



CREATION OF AN OPTIMAL FOOD ENVIRONMENT FOR THE ISOLATION OF MELANIN FROM MELANIN-STORING BACTERIA STRAINS OF THE GENUS AZOSPIRILLUM

Rakhimova K.A.

Tashkent Pharmaceutical Institute

<https://doi.org/10.5281/zenodo.10929561>

ARTICLE INFO

Received: 30th March 2024

Accepted: 03rd April 2024

Online: 04th April 2024

KEYWORDS

Melanin, potatoes, peptone,
nutrient media, Azospirillum
bacteria.

ABSTRACT

First of all, we are comparing the 2 methods used for separating melanin, we consider the 2nd method to be optimal. Because of this, 2 methods require less reagents and equipment than 1 method, and the time required for melanin separation is much shorter. In addition, it was noted that the sensitivity of the detection of melanin formation in the 2nd method is slightly higher than that of the 1st method. In both methods, it was determined that A4-13 and C17-1 strains synthesize the most melanin.

MELANIN SAQLOVCHI AZOSPIRILLUM AVLODIGA MANSUB BAKTERIYA SHTAMMLARIDAN MELANIN AJRATISH UCHUN OPTIMAL OZUQA MUHITINI YARATISH

Raximova K.A.

Toshkent farmatsevtika Instituti

E-mail : komolarahimova837@gmail.com Tel: +998907882562

<https://doi.org/10.5281/zenodo.10929561>

ARTICLE INFO

Received: 30th March 2024

Accepted: 03rd April 2024

Online: 04th April 2024

KEYWORDS

Melanin, kartoshka, pepton,
ozuqa muhitlari, Azospirillum
bakteriyasi.

ABSTRACT

Melanin ajratish bo'yicha qo'llanilgan 2 ta usul solishtirilganda, 2-usulni optimal deb xisoblaymiz. Bunga sabab, 2 usulda 1 usulga nisbatan kamroq reagentlar va asbob—uskunalar talab qiladi hamda melanin ajratishga ketadigan vaqt ancha qisqaradi. Bundan tashqari, 2-usulda melaninni hosil bo'lishini aniqlash sezgirligi 1-usulga nisbatan biroz bo'lsada yuqori ekanligi qayd etildi. Xar ikkala usulda xam melaninni eng ko'p sintez qiladigan A4-13 va C17-1 shtammlari ekanligi aniqlandi. Shunday qilib, dinamikada o'stirilgan stammning tajribada qo'llanilgan oziqa muhitlar o'rtasida melaninni yuqori sintez qilishi kartoshka va temir sitratli oziqa muhiti optimal ekanligi aniqlandi.



KIRISH. Melanin ishlab chiqarish Yerning o'zgaruvchan sharoitlariga tirik organizmlarning eng universal, ammo ayni paytda sirli moslashuvlaridan biridir. Deyarli har bir yirik takson vakillarida turli xil melaninlar mavjudligi melanogenezning evolyutsion ahamiyatini ko'rsatadi. Hozirga qadar ushbu jarayonning asosiy va asosiy vazifasi va uning mahsuloti to'g'risida, hattoki uning asosiy yoki yon ta'siri sifatidagi xususiyati to'g'risida kelishuvga erishilmagan. Buning aksi - bu doimiy munozara va bahs mavzularidan hisoblanadi[1].

Yuqori hayvonlarda va odamda melanogenezning biologiyasi, genetikasi va tibbiy ta'siri haqida ko'plab tadqiqotlar mavjud [3]. Mikroorganizmlardagi melanogen yo'llar haqida juda kam narsa ma'lum. Ushbu hodisalarning amaliy oqibatlarini bizni ushbu mavzuga e'tibor qaratishga va hech bo'lmaganda eng muhim misollarni taqdim etishga undadi. Bu yuqori organizmlarda ham melanogenez evolyutsiyasiga yangi yorug'lik kiritishi mumkin.

Tabiiy manbalardan olingan melanin biologik faolliklarning keng spektriga ega ekanligi haqida xabar beradi, ular ultrabinafsha nurlanishidan himoya qilish, fermentativ lizis, oksidlovchilarning shikastlanishi, patogenlar tomonidan dorilarga chidamliligi, hasharotlarni bakteriyalardan himoya qilish va virusga qarshi himoya [4, 7]. Bundan tashqari, melanin xelat metall ionlari ekanligi va fiziologik oksidlanish-qaytarilish tamponi vazifasini bajarishi ko'rsatilgan [6]. Kosmetik vositalar va quyoshdan himoya qiluvchi vositalarda melaninidan foydalanish ko'plab ishlab chiqaruvchilar tomonidan ushbu molekulalarning teridagi tabiiy rolini taqlid qilish uchun qabul qilingan. Quyoshdan himoya qiluvchi kremning himoya effekti Quyoshdan himoya qilish faktori (SPF) shkalasi yordamida baholanadi va SPF qiymatining yuqoriligi himoya qobiliyatini yaxshilaydi deb o'ylashadi. Huang va boshq. [2] Cinnamomum burmannii va Osmanthus fragranslari mevalaridan melanin ekstraktlari qo'shilishi bilan jel formulalarining SPF qiymati oshganligini ko'rsatdi.

Turli xil manbalardan olingan melaninlar sezilarli antioksidant ta'sir ko'rsatadi [8]. Melaninning superoksid anionlari va singlet kislorod turlarini tozalash yoki o'chirish molekulasida roli Tada M va boshq. (2010) [8] melanin ma'lum fiziologik reaksiyalarda hosil bo'lgan reaktiv kislorod turlari bilan o'zaro ta'sirlashishini ko'rsatish uchun ESR va spektrofotometrik usullardan foydalangan. Ushbu antioksidant melaninlar tarkibiga Cinnamomum burmannii va Osmanthus fragrans mevalaridan ekstraktlar kiradi, ular konsentratsiyaga bog'liq bo'lgan metallarni xelatlash faoliyatiga ham ega. Hoogduijn va boshq. (2003) [9] melanin melanotsitlar va keratinotsitlarni vodorod peroksididan kelib chiqqan DNK shikastlanishidan himoya qiladi, bu pigment terida muhim antioksidant rolga ega ekanligini ko'rsatdi. Choy barglaridan ajratib olingan melanin past zichlikdagi lipoproteinlarning oksidlanishini inhibe qilganligi aniqlandi, bu melaninning peroksil radikallariga qarshi inhibitiv ta'siri g'oyasini qo'llab-quvvatlaydi [10].

Hayvonlarning melaninini oshqozonga ta'siri haqida ilgari o'tkazilgan tadqiqotlar Ommastrephes bartrami Lesuel oshqozon shilliq qavatida fenilbutazon hosil bo'lgan yarani va kalamushlarda me'da shirasining sekretsiasini inhibe qilgan [8]. Oshqozon sog'lig'iga o'xshash foyda melanin o'z ichiga olgan Nigella sativa urug'ining suvli suspenziyasi yordamida olingan. Bundan tashqari, melanin indometazin kabi nekrotizan moddalar tomonidan kelib chiqadigan oshqozon yarasi paydo bo'lishining oldini oladi. Bundan tashqari, melanin etanol bilan susaygan me'da hujayralari devorlarida shilimshiq miqdorini to'ldirishga yordam beradi.



Yaqinda *Nigella sativa* urug'idan olinadigan sof melanin alkogol, indometazin, stress yoki stress va aspirinning birgalikda yaraliogen ta'siridan kelib chiqadigan yaralardan kuchli himoya qiladi [9].

Azospirillum (lot. Azospirillum) - alfa-proteobakteriyalar sinfiga kiruvchi Rhodospirillaceae oilasiga mansub bakteriyalar. Ushbu bakteriyalar azotni o'simliklarning ildizlari bilan biriktirilishiga yordam beradi, bu azo- (frantsuz tilidan - azot) prefiksida aks etadi, bu esa ildizlarning suvni ushlab turish qobiliyatini oshiradi va umuman ildiz tizimining o'sishini kuchaytiradi.

Azospirillum qalinlashgan vibrionlar yoki kattaligi 0,9-1,2 mikronli, ko'pincha uchlari uchli tekis tayoqchalarga o'xshaydi. Grammi bo'yash grammusbatdan grammusbatga natijalar beradi. Bakteriyalar tarkibida hujayra ichidagi poli-b-gidroksibutirat granulari mavjud. Bakteriyalar juda harakatchan, suyuq muhitda ular bitta qutbli flagellum yordamida o'ziga xos spiral harakatni amalga oshiradilar. Ba'zi turlarda, 30 ° C da, qutbli flagellumdan tashqari, lateral flagella ham hosil bo'ladi. Kartoshka maydonidagi ba'zi shtammlarning koloniyalari ochto'q pushti rangga ega. Bakteriyalarni ko'paytirish uchun optimal harorat 34 dan 37°C gacha o'zgarib turadi. Ba'zi shtammlar pH 7.0 da yaxshi o'sadi, boshqalari ko'proq kislotali sharoitlarni afzal ko'rishadi.

Azospirillum bakteriyalari - bu mikroaerobik sharoitda N₂ ga bog'liq holda o'sishga qodir bo'lgan azot fiksatorlari. Ammoniy tuzlari kabi qattiq azot manbai mavjud bo'lganda havoda yaxshi o'sadi. Metabolizm, qoida tariqasida, oxirgi elektron akseptori sifatida kisloroddan foydalangan holda nafas olish turiga kiradi va ba'zi shtammlarda NO₃ ham mavjud. Ular zaif fermentatsiya qobiliyatini ham ko'rsatishi mumkin. Kuchli O₂ tanqisligi sharoitida ba'zi shtammlar NO₃ va N₂ ning dissimilyatsion kamayishini amalga oshirishi mumkin. Bakteriyalar oksidaz-musbat va ximoorganotroflardir, ammo ba'zi turlari molekulyar vodorodni oksidlovchi fakultativ avtotroflardir. Malat, suksinat, laktat va piruvat kabi organik kislotalarning tuzlaridan foydalanish tufayli yaxshi o'sadi; ba'zi uglevodlarni uglerod manbai sifatida ishlatishi mumkin. Bir qator shtammlar biotin talab qiladi. Ular tuproqda erkin yashovchan shakllar yoki o'tlar, don va tup o'simliklarning ildizlari bilan birlashma sifatida uchraydi. Ildiz tugunlarining hosil bo'lishi induksiya qilinmaydi.

Ilmiy ishning maqsadi. Melanin saqlovchi Azospirillum avlodiga mansub bakteriya shtammlaridan melanin ajratish uchun optimal ozuqa muhitni yaratishdan iborat.

Usul va uslublar. Tadqiqot davomida tanlangan hujayra tashqarisiga sintezlanadigan melaninni ekstraksiya qilish va tozalash bo'yicha ishlatilgan reaktivlar: Filtr qog'oz; 0.5 mol/l NH₃·H₂O; 1 mol/l HCl; 6 mol/l HCl; 1 mol/L NH₃·H₂O; xloroform, etilasetat va absolyut etanol ishlatilindi.

Tajriba qismi. Avvalo ilmiy tadqiqot ishlarni boshlash uchun 250 ml konussimon kolbaga 5 ml ozuqa muhitiga fermentatsiya uchun shtammi inokulyasiya qilindi, so'ngra 4 kun davomida 200 aylanish/daqiqa tezligidagi chayqatgichda o'stirildi. 5 l fermentyorda fermentatsiya uchun inokulyumdan foydalanildi.

Fermentyorda – 8 kun 25°C da va 200 aylanish/daqiqada aralashtirishda o'stirildi. Kulturani fermentatsiyasining oxirida 2-3 marta qog'oz filtr orqali filtrlandi. Filtrat 1:1 nisbatda 0.5 mol/l NH₃·H₂O bilan aralashtirildi. 80°C da suv hammomida 2 soatda ekstraksiyalandi, 1 mol/l HCl bilan pH 2-3 gacha olib borildi, 25°C da 24 soatda saqladik. Aralashma 5000



aylanishda 15 daqiqa tsestrifugalandi va ho'l melanin yig'ib olindi. Keyin uni 6 mol/l HCl da, 100 °C da 4 soat davomida gidrolizlandi va 5000 aylanishda 15 daqiqada tsestrifugalandi. Cho'kma suv bilan pH neytral bo'lgunga qadar yaxshilab yuvildi, so'ngra u 1 mol/l NH₃·H₂O da eritildi, bug'lantirilib, so'ngra keragidan ortiq xloroform, etilasetat va absolyut etanol bilan ekastraksiyalandi. Suyuq ekstrakt 1 mol/l HCl bilan pH 2-3 ga etkazildi, 5000 aylanishda 15 minutda sentrifugalandi.

Melanin sintezi optimallashtirish uchun tanlangan oziqa muhitlari tarkibi

1-jadval

№1 - Kartoshkali ozuqa muhiti

№	Kerakli reaktivlar	1-litrغا solinadigan hajmi	pH
1	H ₂ O	1-litr	
2	Kartoshka yoki kartoshka po'stlog'i	100 gr	7 yoki 7.2

Kartoshkali ozuqa muhitini tayyorlash uchun toza sterill idishga 100gr kartoshka solidik, ustidan 1 litr disstillangan suv solib 1- soat davomida qaynatildi. Xona haroratida sovitildi.Kartoshkalar suzib olinib yana ozuqani hajmini 1-litrغا yetkazdik.Ozuqani pH ko'rsatkichi o'lchanib pH 7 yoki 7.2 ga yetkazildi.So'ngra kolbalarga quyib chiqib avtoklavda 1-soat davomida sterillandi. Kulturalarni ekish uchun sterill boksda sterill sharoitda ekildi.

2-jadval

№2 - Kartoshka va pepton ozuqa muhiti

№	Kerakli reaktivlar	1-litrغا solinadigan hajmi	pH
1	H ₂ O	1-litr	
2	Kartoshka yoki kartoshka po'stlog'i	100 gr	
3	Pepton	1 gr	7 - 7.2

Kartoshkali ozuqa muhitini tayyorlash uchun toza sterill idishga 100gr kartoshka solidik, ustidan 1 litr disstillangan suv solib 1-soat davomida qaynatildi. Hona haroratida sovitildi.Kartoshkalar suzib olinib yana ozuqani hajmini 1-litrغا yetkazdik.Peptondan 1 grammdan qo'shildi. Ozuqani pH ko'rsatkichi o'lchanib pH 7 yoki 7.2 ga yetkazildi.So'ngra kolbalarga quyib chiqib avtoklavda 1-soat davomida sterillandi.Kulturalarni ekish uchun sterill boksda sterill sharoitda ekildi.

3-jadval

№3. Kartoshka va acchitqi ozuqa muhiti tarkibi



No	Kerakli reaktivlar	1-litrğa solinadigan hajmi	pH
1	H ₂ O	1-litr	
2	Kartoshka yoki kartoshka po'stlog'i	100 gr	
3	Xamirturush ekstrakti	1 gr	7 yoki 7.2

Kartoshkali va achitqili ozuqa muhitini tayyorlash uchun toza sterill idishga 100gr kartoshka solidik, ustidan 1 litr disstillangan suv solib 1- soat davomida qaynatildi.Xona haroratida sovitildi.Kartoshkalar suzib olinib yana ozuqani hajmini 1-litrğa yetkazdik.1-gramm achitqi ekstrakti solindi. Ozuqani pH ko'rsatkichi o'lchanib pH 7 yoki 7.2 ga yetkazildi.So'ngra kolbalarga quyib chiqib avtoklavda 1-soat davomida sterillandi.Kulturalarni ekish uchun sterill boksda sterill sharoitda ekildi. Xamirturush ekstrakti fermentlarning ta'sirida yoki qizdirilganda xamirturushning parchalanishi natijasida hosil bo'lgan erkin peptidlar va aminokislotalarning suvda eruvchan qismi. Xamirturush ekstraktlari dastlab pekmezda etishtirilgan novvoy yoki pivo xamirturushlari madaniyatidan ishlab chiqariladi .Ekstrakt xamirturushga o'xshash, ammo achchiq ta'mga ega va go'shtli bulonga o'xshaydi (umami). U nonga ziravor, ziravor va xushbo'ylashtiruvchi vosita sifatida ishlatiladi Xamirturush ekstraktining asosiy tarkibiy qismlari oqsillarni parchalanish mahsulotlari (peptidlar, erkin aminokislotalar) va nukleotidlardir. Misol tariqasida avtoliz usuli bilan olingan xamirturush ekstraktining tarkibi 70% quruq moddalar tarkibida keltirilgan. Ekstrakti tarkibidagi aminokislotalar orasida glutamik kislota katta miqdorni egallaydi. Quruq moddadagi aminokislotalarning nisbati jadvalda keltirilgan.

4-jadval

№4. Kartoshka va temir sitratli ozuqa muhiti tarkibi

No	Kerakli reaktivlar	1-litrğa solinadigan hajmi	pH
1	H ₂ O	1-litr	
2	Kartoshka yoki kartoshka po'stlog'i	100 gr	
3	Temir sitrat	0.25 gr	7 yoki 7.2

Kartoshkali va achitqili ozuqa muhitini tayyorlash uchun toza sterill idishga 100gr kartoshka solidik, ustidan 1 litr disstillangan suv solib 1- soat davomida qaynatildi.Xona haroratida sovitildi.Kartoshkalar suzib olinib yana ozuqani hajmini 1-litrğa yetkazdik.0.25 gramm temir sitrati solindi. Ozuqani pH ko'rsatkichi o'lchanib pH 7 yoki 7.2 ga yetkazildi.So'ngra kolbalarga quyib chiqib avtoklavda 30 daqiqa davomida sterillandi.Kulturalarni ekish uchun sterill boksda sterill sharoitda ekildi. Temir (III) sitrat - bu organik birikma, FeC₆H₅O₇ formulali temir va limon kislotasining tuzi, qizil-jigarrang kristallar, suvda eriydi, kristalli gidrat hosil qiladi.

5-jadval

№3. Kartoshka, pepton, achitqi va temir sitratli ozuqa muhiti tarkibi



No	Kerakli reaktivlar	1-litrğa solinadigan hajmi	pH
1	H ₂ O	1-litr	
2	Kartoshka yoki kartoshka po'stlog'i	100 gr	
3	Temir sitrat	0.25 gr	
4	Achitqi ekstrakti	1 gr	
5	Pepton	1 gr	7 yoki 7.2

Kartoshkali va achitqili ozuqa muhitini tayyorlash uchun toza sterill idishga 100gr kartoshka solidik, ustidan 1 litr disstillangan suv solib 1- soat davomida qaynatildi.Xona haroratida sovitildi.Kartoshkalar suzib olinib yana ozuqani hajmini 1-litrğa yetkazdik.1-gramm achitqi ekstrakti,0.25 gramm temir sitrati,1 gramm pepton solindi. Ozuqani pH ko'rsatkichi o'lchanib pH 7 yoki 7.2 ga yetkazildi.So'ngra kolbalarga quyib chiqib avtoklavda 1-soat davomida sterillandi.Kulturalarni ekish uchun sterill boksda sterill sharoitda ekildi.

Ushbu oziqa muhitlari 121 °C haroratda 30 daqiqa davomida sterilizatsiya qilindi. So'ngra steril boksda *Azospirillum* bakteriyasining A4-13; A13-5; A13-8; A15-5; C17-1 shtamlari ekildi. Keyin bu shtamlarni o'stirish uchun 30°C haroratda 15 kun davomida termostatda o'stirdik va har 5 kunda namuna olib tekshirdik.

Xulosa. Hulosa o'rnida shuni aytib o'tish mumkinki, 2-usulda melaninni hosil bo'lishini aniqlash sezgirligi 1-usulga nisbatan biroz bo'lsada yuqori ekanligi qayd etildi. Xar ikkala usulda xam melaninni eng ko'p sintez qiladigan A4-13 va C17-1 shtamlari ekanligi aniqlandi.Shunday qilib, dinamikada o'stirilgan stammning tajribada qo'llanilgan oziqa muhitlar o'rtasida melaninni yuqori sintez qilishi kartoshka va temir sitratli oziqa muhiti optimal ekanligi aniqlandi. Ajratib olingan toza melanin asosida dori vositalari uchun asos bo'lib hizmat qiladi.

References:

1. Park JY, Shigenaga MK, Ames BN. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo (3,2-b) carbazole is associated with oxidative DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93:2322-7.
2. Protective Effects of Tea Melanin against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Induced Toxicity: antioxidant Activity and Aryl Hydrocarbon Receptor Suppressive Effect. Biol Pharm Bull 2006;29:2284-91.
3. Avramidis A, Kourounakis A, Hadjipetrou L, Senchuk V. Antiinflammatory and immunomodulating properties of grape melanin. Inhibitory effects on paw edema and adjuvant induced disease. Arzneimittelforschung 1998;48:764-71.
4. El-Obeid A, Kamal El Din E, Abdelhalim MAK, Haseeb A. Protective action of herbal melanin against carbon tetrachloride induced Hepatotoxicity. Proc. of the Third Intl. Conf. on Advances in Applied Science and Environmental Engineering 2015;1:6.
5. Kamei H, Koide T, Kojima T, Hasegawa M, Umeda T. Suppression of growth of cultured malignant cells by all melanins, plantproduced melanins. Cancer Biother Radiopharm 1997;12:47-9.



6. Kamei H, Koide T, Hashimoto Y, Kojima T, Hasegawa M, Umeda T. Effect of all melanin on tumor growth suppression in vivo and on the cell cycle phase. *Cancer Biother Radiopharm* 1997;12:273–6.
7. Offen D, Ziv I, Barzilai A, Gorodin S, Glater E, Hochman A et al. Dopamine-melanin induces apoptosis in PC12 cells; possible implications for the etiology of Parkinson's disease. *Neurochem Inter* 1997;31:206–17.
8. Blinova MI, Yudintseva NM, Kalmykova NV, Kuzminykh EV, Yurlova NA, Ovchinnikova OA et al. Effect of melanins from black yeast fungi on proliferation and differentiation of cultivated human keratinocytes and fibroblasts. *Cell Biol Int* 2003;27:135–46.
9. Mimura T, Itoh S, Tsujikawa K, Nakajima H, Satake M, Kohama Y et al. Studies on biological activities of melanin from marine animals. Anti-inflammatory activity of low-molecular-weight melanoprotein from Squid (Fr. SM II) . *Chem Pharm Bull* 1987;35:1144–50.
10. El-Obeid A, ELTahirb KH, Haseeb AM. Anti-inflammatory effects of *Nigella sativa* L. Melanin. *World J Pharm Res* 2016;5:155–61.