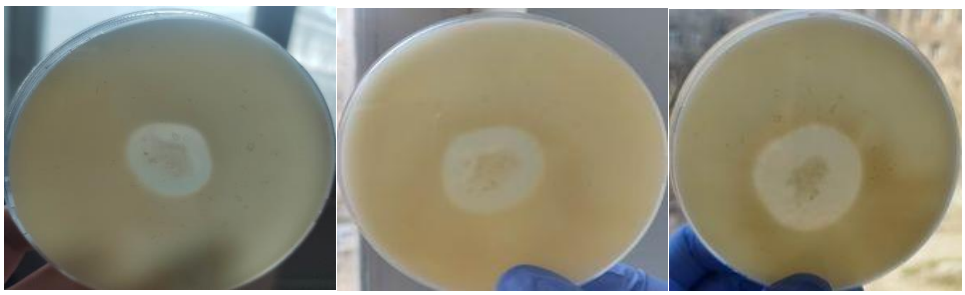
48 საათი 72 საათი 96 საათი



A



B



C

სურათი 6. გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოების ლიზისის ზონის დიამეტრი

A) *Mucor* spp. 2-3

B) Penicillium camemberti 7-5

C) Penicillium candidum 5-1

ცხრილი 2.

შერჩეული პროტეაზას პროდუცენტების ფერმენტული ინდექსის დადგენა

	ლიზისის ზონის დიამეტრი (mm)			კოლონიის დიამეტრი (mm)			ფერმენტული ინდექსი (EI) = ლიზისის ზონის დიამეტრი /კოლონიის დიამეტრი		
ინკუბაციის დრო, სთ	**48**	**72**	**96**	**48**	**72**	**96**	**48**	**72**	**96**
შტამები									
Mucor spp. 2-3	7±0.5	10±0.8	12±0.9	6±0.5	8±0.65	9±0.75	1.1±0.01	1.25±0.01	1.3±0.01
Penicillium camembertі 7-5	13±0.85	15±0.9	20±1.5	7±0.4	10±0.75	17±0.95	1.85±0.01	1.5±0.01	1.17±0.01
Penicillium candidum 5-1	**17**±1.1	**22**±1.8	**28**±1.9	**8**±0.55	**10**±1	**11**±1.1	**2.12**±0.01	**2.2**±0.01	**2.54**±0.01

მნიშვნელობები წარმოდგენილია საშუალოს სახით ± სტანდარტული გადახრა , $p < 0.05$

4.4 პროტეაზას პროდუცენტების საკვები არის შემადგენლობის ოპტიმიზაცია

ცნობილია, რომ საკვები არის კომპონენტური შემადგენლობა ერთ-ერთი არსებითი ფაქტორია, რომელზეც დამოკიდებულია მიკრობთა მეტაბოლიტური პოტენციალის გამოვლენა, ამიტომ მიკროორგანიზმთა ბიოსინთეტიკური აქტივობის შესწავლის საწყის ეტაპს როგორც წესი, საკვები არის კომპონენტური შემადგენლობის ოპტიმიზაცია წარმოადგენს. ამ ინფორმაციაზე დაყრდნობით, შევისწავლეთ ნახშირბადის, აზოტისა ფოსფორის სხვადასხვა წყაროების გავლენა ჩვენს მიერ შერჩეული შტამების პროტეაზურ აქტივობაზე.

საკვები არის ოპტიმიზაცია ნახშირბადის წყაროს შერჩევით დავიწყეთ. 4 გრაფიკზე წარმოდგენილია საკვლევი შტამების პროტაზური აქტივობის დამოკიდებულება ნახშირბადის სახვადსხვა წყაროზე (ფრუქტოზა, გლუკოზა და ლაქტოზა). როგორც გრაფიკიდან ჩანს, პროტეაზას სინთეზის უნარი მეტ-ნაკლებად ყველა შტამს აღმოაჩნდა. ფრუქტოზა სამივე შტამისთვის არახელსაყრელ წყაროს წარმოადგენდა.

მაქსიმალური პროტეაზური აქტივობა გამოავლინა *Penicillium candidum*- 5-1- მა საკვებ არეში ნახშირბადის წყაროდ გლუკოზის გამოყენების შემთხვევაში (გრაფიკი 4). აღსანიშნავია, რომ შტამის მიერ ლაქტოზაზე გამოვლენილი აქტივობა გარკვეულ წილად ჩამოუვარდებოდა გლუკოზაზე გამოვლენილ აქტივობას, მიუხედავად ამისა, შემდგომი კვლევებისთვის მიზანშეწონილად მაინც ბუნებრივ სუბსტრატთან მიახლოებული სუბსტრატის- ლაქტოზის გამოყენება მივიჩნიეთ.

საკვები არის მეორე არსებითი კომპონენტი, რომელიც მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს მიკროორგანიზმთა ზრდა-განვითარებასა და მეტაბოლურ აქტივობაზე,აზოტის წყაროა. ეს უკანასკნელი ამავე დროს პროტეაზული ფერმენტების ინდუქტორსაც წარმოადგეს. აზოტის ოპტიმალური წყაროს შერჩევის მიზნით, შევისწავლეთ საფუვრის ექსტრაქტის, შარდოვანასა და კაზეინის გავლენა საკვლევი შტამების პროტეაზურ აქტივობაზე. როგორც მე-5 გრაფიკიდან ჩანს, სამივე მიკროსკოპული სოკო უპირატესობას კაზეინს ანიჭებდა, თუმცა მაქსიმალური პროტეაზური აქტივობით ისევ *Penicillium candidum* 5-1 გამოირჩეოდა (გრაფიკი 5). მიღებული

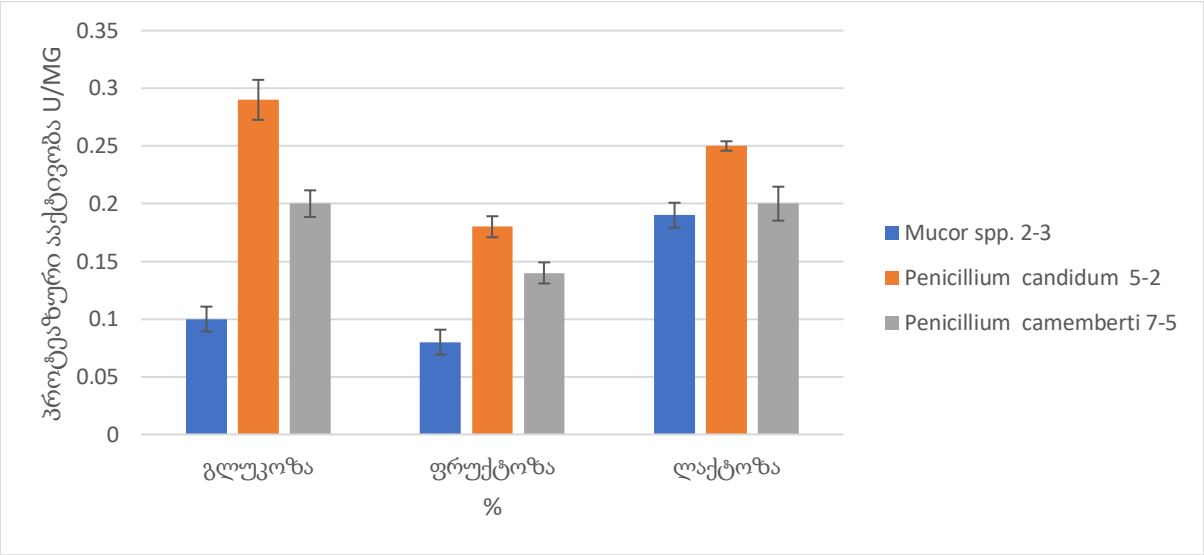
შედეგებიდან გამომდინარე, შემდგომი კვლევისთვის მიზანშეწონილად მივიჩნიეთ საკვებ არეში აზოტის წყაროდ კაზეინის გამოყენება.

ექსპერიმენტის მომდევნო ეტაპზე შვისწავლეთ ფოსფორის სხვადასხვა წყაროების გავლენა შერჩეული შტამების პროტეაზურ აქტივობაზე. ამ შემთხევავშიც ყველაზე მაღალი პროტეაზური აქტივობა *Penicillium candidum* 5-1 -მა გამოავლინა საკვებ არეში ორჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმის მარილის თანაობისას (გრაფიკი 6).

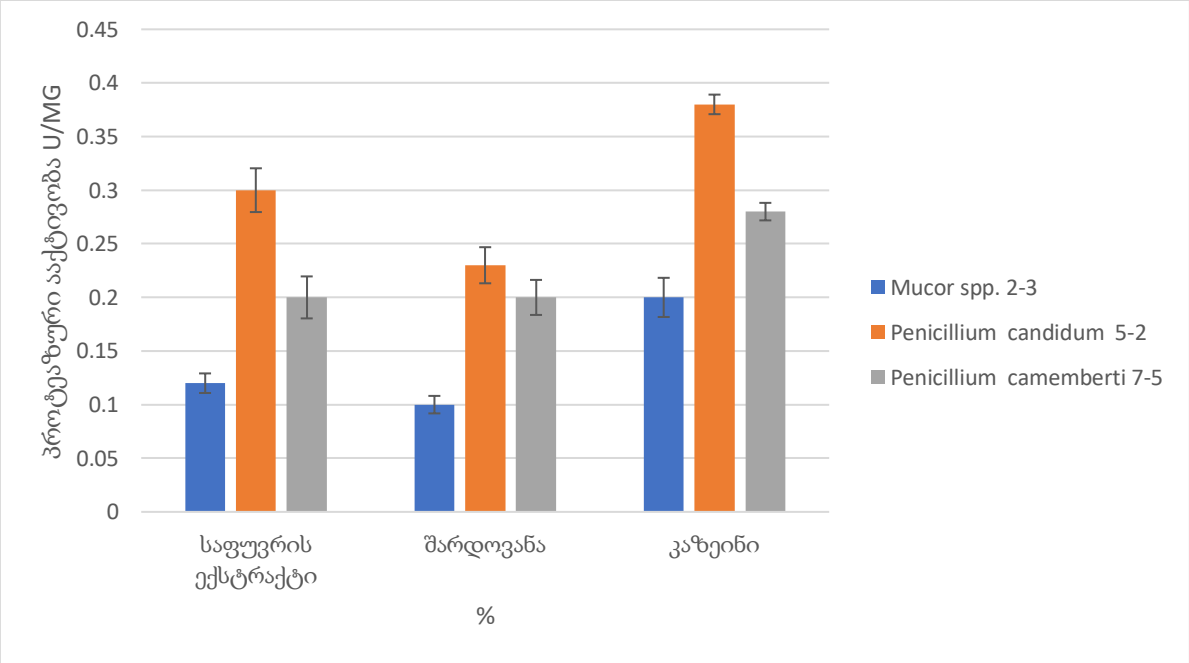
ამრიგად, თანმიმდევრულად განხორციელებული ექსპერიმენტების საფუძველზე შემდგომი კვლევის ობიექტად შევარჩიეთ *Penicillium candidum* 5-1.

ნახშირბადის, აზოტისა და ფოსფორის საუკეთესო წყაროების შერჩევის შემდეგ, ექსპერიმენტის მომდევნო ეტაპზე მიზნად დავისახეთ ცალკეული წყაროს ოპტიმალური კონცენტრაციის დადგენა.

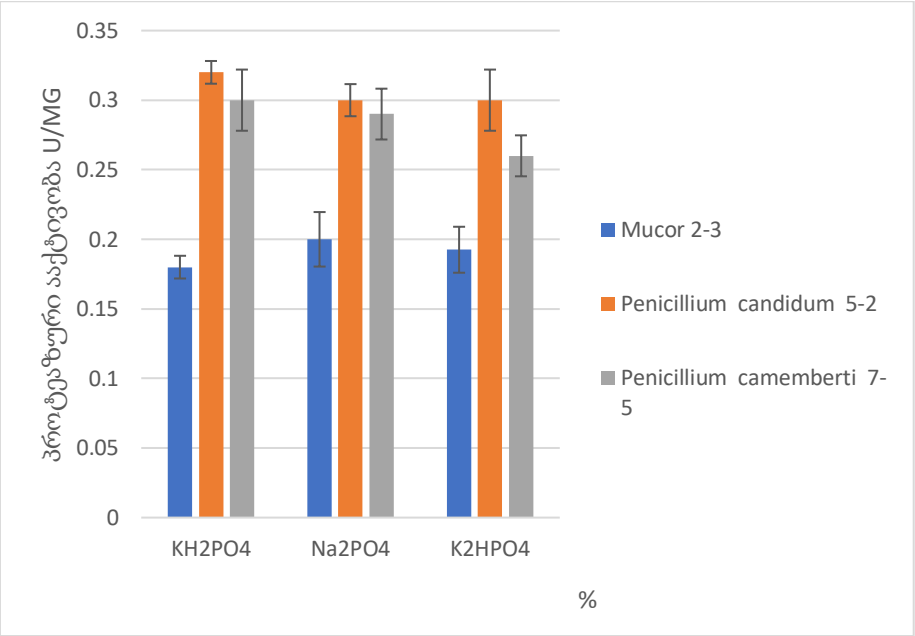
როგორც მე-7 გრაფიკიდან ჩანს, საკვებ არეში ლაქტოზის კონცენტრაციის მატებასთან ერთად შტამის პროტეაზური აქტივობაც იზრდებოდა და მაქსიმუმს აღწევდა ლაქტოზის 4% კონცენტრაციაზე, რის შემდეგაც ფერმენტული აქტივობის აშკარა კლებას ჰქონდა ადგილი (გრაფიკი 7). აზოტის წყაროს ოპტიმალური კონცენტრაციის შერჩევისას დადგინდა, რომ *P. candidum* 5-1 უპირატესობას საკვებ არეში კაზეინის 1,5%-იან კონცენტრაციას ანიჭებდა (გრაფიკი 8), ხოლო ორჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმის სხვადასხვა კონცენტრაციებიდან საუკეთესო აღმოჩნდა აღნიშნული მარილის 0,1% კონცენტრაცია (გრაფიკი 9).



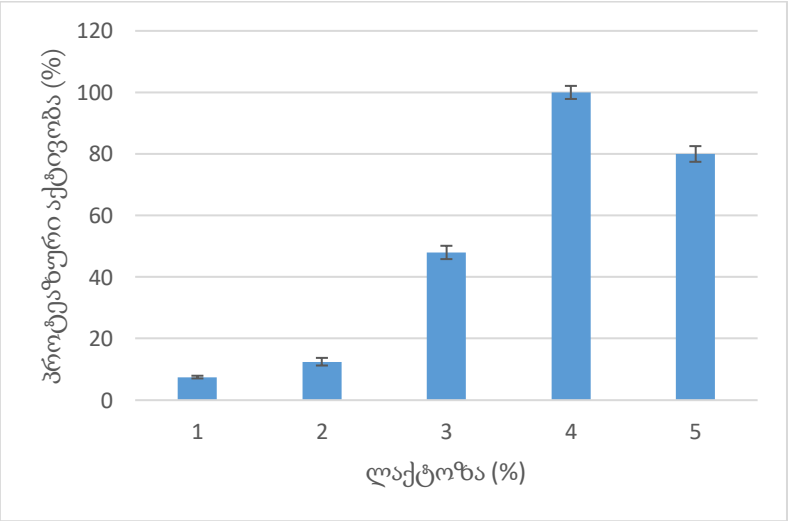
გრაფიკი 4. ნახშირბადის სხვადასხვა წყაროს გავლენა შერჩეული შტამების პროტეაზურ აქტივობაზე.



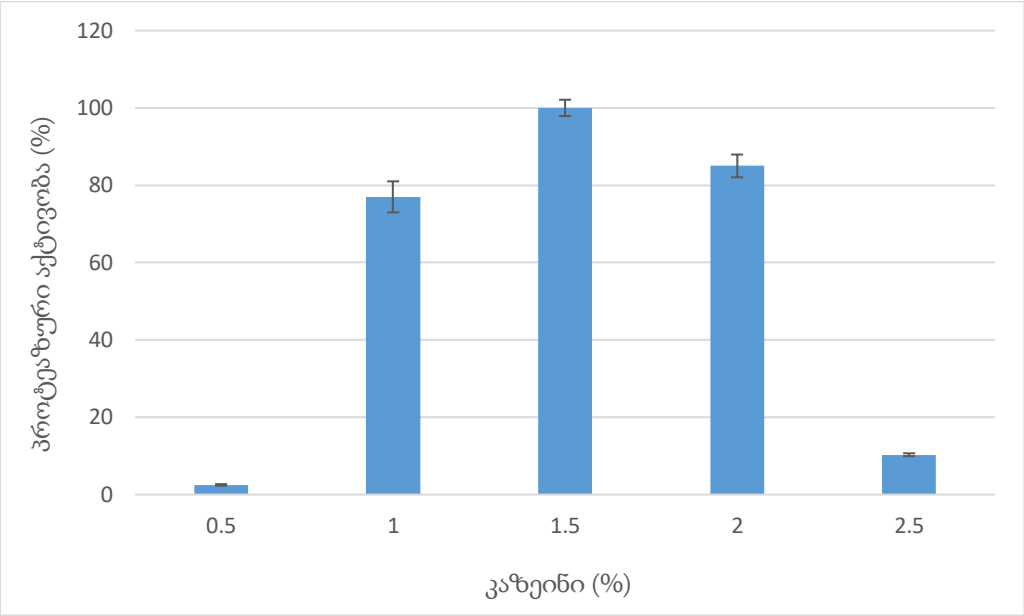
გრაფიკი 5. აზოტის სხვადასხვა წყაროს გავლენა შერჩეული შტამების პროტეაზურ აქტივობაზე



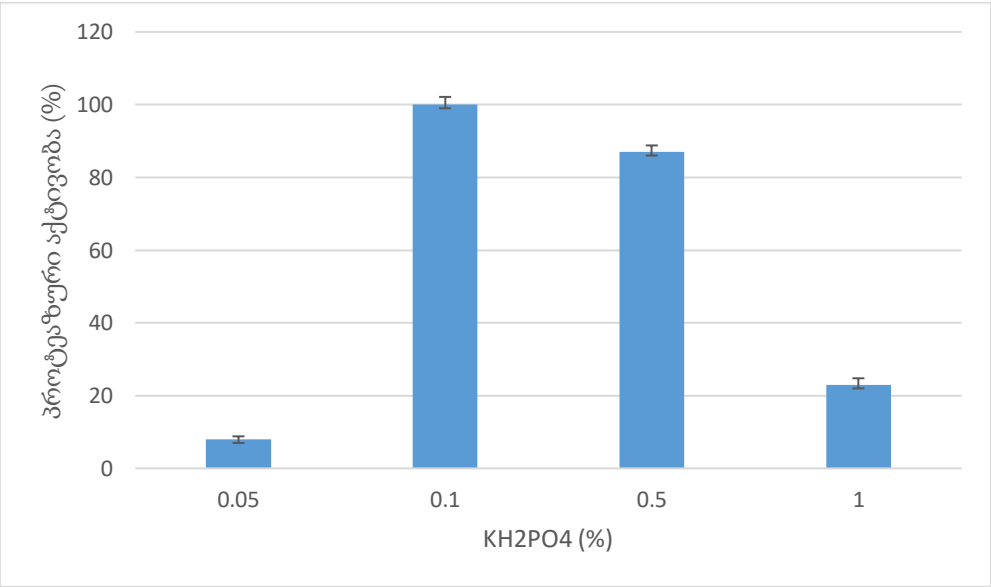
გრაფიკი 6 . ფოსფორის სხვადასხვა წყაროს გავლენა შერჩეული შტამების პროტეაზურ აქტივობაზე



გრაფიკი 7. ლაქტოზის სხვადასხვა კონცენტრაციის გავლენა *P.candidum 5-1-ის* პროტეაზურ აქტივობაზე



გრაფიკი 8. კაზეინის სხვადასხვა კონცენტრაციების გავლენა *P.candidum* 5-1-ის პროტეაზურ აქტივობაზე



გრაფიკი 9. KH_2PO_4-ის სხვადასხვა კონცენტრაციის გავლენა *P.candidum* 5-1-ის პროტეაზურ აქტივობაზე

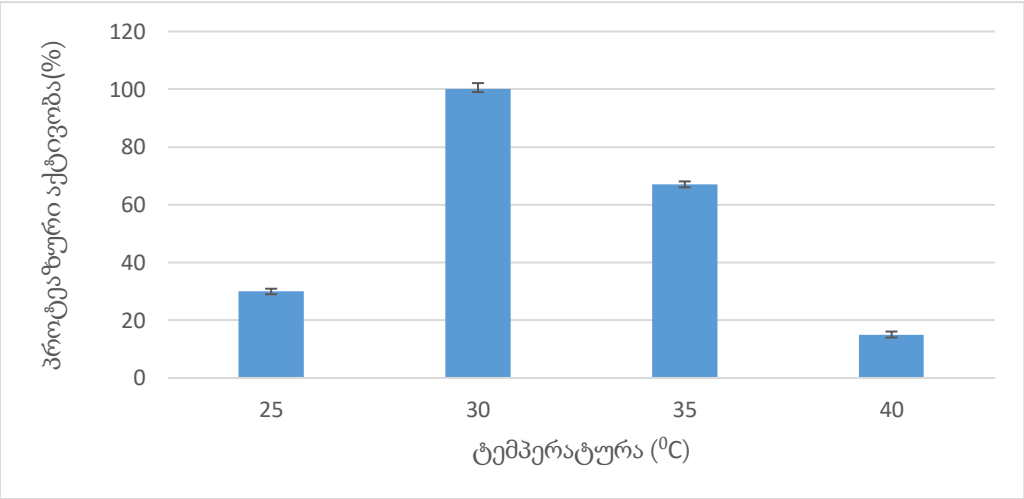
4.5 *Penicillium candidum*- 5-1-ის კულტივირების პირობების ოპტიმიზაცია

ფერმენტის მაქსიმალური სინთეზის მისაღწევად აუცილებელ პირობას შტამის კულტივირების სრული პარამეტრების ოპტიმალური მნიშვნელობების დადგენა წარმოადგენს. აღნიშნული პარამეტრებიდან არსებითი ფაქტორებია საფერმენტაციო არის pH , კულტივირების ხანგრძლივობა და ტემპერატურა. აღსანიშნავია, რომ ტემპერატურის ცვლილება კულტივირების სხვა პარამეტრების ერთდროულ ცვლილებასაც იწვევს. ამ ინფორმაციაზე დაყრდნობით, *Penicillium candidum*- 5-1 -ის კულტივირების პირობების ოპტიმიზაცია ოპტიმალური ტემპერატურის დადგენით დავიწყეთ. ამ მიზნით შტამის სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა 25^0C -დან 40^0C- მდე ტემპერატურულ დიაპაზონში.როგორც მე-10 გრაფიკიდან ჩანს, შერჩეული შტამი ტიპიური მეზოფილია და მაქსიმალურ პროტეაზურ აქტივობას 30^0C-ზე ავლენს, რის გამოც შემდგომი კვლევისთვის მიზანშეწონილად მივიჩნიეთ *Penicillium candidum*- 5-1 -ის კულტივირება წარიმართოს 30^0C-ზე .

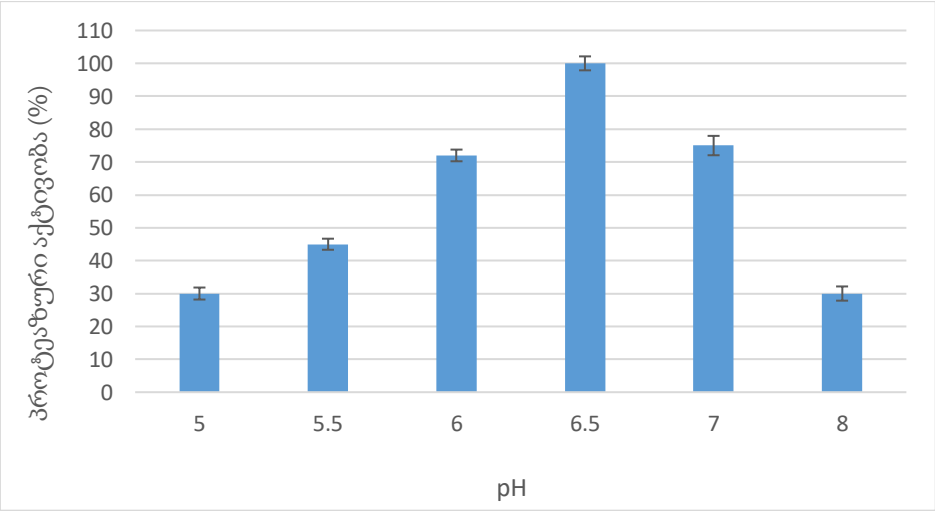
საკვები არის pH არის ის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი პარამეტრი, რომელიც არსებით გავლენას ახდენს მიკროორგანიზმთა ზრდა–განვითარებაზე, მეტაბოლიზმზე, უჯრედში საკვები ნივთიერებების ტრანსპორტსა და ხსნადობაზე, ფერმენტების აქტივობასა და უჯრედის ზედაპირის მახასიათებლებზე, ცხადია, საკულტივაციო არის pH -ის ცვლილება მნიშვნელოვნად აისახება სოკოების ბიოსინთეტიკურ აქტივობასა და პროდუქტიულობაზეც. ამ ინფორმაციაზე დაყრდნობით, ექსპერიმენტის მომდევნო ეტაპზე შევისწავლეთ საკვები არის საწყისი pH–ის გავლენა *Penicillium candidum*- 5-1 -ის პროტეაზურ აქტივობაზე. შტამის სიღრმული კულტივირება მიმდინარეობდა pH 5.0-დან pH 9.0-მდე დიაპაზონში. მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ პროტეაზას მაქსიმალური ბიოსინთეზისთვის მიზანშეწონილია, შტამის კულტივირება განხორციელდეს საკვებ არეზე, რომლის pH 6.5-ია (გრაფიკი 11).

Penicillium candidum- 5-1 -ის კულტივირების პირობების ოპტიმიზაცია დავასრულეთ კულტივირების ოპტიმალური ხანგრძლივობის დადგენით. ამ მიზნით, შტამის კულტივირება მიმდინარეობდა ოპტიმალური შემადგენლობის საკვებ არეზე, უკვე დადგენილ ოპტიმალურ pH -სა და ტემპერატურაზე. როგორც მე-12 გრაფიკიდან ჩანს,

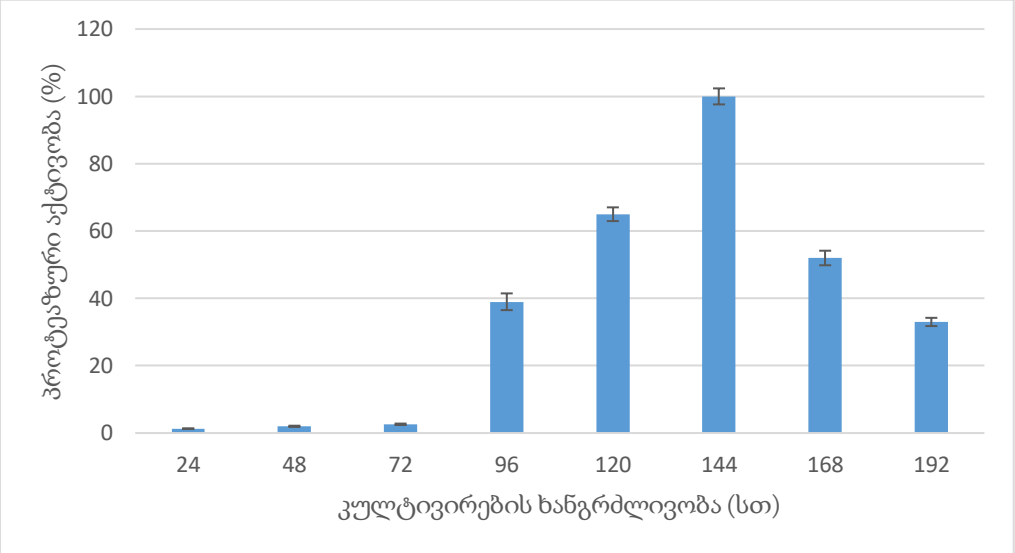
კულტივირების პირველი 24 საათის განმავლობაში საკვლევი შტამი იმყოფება ადაპტაციის (lag)ფაზაში, რის შემდეგაც იწყება ფერმენტის აქტიური სინთეზი, რაც მაქსიმუმს აღწევს ლაქტოზის ფერმენტაციის მე-6 დღეს. ეს პერიოდი, სავარაუდოდ, ზრდის ექსპონენციალურ ფაზას (log- ფაზა) შეესაბამება, რის შემდეგაც კულტურა გადადის სტაციონალურ ფაზაში. ამ პერიოდიდან პროტეაზული აქტივობა მკვეთრად მცირდება .



გრაფიკი 10. ტემპერატურის გავლენა *Penicillium candidum*- 5-1-ის პროტეაზურ აქტივობაზე



გრაფიკი 11. საკვები არის საწყისი pH-ის გავლენა *Penicillium candidum*- 5-1-ის პროტეაზურ აქტივობაზე



გრაფიკი 12. პროტეაზას სინთეზის დინამიკა *Penicillium candidum*- 5-1-ის კულტივირების ხანგრძლივობაზე დამოკიდებულებით

ამრიგად, ეტაპობრივად განხორციელებული ექსპერიმენტების - საკვები არის შემადგენლობისა და კულტივირების პირობების ოპტიმიზაციის საფუძველზე *Penicillium candidum- 5-1*-ის პროტეაზური აქტივობა საწყისთან შედარებით 62.3%-ით არის გაზრდილი.

ვინაიდან შერჩეული შტამის მიერ პროდუცირებული პროტეაზას საშუალებით უნდა ჩატარდეს კვლევები რძის ახალი პროდუქტის მიღების მიმართულებით. აუცილებელი იყო აღნიშნული შტამის შემოწმება ტოქსიკურობაზე. ამ მიზნით გამოვიყენეთ ექსპრეს-ტესტ მეთოდი,რომელიც შტამის ტოქსიკურობის განსაზღვრის ერთ-ერთ ყველაზე ადექვატურ მეთოდად არის მიჩნეული და ეფექტურია ტოქსინის უმცირესი დოზების აღმოსაჩენადაც. როგორც მოველოდით, *Penicillium candidum 5-1* არ აღმოჩნდა ტოქსიკური და ადამიანის ჯანმრთელობისთვის საშიში.

4.6 პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატის მიღება

პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატის მისაღებად გამოვიყენეთ კულტურალური სითხის ამონიუმის სულფატის სხვადასხვა პროცენტული გაჯერებით გამოლექვა (saturation) .

მე-3 ცხრილში მოცემული მაჩვენებლები შეესაბამება ამონიუმის სულფატის ფრაქციებს. პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატის მიღების პროცესში ყველაზე მაღალი პროტეაზური ხვედრითი აქტივობა დაფიქსირდა კულტურალური სითხის ამონიუმის სულფატის 60 %-იანი გაჯერებით გამოლექვის შემთხვევაში (2.01±0.15U/mg) . შესაბამისად ყვლაზე მაღალი გამოსავლიანობით საერთო ფერმენტული აქტივობის მიხედვით (62.2%). განსხვავებული შედეგი მივიღეთ რძის შემადედებელი აქტივობის განსაზღვრის შემთხვევაში, ამ შემთხვევაში ყველაზე მაღალი აქტივობა დაფიქსირდა ფერმეტის 80%-იანი ამონიუმის სულფატით გაჯერების გამოლექვის შემთხვევაში (70 SU/ ml). ხოლო 60%-იანი ამონიუმის სულფატით გამოლექილ ფრაქციაში რძის შემადედებელი აქტივობა თითქმის არ აღმოჩნდა, თუმცა შეინიშნებოდა რძის აჭრის ნიშნები.

ცხრილი 3.

პროტეაზას პრეპარატის მიღების ეტაპები

გაწმენდის ეტაპები	**რძის შემადედებელი აქტივობა (SU/ ml)**	**პროტეაზური აქტივობა (U/ml)**	**ჯამური პროტეაზური აქტივობა (U)**	**ცილა (mg/ml)**	**ხვედრითი აქტივობა (U/mg)**	**გამოსავლიანობა %**	**გაწმენდის ხარისხი**
კულტურალური სითხე		0.27±0.01	135 ±7	2.5±0.12	0.67±0.012	100	1
ამონიუმის სულფატის ფრაქციები							
20%	0	0.085 ±0.0012	4.25 ±0.18	0.7 ±0.012	0.06 ±0.001	3.14	0.09
40%	0	0.072±0.001	3.6 ±0.1	1 ±0.1	0.072±0.001	2.7	0.1
60%	აჭრა	1.68±0.1	84 ±3.4	1.2 ±0.10	2.01±0.15	62.2	3
80%	70	0.97 ±0.08	48.5 ±2.5	1.96±0.14	1.9±0.14	35.5	2.8
სპირტის ფრაქციები თანაფარდობით							
1:4	35	1.5 ±0.1	75±3	1.2 ±0.1	1.8±0.12	55.5	2.68
1:8	50	0.67±0.011	33.5 ±1.5	1.8±0.12	1.2±0.1	24.8	1.8

მნიშვნელობები წარმოდგენილია საშუალოს სახით ± სტანდარტული გადახრა , $p < 0.05$

4.7 რძის შემადედებელი აქტივობის ანალიზი (MCA)

რძის შემადედებელი აქტივობის ანალიზისთვის აღებულ იქნა ახალი პროტეაზური ფერმენტული პრეპარატი აქტივობით 2 U/MG, რომელიც განზავდა 2-ჯერ, 4-ჯერ, 8-ჯერ, 16-ჯერ, ექსპერიმენტის შედეგებმა აჩვენა, რომ 2 U/MG 5 წუთში ჭრიდა რძეს და მისი SU შეადგენდა 80 ±5.6-ს, ხოლო რაც უფრო იზრდებოდა განზავების რიცხვი, მით უფრო იზრდებოდა შედედების დრო და იკლებდა SU . 8-ჯერ განზავების შემდეგ კი შედედება არ ფიქსირდებოდა და შესაბამისად SU გამოთვლა ვერ ხერხდებოდა(ცხრილი 4).

აღნიშნული მეთოდი შერჩეულ იქნა რძეზე მოქმედი ახალი პროტეაზას ეფექტის გამოსავლენად. ვინაიადან ფერმენტის რძეზე მოქმედება დღევანდელ დღემდე აღიწერებოდა როგორც რძის შედედების ეფექტი მეთოდს შესაბამისად დაერქვა რძის შედედების აქტივობის ანალიზი, ჩვენს შემთხვევაში შედედების ეფექტი შეცვლილია აჭრის ეფექტით, თუმცა ანალოგიურად ფასდება როგორც რძეზე მოქმედი პროტეაზური აქტივობა. მეთოდი გამოყენებულ იქნა ჩვენს მიერ გამოყოფილი ფერმენტისთვის აქტივობის ერთეულის მინიჭების მიზმნით.

რძის შედედების აქტივობის ანალიზმა ცხადყო, რომ მიღებულ ფერმენტულ პრეპარატს აქვს უნარი რძეზე განსხვავებული ზემოქმედების, რაც გამოიხატებოდა ფერმენტული პრეპარატის მიერ რძის ხანმოკლე შედედებით, რის შემდეგაც ფიქსირდებოდა რძის აჭრა.

სურათი 7. რძის შემადედებელი აქტივობა

1. კონტროლი - რძე(ფერმენტის გარეშე); 2. პროტეაზას პრეპარატი (2 U/MG); 3. პროტეაზას პრეპარატი (1 U/MG); 4. პროტეაზას პრეპარატი (0.5 U/MG); 5. პროტეაზას პრეპარატი (0.25 U/MG);

ცხრილი 4

რძის შემადედებელი აქტივობის ანალიზი (MCA)

პროტეაზა, ერთ/მგ (U/MG)	**განზავების რიცხვი**	**შედედების დრო(წმ)**	**შედედების აქტივობის ერთეული SU**
2	1	300 ±20	80 ±5.6
1	2	1200±54	40±2.8
0.5	4	4800 ±80	20±1.8
0.25	8	-	-
0.125	**16**	**-**	**-**

მნიშვნელობები წარმოდგენილია საშუალოს სახით ± სტანდარტული გადახრა , $p < 0.05$

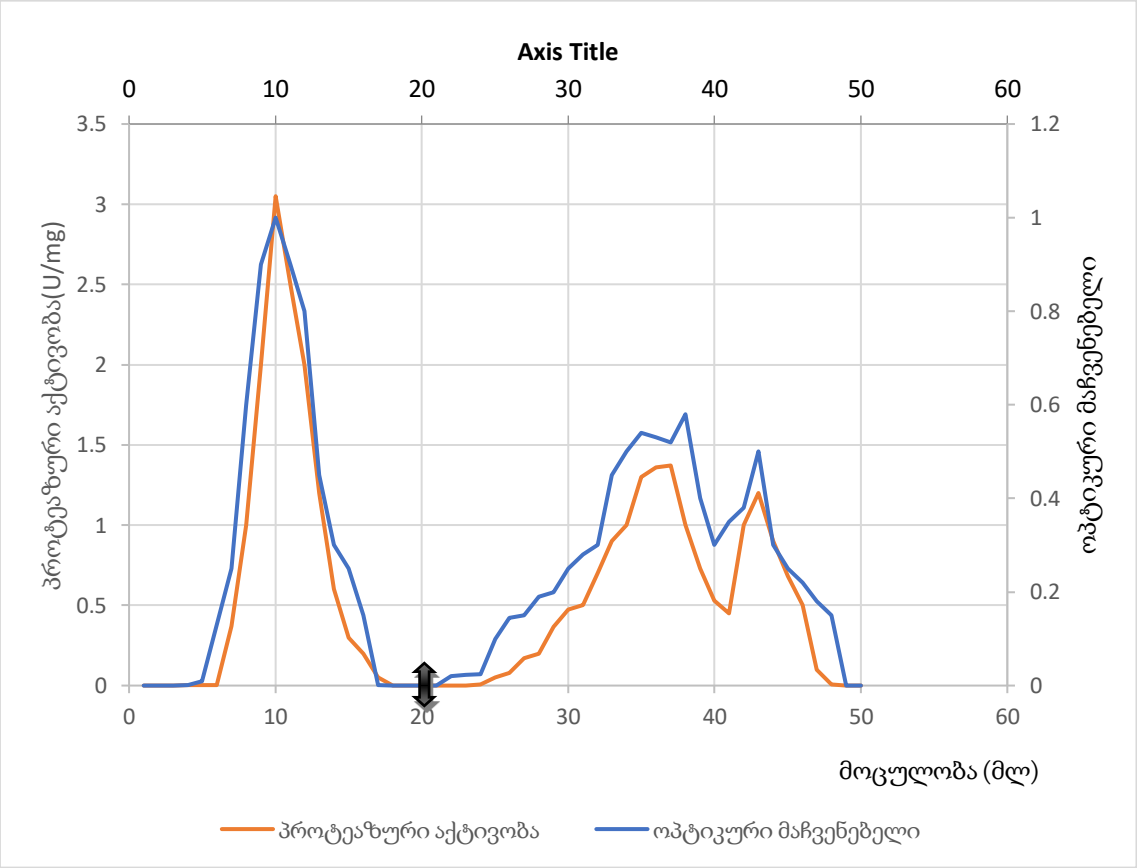
4.8 ფერმენტის გაწმენდა და ფიზიკურ -ქიმიური თვისებების შესწავლა

4.8.1 იონცვლადი ქრომატოგრაფია

ტექნიკური პრეპარატიდან ფერმენტის გაწმენდა განხორციელდა იონცვლადი ქრომატოგრაფიის გამოყენებით DEAE-ცელულოზის სვეტზე. მოცემულ პირობებში DEAE-ცელულოზამ დაიკავა პრეპარატის გარკვეული ნაწილი, ხოლო მიუბმელი ნაწილის ელუცია განხორციელდა ფოსფატური ბუფერით. DEAE-ცელულოზის სვეტზე მიბმული ნაწილის ჩამორეცხვა მოხდა 1M NaCl-ის გრადიენტით. შედეგად 0.5 M NaCl-ით მიღებულ იქნა ცილის ფრაქცია, 0.8 M NaCl-ით კი მიღებულ იქნა მეორე

ცილოვანი პიკი. ცილის კონცენტრაცია და პროტეოლიზური აქტივობა კი განსაზღვრული იყო ყველა ჩამორეცხილ ფრაქციაში (გრაფიკი 13).

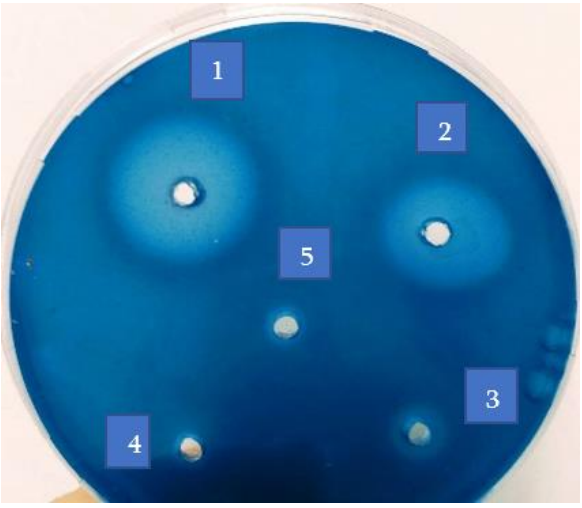
გაწმენდის შედეგებმა აჩვენა, რომ ფრაქცია რომელიც ელუირდა ფოსფატური ბუფერის მიერ ავლენდა ყველაზე მაღალ სპეციფიკურ პროტეოლიზურ აქტივობას, დანარჩენ ფრაქციებში პროტეოლიზური აქტივობა შეინიშნებოდა შედარებით ნაკლები. თითოეული ცილოვანი ფრაქციისთვის განისაზღვრა რძის შემადედებელ აქტივობა, შედეგად პირველმა ფრაქციაში დააფიქსირა რძის აჭრის ფაქტი.



გრაფიკი 13. ტექნიკური პრეპარატის გაწმენდა იონცვლადი ქრომატოგრაფიით ქრომატოგრაფია DEAE-ცელულოზის სვეტზე (20სმx1.5სმ)ფოსფატური ბუფერი pH 8.0 (0.5 M); ელუცია ხორციელდებოდა უწყვეტი გრადიენტით: 1 M ნატრიუმის ქლორიდი, ნაკადის სიჩქარე იყო 0,1 მლ/წთ. შეგროვდა ხუთ მილილიტრიანი ფრაქციები. დეტექცია მიმდინარეობდა 280 ნმ-ზე.

4.8.2 გელ-დიფუზიური მეთოდით პროტეაზური აქტივობის განსაზღვრა

ქრომატოგრაფიის შემდეგ შეგროვებულ ცილოვან ფრაქციებში აქტივობა განისაზვრა გელ- დიფუზიური მეთოდით, როგორც სურათიდან ჩანს პიკებიდან ყველაზე მაღალი პროტეაზური აქტივობა დაფიქსირდა პირველ ფრაქციაში, DEAE-ცელულოზიდან ბუფერით ჩამორეცხილ ფრაქციაში. რაც დადასტურდა სიგმას მეთოდით გაზომვისას(3.05U/mg) , NaCl -ის ჩამორეცხილ ფრაქციებში შეინიშნებოდა გაცილებით ნაკლები ხვედრითი აქტივობა (1.37 U/mg).



სურათი 8. გელ-დიფუზიური მეთოდით მიღებული ფრაქციების პროტეაზური აქტივობის განსაზღვრა

1.საწყისი ფერმენტი -დიამეტრი 12მმ

2.სვეტიდან ფოსფატური ბუფერით ელუირებული პირველი ცილოვანი ფრაქცია - დიამეტრი 7მმ

3. გრადიენტით ჩამორეცხილი მეორე ცილოვანი ფრაქცია -დიამეტრი(2მმ)

4. გრადიენტით მოხსნილი მესამე ცილოვანი ფრაქცია- დიამეტრი(1მმ)

5. კონტროლი (PBS) დიამეტრი -1მმ

ცხრილი 5

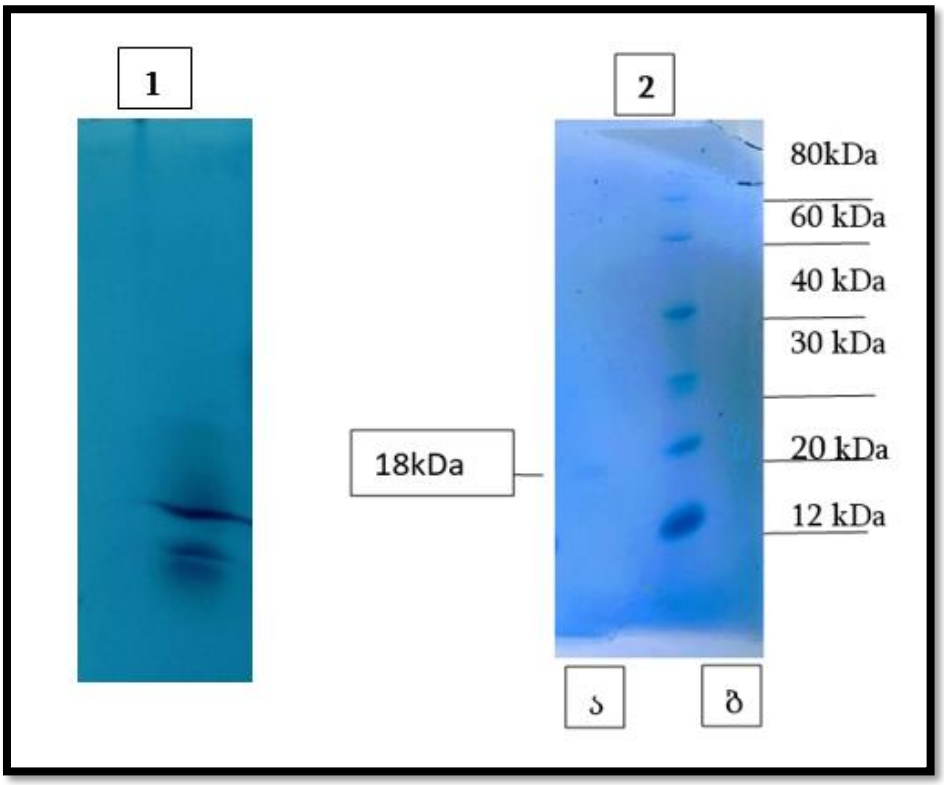
იონცვლადი ქრომატოგრაფიის შემდეგ მიღებული ფრაქციების შეფასება

პროტეაზა	ცილის კონცენტრაცია (mg/ml)	პროტეაზური აქტივობა (U/mg)	გაწმენდის ხარისხი
ამონიუმის სულფატის ფრაქცია(ტექნიკური პრეპარატი)	1.2±0.1	2.01±0.15	1
პირველი ფრაქცია	0.95±0.09	3.05±0.45	1.5
მეორე ფრაქცია	0.48±0.04	1.37±0.1	0.6
მესამე ფრაქცია	0.28±0.018	1.2±0.08	0.59

მნიშვნელობები წარმოდგენილია საშუალოს სახით ± სტანდარტული გადახრა , $p < 0.05$

4.8.3 ელექტროფორეზი

მიღებული პროტეაზური ფრაქციის სისუფთვე შემოწმდა *SDS-PAGE* ელექტროფორეზის საშუალებით. ცილის სხვადასხვა მოლეკულური მასის მარკერების გამოყენებით განისაზღვრა მოლეკულური მასა გაწმენდილი ფერმენტის მოლეკულური მასა შეადგენდა -18 kDa.

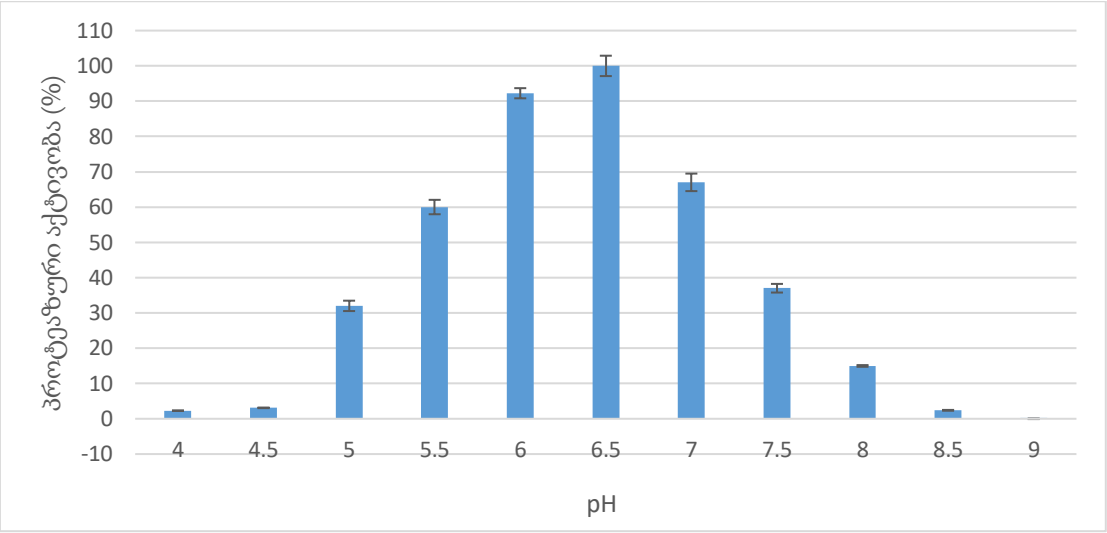


სურათი 9. *Penicillium candidum*- 5-1 დან გამოყოფილი პროტეაზას პოლიაკრილამიდის გელის (SDS-PAGE) ელექტროფორეზი. 1. ფერმენტული პრეპარატი, 2. ა. გაწმენდილი ფერმენტი, ბ. ცილის მარკერები 12, 20, 30, 40, 60, 80 kDa.

4.9 გაწმენდილი ფერმენტის მოქმედების ოპტიმალური პირობების განსაზღვრა

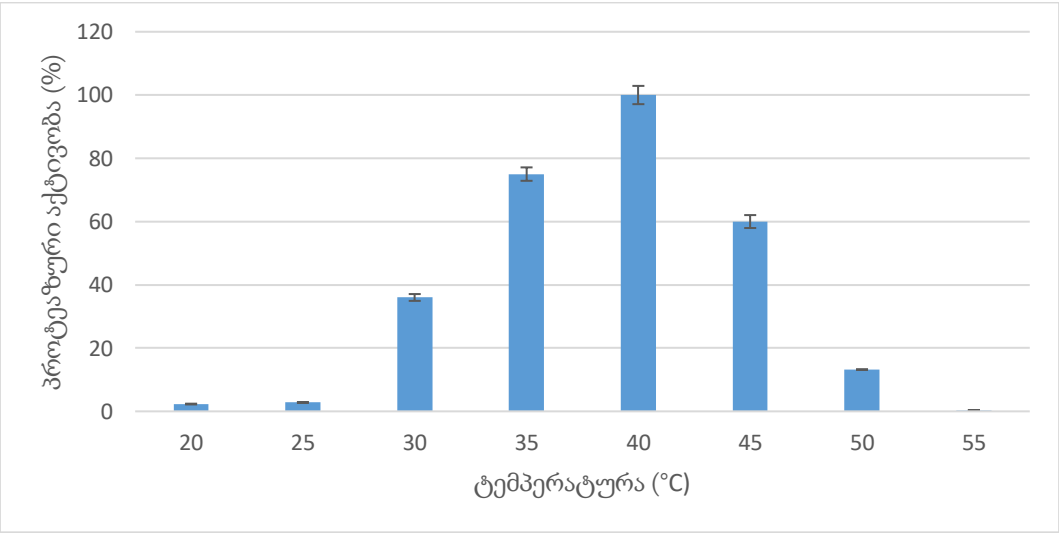
გაწმენდილი ფერმენტის მოქმედების ოპტიმალური პირობების განსაზღვრისას ტემპერატურა და pH არის ორი ძირითადი ფაქტორი ფერმენტის კატალიზური უნარის გამოსავლენად. გარკვეულ ტემპერატურაზე და pH-ზე, ფერმენტის კატალიზური აქტივობა შესაძლოა იყოს ძალიან მაღალი ან დაბალი.

penicillium candidum 5-1-ის მიერ წარმოებული ფერმენტი აქტიური იყო pH-ის არც თუ ისე ფართო დიაპაზონში, ანალიზი ჩატარდა pH 4-pH 9 დიაპაზონში, გაწმენდილი პროტეაზა ავლენდა მაქსიმალურ აქტივობას pH 6.5-ზე. რომლის შემდეგაც დაფიქსირდა პროტეაზას აქტივობის დაქვეითება.



გრაფიკი 14. pH-ის გავლენა გაწმენდილი ფერმენტის პროტეოლიზურ აქტივობაზე.

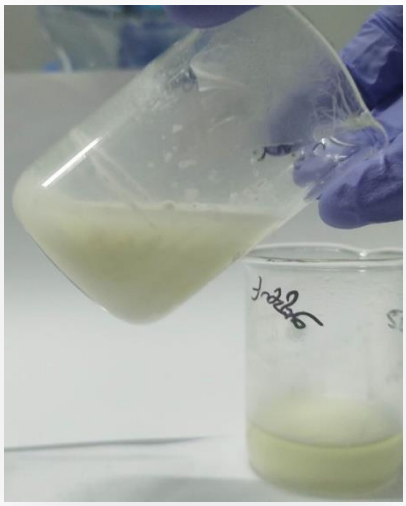
პროტეოლიზური აქტივობის ოპტიმალური ტემპერატურის დიაპაზონი განისაზღვრა 35-40°C. აქტივობის ზრდა შეინიშნება 30°C-დან, ფერმენტი ავლენდა ყველაზე მაღალ პროტეოლიზურ აქტივობას 40°C-ზე. აქტივობის მნიშვნელოვანი დაქვეითება შეინიშნება 40°C-ს ზემოთ .



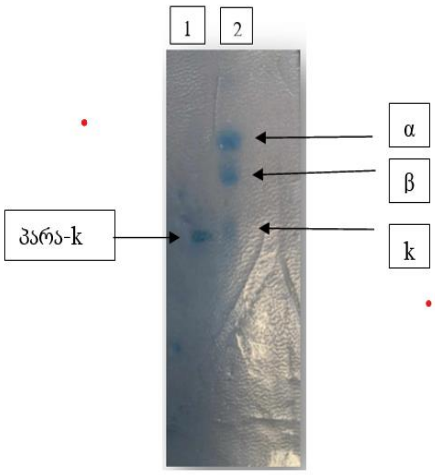
გრაფიკი 15. ტემპერატურის გავლენა გაწმენდილი ფერმენტის პროტეოლიზურ აქტივობაზე.

4.10 მიღებული გაწმენდილი ფერმენტით რძის აჭრა და ტექნოლოგიური სქემის შემუშავება

რძეზე გაწმენდილი ფერმენტის ზემოქმედების შედეგად მიღებულ იქნა აჭრილი მასა, შედედების გარეშე, აჭრა დაფიქსირდა 20 წუთის განმავლობაში (სურათი 11). კაზეინი და გაწმენდილი ფერმენტის კაზეინზე ზემოქმედების შემდეგ (24 საათიანი ინკუბაცია) სუბსტრატის ჰიდროლიზის ფრაქციებს ჩაუტარდა ელექტროფორეზი (სურათი 11), საიდანაც ნათლად ჩანს საწყისი კაზეინის ფრაქციები (α - (23-25 kDa), β- (24 kDa) და κ- (19 kDa)), რომელთაგან ყველაზე დაბალმოლეკულურ სუბერთეულს წარმოადგენს κ-კაზეინი. ჩვენი ფერმენტის კაზეინზე ზემოქმედების შედეგად ზედა ორი ფრაქცია(α, β) განიცდის ჰიდროლიზს, რომელთაც სავარაუდოდ შორდებათ ჰიდროფილური ნაწილი და რჩება დაბალმოლეკულური ჰიდროფობული ნაწილები. ხოლო κ-კაზეინიდან ფერმენტის ზემოქმედებით წარმოიქმნება პარა-κ-კაზეინი, რაც დასტურდება ელექტროფორეზით (პარა-κ-კაზეინი არის შედარებით დაბალმოლეკულური ვიდრე კაზეინის κ ფრაქცია).



სურათი 10. რძის აჭრა გაწმენდილი ფერმენტის საშუალებით



სურათი 11. პოლიაკრილამიდის გელის (SDS-PAGE) ელექტროფორეზი . 1. კაზეინის ჰიდროლიზის პროდუქტები *Penicillium candidum*- 5-1 დან გამოყოფილი გაწმენდილი პროტეაზას ფერმენტის ზემოქმედებით. 2. კაზეინის ფრაქციები (α - (23-25 kDa), β- (24 kDa) და κ- (19 kDa).

4.11 მიღებული სპეციფიკური პროტეაზას საშუალებით პროდუქტის დამზადების და ტრადიციული გზით ხაჭოს მიღების ზოგადი ტექნოლოგიური სქემა

წარმოდგენილ სამუშაოში აქცენტი გაკეთებულია ახალი თვისებების მქონე პროტეაზის არსებობის დასაბუთებაზე. აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ აღნიშნული ფერმენტის პროდუცენტს წარმოადგენს მიკროსკოპული სოკო, ვინაიდან ეს არის არსებული ფერმენტის შესწავლის პირველი ნაბიჯი (შემდგომი ეტაპები მოიცავს ან არსებული შტამის მუტაგენეზს, კულტივირების პირობების შესწავლას, უფრო მაღალაქტიური პროდუცენტის ძიებას ან კლონირების გზით სამრეწველო შტამის მიღებას) ამ ეტაპზე არ ჩავთვალეთ მიზანშეწონილად ტექნოლოგიური სქემის დეტალური ვერსიის წარმოდგენა. გამომდინარე იქიდან, თუ რა შემადგენლობა, ფიზიკურ-ქიმიური თვისებები და სხვა მაჩვენებლები ექნება სამრეწველო შტამის მიერ სინთეზირებულ ფერმენტებს შესაბამისად, ტექნოლოგიური სქემაც დამოკიდებული იქნება აღნიშნულ მაჩვენებლებზე. ამ ეტაპზე ჩვენს მიერ შემოთავაზებულია ზოგადი ტექნოლოგიური მიდგომა, რომელიც ასახავს აუცილებელ სამრეწველო ტექნოლოგიურ ეტაპებს და არ გამოხატავს საბოლოო სამრეწველო ტექნოლოგიას .

ვინაიდან, პირველი შეფასებით მიღებული პროდუქტი შესაძლოა შედარებულ იქნას ხაჭოსებურ მასასთან შესაბამისად, გთავაზობთ ორი ტიპის პროდუქტის მიღების ზოგად ტექნოლოგიურ სქემის შედარებას- ხაჭოს და ხაჭოსებური მასის.

როგორც სქემა 1-დან ჩანს ხაჭოს მიღების ტექნოლოგიური და ჩვენი ფერმენტით მიღებული პროდუქტის ტექნოლოგიური სქემები მსგავსია, თუმცა მათ შორის არის წარმოებისთვის მნიშვნელოვანი განსხვავებებიც, კერძოდ, ხაჭოს მიღების დროს რძეში ხდება რძემჟავა ბაქტერიული კულტურების შეტანა, რის შემდეგაც რძე ყოვნდება 6-7 საათი, მაშინ როდესაც ჩვენ მიერ შემოთავაზებულ ტექნოლოგიაში რძეს ემატება ახალი პროტეოლიზური ფერმენტი, შედეგად აჭრილი მასა მიიღება 20-30 წუთში. აღნიშნული ფაქტი დროის თვალსაზრისით წარმოებას უფრო რენტაბელურს ხდის. გარდა ამისა ხაჭოს მიღების ტექნოლოგიაში ემატება კალციუმის ქლორიდი და ნადედის მასის შრატისგან უკეთ გამოსაყოფად მაჭიკის ფერმენტები, რაც დამატებით ხარჯებთან არის დაკავშირებული.

გამომდინარე ზემოთ თქმულისა, ახალი პროტეოლიზური ფერმენტით მიღებული პროდუქტი მისი გემოვნური თვისებებით და ტექსტურით ძალიან ახლოს არის ხაჭოს პროდუქტთან, თუმცა ამ პროდუქტის მიღების ტექნოლოგია წარმოების თვალსაზრისით შედარებით გამარტივებული და წარმოებისთვის მომგებიანია, რაც შეიძლება ჩაითვალოს ახალი პროდუქტის უპირატესობად.

ახალი ფერმენტით მიღებულ პროდუქტში განისაზღვრა ცილები, ცხიმები და ნახშირწყლები (ცხრილი 6), უცხიმო (მშრალი) რძიდან მიღებულ ხაჭოსებრ პროდუქტში ცილების რაოდენობა აღმოჩნდა 10±2.0 %, ცხიმების- 0±0.0%, ნახშირწყლები 4.5±0.2 %.

ხაჭოსებრი მასის ფაქტობრივი გამოსავლიანობა 100 მლ რძიდან შეადგენდა 10%-ს.

ცხრილი 6.

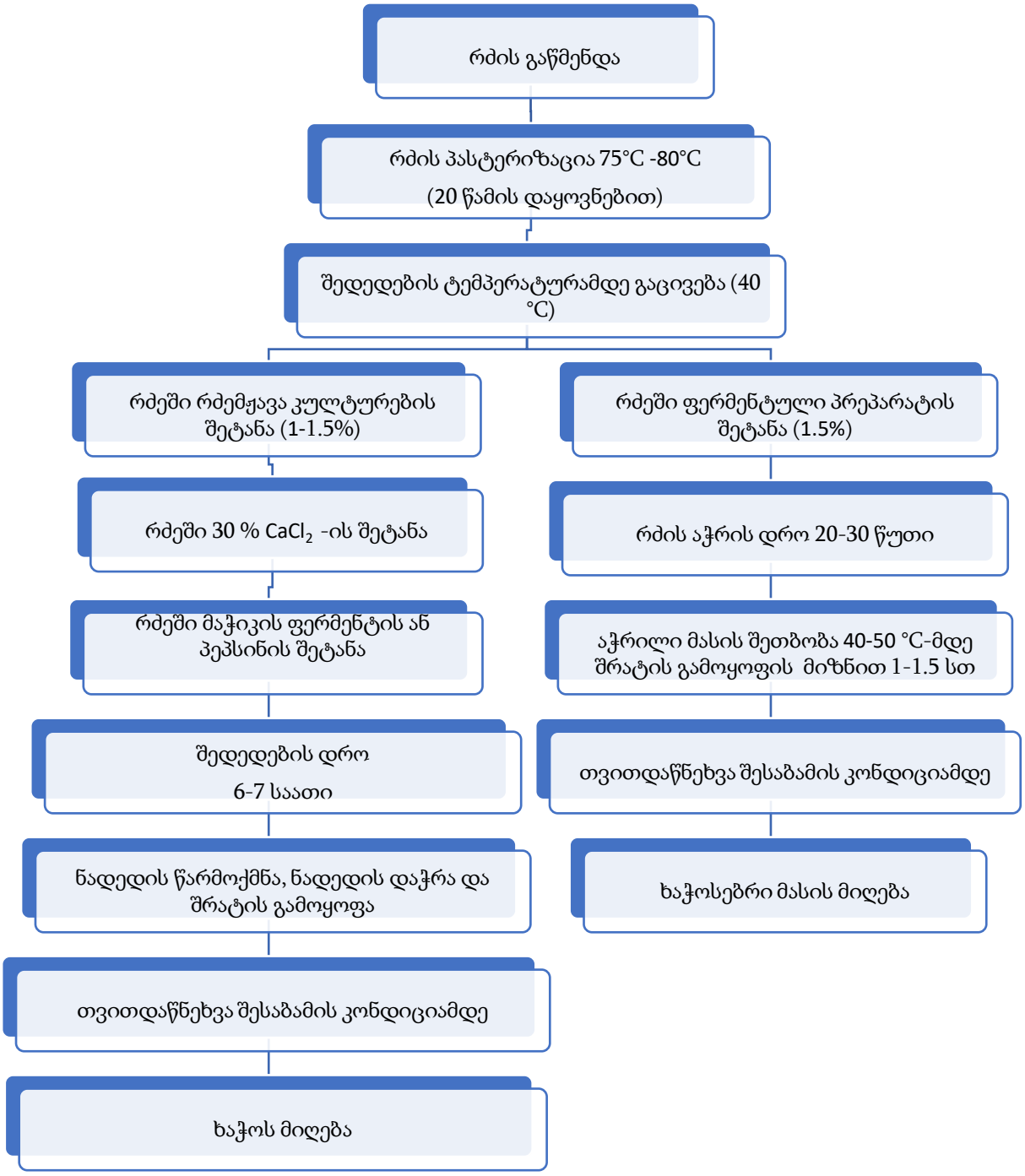
მიღებულ პროდუქტში ცილების, ცხიმების და საერთო შაქრების განსაზღვრა

	ცილა (%)	ცხიმი (%)	საერთოშაქრები (%)
უცხიმო რძის აჭრის შედეგად მიღებული პროდუქტი (100 გრამი)	10.0 ±2	0±0.0	4.5 ±0.2

მნიშვნელობები წარმოდგენილია საშუალოს სახით ± სტანდარტული გადახრა , p <0.05

სქემა 1.

ახალი სპეციფიკური პროტეაზას საშუალებით პროდუქტის მიღებისა და ტრადიციული გზით ხაჭოს მიღების ზოგადი ტექნოლოგიური სქემა



4.12 მომხმარებლის მიერ ახალი პროტეაზური ფერმენტით მიღებული პროდუქტის სენსორული ანალიზი და მიმღებლობის დადგენა

მიღებული პროდუქტი შეფასებულ იქნა ლაბორატორიის თანამშრომლების მიერ მოწონების მიხედვით (ფერი, გემო, არომატი, სუნი, ტექსტურა). მოწონების დონის აღსანიშნავად გამოყენებული იყო ხუთბალიანი ჰედონური შკალა, რომელიც მერყეობდა ძალიან კარგიდან ძალიან ცუდამდე (ცხრილი 7).

მიღებული პროდუქტი ასევე დახასიათდა ფერის, გემოს, არომატის, სუნისა და ტექსტურის მიხედვით, საბოლოო ჯამში პროდუქტის ფერი შეფასდა როგორც თეთრი(მოთეთრო), გემო ცხიმთან ასოცირებული, სუნი ყველის მსგავსი, ტექსტურა ხაჭოს მსგავსი, არომატი ხაჭოსა და ყველს შორის გარდამავალი (გრაფიკი 16).

გრაფიკი 16. მომხარებლის მიერ ახალი პროტეაზური ფერმენტით რძის აჭრის შედეგად მიღებული პროდუქტის შეფასება სხვადასხვა კრიტერიუმის მიხედვით

ცხრილი 7

მომხარებლების მიერ ახალი პროტეაზური ფერმენტით რძის აჭრის შედეგად მიღებული პროდუქტის შეფასების მაჩვენებელი. შეფასება 5-ბალიანი ჰედონური შკალით, 1-ძალიან ცუდი - 5-ძალიან კარგი.

ჰედონის შკალა	ძალიან კარგი	კარგი	არც კარგი, არც ცუდი	ცუდი	ძალიან ცუდი
ფერი	5	5	0	0	0
ტექსტურა	5	4	1	0	0
არომატი	4	4	2	0	0
გემო	7	3	0	0	0
სუნი	4	4	2	0	0

5. შედეგების განხილვა

მსოფლიოს მასშტაბით რძის ფერმენტების ბაზრის ზრდის ერთ-ერთი მთავარი მამოძრავებელი ფაქტორი ფუნქციურ საკვებსა და სასმელებზე მზარდი მოთხოვნაა. ცნობილია, რომ რძის ინდუსტრიაში ფერმენტების გამოყენება ხელს უწყობს საბოლოო პროდუქტის კვების ღირებულების გაუმჯობესებას და ყოველგვარი ქიმიური დანამატების გარეშე აძლიერებს მის გემოსა და ტექსტურას. აღნიშნულიდან გამომდინარე, ნებისმიერი ახალი სამეცნირო კვლევა, რომელიც მიმართულია პროტეაზების ახალი პროდუცენტების გამოვლენისკენ, მათი კულტივირების პირობების ოპტიმიზაციის საფუძველზე ფერმენტების სპეციფიკური ეფექტის გაძლერებისკენ, ერთ-ერთ მიზნად ისახავს გაუმჯობესებული გემოვნებითი თვისებების პროდუქტის მიღებას, აღნიშნული შესაძლოა ძალზედ მნიშვნელოვანი აღმოჩნდეს რძის პროდუქტების ასორტიმენტის გაფართოებისა და ფუნქციური საკვების ინდუსტრიის შემდგომი განვითარებისთვის.

განხორციელებული კვლევის მიზანს შეადგენდა კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის პროტეაზას აქტიური პროდუცენტის შერჩევა; შერჩეული შტამისთვის კულტივირების პირობებისა და საკვები არის შემადგენლობის ოპტიმიზაცია; სპეციფიკური ეფექტის პროტეაზას ფერმენტული პრეპარატის მიღება და მისი გამოყენებით რძის ახალი, გაუმჯობესებული თვისებების პროდუქტის დამზადება .

რძის პროდუქტები ადვილად ასათვისებელი ცილის მდიდარი წყაროა და მათი „გაფუჭება“ პროტეაზური აქტივობის მიკროორგანიზმებთანაა დაკავშირებული. ამ ინფორმაციის გათვალისწინებით, ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე, პროტეაზური აქტივობის მიკროსკოპული სოკოების გამოყოფა სწორედ კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან განვახორციელეთ. მიკრობიოლოგიური კვლევის შედეგად გამოყოფილია მიკროსკოპული სოკოს 17 კულტურა. დასაწყისშივე გამოიკვეთა, რომ ვადაგასული რძის პროდუქტების მიკოფლორა დიდი მრავალფეროვნებით არ გამოირჩევა. როგორც მოველოდით, პირველი რიგის დომინანტს ყველის დამზადების

პროცესის მთავარი აგენტები- *Penicillium* -ის გვარის კულტურები წარმოადგენდნენ. კულტურალურ- მორფოლოგიური კვლევის საფუძველზე განხორციელებული იდენტიფიკაციის შედეგად გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები ასევე მიეკუვნა *Scopularipsis, Penicillium, Mucor*, *Fusarium* -ისა და *Geotrichum* -ის გვარებს.

ზოგადად, მიკობიოტა მნიშვნელოვან როლს ასრულებს რძის პროდუქტების გემოს, არომატის, ტექსტურის და ვიზუალიური მხარის ფორმირებაში. ეს რთული მიკრობული ცენოზი მოიცავს მიკროორგანიზმთა განსხვავებული ტაქსონების წარმომადგენელებს- ბაქტერიებს, საფუვრებსა და ობის სოკოებს. რძის პროდუქტების მიკრობიოტის კვლევას არაერთი სამეცნიერო პუბლიკაცია მიეძღვნა. მაგალითად, მკვლევართა ერთი ჯგუფის მიერ *(Cenci-Goga et al., 2021)* რძის პროდუქტების სამი სხვადასხვა ქარხნიდან აღებული 69 ნიმუშიდან განხორციელდა მიკროფლორის გამოყოფა. ტესტირებული 69 ნიმუშიდან 51-ში გამოვლინდა საფუარი, რომლებიც მიეკუთვნა 8 განსხვავებული გვარის 9 სახეობას; ობის სოკოები გამოვლინდა 25 ნიმუშში. გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები იდენტიფიკაციის შედეგად მიეკუთვნა 6 სხვადასხვა გვარის 13 სახეობას. გამოყოფილ საფუვრებს შორის ყველაზე გავრცელებული გვარები იყო - *Debaryomyces* და *Kluyveromyces* , ხოლო ობის სოკოებს შორის - *Penicillium* და *Galactomyces* .

შეერთებული შტატების აღმოსავლეთში მდებარე ყველის სპეციალური გამოქვაბულიდან ბანკსმა და სხვებმა (Banks, et al., 2023) გამოყვეს და დაახასიათეს მიკროსკოპული სოკოები. იზოლატების უმეტესობა ამ შემთხვევაშიც Penicillium (26) -ის გვარს მიეკუთვნა, მხოლოდ ერთი კულტურა იყო Scopulariopsis-ის გვარიდან. ეს უკანასკნელი რძის გაფუჭებული პროდუქტებიდან ჩვენს მიერ გამოყოფილ მიკოფლორაშიც დაფიქსირდა.

მსგავსი შედეგები მიიღეს ესპანელმა მკვლევრებმაც (Ramos-Pereira, et., al., 2023), კერძოდ, ესპანეთის ჩრდილო-დასავლეთში მდებარე შვიდი სხვადასხვა ქარხნიდან აღებულ ყველის თხუთმეტი ნიმუშიდან გამოყვეს 32 იზოლატი, რომლებიც იდენტიფიკაციის საფუძველზე მიეკუთვნა Penicillium -ის გვარს, საგულისხმოა, რომ აღნიშნლი გვარის წარმომადგენლები დამახასიათებელი იყო როგორც „გაფუჭებული“ სიმპტომების , ასევე- „სუფთა“ ყველის მიკობიოტისთვის .

ამრიგად, მკვლევართა უმეტესობა მიუთითებს, რომ რძის პროდუქტებიდან გამოყოფილ მიკროსკოპულ სოკოებს შორის დომინირებს *Penicillium*-ის გვარის წარმომადგენლები, რაც დადასტურდა ჩვენს მიერ მიღებული ექსპერიმენტული შედეგებითაც.

იდენტიფიკაციის დასრულების შემდეგ, კვლევის მომდევნო ეტაპზე მიზნად დავისახეთ პროტეაზას პროდუცენტების გამოვლენა რძის ვადაგასული პროდუქტებიდან გამოყოფილ მიკოფლორაში. პროტეაზების პროდუცენტების სკრინინგი თავდაპირველად განვახორციელეთ პროტეაზას აღმოჩენის თვისობრივი ტესტით, რომელიც ემყარება ფერმენტული ინდექსის (EI) გამოთვლას უცხიმო რძის აგარზე წარმოქმნილი ლიზისის ზონის მიხედვით. პროტეაზული აქტივობის მაქსიმალური ინდექსით (EI= 2.54) გამოირჩეოდა *Penicillium candidum* 5-1 უცხიმო რძის აგარზე 96 სთ-იანი ინკუბაციის პირობებში. შედარებით დაბალი ფერმენტული ინდექსით ხასიათდებოდნენ შტამები: *Mucor* spp. 2-3 და *Penicillium camemberti* 7-5 . კვლევის შემდგომი მიზნებისთვის ეს სამი შტამი იქნა შერჩეული - *Penicillium candidum* 5-1, *Penicillium camemberti* 7-5 და *Mucor* spp. 2-3 .

აღსანიშნავია, რომ მსგავსი მეთოდით პროტეაზური აქტივობა განსაზღვრეს სხვა მკვლევრებმაც (Abdalla et al., 2018), რომლებმაც მიკროორგანიზმები გამოყვეს სამი განსხვავებული ლოკაციის ნიადაგებიდან. იზოლატებს შორის მაღალი პროტეაზური აქტივობით ხასიათდებოდა *Aspergillus* sp. 14L3S, ფერმენტული ინდექსით 2.09. (ეს მაჩვენებელი ერთგვარად ჩამორჩებოდა ჩვენს მიერ გამოვლენილი ერთ-ერთი შტამის -*Penicillium candidum* 5-1 -ის პროტეაზული აქტივობის ინდექსს (2.54)) .შედარებით დაბალი ფერმენტული ინდექსი დაფიქსირდა შტამებში- *Rhizopus* sp. 6L1D, *Fusarium* sp. 5L2S, *Mucor* sp. 9L2D. ჩვენ შემთხვევაშიც შერჩეულ ორ შტამს (*Penicillium camemberti*- spp. 7-5 და *Mucor* spp. 2-3) აღენიშნებოდა შედარებით ნაკლები ფერმენტული ინდექსი.

ცნობილია, რომ მიკროორგანიზმთა ფერმენტული აქტივობა მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული საკვები არის შემადგენლობასა და კულტივირების პირობებზე. სამეცნიერო წრეებში კომპლექსურად იკვლევენ ტემპერატურის, pH-ის, ნახშირბადისა და აზოტის წყაროების გავლენას მიკროორგანიზმთა მეტაბოლურ აქტივობაზე. მაგ, მკვლევართა ჯგუფის მიერ შესწავლილია სხვადასხვა ფაქტორების გავლენა *Geobacillus*

kaustophilus-ის 4 განსხვავებული შტამის უჯრედგარე პროტაზას ბიოსინთეზზე (.Dissanayaka, D. M. S., & Rathnayake, I. V. N. (2019)).მათ მიერ გამოყოფილი ბაქტერიების იზოლატები კარგად იზრდებოდნენ მანიტოლის, ფრუქტოზის, საქაროზასა და მანიტის შემცველ არეებზე, თუმცა პროტეაზას ბიოსინთეზის თვალსაზრისით განსხვავებულ წყაროებს ანიჭებდნენ უპირატესობას. ნახშირბადის საუკეთესო წყაროს საქაროზა და ფრუქტოზა წარმოადგენდა.

ამ მკვლევრების მსგავსად, ჩვენს ექსპერიმენტში ნახშირბადის წყაროდ გამოვიყენეთ მონოსაქარიდები-ფრუქტოზა და გლუკოზა, მათგან განსხვავებით კი შევისწავლეთ ლაქტოზას გავლენა საკვლევი შტამების პროტეაზურ აქტივობაზე. კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან გამოყოფილი მიკროსკოპული სოკოები ყველა შესწავლილ წყაროზე მეტ-ნაკლები ხარისხით ამჟღავნებდნენ პროტეაზულ აქტივობას. ფერმენტის მაქსიმალური რაოდენობა დაფიქსირდა გლუკოზის და ლაქტოზის შემცველ არეებზე *Penicillium candidum*- 5-1 კულტივირებისას. მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით, შემდგომი კვლევისთვის ბუნებრივ სუბსტრატთან მიახლოებული ნახშირბადის წყარო- ლაქტოზა შევარჩიეთ.
დადგენილია,რომ გენეტიკური აპარატის მოდიფიკაციის გარეშე მიკროორგანიზმთა ბიოსინთეტიკური აქტივობის ცვლილების ერთ-ერთ გზას ფერმენტების სინთეზის ფიზიოლოგიური რეგულაცია წარმოადგენს, კერძოდ, ინდუქტორის სწორი შერჩევით ინდუციბელური ფერმენტების ბიოსინთეზის ინდუქციაა შესაძლებელი. მხედველობაში მივიღეთ ის ფაქტი, რომ აზოტის წყარო პროტეაზური ფერმენტების ინდუქტორს წარმოადგენს, ამავე დროს ამ ელემენტს შეიცავს მიკროორგანიზმების უჯრედის კედელი (ქიტინი და მურეინის პეპტიდოგლიკანი), ამინომჟავები, პეპტიდები, ცილები (მათ შორის სამრეწველო ფერმენტები) და ნუკლეოტიდები/ნუკლეინის მჟავები, ამიტომ კვლევის მომდევნო ეტაპზე მიზნად დავისახეთ პროტეაზას შერჩეული პროდუცენტებისთვის აზოტის ოპტიმალური წყაროს დადგენა. კერძოდ, შვისწავლეთ საფუვრის ექსტრაქტის, შარდოვანასა და კაზეინის გავლენა შტამების - *Penicillium candidum* 5-1, *Penicillium camemberti* 7-5 და *Mucor* spp. 2-3 პროტეაზურ აქტივობაზე. კაზეინის მასტიმულირებელი გავლენა

სამივე შტამის შემთხვევაში დაფიქსირდა, თუმცა მაქსიმალური აქტივობა ამჯერადაც შტამმა - *Penicillium candidum* 5-1 გამოავლინა.

კაზეინის და ლაქტოზის გავლენა მიკროსკოპული სოკოების პროტეაზურ აქტივობაზე (ჩვენი ექსპერიმენტის მსგავსად) შესწავლილია მკვლევართა სხვა ჯგუფის მიერ (Shellomith & Preetha 2018), რომლებმაც განახორციელეს რძის შემადედებელი ფერმენტების პროდუცენტის - *Penicillium camemberti* საკვები არის ოპტიმიზაცია, ძირითად სუბსტრატან- კაზეინთან ერთად ექსპერიმენტში გამოიყენეს შრატი, რომელზეც საკვლევმა შტამმა რძის შედედების მაღალ უნარი გამოავლინა.

განსხვავებული შედეგები მიიღეს სხვა მკვლევრებმა (Sidhu et al.,2017),რომლებმაც შეისწავლეს აზოტის არაორგანული და ორგანული წყაროების გავლენა შტამის- *Streptomyces globisporus* 1/68 პროტეაზურ აქტივობაზე. ექსპერიმენტმა აზოტის არაორგანული წყაროების აშკარა უპირატესობა გამოავლინა ორგანულ წყაროებთან შედარებით. არაორგანული აზოტის შესწავლილი წყაროებიდან ყველაზე ეფექტური ამონიუმის დიჰიდროფოსფატი - $NH_4H_2PO_4$ აღმოჩნდა. კერძოდ, *Streptomyces globisporus* 1/68-ის პროტეაზურმა აქტივობამ საკვებ არეში ამ მარილის თანაობისას 5.8 U/ml შეადგინა. საინტერესო შედეგები იქნა მიღებული საკვებ არეში აზოტის სხვადასხვა ორგანული წყაროს შეტანისას: პროტეაზას სინთეზზე გავლენა არ ჰქონდა პეპტონს, კაზეინს, რძის შრატს, ხორბლის ფქვილს, სოიოს ფქვილს, მეთიონინსა და ხორბლის ქატოს. ჩვენი შედეგებისგან განსხვავებით, საკვებ არეში კაზეინის შეტანა ფერმენტული აქტივობის მკვეთრ კლებას (0.7 U/ml)იწვევდა.

ფოსფორის ოპტიმალური წყაროს შერჩევისას მაქსიმალური პროტეაზური აქტივობა სამივე შტამმა გამოავლინა საკვებ არეში ორჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმის თანაობისას. თუმცა შედარებით მეტ პროტეაზას კვლავ შტამი -*Penicillium candidum* 5-1 პროდუცირებდა. ჩვენი შედეგებისგან ერთგვარად განსხვავებული შედეგი მიიღო მეცნიერთა ჯგუფმა (Ibrahim et al., 2015), რომელმაც კომპლექსურად შეისწავლა ნახშირბადისა და ფოსფორის წყაროების გავლენა რძის შემადედებელი ფერმენტის ბიოსინთეზზე: შტამის -*Mucor mucedo* KP736529 სიღრმული კულტივირების პირობების ოპტიმიზაციის შედეგად დაადგინეს გლუკოზისა და ფოსფორის წყაროს მასტიმულირებელი გავლენა შტამის ფერმენტულ აქტივობაზე: ეს უკანასკნელი საწყისთან შედარებით 6,12-ჯერ გაიზარდა. ჩვენი შედეგებისგან განსხვავებით, *Mucor*

mucedo KP736529 უპირატესობას ერთჩანაცვლებულ ფოსფორმჟავა კალიუმს ანიჭებდა.

ჩვენს მიერ განხორციელებული ექსპერიმენტების მსვლელობისას, ნახშირბადის, აზოტის და ფოსფორის საუკეთესო წყაროების შერჩევის პროცესში, პროტეაზის პროდუცენტებს შორის გამოვლინდა მიკროსკოპული სოკო- *Penicillium candidum* 5-1, რომელიც მაქსიმალური პროტეაზური აქტივობით გამოირჩეოდა, რის გამოც შემდგომი კვლევისთვის აღნიშნული შტამი შევარჩიეთ.

ცნობილია,რომ ფერმენტული აქტივობის მნიშვნელოვან რეგულატორს აზოტის, ნახშირბადის, ფოსფორის და ა.შ წყაროების სწორედ შერჩეული კონცენტრაცია წარმოადგენს. ამ ინფორმაციაზე დაყრდნობით, ექსპერიმენტის შემდგომ ეტაპზე მიზნად დავისახეთ ლაქტოზის, კაზეინისა და ორჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმის ოპტიმალური კონცენტრაციების შერჩევა. თანმიმდევრულად განხორციელებული ექსპერიმენტების საფუძველზე დადგინდა, რომ *Penicillium candidum* 5-1-ის მიერ პროტეაზას ბიოსინთეზისთვის ოპტიმალურია საკვებ არეში ლაქტოზის კონცენტრაცია შეადგენდეს 4%-ს, კაზინის-1,5%-ს, ხოლო ორჩანაცვლებული ფოსფორმჟავა კალიუმის მარილის- 0.1%.

ცვლადი გარემოსადმი სოკოების ადაპტაციური მექანიზმების შესწავლისა და პროტეაზების ბიოსინთეზისთვის ოპტიმალური პირობების შერჩევის მიზნით, მეცნიერები ხშირად იკვლევენ ფერმენტული აქტივობის დამოკიდებულებას კულტივირების პირობების პარამეტრების ცვლილებაზე. აღნიშნული პარამეტრებიდან არსებითი ფაქტორებია საფერმენტაციო არის pH , კულტივირების ხანგრძლივობა და ტემპერატურა. ცნობილია, რომ მიკროსკოპული სოკოები ტემპერატურის ფართო დიაპაზონში (25-დან 47 °C-მდე) წარმოქმნიან სხვადასხვა ფერმენტებს, (Cavalcanti, et al., 2017; Pachauri, et al., 2018; El-Refai, et al., 2017). ჩვენს შემთხვევაში, ტემპერატურის ფართო დიაპაზონში *Penicillium candidum*- 5-1-ის სიღრმული კულტივირებისას დადგინდა, რომ შერჩეული შტამი ტიპიური მეზოფილია და მაქსიმალურ პროტეაზურ აქტივობას 30^{0}C-ზე ავლენს, რის გამოც შემდგომი კვლევისთვის მიზანშეწონილად მივიჩნიეთ *Penicillium candidum*- 5-1 -ის კულტივირება წარიმართოს 30^{0}C-ზე .

ცნობილია,რომ მიკროსკოპულ სოკოებს ბაქტერიებთან შედარებით ფართო სპექტრის ფერმენტების სინთეზისა და pH -ის ფართო დიაპაზონში ზრდის უნარი შესწევთ (Rao et al., 1998 ; Cavalcanti, et al., 2017; Pachauri, et al., 2018; Lincoln & More 2017 ; Usha, et al., 2014, El-Refai, et al., 2017). მაგალითად, *Aspergillus oryzae* წარმოქმნის როგორც მჟავა, ასევე-ნეიტრალურ და ტუტე პროტეაზებს. ამავე დროს, სოკოური პროტეაზები აქტივობას ინარჩულებენ pH (pH 4 – 11) -ის ფართო დიაპაზონში და ამჟღავნებენ გაცილებით მაღალ სპეციფიკურობას ბაქტერიულ პროტეაზებთან შედარებით. (Niyonzima & More, 2013; Dhital, et al.,2013; Sandhya, et al., 2015; da Costa Souza, et al., 2015). ჩვენს მიერ შერჩეული შტამი სიღრმული კულტივირების პირობებში მაქსიმალურ პროტეაზურ აქტივობას ამჟღავნებდა საკვებ არეზე, რომლის საწყისი pH იყო - 6.5.

ლიტერატურული მონაცემებით, მიკრობული ფერმენტების სეკრეცია მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული მათი კულტივირების პერიოდის ხანგრძლივობაზე: ფერმენტების ინტენსიური სინთეზის ფაზას ენაცვლება სტაციონარული ფაზა, რის შემდეგაც იწყება ლიზისის პერიოდი, შესაბამისად, ფერმენტების სეკრეციაც წყდება. მიკროორგანიზმთა ლიზისის ფაზას მრავალი მიზეზი განაპირობებს, მათ შორის უმთავრესია საკვებ არეში საკვები კომპონენტების ამოწურვა და ზრდის ინჰიბიტორების დაგროვება (Anandan, et al., 2007). *Penicillium candidum* 5-1-ის პროტეაზას ბიოსინთეზის დინამიკის შესწავლის საფუძველზე დადგინდა, რომ ჩვენს მიერ შერჩეული შტამი კულტივირების პირველი 24 საათის განმავლობაში იმყოფება ადაპტაციის (lag) ფაზაში, რის შემდეგაც იწყება ფერმენტის აქტიური სინთეზი, რაც მაქსიმუმს აღწევს კულტივირების მე-6 დღეს. ეს პერიოდი, სავარაუდოდ, ზრდის ექსპონენციალურ ფაზას (log- ფაზა) შეესაბამება, რის შემდეგაც კულტურა გადადის სტაციონალურ ფაზაში. ამ პერიოდიდან პროტეაზული აქტივობა მკვეთრად მცირდება .

მრავალი მეცნიერის მონაცემებით, სოკოების მიერ ფერმენტების სეკრეციის ოპტიმალური დრო, უმეტესად, მათი ზრდა-განვითარების მეოთხე - მეხუთე დღეს ემთხვევა. (da Costa Souza, et al., 2015; Sharma, et al., 2016). თუმცა საფუარი სოკოს - *Saccharomyces cerevisiae*-ის მიერ ინვერტაზას ბიოსინთეზისთვის გაცილებით მოკლე პერიოდი (2-3 დღე) იყო საკმარისი. (Sivakumar,et al., 2013). მსგავსი შედეგი მიიღო

ლინკოლმა და მისმა ჯგუფმა *Trichoderma viride*-ს L-ასპარაგინაზას სინთეზის დინამიკის შესწავლისას (Lincoln, et al., 2015). *Aspergillus niger* -ის პექტინაზას, *Penicillium* sp. ის და *Aspergillus awamori-ის* ცელულაზების (Pachauri, et al., 2018; Prasanna, et al.,2016) და *Scytalidium lignicola* -ს ლაკაზას (Dhital, et al., 2013) ბიოსინთეზისთვის ოპტიმალური აღმოჩნდა კულტივირების 7 დღე, რაც ახლოს დგას ჩვენს მიერ მიღებულ მონაცემთან.

ამრიგად, ეტაპობრივად განხორციელებული ექსპერიმენტების - საკვები არის შემადგენლობისა და კულტივირების პირობების ოპტიმიზაციის საფუძველზე Penicillium candidum- 5-1-ის პროტეაზური აქტივობა საწყისთან შედარებით 62.3%-ითაა გაზრდილი.

საწარმოო შტამისადმი კვების მრეწველობის მიერ წაყენებულ მოთხოვნებს შორის უმთავრესია მიკროორგანიზმის უსაფრთხოება, კერძოდ, აუცილებელია შტამს შემოწმება ტოქსიკურობაზე.

ცნობილია, რომ ხარისხის დახვეწის მიზნით, ყველის ინდუსტრიაში, ტექნოლოგიურ პროდუქტებს მიზანმიმართულად ემატება სოკოს რამდენიმე სახეობა- *Debaryomyces hansenii, Candida catenulata, Galactomyces geotrichum, Kluyveromyces marxianus, Mucor lanceolatus, Penicillium roqueforti, Penicillium camemberti,* ან *Saccharomyces cerevisiae* (Prado, et al,. 2015; Desmasures & Batt, 2014). ამავე დროს, რძის პროდუქტების გაფუჭება ხშირად უკავშირდება მიკროორგანიზმთა ზოგიერთი შტამის არსებობას. მაგალითად, სოკოს ხილული ზრდა პროდუქტის ზედაპირზე და მის მიერ პროდუცირებული მეტაბოლიტები განაპირობებენ უსიამოვნო სუნსა და არომატს, ასევე ფერის / ან ტექსტურის ხილულ ცვლილებებს (Ledenbach & Marshall, 2009). ორგანოლეპტიკური თვისებების გაუარესებისთან ერთად, *Aspergillus* -ის გვარის ზოგიერთი სახეობა მიკოტოქსინებსაც გამოიმუშავებს (Hymery, et al., 2015). მაგალიად, რძესა და რძის პროდუქტებში გვხვდება ასპერგილუსის გვარის ზოგიერთი სახეობის მიერ წარმოქმნილი აფლატოქსინი M1 (AFM1) და ისეთი მიკოტოქსინები, როგორიცაა ოხრატოქსინი A, ციტრინინი, როკეფორტინ C, მიკოფენოლი და ციკლოპიაზონის მჟავები და სხვა (Garnier, et al., 2017). ამ ინფორმაციის გათვალისწინებით, აუცილებლად მივიჩნიეთ ჩვენს მიერ შერჩეული შტამის შემოწმება ტოქსიკურობაზე. ამ მიზნით გამოვიყენეთ ექსპრეს-ტესტ მეთოდი,რომელიც შტამის ტოქსიკურობის

განსაზღვრის ერთ-ერთ ყველაზე ადექვატურ მეთოდად არის მიჩნეული და ეფექტურია ტოქსინის უმცირესი დოზების აღმოსაჩენადაც. როგორც მოველოდით, *Penicillium candidum* 5-1 არ აღმოჩნდა ტოქსიკური და ადამიანის ჯანმრთელობისთვის საშიში, რამაც „უფლება მოგვცა“ დაგვეწყო კვლევები უკვე რძის ახალი პროდუქტის მიღების მიმართულებით.

ექსპერიმენტის მომდევნო ეტაპი შტამის- *Penicillium candidum* 5-1 მიერ პროდუცირებული ფერმენტის ბიოქიმიურ შესწავლას დაეთმო. ამ ტიპის კვლევის საწყის ეტაპს ფერმენტის ტექნიკური პრეპარატის მიღება წარმოადგენს. ამ მიზნით, შერჩეული შტამის სიღრმული კულტივირება განვახორციელეთ *P.candidum* 5-1-ისთვის დადგენილ ოპტიმალურ პირობებსა და ოპტიმალური შემადგენლობის საკვებ არეზე. პროტეაზას ტექნიკური პრეპარატის მისაღებად გამოვიყენეთ კულტურალური სითხის ამონიუმის სულფატის სხვადასხვა პროცენტული გაჯერებით გამოლექვა. ყველაზე მაღალი პროტეაზური აქტივობა 60%-იანი ამონიუმის სულფატით გაჯერებით დალექილი ფერმენტულ ფრაქციას აღმოაჩნდა.

რძის შემადედებელი აქტივობის განსაზღვრის შედეგად დადგინდა, რომ ჩვენს მიერ მიღებულ პროტეაზას ტექნიკურ პრეპარატს აქვს რძის აჭრის უნარი. ძალზედ საინტერესო ფაქტი გამოვლინდა პრეპარატით რძეზე ზემოქმედების შედეგად: რძის აჭრამდე მის ხანმოკლე შედედებას ჰქონდა ადგილი. ამ მოვლენის შესაძლო ახსნას წარმოადგენს ის, რომ ამონიუმის სულფატით ხდება ამჭრელი ფერმენტის ნაწილობრივი გაწმენდა, სავარაუდოდ, გარდა ამჭრელი ფერმენტისა , მასთან ერთად ილექება სხვადასხვა კონცენტრაციით შემადედებელი ფერმენტის გარკვეული ფრაქციაც, რძის შემადედებელი ფერმენტი ილექება სხვადასხვა კონცენტრაციით, რაც განაპირობებს ყოველი ცალკეული მიღებული პრეპარატით რძის შედედების ფაქტს და განსხვავებულ დროს. აღსანიშნავია, რომ ლიტერატურაში არაა აღწერილი ფერმენტების მიერ რძის აჭრის ფაქტი.

რძის შედედების მაღალი უნარი და დაბალი პროტეაზური აქტივობა განიხილება, როგორც ყველის მიღებისთვის ფერმენტების მნიშვნელოვან მახასიათებლად, რაც ახასიათებს ხბოს ქიმოზინის. რძის თანამედროვე ინდუსტრიაში აღნიშნული თვისება აღმოაჩნდა მიკროსკოპული სოკოს *Rhizomucor miehei* NRRL 2034 -მიერ პროდუცირებულ ფერმენტს , რომლის შემადედებელი აქტივობა 10-ჯერ აღემატებოდა

პროტეაზურს .(Foda, et al., 2012) სხვა მკვლევრები ასპარტინის პროტეაზას პოტენციურ საწარმოო შტამად (Qasim et al., 2022) მოიაზრებენ *Mucor racemosus* CBS 381-ს , რომლის მიერ სინთეზირებული ფერმენტი ასევე ხასიათდება რძის მაღალი შედედებისა და დაბალი პროტეაზური აქტივობით.

აღნიშნული ეფექტი აიხსნება შემდეგი მსჯელობით: რაც უფრო სპეციფიკურია პროტეაზა მით უფრო დაბალ აქტივობას ავლენს იგი. მაგალითად, თუ პროტეაზა სპეციფიკურია ALA-ARG ბმის მიმართ ამ ბმების ჰიდროლიზის ამოწურვის შემდგომ იგი თავის აქტივობას ვეღარ ავლენს, მაშინ როცა ფართო სპეციფიკურობის პროტეაზა კიდევ დიდ ხანს განაგრძობს სხვადასხვა ცილების ჰიდროლიზს და შესაბამისად ავლენს უფრო მაღალ აქტივობას. ამავდროულად უნდა ითქვას რომ ALA-ARG ბმების დაშლა საკმარისია რომ შედედდეს რძე, რასაც უფრო ეფექტურად და ჩქარა ახერხებს სპეციფიკური პროტეაზა.

ჩვენს ექსპერიმენტში, ამონიუმის სულფატის სხვადასხვა კონცენტრციებით დალექვის შედეგად მიღებულ, ნაწილობრივ გაწმენდილ ფერმენტის ფრაქციებში პროტეაზური და რძის შემადედებელი აქტივობების განსაზღვრით დადგინდა, რომ 80% ამონიუმის სულფატით დალექილი ფრაქცია ავლენდა რძის შემადედებელი აქტივობის მაღალ მაჩვენებელს, ხოლო 60% ამონიუმის სულფატით დალექილი ფრაქცია - ყველაზე მაღალ ხვედრით პროტეაზურ ქტივობას. განსხვავებული შედეგები მიიღეს (Ashraf et al., 2022) *Pleurotus florida* -ს მიერ პროდუცირებული, რძის შემადედებელი ფერმენტების ნაწილობრივი გაწმენდისას: ყველაზე მაღალი საერთო MCE აქტივობა (367.85 SU) დაფიქსირდა 20%-იანი ამონიუმის სულფატით გამოლექილ ფრაქციაში. ამონიუმის სულფატის კონცენტრაციის ზრდა ფერმენტული აქტივობის კლებას იწვევდა. ჩვენი ექსპერიმენტისგან განსხვავებული შედეგები მიიღო მკვლევართა სხვა ჯგუფმაც (Wajeeha et al., 2021), რომელთა მონაცემებით, *Aspergillus flavus*-ის მიერ პროდუცირებული ტუტე პროტეაზა მაქსიმალურ აქტივობას 80%-იანი ამონიუმის სულფატით გამოლექვისას ავლენდა.

ჩვენს ექსპერიმენტში, რძის კოაგულაციაში მონაწილე ფერმენტი, რომელიც ილექებოდა ამონიუმის სულფატის 60 -დან 80% - კონცენტრაციის დიაპაზონში, სავარაუდოდ, ტიპიურ რძის შემადედებელ პროტეაზას უნდა წარმოადგენდეს. ჩვენი მიზანი კი განსხვავებული სპეციფიკურობის პროტეაზას გამოვლენა იყო. ასეთ

უჩვეულო თვისებას ავლენდა 60% -ანი ამონიუმის სულფატით გამოლექილი ფერმენტის ფრაქცია, რომელიც რძის აჭრამდე მისი ხანმოკლე შედეგებით ხასიათდებოდა. აქედან გამომდინარე, შემდგომი კველევისთვის აღნიშნული ფრაქცია შევარჩიეთ. ექსპერიმენტის მომდევნო ეტაპი ტექნიკური პრეპარატის შემდგომ გაწმენდას დაგაწმენდილი ფერმენტის თვისებების შესწავლას დაეთმო.

DEAE -ცელულოზაზე განხორციელებული იონცვლადი ქრომოტოგრაფიით ტექნიკური პრეპარატიდან მინარევების სრული მოცილება გახდა შესაძლებელი მინარევების იონცვლად მატარებელზე დასმის შედეგად. შესაბამისად, მივიღეთ გაწმენდილი ფერმენტული ფრაქცია, რაც დადასტურდა SDS- ელექტროფორეზით. ელექტროფორეზის საშუალებით განისაზღვრა ფერმენტის მოლეკულური მასაც ,რომელიც 18 kDa-ს შეადგენდა. სხვა მეცნიერების მიერ გაწმენდილი პროტეაზების მოლეკულური მასა 28-დან 80 kDa-მდე მერყეობდა (Li et al 2007, Meshram & Saxena, 2016; Meshram, et al 2016, Meshram, et al 2017;, Noor, et al 2016; El-Khonezy et al 2021), რაც მნიშვნელოვნად აღმატება ჩვენი ფერმენტის წონას.

ცნობილია,რომ გაწმენდილი ფერმენტის მნიშვნელოვან მახასიათებლებს წარმოადგენს მისი მოქმედების ტემპერატურული და pH ოპტიმუმები. ჩვენს მიერ გაწმენდილი პროტაზა მაქსიმალურ აქტივობას pH 6,5-ზე ავლენდა. მსგავსი შედეგები მიიღეს სხვა მკვლევრებმაც (Oliveira Melo, et al., 2023), რომლებმაც გაწმინდეს *P. camemberti* 0798400075-ის მიერ პროდუცირებული პროტეაზა და დაადგინეს მისი pH -ოპტიმუმი (7.0).

ჩვენს მიერ გაწმენდილი ფერმენტის მოქმედების ტემპერატურული ოპტიმუმი 35-40°C -ის ფარგლებში იყო. ფერმენტული პრეპარატი აღნიშნულ ტემპერატურულ დიაპაზონში ამჟღავნებდა მაქსიმალურ პროტეაზურ აქტივობას. მსგავსი შედეგები მიიღეს სხვა მეცნიერებმა (Yadav et al. 2015) , რომლებმაც *Aspergillus avus*-დან გამოყოფილი ტუტე სერინის პროტეაზას მაქსიმალური აქტივობა დააფიქსირეს 40ºC ტემპერატურაზე.

გაწმენდილი სახით ფერმენტის მიღებამ საშუალება მოგვცა დაგვედასტურებინა ფაქტი პროტეაზის განსხვავებული სპეციფიკურობის არსებობის, რაც როგორც იყო დაგეგმილი უნდა გამოსახულიყო კაზეინის (როგორც სუბსტრატის) ჰიდროლიზის შედეგად და შესაბამისად, განსხვავებული პროდუქტის მიღებით. ელექტროფორეზის

საშუალებით ფერმენტის მიერ კაზეინის დეგრადციის ზონების ანალიზმა დაადასტურა ფერმენტის სპეციფიკური მოქმედება. საგულისხმოა, რომ კაზეინი შედგება რამდენიმე სუბერთეულისაგან (αs1- (22-23.7 kDa), αs2- (25 kDa), β- (24 kDa) და κ-კაზეინი 19 kDa), რომელთაგან ყველაზე დაბალმოლეკულურ სუბერთეულს წარმოადგენს κ-კაზეინი (De Kruif & Holt, 2003). ჩვენი ფერმენტის კაზეინზე ზემოქმედების შედეგად ზედა ორი ფრაქცია (შედარებით მძიმე ფრაქციები) განიცდის ჰიდროლიზს, რომელთაც სავარაუდოდ შორდებათ ჰიდროფილური ნაწილი და რჩება დაბალმოლეკულური ჰიდროფობული ნაწილები. ხოლო κ-კაზეინიდან წარმოიქმნება პარა-κ-კაზეინი, რაც დასტურდება ელექტროფორეზით, შესაბამისად, κ- კაზეინზე პროტეაზას ზემოქმედების შედეგად შორდება დაბალმოლეკულურ ჰიდროფილური უბანი და რჩება პარა- κ-კაზეინი. სწორედ ეს დაშლილი ნაწილები წარმოქმნიან კონგლომერატებს ანუ ხაჭოსებრ მასას, რაც მეტყველებს ამ კონგლომერატების ჰიდროფობულ ფიზიკურ-ქიმიურ თვისებებზე. მეცნიერების ჯგუფმა(Chen, C. C., et. al., 2021) დეტალურად შეისწავლეს ფერმენტ ქიმოზინის ზემოქმედებით კაზეინის ფრაქციების (αs1,αs2,β და κ) პროტეოლიზი. ვინაიდან ავტორები ამოწმებდნენ არა ფერმენტის ზემოქმედებას არამედ სუბსტრატის გარდაქმნას, ექსპერიმენტალური მოდელისთვის მათ ჰქონდათ აღებული რძე(ჩვენს ექსპერიმენტში სუბსტრატად აღებულ იქნა კაზეინი). ავტორების მიერ ელექტროფორეზის სურათებით ნაჩვენებია რომ ქიმოზინის სამსაათიანი ზემოქმედების შედეგად ჰიდროლიზს განიცდის αs1,αs2,β, κ-კაზეინი მაღალმოლეკულური პეპდიდების წარმოქმნით, მაშინ როდესაც ჩვენი ფერმენტის 24 საათიანი ზემოქმედების შემთხვევაში αs1, αs2, β კაზეინი ჰიდროლიზდება შედარებით დაბალმოლეკულურ ფრაგმენტებად (სავარაუდოდ დაბალმოლეკულურ პეპტიდებად), ხოლო κ-კაზეინის ჰიდროლზის შედეგად წარმოიქმნება პარა- κ-კაზეინი. რაც მიანიშნებს ამ ფერმენტების განსხვავებულ ზემოქმედების უნარზე.

აღსანიშნავია, რომ პროტეაზის პრეპარატმა შედედების ნაცვლად რძის აჭრა გამოიწვია. იგივე შედეგი განმეორდა გაწმენდილი ფერმენტით რძეზე ზემოქმედების შედეგად. ფერმენტის მოქმედებამ წარმოქმნა ხაჭოსებრი მასა (ხაჭოს მსგავსი ტექსტურით) და

გემოთი. უნდა აღინიშნოს რომ, მოკლევადიანი რძის შედედების ეფექტი, რასაც ავლენდა პრეპარატი, გაწმენდილ ფერმენტს გაუქრა, რაც მეტყველებს იმაზე, რომ პრეპარატში არის როგორც მინიმუმ ორი სახის ამჭრელი და შემადედებელი ფერმენტი, რომელიც იონცვლადი ქრომატოგრაფიის შედეგად განცალკევდა ერთმანეთისგან. მნიშვნელოვანია, რომ გაწმენდილი ფერმენტისგან მიღებული პროდუქტი იყო განსხვავებული ფაქტურის სხვა ფერმენტებისგან მიღებულ პროდუქტებთან შედარებით. ხაზგასმით უნდა ითქვას, რომ ეს პროდუქტი შედგება ამინომჟავებისგან და არა ცხიმისგან და აქვს ცხიმთან ასოცირებული ორგანოლეპტიკური თვისებები.

გამომდინარე აღწერილი თვისებებიდან აღნიშნული ტიპის ფერმენტი შესაძლოა გამოყენებულ იქნას არამარტო განსხვავებული პროდუქტის მისაღებად არამედ გარკვეული დოზირებით ყველის, ხაჭოს და სხვა რძის პროდუქტებში ცხიმოვანი საგემოვნო თვისებების გასაძლიერებლად.

ამრიგად, ჩვენს მიერ აღმოჩენილი, სპეციფიკური პროტეაზას გამოყენებით რძის ინდუსტრიაში შესაძლებელია რძიდან ისეთი ახალი პროდუქტის დამზადება, რომელშიც მომატებული იქნება არა ცხიმის შემცველობა, არამედ -ცხიმთან ასოცირებული გემოვნებითი თვისებები. ხაჭოს მსგავსი კონსისტენციის ეს პროდუქტი გამორჩეულია განსხვავებული საგემოვნო თვისებებით და დიეტური კვების რაციონში ჩართვის პერსპექტივით.

6. დასკვნები და რეკომენდაციები

1. კვებისთვის გამოუსადეგარი რძის პროდუქტებიდან (ხაჭო, ყველი) გამოიყო პროტეაზას პროდუცენტი მიკროსკოპული სოკოების კულტურები.
2. სკრინინგის შედეგად გამოვლინდა ყველაზე მაღალაქტიური პროტეაზას პროდუცენტი შტამი, რომელიც იდენტიფიცირებულია სახეობამდე *Penicillium candidum 5-1.*
3. შერჩეული პროტეაზას პროდუცენტი შტამებისთვის კულტივირებისთვის ოპტიმალური პირობების დადგენის და საკვები არის ოპტიმიზაციის შემდეგ პროტეაზური აქტივობა გაიზარდა 62.3%-ით.
4. შტამის უვნებლობა დადგინდა ტოქსიკოლოგიური კვლევით.
5. განხორციელდა განსხვავებული სპეციფიკურობის მქონე პროტეაზას ფერმენტული (ტექნიკური) პრეპარატის მიღება და რძეზე ზემოქმედება, რამაც გამოიწვია რძის აჭრა.
6. ქრომატოგრაფიულად გაიწმინდა და ელექტროფორეზის შედეგად გამოვლინდა გაწმენდილი პროტეაზა , დადგინდა მისი მოლეკულური მასა (18 kDa).
7. გაწმენდილი სპეციფიკური ფერმენტის რძეზე ზემოქმედების შედეგად განმეორდა რძის აჭრის ფაქტი, რომლის შედეგეადაც მიღებული იქნა ახალი პროდუქტი, რომელსაც აქვს მომატებული ცხიმოვანი, გემოვნებითი თვისებები.
8. შემუშავდა ახალი პროდუქტის მიღების ზოგადი ტექნოლოგიური სქემა.
9. მიღებული ახალი პროტეაზური ფერმენტი შეიძლება გამოყენებულ იქნეს როგორც ახალი პროდუქტის მისაღებად , ასევე როგორც დამატებითი კომპონენტი, რძის პროდუქტების საგემოვნო თვისებების გასაუმჯობესებლად.

რეკომენდაციები

- შერჩეული პროტეაზას პროდუცენტი შტამებისათვის კულტივირების ოპტიმალური ფერმენტული პრეპარატის მიღება უნდა განხორციელდეს **60%**-იანი ამონიუმის სულფატის გაჯერებით.
- ფერმენტის შეტანა უნდა მოხდეს რძის პასტერიზაციის შემდეგ, ყველანაირი პირობის დაცვით 40°C -ზე 20-30 წუთის განმავლობაში.

დისერტაციის ექსპერიმენტული მასალები გამოქვეყნებულია საერთაშორისო და ადგილობრივ სამეცნიერო ჟურნალებში:

Museliani, K., Kvesitadze, E., Kutateladze, L., & Khobelia, T. Optimizing of nutrient media for Penicillium candidum 5-1 to increase the biosynthesis of casein-specific protease. *Annals of Agrarian Science*, *17*, 209.

Museliani, K., Kvesitadze, E., Kutateladze, L., & Khobelia, T. Screening of Protease-Producing Microscopic Fungi Growing on Nutrient Media Similar to Natural Substrates. BULLETIN OF THE GEORGIAN NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 17, no. 2, 2023, 129-134.

Museliani, K., Kvesitadze, E., Kutateladze, L., & Khobelia, T. EXPLORING CASEIN-SPECIFIC PROTEASE: PURIFICATION, PROPERTIES AND MILK CURDLING CONFIRMATION, Paris Congress on Agriculture and animal husbandry, June 29-30 2023, Paris.

დისერტაციის ექსპერიმენტული მასალები წარდგენილი იყო საერთაშორისო კონფერენციებზე:

Museliani, K., Kvesitadze, E., Kutateladze, L., & Khobelia, T. EXPLORING CASEIN-SPECIFIC PROTEASE: PURIFICATION, PROPERTIES AND MILK CURDLING CONFIRMATION, Paris Congress on Agriculture and animal husbandry, June 29-30 2023, Paris.

Museliani, K., Kvesitadze, E., & Khobelia , New type of milk-digesting proteolytic enzymes The second interdisciplinary international conference in Batumi, IKSAD INSTITUTE, Georgia, Batumi 2022.

7. ბიბლიოგრაფია

Abada, E. A. (2019). Application of microbial enzymes in the dairy industry. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 61-72). Academic Press.

Abada, E. A. (2019). Application of microbial enzymes in the dairy industry. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 61-72). Academic Press.

Abbas, H. M., Foda, M. S., Kassem, J. M., Bayomi, H. M., & Moharam, M. E. (2013). Production of white soft cheese using fungal coagulant produced by solid state fermentation technique. *World Applied Sciences Journal*, *25*(6), 939-944.

Abdul Hakim, B. N., Xuan, N. J., & Oslan, S. N. H. (2023). A Comprehensive Review of Bioactive Compounds from Lactic Acid Bacteria: Potential Functions as Functional Food in Dietetics and the Food Industry. *Foods*, *12*(15), 2850.

Abidi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T., & Marzouki, M. N. (2011). Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from Botrytis cinerea. *Process Biochemistry*, *46*(12), 2301-2310.

Abu-Tahon, M. A., Arafat, H. H., & Isaac, G. S. (2020). Laundry detergent compatibility and dehairing efficiency of alkaline thermostable protease produced from Aspergillus terreus under solid-state fermentation. *Journal of Oleo Science*, *69*(3), 241-254.

Agu, K. C., Umeoduagu, N. D., Victor-Aduloju, A. T., Uwanta, L. I., Adepeju, D. M., Udenweze, E. C., ... & Udeh, K. C. (2023). Isolation and Characterization of Proteolytic Enzyme Produced from Fungi.

Ahmad, W., Tayyab, M., Aftab, M. N., Hashmi, A. S., Ahmad, M. D., Firyal, S., ... & Awan, A. R. (2020). Optimization of conditions for the higher level production of protease: characterization of protease from Geobacillus SBS-4S. *Waste and Biomass Valorization*, *11*, 6613-6623.

Ahmed, S. A., Wehaidy, H. R., Ibrahim, O. A., Abd El Ghani, S., & El-Hofi, M. A. (2016). Novel milk-clotting enzyme from Bacillus stearothermophilus as a coagulant in UF-white soft cheese. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *7*, 241-249.

Aissaoui, N., Chobert, J. M., Haertlé, T., Marzouki, M. N., & Abidi, F. (2017). Purification and biochemical characterization of a neutral serine protease from Trichoderma harzianum. Use in antibacterial peptide production from a fish by-product hydrolysate. *Applied biochemistry and biotechnology*, *182*, 831-845.

Akishev, Z., Aktayeva, S., Shamsiyeva, Y., Tursunbekova, A., Kalemshariv, B., Tultabayeva, T., & Khassenov, B. (2023). Milk-clotting activity of recombinant bovine and camel chymosin for cow's, goat's and ewes' milk. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, (2), 61-68.

Al-Dhabi, Naif Abdullah, et al. "Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from Streptomyces sp. Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications." *Journal of King Saud University-Science* 32.1 (2020): 1258-1264.

Ali, M. A., Kamal, M. M., Rahman, M. H., Siddiqui, M. N., Haque, M. A., Saha, K. K., & Rahman, M. A. (2022). Functional dairy products as a source of bioactive peptides and probiotics: Current trends and future prospectives. *Journal of Food Science and Technology*, *59*(4), 1263-1279.

Ali, N., Ullah, N., Qasim, M., Rahman, H., Khan, S. N., Sadiq, A., & Adnan, M. (2016). Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing Bacillus Subtilis Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan. *Extremophiles*, *20*, 395-402.

Alves, M. P., Salgado, R. L., Eller, M. R., Vidigal, P. M. P., & de Carvalho, A. F. (2016). Characterization of a heat-resistant extracellular protease from Pseudomonas fluorescens 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity. *Journal of Dairy Science*, *99*(10), 7842-7851.

Anandan, D., Marmer, W. N., & Dudley, R. L. (2007). Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from Aspergillus tamarii. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *34*(5), 339-347.

Andrade, V. S., Sarubbo, L. A., Fukushima, K., Miyaji, M., Nishimura, K., & Campos-Takaki, G. M. D. (2002). Production of extracellular proteases by Mucor circinelloides using D-glucose as carbon source/substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, *33*, 106-110.

Annapure, U. S., & Gaur, S. S. (2022). Commercial enzymes in dairy processing. In *Value-addition in food products and processing through enzyme technology* (pp. 205-219). Academic Press.

Ao, X. L., Yu, X., Wu, D. T., Li, C., Zhang, T., Liu, S. L., ... & Zou, L. K. (2018). Purification and characterization of neutral protease from Aspergillus oryzae Y1 isolated from naturally fermented broad beans. *AMB Express*, *8*(1), 1-10.

Arima, K., Yu, J., & Iwasaki, S. (1970). [30] Milk-clotting enzyme from Mucor pusillus var. Lindt. InMethods in enzymology (Vol. 19, pp. 446-459). Academic Press

Aruna, K., Shah, J., & Birmole, R. (2014). Production and partial characterization of alkaline protease from Bacillus tequilensis strains CSGAB0139 isolated from spoilt cottage cheese. *Int J Appl Biol Pharm*, *5*, 201-221.

Asha, B., & Palaniswamy, M. (2018). Optimization of alkaline protease production by Bacillus cereus FT 1isolated from soil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *8*(2), 119-127.

Ayana, I. A., Ibrahim, A. E., & Saber, W. I. (2015). Statistical optimization of milk clotting enzyme biosynthesis by Mucor mucedo Kp736529 and its further application in cheese production. *Int J Dairy Sci*, *10*, 61-76.

Banks, A., Behrmann, E., & Robertson, L. (2023). Identification and characterization of fungi isolated from a cheese cave in the Eastern United States. *Proceedings of the West Virginia Academy of Science*, *95*(3).

Barredo, J. L., & Barredo, J. L. (Eds.). (2005). *Microbial enzymes and biotransformations* (pp. 1-319). New York: Humana Press.

Benmrad, M. O., Moujehed, E., Elhoul, M. B., Mechri, S., Bejar, S., Zouari, R., ... & Jaouadi, B. (2018). Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from Penicillium chrysogenium strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. *International journal of biological macromolecules*, *119*, 1002-1016.

Bensmail, S., Boudjema, K., & Naimi-Fazouane, F. (2020). Production of extracellular rennin-like enzyme by a newly isolate Mucor circinelloides (von Tieghem) and its application in Camembert cheese making. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, *7*(1), 16-24.

Bhagwat, P. K., & Dandge, P. B. (2018). Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, *15*, 43-55.

Bhatia, R. K., Ullah, S., Hoque, M. Z., Ahmad, I., Yang, Y. H., Bhatt, A. K., & Bhatia, S. K. (2021). Psychrophiles: A source of cold-adapted enzymes for energy efficient biotechnological industrial processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *9*(1), 104607.

Bhatia, R. K., Ullah, S., Hoque, M. Z., Ahmad, I., Yang, Y. H., Bhatt, A. K., & Bhatia, S. K. (2021). Psychrophiles: A source of cold-adapted enzymes for energy efficient biotechnological industrial processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *9*(1), 104607.

Biesebeke Rt, Ruijter G, Rahardjo YSP *et al.* (2002) *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations Progress report on a multi-disciplinary project. FEMS Yeast Res 2:245–248.

Bintsis, T., & Papademas, P. (2017). An overview of the cheesemaking process. *Global cheesemaking technology: Cheese quality and characteristics*, 120-156.

Biškauskaitė, R., Valeikienė, V., & Valeika, V. (2021). Enzymes for leather processing: Effect on pickling and chroming. *Materials*, *14*(6), 1480.

Blieva, R. K., Mustafin, K. G., Akhmetsadykov, N. N., Suleimenova, Z., Saduyeva, Z., Zhakipbekova, A., ... & Narmuratova, Z. (2021). Optimization of culture medium for enhanced protease biosynthesis in Streptomyces globisporus. *Rasayan Journal of Chemistry*, *14*(1), 270-275.

Blieva, R. K., Mustafin, K. G., Akhmetsadykov, N. N., Suleimenova, Z., Saduyeva, Z., Zhakipbekova, A., ... & Narmuratova, Z. (2021). Optimization of culture medium for enhanced protease biosynthesis in Streptomyces globisporus. *Rasayan Journal of Chemistry*, *14*(1), 270-275.

Bond, J. S. (2019). Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(5), 1643-1651.

Bouroutzika, E., Proikakis, S., Anagnostopoulos, A. K., Katsafadou, A. I., Fthenakis, G. C., & Tsangaris, G. T. (2021). Proteomics Analysis in Dairy Products: Cheese, a Review. *Applied Sciences*, *11*(16), 7622.

Briki, S., Hamdi, O., & Landoulsi, A. (2016). Enzymatic dehairing of goat skins using alkaline protease from Bacillus sp. SB12. *Protein expression and purification*, *121*, 9-16.

Britten, M., & Giroux, H. J. (2022). Rennet coagulation of heated milk: A review. *International Dairy Journal*, *124*, 105179.

Caroli, A., Poli, A., Ricotta, D., Banfi, G., & Cocchi, D. (2011). Invited review: dairy intake and bone health: a viewpoint from the state of the art. *Journal of dairy science*, *94*(11), 5249-5262.

Cavalcanti, M. T. H., Martinez, C. R., Furtado, V. C., Neto, B. B., Teixeira, M. F., Lima Filho, J. L., & Porto, A. L. F. (2005). Milk-clotting protease production by Nocardiopsis sp. in an inexpensive medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*, 151-154.

Cavalcanti, R. M. F., de Oliveira Ornela, P. H., Jorge, J. A., & Guimarães, L. H. S. (2017). Screening, selection and optimization of the culture conditions for tannase production by endophytic fungi isolated from Caatinga. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, *5*(1), 001-009.

Cavalcanti, R. M. F., de Oliveira Ornela, P. H., Jorge, J. A., & Guimarães, L. H. S. (2017). Screening, selection and optimization of the culture conditions for tannase production by endophytic fungi isolated from Caatinga. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, *5*(1), 001-009.

Cenci-Goga, B., Cruciani, D., Crotti, S., Karama, M., Yıldırım, G., Bulut, M., ... & Grispoldi, L. (2021). Diversity of yeasts and moulds in dairy products from Umbria, central Italy. *Journal of Dairy Research*, *88*(2), 217-220.

Chen, C. C., Chen, L. Y., Li, W. T., Chang, K. L., Kuo, M. I., Chen, C. J., & Hsieh, J. F. (2021). Influence of chymosin on physicochemical and hydrolysis characteristics of casein micelles and individual caseins. *Nanomaterials*, *11*(10), 2594.

Chandrasekaran, M., Basheer, S. M., Chellappan, S., Krishna, J. G., & Beena, P. S. (2015). Enzymes in food and beverage production: an overview. *Enzym Food Beverage Process CRC Press*, *25*, 133-154.

Chatha, S. A. S., Asgher, M., & Iqbal, H. M. (2017). Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*, 14005-14018.

Clare, D. A., Catignani, G. L., & Swaisgood, H. E. (2003). Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Current pharmaceutical design*, *9*(16), 1239-1255.

Contesini, F. J., Melo, R. R. D., & Sato, H. H. (2018). An overview of Bacillus proteases: from production to application. *Critical reviews in biotechnology*, *38*(3), 321-334.

Crichton, G. E., Elias, M. F., Dore, G. A., & Robbins, M. A. (2012). Relation between dairy food intake and cognitive function: The Maine-Syracuse Longitudinal Study. *International dairy journal*, *22*(1), 15-23.

Cupp-Enyard C. (2008). Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 19, e899.

da Costa Souza, P. N., da Costa Maia, N., Guimarães, L. H. S., de Resende, M. L. V., & Cardoso, P. G. (2015). Optimization of culture conditions for tannase production by Aspergillus sp. gm4 in solid state fermentation. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, *37*(1), 23-30.

da Costa Souza, P. N., da Costa Maia, N., Guimarães, L. H. S., de Resende, M. L. V., & Cardoso, P. G. (2015). Optimization of culture conditions for tannase production by Aspergillus sp. gm4 in solid state fermentation. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, *37*(1), 23-30.

Da Silva, R. R., Souto, T. B., de Oliveira, T. B., de Oliveira, L. C. G., Karcher, D., Juliano, M. A., ... & Cabral, H. (2016). Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from Rhizomucor miehei. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *43*(8), 1059-1069.

Da Silva, R. R., Souto, T. B., de Oliveira, T. B., de Oliveira, L. C. G., Karcher, D., Juliano, M. A., ... & Cabral, H. (2016). Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from Rhizomucor miehei. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *43*(8), 1059-1069.

Das K, Mukherjee AK (2007) Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. Process Biochem 42:1191–1199.

de Castro, R. J. S., Ohara, A., Nishide, T. G., Albernaz, J. R. M., Soares, M. H., & Sato, H. H. (2015). A new approach for proteases production by Aspergillus niger based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *4*(2), 199-207.

de Oliveira Melo, A. M., Silva, T. P., de Carvalho Tavares, I. M., Silva, F. N., Bilal, M., Salay, L. C., ... & De Oliveira, J. R. (2023). New Protease Produced by Solid State Fermentation of Penicillium camemberti 0798400075 Using Coffee Hull Applied in Milk Coagulation.

de Oliveira, J. M., Fernandes, P., Benevides, R. G., & de Assis, S. A. (2020). Characterization and immobilization of protease secreted by the fungus Moorella speciosa. *3 Biotech*, *10*, 1-14.

de Souza Vandenberghe, L. P., Karp, S. G., Pagnoncelli, M. G. B., von Linsingen Tavares, M., Junior, N. L., Diestra, K. V., ... & Soccol, C. R. (2020). Classification of enzymes and catalytic properties. In *Biomass, biofuels, biochemicals* (pp. 11-30). Elsevier.

Dekker, P. (2019). Dairy enzymes. *Industrial Enzyme Applications*, 143-166.

Deng, J. J., Shi, D., Zhao, M., Li, Z. Q., Lu, D. L., Xu, S., ... & Luo, X. C. (2021). Recombinant neutral protease rNpI as fish feed additive to improve protein digestion and growth. *Aquaculture Research*, *52*(1), 273-281.

Deng, L., Wang, Z., Yang, S., Song, J., Que, F., Zhang, H., & Feng, F. (2016). Improvement of functional properties of wheat gluten using acid protease from Aspergillus usamii. *PLoS One*, *11*(7), e0160101.

Desmasures, N., & Batt, C. A. (2014). Encyclopedia of Food Microbiology.

determining protein concentration." Cold Spring Harbor Protocols 2020, no. 4 (2020): pdb-prot102269.

Dhital, R., Panta, O. P., & Karki, T. B. (2013). Optimization of cultural conditions for the production of pectinase from selected fungal strain. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, *8*, 65-70.

Dhital, R., Panta, O. P., & Karki, T. B. (2013). Optimization of cultural conditions for the production of pectinase from selected fungal strain. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, *8*, 65-70.

Dissanayaka, D. M. S., & Rathnayake, I. V. N. (2019). Effect of temperature, pH, carbon and nitrogen sources on extracellular protease production by four Geobacillus species isolated from Maha Oya geothermal springs in Sri Lanka. *Appli Microbiol Open Access*, *5*, 160.

dos Santos, W. M., Gomes, A. C. G., de Caldas Nobre, M. S., de Souza Pereira, Á. M., dos Santos Pereira, E. V., dos Santos, K. M. O., ... & Buriti, F. C. A. (2022). Goat milk as a natural source of bioactive compounds and strategies to enhance the amount of these beneficial components. *International Dairy Journal*, 105515.

Dudani, J. S., Warren, A. D., & Bhatia, S. N. (2018). Harnessing protease activity to improve cancer care. *Annual review of cancer biology*, *2*, 353-376.

El-Khonezy, M. I., Elgammal, E. W., Ahmed, E. F., & Abd-Elaziz, A. M. (2021). Detergent stable thiol-dependant alkaline protease produced from the endophytic fungus Aspergillus ochraceus BT21: Purification and kinetics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *35*, 102046.

El-Refai, H. A., Abdel-Naby, M. A., Mostafa, H., Amin, M. A., & Salem, H. A. A. (2017). Statistical optimization for tannase production by Mucor circinelloides isolate F6-3-12 under submerged and solid state fermentation. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, *11*(2), 167-180.

El-Refai, H. A., Abdel-Naby, M. A., Mostafa, H., Amin, M. A., & Salem, H. A. A. (2017). Statistical optimization for tannase production by Mucor circinelloides isolate F6-3-12 under submerged and solid state fermentation. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, *11*(2), 167-180.

Fang, Z., Yong, Y. C., Zhang, J., Du, G., & Chen, J. (2017). Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*, 7771-7779.

Fernandes, K. E., & Carter, D. A. (2017). The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens. *Frontiers in microbiology*, *8*, 2.

FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2003). Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A/Part B* (pp. 675-698). Boston, MA: Springer US.

Foda, M. S., Moharam, M. E., Ramadan, A., & El-Bendary, M. A. (2012). Over production of milk clotting enzyme from Rhizomucor miehei through adjustment of growth under solid state fermentation conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *6*(8), 579-589.
Foda, M. S., Moharam, M. E., Ramadan, A., & El-Bendary, M. A. (2012). Over production of milk clotting enzyme from Rhizomucor miehei through adjustment of growth under solid state fermentation conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *6*(8), 579-589.
Food, D. (2015). Using sweet whey for production of milk clotting enzyme by Mucor miehei NRRL 3420 in production of white soft cheese. *Sciences*, *5*(04), 1068-1081.

Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms*, *5*(3), 42.

Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., & Soccol, C. R. (2003). Characterization and stability of proteases from Penicillium sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and microbial technology*, *32*(2), 246-251.

Gobbetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2007). Bioactive peptides in dairy products. *Handbook of food products manufacturing*, *2*, 489-517.

Gomes, H. A., Moreira, L. R., & Edivaldo Filho, X. F. (2018). Enzymes and food industry: A consolidated marriage. In *Advances in biotechnology for food industry* (pp. 55-89). Academic Press.

Grażyna, C., Hanna, C., Adam, A., & Magdalena, B. M. (2017). Natural antioxidants in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, *70*(2), 165-178.

Green, A. A., & Hughes, W. L. (1955). [10] Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents.

Gruden, Š., & Poklar Ulrih, N. (2021). Diverse mechanisms of antimicrobial activities of lactoferrins, lactoferricins, and other lactoferrin-derived peptides. *International journal of molecular sciences*, *22*(20), 11264.

Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., & Shirkot, C. K. (2016). Immobilization of Bacillus amyloliquefaciens SP1 and its alkaline protease in various matrices for effective hydrolysis of casein. *3 Biotech*, *6*, 1-12.

Guo, Q., Chen, P., & Chen, X. (2023). Bioactive peptides derived from fermented foods: Preparation and biological activities. *Journal of Functional Foods*, *101*, 105422.

Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, *59*, 15-32.

Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International journal of biological macromolecules*, *128*, 254-267.

Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, *89*(1), 17-34.

Hakim, A., Bhuiyan, F. R., Iqbal, A., Emon, T. H., Ahmed, J., & Azad, A. K. (2018). Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from Bacillus subtilis AKAL7 and Exiguobacterium indicum AKAL11 by using organic municipal solid wastes. *Heliyon*, *4*(6).

Hamza, T. A. (2017). Bacterial protease enzyme: safe and good alternative for industrial and commercial use. *Int J Chem Biomol Sci*, *3*(1), 1-0.

Heydari, S., Hosseini, S. E., Mortazavian, A. M., & Taheri, S. (2023). Extraction of bioactive peptides produced in probiotic yoghurt and determination of their biological activities. *International Dairy Journal*, *139*, 105544.

https://wemarketresearch.com/reports/dairy-enzymes-market/1030/

Hussain, F., Kamal, S., Rehman, S., Azeem, M., Bibi, I., Ahmed, T., & Iqbal, H. M. (2017). Alkaline protease production using response surface methodology, characterization and industrial exploitation of alkaline protease of Bacillus subtilis sp. *Catalysis Letters*, *147*, 1204-1213.

Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J. L., Barbier, G., & Coton, E. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(4), 437-456.

Ikram-Ul-Haq, & Mukhtar, H. (2007). Biosynthesis of acid proteases by Penicillium griseoroseum IH-02 in solid-state fermentation. *Pakistan Journal of Botany*, *39*(7), 2717-2724.

Jensen, B., Nebelong, P., Olsen, J., & Reeslev, M. (2002). Enzyme production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, Thermomyces lanuginosus. *Biotechnology Letters*, *24*, 41-45.

Kamarudin, N. B., Sharma, S., Gupta, A., Kee, C. G., Chik, S. M. S. B. T., & Gupta, R. (2017). Statistical investigation of extraction parameters of keratin from chicken feather using Design-Expert. *3 Biotech*, *7*, 1-9.

Kennedy, A., Martinez, K., Schmidt, S., Mandrup, S., LaPoint, K., & McIntosh, M. (2010). Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. *The Journal of nutritional biochemistry*, *21*(3), 171-179.

Kielkopf, Clara L., William Bauer, and Ina L. Urbatsch. "Bradford assay for

Kindstedt, P. S. (2017). The history of cheese. Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics, 1-19.

Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*, *9*(16), 1309-1323.

Kleyn, D. H., Lynch, J. M., Barbano, D. M., Bloom, M. J., Mitchell, M. W., & Collaborators: Cooper LS Cusak E Fick M Hanks T Hesen MK Johnson J Kleyn DH Mercer F Monahan D Peat B Petit M. (2001). Determination of fat in raw and processed milks by the Gerber method: collaborative study. *Journal of AOAC international*, *84*(5), 1499-1508.

Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current pharmaceutical design*, *9*(16), 1297-1308.

Kranthi, V. S., Rao, D. M., & Jaganmohan, P. (2012). Production of protease by Aspergillus flavus through solid state fermentation using different oil seed cakes. *International Journal of Microbiological Research (IJMR)*, *3*(1), 12-15.

Kratz, M., Baars, T., & Guyenet, S. (2013). The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *European journal of nutrition*, *52*(1), 1-24.

Kucera M (1981) The production of toxic protease by the entomopathogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture. J Invertebr Pathol 38:33–38.

Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*, *17*(7), 561-594.

Kumar, L., & Jain, S. K. (2017). A Review on Environmental Pollution Mitigation by Fungal Proteases. *Research & Reviews: A Journal of Microbiology and Virology*, *7*(3), 32-37.

Kumar, L., & Jain, S. K. (2018). Proteases: a beneficial degradative enzyme in therapeutic applications. *Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences Vol*, *5*, 4.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. nature, 227(5259), 680-685.

Lam, M. Q., Nik Mut, N. N., Thevarajoo, S., Chen, S. J., Selvaratnam, C., Hussin, H., ... & Chong, C. S. (2018). Characterization of detergent compatible protease from halophilic Virgibacillus sp. CD6. *3 Biotech*, *8*, 1-9.

Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T. (2009). Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. *Chap. Microbiological spoilage of dairy products, pp. 41–46). New York: Springer Science+ Business Media, LLC*.

Li, A., Zheng, J., Han, X., Jiang, Z., Yang, B., Yang, S., ... & Sun, M. (2023). Health implication of lactose intolerance and updates on its dietary management. *International Dairy Journal*, 105608.

Li, A., Zheng, J., Han, X., Yang, S., Cheng, S., Zhao, J., ... & Lu, Y. (2023). Advances in Low-Lactose/Lactose-Free Dairy Products and Their Production. *Foods*, *12*(13), 2553.

Li, Y., Shuang, J. L., Yuan, W. W., Huang, W. Y., & Tan, R. X. (2007). Verticase: a fibrinolytic enzyme produced by Verticillium sp. Tj33, an endophyte of Trachelospermum jasminoides. *Journal of Integrative Plant Biology*, *49*(11), 1548-1554.

Limkar, M. B., Pawar, S. V., & Rathod, V. K. (2019). Statistical optimization of xylanase and alkaline protease co-production by Bacillus spp using Box-Behnken Design under submerged fermentation using wheat bran as a substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *17*, 455-464.

Lincoln, L., & More, S. S. (2017). Screening and Enhanced Production of neutral invertase from Aspergillus sp. by utilization of Molasses-A by-product of Sugarcane industry. *Advances in Bioresearch*, *8*(4).

Lincoln, L., Niyonzima, F. N., & More, S. S. (2015). Purification and properties of a fungal L-asparaginase from Trichoderma viride pers: SF GREY. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *4*(4), 310.

Liu, X., & Kokare, C. (2023). Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 405-444). Academic Press.

Liu, X., Wu, Y., Guan, R., Jia, G., Ma, Y., & Zhang, Y. (2021). Advances in research on calf rennet substitutes and their effects on cheese quality. *Food Research International*, *149*, 110704.

M.A. Manan, C. Webb, Design aspects of solid state fermentation as appliedto microbial bioprocessing, J. Appl. Biotechnol. Bioeng. 4 (2017) 511-532.

Macchione, M. M., Merheb, C. W., Gomes, E., & Da Silva, R. (2008). Protease production by different thermophilic fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *146*, 223-230.

Macchione, M. M., Merheb, C. W., Gomes, E., & Da Silva, R. (2008). Protease production by different thermophilic fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *146*, 223-230.

Machado, A. R. G., Teixeira, M. F. S., de Souza Kirsch, L., Campelo, M. D. C. L., & de Aguiar Oliveira, I. M. (2016). Nutritional value and proteases of Lentinus citrinus produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *23*(5), 621-627.

Maheshwari, R., Bharadwaj, G., & Bhat, M. K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and molecular biology reviews*, *64*(3), 461-488.

Mamo, J., & Assefa, F. (2018). The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. *Journal of Food Quality*, *2018*.

Mamo, J., & Assefa, F. (2018). The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. *Journal of Food Quality*, *2018*.

Mandujano-González, V., Villa-Tanaca, L., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2016). Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Revista Iberoamericana de Micología*, *33*(2), 76-82.
Mandujano-González, V., Villa-Tanaca, L., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2016). Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Revista Iberoamericana de Micología*, *33*(2), 76-82.
Masi, C., Chandramohan, C., & Ahmed, M. F. (2018). Immobilization of the magnetic nanoparticles with alkaline protease enzyme produced by Enterococcus hirae and Pseudomonas aeruginosa isolated from dairy effluents. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *60*.

Matar, C., LeBlanc, J. G., Martin, L., & Perdigón, G. (2003). Biologically active peptides released in fermented milk: role and functions. *Handbook of fermented functional foods*, *177*, 201.

Mehla, R. (2020). Bioactive peptides in fermented milk products and their functionality. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *9*(1), 2123-2126.

Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current pharmaceutical design*, *9*(16), 1289-1296.

Merheb, C. W., Cabral, H., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, Thermoascus aurantiacus, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, *104*(1), 127-131.

Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., & da Silva, R. (2010). Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated Thermomucor indicae-seudaticae N31:(Milk-clotting protease from the newly isolated Thermomucor indicae-seudaticae N31). *Food Chemistry*, *120*(1), 87-93.

Meshram, V., & Saxena, S. (2016). Potential fibrinolytic activity of an endophytic Lasiodiplodia pseudotheobromae species. *3 Biotech*, *6*(1), 114.

Meshram, V., Saxena, S., & Paul, K. (2016). Xylarinase: a novel clot busting enzyme from an endophytic fungus Xylaria curta. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, *31*(6), 1502-1511.

Meshram, V., Saxena, S., & Paul, K. (2016). Xylarinase: a novel clot busting enzyme from an endophytic fungus Xylaria curta. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, *31*(6), 1502-1511.

Meshram, V., Saxena, S., Paul, K., Gupta, M., & Kapoor, N. (2017). Production, purification and characterisation of a potential fibrinolytic protease from endophytic Xylaria curta by solid substrate fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, *181*, 1496-1512.

Miguel, A. M., Martins-Meyer, T. S., Figueiredo, E. V. D. C., Lobo, B. W. P., & Dellamora-Ortiz, G. M. (2013). Enzymes in bakery: current and future trends. *Food industry*, 287-321.

Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International dairy journal*, *21*(6), 377-401.

Minj, S., & Anand, S. (2020). Whey proteins and its derivatives: Bioactivity, functionality, and current applications. *Dairy*, *1*(3), 233-258.

Mir Khan, U., & Selamoglu, Z. (2020). Use of enzymes in dairy industry: a review of current progress. *Archives of Razi Institute*, *75*(1), 131-136.

Mir Khan, U., & Selamoglu, Z. (2020). Use of enzymes in dairy industry: a review of current progress. *Archives of Razi Institute*, *75*(1), 131-136.

Mohsin, A. Z., Norsah, E., Marzlan, A. A., Abd Rahim, M. H., & Hussin, A. S. M. (2023). Exploring the applications of plant-based coagulants in cheese production: A review. *International Dairy Journal*, 105792.

Mozzon, M., Foligni, R., Mannozzi, C., Zamporlini, F., Raffaelli, N., & Aquilanti, L. (2020). Clotting properties of Onopordum tauricum (Willd.) aqueous extract in milk of different species. *Foods*, *9*(6), 692.

Muchiri, M. N., McCartney, A. L., & Methven, L. (2020). Sensory profile and consumer preference of novel probiotic yoghurt enriched with orange sweet potato (Ipomoea batatas). *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, *20*(5), 16471-16489.

Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2021). Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*, *151*, 307-323.

Niranjana J., & Bavithara P. S. (2020) A Comparative Study on Screening Methods for the Detection of Protease Activity Containing Bacteria. *International Journal of Science and Research (IJSR). 9*, 1: 169-171.

Niyonzima, F. N., & More, S. (2015). Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *45*(3), 233-258.

Niyonzima, F. N., & More, S. S. (2013). Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by Aspergillus terreus gr. under submerged fermentation. *Int J Pharm Bio Sci*, *4*(1), 1016-1028.

Noor, Z. M., Ahmad, M. S., & Ariffin, Z. Z. (2016). Purification and characterisation of fibrinolytic enzymes from endophytic fungi and Lignosus rhinocerus. *J. Teknol*, *78*, 53-57.

O'Donnell, D., Wang, L., Xu, J., Ridgway, D., & Gu, T. (2001). Moo-YoungM. Enhanced heterologous protein production in Aspergillus niger through pH control of extracellular protease activity, Bichem Eng J, 8, 187-193.

Ojiagu, K. D., Odibo, F. J. C., Ojiagu, N. C., Agu, K. C., & Okafor, A. C. (2018). Biosorption of Hexavalent Chromium by Pseudomonas aeruginosa strain ANSC: Equilibria isothermic, kinetic and thermodynamic studies. *Bioeng. Biosci*, *6*(1), 1-10.

Oštarić, F., Antunac, N., Cubric-Curik, V., Curik, I., Jurić, S., Kazazić, S., ... & Mikulec, N. (2022). Challenging Sustainable and Innovative Technologies in Cheese Production: A Review. *Processes*, *10*(3), 529.

Pachauri, P., More, S., Aranganathan, V., Sullia, S. B., & Deshmukh, S. (2018). Kinetic study and characterization of cellulase enzyme from isolated Aspergillus niger subsp. awamori for cellulosic biofuels.

Parodi, P. W. (2006). Nutritional significance of milk lipids. In *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 601-639). Boston, MA: Springer US.

Patel, A. K., Dong, C. D., Chen, C. W., Pandey, A., & Singhania, R. R. (2023). Production, purification, and application of microbial enzymes. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 25-57). Academic Press.

Pathak, A. P., & Rathod, M. G. (2018). A review on alkaline protease producers and their biotechnological perspectives.

Perraudin, J. P. (2020). Lactoferrin production from bovine milk or cheese whey. Journal of Engineering and Applied Sciences Technology. SRC/JEAST-105. have been highlighted during all these years.

Philipps-Wiemann, P. (2018). Proteases—human food. In *Enzymes in human and animal nutrition* (pp. 267-277). Academic Press.

Pitt J.I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. – Australia: Published by Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, 1991. – 187 p; C.M. Visagie, J. Houbraken, 2014; Саттон, 2001

Polzonetti, V., Pucciarelli, S., Vincenzetti, S., & Polidori, P. (2020). Dietary intake of vitamin D from dairy products reduces the risk of osteoporosis. *Nutrients*, *12*(6), 1743.

Poza, M., Sieiro, C., Carreira, L., Barros-Velazquez, J., & Villa, T. G. (2003). Production and characterization of the milk-clotting protease of Myxococcus xanthus strain 422. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *30*(12), 691-698.

Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in microbiology*, *6*, 1177.

Prasanna, H. N., Ramanjaneyulu, G., & Rajasekhar Reddy, B. (2016). Optimization of cellulase production by Penicillium sp. *3 Biotech*, *6*, 1-11.

Putatunda, C., Kundu, B. S., & Bhatia, R. (2019). Purification and characterization of alkaline protease from Bacillus sp. HD292. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, *89*, 957-965.

Qasim, F., Diercks-Horn, S., Gerlach, D., Schneider, A., & Fernandez-Lahore, H. M. (2022). Production of a novel milk-clotting enzyme from solid-substrate Mucor spp. culture. *Journal of Food Science*, *87*(10), 4348-4362.

Qasim, F., Diercks-Horn, S., Gerlach, D., Schneider, A., & Fernandez-Lahore, H. M. (2022). Production of a novel milk-clotting enzyme from solid-substrate Mucor spp. culture. *Journal of Food Science*, *87*(10), 4348-4362.

Ramos-Pereira, J., Mareze, J., Patrinou, E., Santos, J. A., & López-Díaz, T. M. (2019). Polyphasic identification of Penicillium spp. isolated from Spanish semi-hard ripened cheeses. *Food Microbiology*, *84*, 103253.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, *62*(3), 597-635.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, *62*(3), 597-635.

Rapid purification of small molecule libraries by ion exchange chromatography. Tetrahedron letters, 38(19), 3357-3360.

Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., ... & Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food technology and biotechnology*, *56*(1), 16.

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *7*, 110.

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. Front Bioeng Biotechnol 7: 110.

Rodamilans, B., Shan, H., Pasin, F., & García, J. A. (2018). Plant viral proteases: beyond the role of peptide cutters. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 666.

Sakovich, V. V. (2020). Structural and functional peculiarities of aspartic proteases of basidiomycetes. *Biopolymers & Cell*, *36*(2), 87.

Salwan, R., & Sharma, V. (2019). Trends in extracellular serine proteases of bacteria as detergent bioadditive: alternate and environmental friendly tool for detergent industry. *Archives of microbiology*, *201*(7), 863-877.

Sandhya, A., Sridevi, A., Suvarnalatha, D., & Narasimha, G. (2015). Production and optimization of phytase by Aspergillus niger. *Pharm. Lett*, *7*, 148-153.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. *Process biochemistry*, *40*(8), 2689-2694.

Sathya, R., Pradeep, B. V., Angayarkanni, J., & Palaniswamy, M. (2009). Production of milk clotting protease by a local isolate of Mucor circinelloides under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *14*, 788-794.

Sattar, H., Bibi, Z., Kamran, A., Aman, A., & Qader, S. A. U. (2019). Degradation of complex casein polymer: production and optimization of a novel serine metalloprotease from Aspergillus niger KIBGE-IB36. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *21*, 101256.

Schulz, P., & Rizvi, S. S. (2023). Hydrolysis of lactose in milk: Current status and future products. *Food Reviews International*, *39*(5), 2875-2894.

Sharma, H., Ozogul, F., Bartkiene, E., & Rocha, J. M. (2023). Impact of lactic acid bacteria and their metabolites on the techno-functional properties and health benefits of fermented dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *63*(21), 4819-4841.

Sharma, N. (2019). A review on fungal alkaline protease. *J Emerg Tech Innov Res*, *6*(6), 1-14.
Sharma, N. (2019). A review on fungal alkaline protease. *J Emerg Tech Innov Res*, *6*(6), 1-14.
Sharma, P., Kaushik, N., Sharma, S., & Kumar, V. (2016). Isolation, screening, characterization and optimization of xylanase production from thermostable alkalophillic Fusarium sp. XPF5. *Journal of Biochemical Technology*, *7*(3), 1089.

Shellomith, A. S., & Preetha, B. (2018). Production of milk clotting enzyme by Penicillium camemberti using whey medium. *IOSR J. Biotechnol. Biochem*, *4*(1), 33-40.

Sidhu, A. K., Darade, S. B., Bhavsar, P. P., Gaikwad, V. B., & Patil, S. N. (2017). Isolation, screening and optimization for laccase production by Scytalidium lignicola pesante under submerged fermentation. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, *6*(4), 2477-2491.

Siegel, M. G., Hahn, P. J., Dressman, B. A., Fritz, J. E., Grunwell, J. R., & Kaldor, S. W. (1997).

Singh, A., Duche, R. T., Wandhare, A. G., Sian, J. K., Singh, B. P., Sihag, M. K., ... & Panwar, H. (2023). Milk-derived antimicrobial peptides: overview, applications, and future perspectives. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *15*(1), 44-62.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, *6*, 1-15.

Singh, S., & Bajaj, B. K. (2017). Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. *Energy, Ecology and Environment*, *2*, 370-386.

Sivakumar, T., Ravikumar, M., Prakash, M., & Shanmugaraju, V. (2013). Production of extracelluar invertase from Saccharomyces cerevisiae strain isolated from grapes. *Int J Curr Res Acad Rev*, *1*, 72-83.

Soares, M. J., Murhadi, L. L., Kurpad, A. V., Chan She Ping-Delfos, W. L., & Piers, L. S. (2012). Mechanistic roles for calcium and vitamin D in the regulation of body weight. *Obesity Reviews*, *13*(7), 592-605.

Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R., & Walia, A. (2021). Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, *11*(10), 428.

Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R., & Walia, A. (2021). Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, *11*(10), 428.

Souza, P. M. D., Bittencourt, M. L. D. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. D., Silveira, D., ... & Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*, 337-346.

Summer, A., Formaggioni, P., Franceschi, P., Di Frangia, F., Righi, F., & Malacarne, M. (2017). Cheese as functional food: The example of Parmigiano Reggiano and Grana Padano. *Food technology and biotechnology*, *55*(3), 277-289.

Sun, S. Y., & Xu, Y. (2009). Membrane-bound 'synthetic lipase'specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by Rhizopus chinensis: a comparative investigation. *Bioresource technology*, *100*(3), 1336-1342.

Tadesse, S. A., & Emire, S. A. (2020). Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. *Heliyon*, *6*(8)

Troch, T., Lefébure, É., Baeten, V., Colinet, F., Gengler, N., & Sindic, M. (2017). Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, *21*.

Alongi, M., & Anese, M. (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. *Journal of Functional Foods*, *81*, 104466.

Varghese, S. L., Mayuri, T. and Balaji, J. 2023. An Overview on Dairy based Functional Foods. Vigyan Varta 4(4): 98-100.

Gerosa, S., & Skoet, J. (2012). Milk availability: trends in production and demand and medium-term outlook.

Michaelidou, N., & Hassan, L. M. (2008). The role of health consciousness, food safety concern and ethical identity on attitudes and intentions towards organic food. *International journal of consumer studies*, *32*(2), 163-170.

Pereira, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, *30*(6), 619-627.

Górska-Warsewicz, H., Rejman, K., Laskowski, W., & Czeczotko, M. (2019). Milk and dairy products and their nutritional contribution to the average polish diet. *Nutrients*, *11*(8), 1771.

Tunick, M. H., & Van Hekken, D. L. (2015). Dairy products and health: recent insights. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(43), 9381-9388.

Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International dairy journal*, *21*(6), 377-401.

Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Walther, B., & Wechsler, D. (2008). Occurrence of the angiotensin-converting enzyme–inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *Journal of Dairy Science*, *91*(1), 29-38.

Timon, C. M., O'Connor, A., Bhargava, N., Gibney, E. R., & Feeney, E. L. (2020). Dairy consumption and metabolic health. *Nutrients*, *12*(10), 3040.

Tung, Y. T., Chen, H. L., Yen, C. C., Lee, P. Y., Tsai, H. C., Lin, M. F., & Chen, C. M. (2013). Bovine lactoferrin inhibits lung cancer growth through suppression of both inflammation and expression of vascular endothelial growth factor. *Journal of dairy science*, *96*(4), 2095-2106.

Tunick, M. H., & Van Hekken, D. L. (2015). Dairy products and health: recent insights. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(43), 9381-9388.

Uday, M. M., Bennur, R. S., Veena, S. M., Niyonzima, F. N., & More, S. S. (2013). Isolation and characterization of β-amylase from Penicillium nigricans. *BTAIJ*, *7*, 85-88.

Usha, K. Y., Praveen, K., & Reddy, B. R. (2014). Enhanced production of ligninolytic enzymes by a mushroom Stereum ostrea. *Biotechnology Research International*, *2014*.

Vijayaraghavan P., & Vincent, S. G. P. (2013) A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. *Journal of Biochemical Technology*. *4*, 3: 628-630.

Maitig, A. M. A., Alhoot, M. A., & Tiwari, K. (2018). Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, *12*(4).

Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., & Singh, S. A. (2010). Production and characterization of a milk-clotting enzyme from Aspergillus oryzae MTCC 5341. *Applied microbiology and biotechnology*, *85*, 1849-1859.

Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., & Singh, S. A. (2010). Production and characterization of a milk-clotting enzyme from Aspergillus oryzae MTCC 5341. *Applied microbiology and biotechnology*, *85*, 1849-1859.

Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., & Singh, S. A. (2010). Production and characterization of a milk-clotting enzyme from Aspergillus oryzae MTCC 5341. *Applied microbiology and biotechnology*, *85*, 1849-1859.

Vishwanatha, K. S., Rao, A. A., & Singh, S. A. (2009). Characterisation of acid protease expressed from Aspergillus oryzae MTCC 5341. *Food chemistry*, *114*(2), 402-407.

Voronina, O. A., Bogolyubova, N. V., & Zaitsev, S. Y. (2022). MINERAL COMPOSITION OF COW MILK—A MINI REVIEW.

Wajeeha, A. W., Asad, M. J., Mahmood, R. T., Zainab, T., Nazir, S., Khan, J., ... & Rizwan, M. (2021). Production, Purification, and Characterization of Alkaline Protease from Aspergillus flavus and its Compatibility with Commercial Detergents. *BioResources*, *16*(1).

Wakabayashi, H., Takase, M., & Tomita, M. (2003). Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Current pharmaceutical design*, *9*(16), 1277-1287.

Wu, T. Y., Mohammad, A. W., Jahim, J. M., & Anuar, N. (2006). Investigations on protease production by a wild-type Aspergillus terreus strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(6), 1223-1229.

Yadav, S. K., Bisht, D., Tiwari, S., & Darmwal, N. S. (2015). Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from Aspergillus flavus MTCC 9952 mutant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *4*(4), 667-677.

Yegin, S., & Dekker, P. (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Science & Technology*, *93*, 565-594.

Yegin, S., Goksungur, Y., & Fernandez-Lahore, M. (2012). Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of Mucor mucedo DSM 809. *Food chemistry*, *133*(4), 1312-1319.

Yusuf, I., Ahmad, S. A., Phang, L. Y., Yasid, N. A., & Shukor, M. Y. (2019). Effective production of keratinase by gellan gum-immobilised Alcaligenes sp. AQ05-001 using heavy metal-free and polluted feather wastes as substrates. *3 Biotech*, *9*, 1-12.

Zhang X., Shuai Y., Tao H., Li C., He L. (2021) Novel Method for the Quantitative Analysis of Protease Activity: The Casein Plate Method and Its Applications. *ACS omega*. 6, 5: 3675-3680.

Гурьянов, И. Д., & Юсупова, Д. В. (2008). Токсикологические эффекты бактериального пигмента продигиозина. *Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки*, *150*(2), 120-125.

Голубева, Л. В., & Долматова, О. И. (2010). Производственный учет и отчетность в молочной отрасли: учеб. пособие. *СПб.: Гиорд*, 634.

Липатов, Н. Н. Производство творога, Россия, 1973 г.