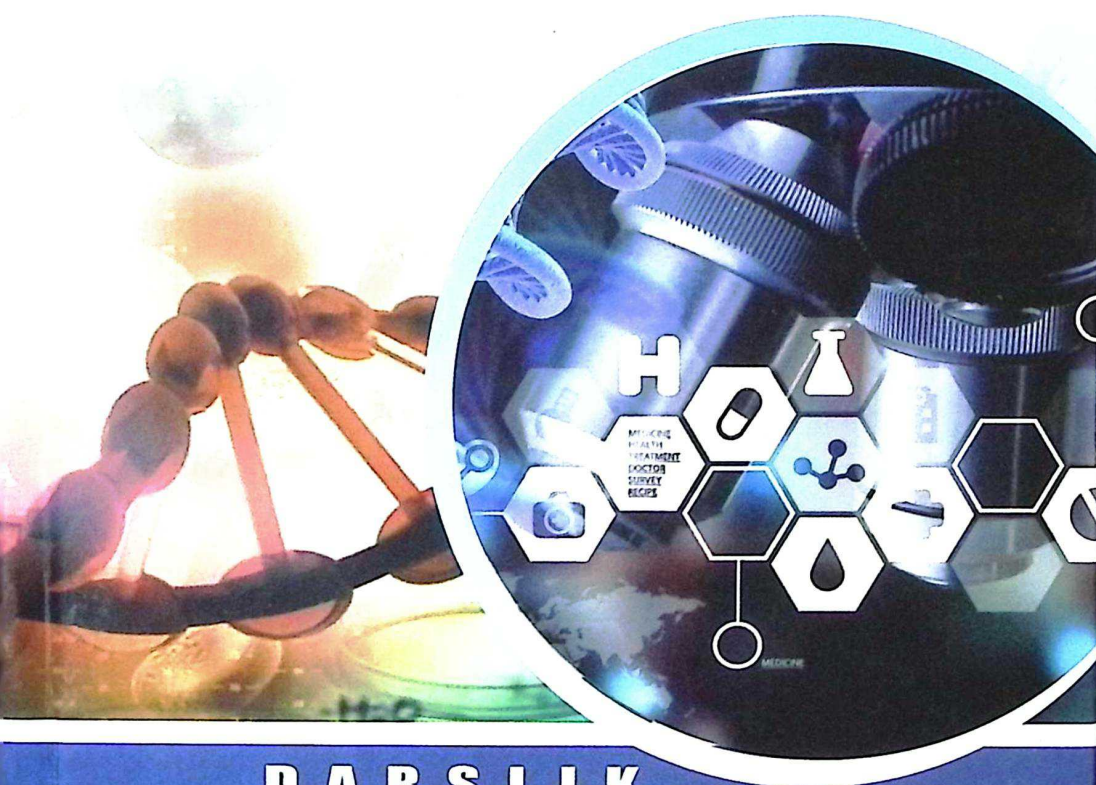


60 (045.8)
7-29

Sh.S. Tashmuxeamedova
Z.A. Kadirova

BIOTEKNOLOGIYA



D A R S L I K

0(075.8)

29

**O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIIY TA'LIM, FAN VA INNOVATSIYALAR
VAZIRLIGI**

**MIRZO ULUG'BEK NOMIDAGI
O'ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI**

SH.S. TASHMUXAMEDOVA, Z.A. KADIROVA

BIOTEXNOLOGIYA

DARSLIK

60510100 – Biologiya (turlari bo'yicha)



**Toshkent
«Mehr-nuri nashriyoti»
2024**

UO'K 60(075.8)
KBK 30.16ya73
T 29

Tashmuxeamedova, Sh.S.

Biotexnologiya [Matn]: darslik / Sh.S. Tashmuxeamedova,
Z.A. Kadirova. – Toshkent: «Mehr-nuri nashriyoti», 2024. –
272 b.

Darslik “Biotexnologiya” fani dasturiga muvofiq yozilgan bo‘lib, unda ushbu fanning maqsadi va vazifalari, tadqiqot usullari va uning asosiy yo‘nalishlari yoritilgan. Shuningdek, fanning boshqa turli sohalardagi muammolarni yechishda tutgan o‘rni, turli sohalarda ishlatiladigan fermentlarning o‘ziga xos xususiyatlari, o‘simlik va hayvon organlaridan fermentlar ajratib olish usullari, biospetsifik sorbentlar haqida tushuncha va ular asosida yaratilgan texnologik jarayonlar, organizm (in vivo) gen injenerligi, genlar tuzilishi va ekspressiyaning boshqarilishi, rekombinant DNK olish texnologiyasi, o‘simlik va hayvon gen muhandisligi haqidagi ma‘lumotlardan iborat.

Mas‘ul muharrir:

Eshova X. – biologiya fanlari doktori, professor

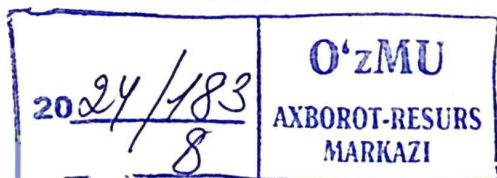
Taqrizchilar:

Kuchkarova L.S. – biologiya fanlari doktori, professor

Yakubov M.D. – biologiya fanlari nomzodi

UO'K 60(075.8)
KBK 30.16ya73

ISBN 978-9910-8801-6-2



© «Mehr-nuri nashriyoti», 2024.
© Sh.S. Tashmuxeamedova,
Z.A. Kadirova.

BIOTEXNOLOGIYA (DARSLIK)

“Biotexnologiya” nomli darslik biologiya (Ta’lim yo’nalishi – 5140100 Biologiya) va biotexnologiya yo’nalishi (Ta’lim mutaxassisligi – 70510103 Biotexnologiya) bo’yicha tahsil olayotgan bakalavrlar, magistrlar va shuningdek, ushbu sohada faoliyat ko’rsatayotgan ilmiy tadqiqotchilar uchun mo’ljallangan. Ushbu darslik biotexnologiya fanining maqsadi va vazifalari, fanning tadqiqot usullari, asosiy obyektlari, shuningdek, fermentlarning o’ziga xos xususiyatlari, biospetsifik sorbentlar, organizm (*in vivo*) gen injenerligi, o’simlik va hayvon gen muhandisligi haqidagi ma’lumotlardan iborat.

Учебник «Биотехнология» предназначен для бакалавров, магистрантов и научных исследователей, обучающихся в области биологии биология (Направление -5140100 Биология) и биотехнологии йўналиши (Образовательная специальность – 70510103 Биотехнология). В данном учебнике описаны цели и задачи биотехнологической науки, методы исследования, основные объекты науки, а также специфические свойства ферментов, биоспецифические сорбенты, генная инженерия организма (*in vivo*), генная инженерия растений и животных.

The "Biotechnology" (Field of study-5140100 Biology) is intended for bachelors, masters and scientific researchers studying in the field of biology and biotechnology (Educational specialty – 70510103 Biotechnology). This textbook describes the goals and objectives of biotechnological science, research methods, the main objects of science, the role of science in solving problems in other areas and its main directions, as well as the specific properties of enzymes, biospecific sorbents, genetic engineering of an organism (*in vivo*), genetic engineering of plants and animals.

I BOB. KIRISH. BIOTEXNOLOGIYANING ASOSIY VAZIFALARI VA DOLZARB MUAMMOLARI. FERMENTLAR MUHANDISLIGI

Biotexnologiya fanining yo'nalishlaridan biri bu – fermentlar muhandisligi bo'lib, ushbu yo'nalish turli sohalar rivojlanishida muhim rol o'ynamoqda. Fermentlarni, ya'ni enzimlarni kimyoviy reaksiyalardagi ko'plab yangi xususiyatlarining ochilishi, ularni biotexnologik yo'l bilan barqaror formalarining yaratilishi, bir necha yo'nalishlarning paydo bo'lishiga va taraqqiy etishiga imkon yaratdi. Enzimologiya muhandisligi sohasini jadal tusda rivojlanishi asosida enzimologiyada fundamental tadqiqotlar bilan birga, natijalarni amaliy tatbiqi birgalikda olib borildi. Biologik faol moddalarni ma'lum manbalardan ajratish, tozalash va amaliyotda qo'llash sohasidagi yutuqlar yuqori darajada katta ahamiyat kasb etdi. Biokatalizatorlarning noyob xususiyatlari, ya'ni ularning spetsifikligi va yuqori katalitik faolligi hamda ferment molekulalari strukturasini tutuvchi bog'larning xususiyatlari haqidagi ma'lumotlar, bir qator ilmiy masalalarni hal etishga qaratilgan tadqiqotlarda muhim natijalar olishda, asos sifatida katta rol o'ynadi.

Hozirgi kunda immobillangan oqsillar va turli biologik faol moddalar (BFM) bilan birgalikdagi polimer sistemalar biotexnologiya va tibbiyotning turli sohalarida keng qo'llanilib kelinmoqda. Yuqori fermentativ faollik, mukammal substrat spetsifiklik kabi fermentlarning noyob xususiyatlari, ulardan amaliy foydalanish imkoniyatlarini aniqlab berdi. Tibbiyotda va sanoatda turli fermentlardan foydalanishning samarasi yuqoriligiga qaramay, turli biologik faol moddalarning o'zgaruvchanligini va boshqa xususiyatlarini hisobga olish zarur.

Nativ holatdagi, ya'ni bog'lanmagan holatdagi fermentlar ma'lum muddat saqlanganda o'z fermentativ faolligini yo'qotishi va shu bilan birga, fermentlar biologik sistemalarda barqaror bo'lmasligi to'g'risidagi ma'lumotlar ko'plab ilmiy adabiyotlarda keltirilgan. Shuning uchun ham fermentlarni turli sohalarda keng qo'llanilishi birmuncha chegaralangan. Ushbu kamchiliklarni

bartaraf etish, ko'p yillardan beri dolzarb muammolardan biri bo'lib kelmoqda. Bugungi kunda ushbu muammolarni fanda, amaliyotda fermentlar bilan birga, turli tabiiy va sintetik tashuvchilar vositasida immobillash orqali bartaraf etish usullari hozirda ishlab chiqilib, amaliyotga tatbiq etilmoqda.

Enzimologiyaning jadal rivojlanishi uni tibbiyot va farmatsevtika sohaslariga tez sur'atlarda kirishiga muhim asos bo'ldi. Faol moddalarni yangi xususiyatga ega bo'lishini modifikatsiyalash orqali hal etilishi, nazariy va amaliy masalalarni uzil-kesil yechishga olib keldi. Biroq, bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, barqaror biologik sistemalarni, shuningdek, faol moddalarni ishlab chiqarishda, oziq-ovqat sohasida, tibbiyotda, farmatsevtikada, diagnostikada va boshqa turli sohalarda qo'llash, bog'langan biologik faol moddalarni o'ziga xos sharoitlarda o'rganishni taqozo etadi.

1.1. Fermentlar muhandisligi.

Fermentlar va ularning xossalari

Fermentlar (lotincha fermentum–bijg'imoq, achitqi) barcha tirik hujayralarda mavjud bo'lgan va biologik katalizator vazifasini bajaruvchi spetsifik oqsillardir. Ular yordamida genetik axborot aniqlanadi va tirik organizmlarda moddalar va energiya almashinuvi jarayoni amalga oshiriladi. Fermentlar sodda va murakkab ko'rinishdagi oqsillar bo'lib, ularning tarkibi oqsilli komponent (apoferment) va oqsil bo'lmagan qism kofermentlardan tashkil topgan. Fermentlarning ta'sir samaradorligi oraliq ferment-substrat kompleksining hosil bo'lishi natijasidagi katalizlanish energiyasining kamayishi bilan aniqlanadi. Substratlarning bog'lanishi faqatgina ma'lum substratlar bilangina faol markazlarda sodir bo'ladi. Fermentlarning xususiyatlaridan biri yo'naltirilgan va boshqariladigan ta'sirga egaligidir. Shu sababli, barcha turdagi moddalar almashinuvi, faol moddalar sintezi, fermentlar ishtirokida boradigan boshqa turli jarayonlar muvofiqlik asosida amalga oshadi va nazorat qilinadi.

Yana shuni qayd etish lozimki, fermentlar molekulari strukturasi fazoviy tuzilishi ham muhim ahamiyatga ega bo'lib, buning asosida uning faolligi xarakterlanadi. Ushbu holat fermentlarning ta'sir tezligi o'zgarishi bilan aniqlanadi va substrat hamda kofaktorlar konsentratsiyasi, muhit pH, haroratga shuningdek, aktivatorlar va ingibitorlarning (masalan, adenil nukleotidlari, karbonil, sulfogidril birikmalar) ishtirokiga bog'liq bo'ladi. Ba'zi fermentlar faol markazlardan tashqari, allosterik boshqaruvchi markazlarga ham ega bo'ladi. Fermentlar biosintezini genlar nazorati ostida bo'ladi. Hujayra tarkibida doimiy uchraydigan konstitutiv fermentlar va biosintezga muvofiq substratlar orqali aktivlanuvchi induksirlanuvchi fermentlar ajratiladi. Bir-biri bilan o'zaro funksional bog'langan fermentlar hujayrada strukturaviy tuzilmalar poliferment komplekslari hosil qiladi. Ko'pchilik fermentlar yoki ferment komplekslari hujayra membranasi yoki organoidlari (mitoxondriya, lizosoma, mikrosoma) bilan mustahkam bog'langan bo'ladi va moddalarning membrana orqali aktiv transportida ishtirok etadi.

Hozirgi kunda 20000 dan ortiq fermentlar ma'lum bo'lib, ularning ko'pchiligi tirik hujayralardan ajratib olingan. Birinchi kristall ferment (ureaza) amerikalik biokimyogar D.Samner tomonidan 1926-yilda kristall holatda olingan. Fermentlarning aminokislotalar ketma-ketligi o'rganilgan va uch o'lchamli fazoda polipeptid zanjirlarning joylashishi tushuntirib berilgan. Laboratoriya sharoitida ribonukleaza fermentining sun'iy kimyoviy sintezi amalga oshirilgan. Fermentlar preparatlaridan turli jarayonlarda jumladan, faol moddalarni olish va miqdorini aniqlashda, gen muhandisligi usullarida nuklein kislota molekularidan nusxa ko'chirish, o'zgartirishda, turli yuqumli va autoimmun kasalliklar diagnostikasida va ularni davolashda, shuningdek, bir qator yengil sanoat, oziq-ovqat va farmatsevtika sanoatida, texnologik jarayonlarda keng foydalaniladi. Shu bilan birga biokatalizatorlar ularning oqsil tabiatidan kelib chiquvchi qator spetsifik sifatlar bilan ta'riflanadi. Bu sifatlar fermentlarni oddiy tipdagi katalizatorlardan ajratib turadi. Bunga fermentlarning barqarorligi (harorat ta'sirida o'zgarishi), ularning

muhit pH qiymatiga bog'liqligi, spetsifikligi va aktivatorlar hamda ingibitorlar ta'sirida faolliklarining o'zgarishi kiradi.

Fermentlarning termolabiligi haroratning bir tarafdan fermentning oqsil qismiga ta'sir etishi va juda yuqori haroratda ularni denaturatsiyaga uchratishi va katalitik funksiyasining pasayishi bilan, boshqa tarafdan esa, ferment-substrat kompleksining hosil bo'lishi tezligiga ta'siri va kataliz jarayonining tezlashuviga olib kelishi bilan tushuntiriladi. Fermentlar katalitik faolligining haroratga bog'liqligi tipik egri chiziqlar orqali ta'riflanadi. Haroratning ma'lum qiymatigacha (o'rtacha 50°C gacha) katalitik faollik oshadi, shundan har 10°C oshganda substratning parchalanish tezligi 2 marta ortadi. Shu vaqtda sekinlik bilan qayta faollashgan ferment miqdori uning oqsil qismining denaturatsiyasi hisobiga ortadi. 50°C dan yuqori haroratda fermentli oqsil denaturatsiyasi birdaniga tezlashadi va substratning qayta hosil bo'lish reaksiya tezligi oshsa-da, ferment faolligi pasayadi.

So'nggi yillarda harorat oshishi bilan ferment faolligi ortishi haqidagi batafsil tadqiqotlar shuni ko'rsatadiki, bu bog'liqlik yuqorida qayd etilgandek murakkab xarakterga ega. Birinchidan, ko'p holatlarda harorat har 10°C ga ko'tarilganda fermentning faolligi ikki marta ortish qoidasi, ferment molekulasining konformatsion o'zgarishlarini ortishi bilan bog'liq emas. Fermentning o'z faolligini maksimal namoyish etish harorati uning optimum harorati deb yuritilib, ferment molekulasining faolligi ortishi uning harorat ta'sirida ferment molekulasining harakati kuchayishi bilan xarakterlanadi. Fermentning optimum harorati uning qanday manbadan ajratib olinganiga qarab, turlicha bo'lishi mumkin.

Umumiy holda hayvon organizmidan ajratib olingan fermentlar uchun harorot ko'rsatgichi 40 va 50°C , o'simliklar uchun esa 50 va 60°C oralig'ida yotadi. Lekin, ancha yuqori harorat optimumiga ega fermentlar ham mavjud, masalan, papainning (o'simliklardan ajratilgan olingan, oqsil gidrolizini tezlashtiruvchi ferment) optimumi 80°C ni tashkil etadi. Katalaza fermentining (H_2O_2 ning H_2O va O_2 ga parchalanishini

tezlashtiruvchi ferment) optimal harorati esa 0 va 10⁰ C oralig'ida, yuqori haroratlarda esa fermentning energetik oksidlanishi va uning inaktivatsiyasi kechadi.

Fermentlar faolligi muhit pH ga bog'liq bo'lib, ushbu faktorning ta'siri ustida ko'pgina olimlar tadqiqot ishlarini olib borganlar. Olib borilgan ilmiy izlanishlar asosida shu narsa ma'lum bo'ldiki, har bir ferment uchun uning maksimal faolligini ko'rsatuvchi muhitning pH qiymati mavjud ekan. Bir qancha fermentlar uchun pH muhitda uning maksimal faolligi, neytral nuqta yaqinida namoyon bo'lar ekan. Kuchli kislotali yoki kuchli ishqoriy muhitda esa faqatgina ba'zi fermentlar yaxshi ishlar ekan.

Vodorod ionlarining yuqori yoki past (optimal bilan solishtirganda) konsentratsiyaga o'tishi, ferment aktivligining bir tekis pasayishi bilan bog'liqdir.

Vodorod ionlari konsentratsiyasining ferment katalitik faolligiga ta'siri, uning faol markazga ta'sirida ko'rinadi. Turli reaksiya pH muhitda, muhit kuchli yoki kuchsiz ionlashgan bo'lishi mumkin. Bundan tashqari, muhitning pH – substratning ionlanish darajasiga, ferment-substrat kompleksi va reaksiya mahsulotlariga ham ta'sir ko'rsatadi. Shuningdek, fermentning holatiga undagi kation va anion markazlar mutanosibligi ham katta ta'sir ko'rsatishi mumkin.

Fermentlarning substratlar bilan o'zaro ta'siri, ya'ni spetsifiklik – fermentlarning eng asosiy xususiyatlaridan biridir. Ularning bu xususiyati o'tgan yuz yillikda, ya'ni strukturasi jihatidan yaqin moddalar – fazoviy izomerlarida (a- va b-metilglyukozidlar) efir bog'larini uzilishi, ikkita biologik faol moddalar yordamida amalga oshirishi aniqlangandan so'ng ma'lum bo'lgan. Fermentlar spetsifikligi haqidagi ma'lumotlar ayniqsa, fermentlar bir-biridan sezilarli farqlarga ega kimyoviy birikmalarni ham, masalan, metilglyukozid molekulalaridagi 1-uglerod atomidagi vodorod atomini va metoksil radikalining fazoviy joylashuvini ajratishi mumkinligi ma'lum bo'lgandan so'ng yanada mustahkamlandi.

Ilmiy adabiyotlarda ko'rsatilishicha, ferment substrat bilan xuddi "Kalit-qulf" prinsipi asosida bog'lanar ekan. Ushbu nazariya 1894-yilda E.Fisher tomonidan ta'riflangan. Shundan kelib chiqqan holda, fermentning ta'sir spetsifikligi, qat'iy ravishda substrat va ferment faol markazining geometrik strukturasiga mosligi asosida amalga oshar ekan.

Biroq ushbu prinsip o'tgan asrning o'rtalarida D.Koshlandning substrat va fermentning indutsirlangan mosligi qonuniyati bilan almashtirildi. Uning mohiyati, substrat va ferment faol markazining fazoviy mosligi, ularning bir-biri bilan xuddi "qo'lqop-qo'l" prinsipi asosida bog'lanishi orqali amalga oshishi bilan tushuntirilib berildi. Ushbu jarayonga aniqlik kiritiladigan bo'lsa, substratda ba'zi bog'larning o'zgarishi, ferment molekulasida esa konformatsion qayta tartiblanish sodir bo'lishi yuz beradi. Ferment faol markazining o'zgaruvchanligi, Koshland nazariyasi bo'yicha, fermentlarning faollanish va ingibirlanish ta'siri hamda ular faolligini turli faktorlar ta'sirida boshqarilishi ushbu qonuniyat yordamida qoniqarli darajada asoslab berildi. Xususan, ferment faolligi o'zgarish jarayonida undagi konformatsion qayta tartiblanishlarni Koshland o'rgimchakning o'ljasi (substrat) tushgan paytdagi tebranishi bilan taqqoslagan.

Hozirgi kunda Koshland gipotezasining o'rnini sekinlik bilan topokimyoviy muvofiqlik gipotezasi egallamoqda. Topokimyoviy muvofiqlikka ko'ra, substrat va fermentning bir-birini indutsirlovchi asosiy holatlarini saqlagan holatda, fermentning ta'sir spetsifikligi, birinchi navbatda substratning kataliz jarayonidagi o'zgarmay qoladigan qismlarini tanishi orqali borishi tushuntiriladi. Bu holatda substratning o'zgarmas qismi va fermentning substrat markazi orasida ko'p sonli gidrofob bog'lanishlar va vodorod bog'lar paydo bo'lishi bilan xarakterlanadi.

Nazorat savollari

1. Fermentlar xususiyati haqida ma'lumot bering.
2. Ferment bilan substrat qaysi prinsip bo'yicha ta'sirlashadi?
3. Ovqat hazm qilish jarayonida ishtirok etadigan fermentlar haqida ma'lumot bering.
4. Fermentativ kataliz qanday prinsip asosida amalga oshadi?

Test savollari

1. Ferment bilan substrat qaysi prinsip bo'yicha ta'sirlashadi?

- A) Komplementarlik
- B) Substansiya kvartirant
- C) Qulf-kalit
- D) Barmoq qo'lqop

2. Fermentlar qanday haroratda va qanday muhitda samarali ishlaydi?

- A) Suvli muhitda, 37°C haroratda
- B) Suvli muhitda, 50°C haroratda
- C) Kislotali muhitda
- D) 37°C haroratda

3. Qaysi ferment pishloq ishlab chiqarishda qo'llaniladi?

- A) Renin, fosfataza
- B) Amilaza, fosfalipaza
- C) Ximozin, pepsin
- D) Protreaza, lipaza

Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Fermentlarning xalq xo'jaligidagi ahamiyati.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

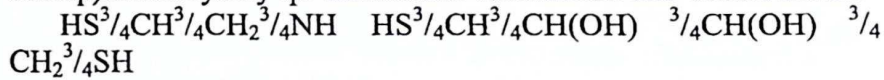
II BOB. FERMENTLARNI AJRATISH, TOZALASH TEXNOLOGIYALARI

Uzoq yillar davomida barcha fermentlar oqsil tabiatli moddalar deb sanalib kelingan. 80-yillarga kelib, quyi molekulyar ribonuklein kislotalarni turli holatlarga o'tish reaksiyalarini tezlashtirishda fermentlarning roli mavjudligi ma'lum bo'ldi. Bu esa ribozimlar deb ataluvchi poliribonukleotid tabiatiga ega ba'zi fermentlar haqidagi qarashlarning paydo bo'lishiga olib keldi va bir qator fermentlar, jumladan ribonukleazalar, lizotsim, ferredoksin kabi sitoxrom S kabi fermentlarni laboratoriya sharoitidagi sintezi amalga oshirildi. Sintetik fermentlarning olinishi murakkab va qimmat bo'lganligi sababli, hozirgi kunda fermentlarni olishning eng samarali yagona real usuli, bu ularni biologik obyektlardan ajratib olish hisoblanadi.

Fermentlarni ajratishning maxsus usullari mavjud bo'lsa-da, fermentlarni boshqa oqsillar singari klassik yoki biospetsifik usullar yordamida ajratish samarali hisoblanadi. Lekin, fermentlarni nativ xususiyatlarini tozalash jarayonida yaxshi saqlanuvchi usullardan biri, bu glitserin bilan ekstraksiya qilish, shuningdek, 10^0 C dan yuqori bo'lmagan haroratda tez suvsizlantirish va asetonli kukunlar yordamida ajratish kabi metodlarni aytib o'tish mumkin. Ushbu usullar qatoriga fermentlarni adsorbentga adsorbsiyalash yo'li bilan olinishini ham kiritish mumkin. Adsorbsion metod fermentlar kimyosiga A.Ya.Danilevskiy tomonidan kiritilgan bo'lib, fermentologiya yo'nalishining rivojlanishida muhim turtki bo'ldi. Hozirda fermentlarni ajratish va tozalashning adsorbsion metodi batafsil o'rganilgan. Shular qatorida ionalmashinuvli xromatografiya, elektroforez va asosan izoelektrofokuslash kabi metodlar ham keng qo'llanilmoqda. Adsorbsion metodning modifikatsiya qilingan usullaridan biri affin xromatografiya metodi hisoblanib, bunda adsorbent fermentga xos ravishda tanlanadi yoki sintez qilinadi. Natijada, xromatografiya jarayonida faqat ushbu fermentgina kolonkada ushlab qolinadi, qolgan moddalar esa kolonkadan chiqib ketadi. Ushbu metod asosida faqatgina bir

qavatli (affin sorbsiya-elyusiya)ni qo'llagan holda, ferment molekulasini bir necha ming marotabagacha tozalash mumkin.

Hujayradan, subhujayraviiy strukturalar: lizosomalar, mitoxondriyalar, yadro tarkibidan va boshqa individual strukturalardan fermentlarni muvaffaqiyatli ajratib olish uchun hujayrani va yuqorida qayd etilgan komponentlarni juda ham maydalash kerak bo'ladi. Fermentlarni ajratib olishda barcha jarayonlar uchun eng muhimi, bu oqsil denaturatsiyasi jarayoni hisoblanadi. Sababi, fermentlarni ajratish jarayonida ferment o'z fermentativ faolligini yo'qotmasligi lozim. Shuning uchun, ferment molekulasini ajratishda -HS- guruhni tutuvchi birikmalar (sistein, glutation, merkaptotanol, sisteamin, ditiotreitol va boshq.)ni himoyaviy qo'shimchalar ishtirokida olib borish kerak.



Sisteamin Ditiotreitol

Fermentlarni ajratib olishning barcha bosqichlarida past haroratni ushlab turish kerak, chunki ular oqsil tabiatli bo'lganligi sababli, ular harorat yuqori bo'lsa o'z faolliklarini yo'qotishlari mumkin.

Ferment preparatining tozalik darajasini, ya'ni gomogenligini baholash uchun oqsil kimyosida mavjud metodlarga tayaniladi. Yuqori tozalikka ega, gomogen ferment preparatlarni olish usullarining takomillashishida, birinchi marta 1906-yilda A.D.Rozenfeldning fermentlar ustida olib borgan tadqiqotlari muhim rol o'ynadi. Olim tomonidan aniqlangan fermentni kristall (turpdan oksidaza fermentini ajratib, kristallar ko'rinishida taqdim etgan edi) holatda bo'lishi mumkinligini ko'rsatilishi, fanda, fermentologiyada keskin burilishga sabab bo'ldi. Shundan so'ng, boshqa enzimolog olimlar tomonidan katta tadqiqot ishlari olib borildi va ular bir qator fermentlarni kristall holatda ajratib olishga muvaffaq bo'ldilar.

Ferment preparatining tozalik darajasi uning biologik faolligi bilan xarakterlanadi. Agar uning faolligi tozalash jarayonining keyingi bosqichida ortmasa, preparat o'zining maksimal faolligiga erishgan deb, hisoblash mumkin. Bu o'rinda shuni qayd

etish lozimki, bugungi kundi fermentologiyada fermentlar ro'yxatiga kiritilgan 2000 dan ziyod fermentdan 1500 tasi turli usullar yordamida ajratib olingan bo'lib, ular turli darajada tozalangandir. Ulardan ba'zilar kristall holatda olingan.

Fermentlar va boshqa oqsil moddalari har xil erimaydigan birikmalarga adsorbsiyalanishi (so'rilish) mumkin. Bu xususiyat oqsil aralashmalarini ajratishda va ayniqsa, fermentlarni laboratoriya sharoitida tozalashda hamda gomogen bo'lgan ferment preparatlarini olishda muhim rol o'ynaydi. Adsorbsiya usuli, shu bilan birga kolonkali xromatografiya usullari fermentlarni yuqori darajada toza va ko'p miqdorda olish imkonini beradi.

Oqsillarning muhim adsorbentlari bo'lib, har xil ionalmashuvchilar, ya'ni kalsiy fosfat, aluminiy gidroksid gellari va ma'lum tipdagi fermentlar uchun maxsus bo'lgan har xil affini adsorbent moddalar hisoblanadi. Fermentlarni tozalash va oqsillarni ajratish texnologiyasi quyidagicha amalga oshiriladi. Bunda ferment preparatining oqsil aralashmasi fermentga xos va mos bo'lgan erituvchida (buferda) eritiladi va shu erituvchi bilan muvozanatlangan kolonkaga yuboriladi. Keyin esa shu kolonkadan bufer yoki konsentratsiyasi ortib boruvchi gradientli yuvish eritmasi, yoki bo'lmasa ushbu ferment uchun maxsus bo'lgan bog'lovchi (ligand) yordamida oqsil bosqichma-bosqich yuviladi. Kolonkadan yuvish natijasida olingan ferment preparatlari fraksiyalarga ajratilgan holda yig'iladi va fermentning toza preparatini olish uchun boshlang'ich material bo'lib xizmat qiladi.

Nazorat savollari

1. Fermentlarning o'ziga xos xususiyatlaridan qaysi biri biotexnologiyada muhim rol o'ynaydi?
2. Fermentlar muhandisligi yo'nalishi o'z oldiga qanday maqsad qo'ygan?

Test savollari

1. Fermentlarni eng ko'p miqdorda ajratish mumkin bo'lgan manbani aniqlang.

- A) Miroorganizmlar
- B) Viruslar
- C) Hayvon organlari
- D) O'simliklar

2. Saxarozani qanday ferment ta'sirida parchalash mumkin?

- A) Invertaza
- B) Esteraza
- C) Amilaza
- D) Glukooksidaza

3. Qaysi ferment reaksiya tezligini 1014 marta tezlashtirish xususiyatiga ega?

- A) Ureaza
- B) Katalaza
- C) Lipaza
- D) Liaza

4. Qaysi fermentlar o'simlik hujayra qobig'ini lizis qilishi mumkin?

- A) Selluloza, pektinaza, proteinaza
- B) Selluloza, fenoloksidaza, amilaza
- C) Amilaza, proteinaza, pektinaza
- D) Pektinaza, invertaza, esteraza

5. Quyidagi fermentlarga xos xususiyatlardan qaysi biri biotexnologiyada muhim rol o'ynaydi?

- A) barqarorligi
- B) aktiv markazning tuzilishi
- C) muhitning ta'siri
- D) denaturatsiyaga moyilligi

Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Fermentlarning xalq xo'jaligidagi ahamiyati.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

2.1. Ionalmashinuv xromatografiya usuli

Ionalmashinuv xromatografiya usulida oqsillar elektrostatik kuch yordamida bog'lanadilar, ya'ni ushbu jarayon zaryadlangan oqsil guruhlari va zaryadlangan ionalmashuv birikma guruhlarning zich qatlami asosida yuzaga keladi.

Tipik ion almashuvchi sifatida bo'ktirilgan dietilaminoetil (DEAE-) yoki karboksimetil (KM-) sellulozani ko'rsatish mumkin. Ular bo'ktirilgan holatda zaryadli guruhlarning 0,5 M konsentratsiyasiga ega bo'ladi. Bu zaryadlar kolonkada qarama-qarshi bo'lgan ionlarni (metall ionlari, xlor ionlari, bufer va h.k.) neytrallaydi. Odatda, oqsilning umumiy zaryad belgisi ion almashuvchiga o'tirgan ion belgisi bilan bir xil bo'ladi va kolonkadan o'tish jarayonida aynan uni siqib chiqaradi. Shuning uchun ham bu jarayon xususiyatiga qarab "ion almashuv" deb yuritiladi.

Kolonkada adsorbsiyalangan kerakli oqsilni yuvish uchun affin xromatografiya usulidan tashqari yana ikki usuldan foydalaniladi.

Birinchi usul – buferning pH ko'rsatkichini ma'lum darajada o'zgartirish bilan ion kuchini oshirib, adsorbent va oqsil o'rtasidagi elektrostatik o'zaro ta'sirni kamaytirishdir. Bu usul umuman yaxshi natija bermaydi. Chunki, bufer pH ko'rsatkichini birdaniga o'zgartirish oqsil aralashmalari va boshqa birikmalarning yomon ajralishiga sabab bo'ladi.

Keyingi yillarda bu usul xromatofokus usuliga o'tkazish yo'li bilan takomillashtirilmoqda. Bunda yuvish jarayonida *amfolit* tipidagi buferlardan foydalaniladi.

Ikkinchi usul – keng miqyosda foydalanilayotgan kaliy yoki natriy xlorid tuzlari yordamida gradient tuzishga asoslangan. Tuz ionlari ishtirokida mustaqil oqsil va adsorbentlar o'rtasidagi o'zaro tortish kuchi kamayadi. Tuz ionlari konsentratsiyasining oshishi bilan adsorbentga bog'langan oqsillar o'z o'rinlarini tuz ionlariga bo'shatadilar va o'zlari kolonkadan yuvilib chiqib boshlaydilar. Shu bilan birga tuz ionlari ta'sirida adsorbentlar o'zaro yaqinlashib, oqsil harakati uchun tor yo'lkalar hosil qiladi va bu hodisa fermentlarning kolonkadan chiqishida fraksiyalarga ajratib olish imkonini beradi.

Ion almashuvchiga bog'langan fermentni esa ushbu jarayonda affinli yuvish yordamida ajratish mumkin. Buning uchun kolonkaga oqsil bilan bog'lanadigan maxsus ligand yuboriladi. Bunda oqsil ligand bilan birgalikda tezda kolonkadan yuvilib chiqadi. Lekin, kerakli oqsilni taniydigan va uni sorbentdan ajratib oladigan ligandni topish juda mushkul vazifadir. Shu bilan birga ligandning qanday zaryadlanganligi va konsentratsiyasiga alohida e'tibor berish kerak. Aks holda qarama-qarshi holatda ligand o'zi ionalmashuvchiga bog'lanib qolishi mumkin.

Nazorat savollari

1. Xromatografik usullar nima maqsadda ishlatiladi?
2. Ion almashuv xromatografiya usullarini tushuntiring.

Test savollari

1. Fermentlarni kimyoviy immobillashda tikuvchi sifatida qanday moddalarni ishlatish mumkin?

- A) Glutar aldegid, gossipol, karbodiimid
- B) Gossipol, gidrolaza, EDTA,
- C) Karbodiimd, gossipol, etilen
- D) Etilen, gossipol, lizin

Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Ionalmashuv xromatografiya usulida fermentlarni tozalash.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

2.2. Affinli (biopsififik) xromatografiya usuli

Affinli (biopsififik) xromatografiya usuli oqsil va fermentlarni tozalash hamda ajratishning adsorbsiya hodisasiga asoslangan usullari ichida alohida o'rin egallaydi. Ko'pincha ushbu usul, affin xromatografiya yoki bioaffin, yoki biopsififik xromatografiya deb yuritiladi.

Ma'lumki, barcha biologik faol birikmalar, xususan fermentlar ham **ligandlar** yoki **affinli ligandlar** deb nomlanadigan birikmalarga maxsus bog'lanish xususiyatlariga egadir. Agarda

shunday ligandlar inert matritsaga kovalent bog'lansa, faqat kerakli fermentni bog'lovchi va qolgan oqsil moddalarni o'tkazib yuboruvchi maxsus adsorbentni hosil qilish mumkin.

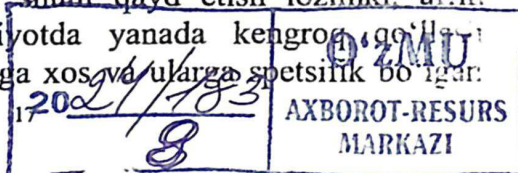
Maxsus yuvuvchi buferlar yordamida yoki jarayon optimal sharoitlarini yaratish asosida, ligandning fermentga bo'lgan xususiyatini o'zgartirish va desorbsiyalash yo'li bilan bitta yuqori tozalikka ega bo'lgan ferment preparatini olish mumkindir. Biroq, ligandni va matritsani, ya'ni sorbentni tanlash juda qiyin vazifadir. Ko'pchilik hollarda affin adsorbentlarni sintez qilishda tozalanayotgan fermentning xususiyatlarini e'tiborga olish kerak.

Sorbent yuqori spetsifiklikka ega bo'lmasligi, boshqa fermentlarni, turli moddalarni ham ushlab qolishi natijasida fermentni bu murakkab kompleksdan ajratib olishni qiyinlashtirishi ham mumkin.

Affin xromatografiya turli xildagi erimaydigan sorbentlardan foydalaniladi. Xromatografiya jarayonida ko'p qo'llaniladigan sorbentlardan biri, bu agaroz donachalaridir. Ular yuqori bosimda o'z shaklini saqlaydi va buferlarda, shuningdek ba'zi erituvchilarda o'z xususiyatlarini barqaror saqlaydi.

Xromatografiya ishlatiladigan ligandlarga juda katta talablar qo'yiladi. Jumladan, ular matritsaga shunday bog'langan bo'lishi kerakki, oqsillar moddalar hech qiyinchiliksiz ularga kelib bog'lanishi va buning uchun esa matritsa bilan ligand o'rtasida hech qanday qo'shimcha komponent ko'priki vazifasini o'tashi kerak bo'lmasligi lozim. Bundan tashqari, ligand xromatografiya jarayonida boshqa birikmalar bilan o'zaro bog'lanmasligi, sorbentni yuvishda va regeneratsiya jarayonlarida o'z xususiyatlarini o'zgartirmasligi zarur.

Sorbentlarga qo'yilgan ushbu shartlardan ko'rinib turibdiki, affin xromatografiya jarayoni murakkab va o'ziga xos jarayon bo'lib, amaliyotchidan katta bilim talab etadi. Shunga qaramay ushbu usul amaliyotda keng qo'llanilib, ko'plab fermentlar, jumladan amilolitik, lipolitik fermentlar ana shu usul asosida tozalangan. Biroq bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, affin xromatografiya usulini amaliyotda yanada kengroq qo'llanish uchun, biologik faol moddalarga xos va ularga spetsifik bo'lgan



yangi ligandlarni topish, shuningdek, suvli eritmalarda erimaydigan, bo'lmaydigan va boshqa ijobiy xususiyatlarga ega bo'lgan, sorbentlarni sintez qilish kerak bo'ladi.

Nazorat savollari

1. Affinli xromatografiya deganda qanday usulni tushunasiz?
2. Affinli xromatografiyada qanday sorbentlar ishlatiladi?

Test savoli

1. Fermentlarni immobilizatsiya qilish usullarini aniqlang.

- A) kimyoviy va fizikaviy yo'llari bilan
- B) modifikatsiya va rektifikatsiya yo'li bilan
- C) izotop moddalar asosida ishlov berish asosida
- D) affinli xromatografiya usulida

Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Affinli xromatografiya usulida fermentlarni tozalash.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

2.3. Gel xromatografiya usuli

Amaliy enzimologiyada yuqori haroratga chidamli bo'lmagan fermentlarni va boshqa biologik faol moddalarni past haroratda o'ziga xos sharoitda ajratish, tozalash ishlari amalga oshiriladi. Enzimlarni biror manbadan ajratib, tozalash jarayoni davomida ular uzoq muddat eritma tarkibida bo'lib o'z faolliklarini bir muncha yo'qotishlari mumkin. Shu sababli, bunday sharoitda ferment preparatlarini turli usullar asosida tezda fraksiyalarga ajratish ishlari amalga oshirish talab etiladi. Sababi, ferment preparati tarkibidagi boshqa birikmalar, asosiy ferment preparati faolligiga salbiy ta'sir ko'rsatishi mumkin. Natijada tozalanayotgan asosiy ferment preparatining fermentativ faolligi ancha pasayadi.

Ferment preparatini tozalash usullari orasida ko'p qo'llaniladigan usullardan biri gelfiltratsiya, elektroforez, izoelektrik fokuslash kabi usullar hisoblanadi.

Ferment preparatlarini tozalash usullari orasida amaliy ahamiyatga ega bo'lgan usullardan biri — gelfiltratsiyadir. Gelfiltratsiya usulini amalga oshirish uchun, ko'p hollarda dekstran ishlatilib, ushbu jarayonda gelning o'lchami muhim rol o'ynaydi. Sababi, gel o'lchamiga qarab, eritma tarkibidagi moddalarni makromolekulalarini ajratish amalga oshiriladi.

Gelfiltratsiya jarayonida ishlatiladigan gel, kolonkalarini oson to'ldirish uchun yumaloq donachalar (granula) ko'rinishida bo'ladi. Donachalarda mayda teshikchalar mavjud bo'lib, ularga faqat juda kichik molekulali birikmalar kiradi, yirik molekulalar esa kirmaydi va natijada kirmay qolgan molekulalar gel yuzasidan tezda yuvilib, kolonkadan fraksiyalarga ajralib chiqa boshlaydi. Gelfiltratsiya jarayoni esa shu sababdan ham, moddalarni molekulyar og'irliklari asosida fraksiyalarga ajralishiga asoslangan.

Fermentlarni tozalash va ajratish nafaqat laboratoriya sharoitida, balki sanoat miqyosida ham amalga oshiriladi. Gelfiltratsiya uchun yuqorida qayd etilganidek, dekstran (sefadekslar va sefakrillar) gellaridan, poliakrilamid (biogellar), akrilamid, agaroz gellaridan (ultragellar) va boshqa qattiq *CL*-sefaroza va *S*-sefakril kabi gellardan foydalaniladi. Kolonkada ferment eritmasining bir qismi gel donachalar orasida va bir qismini esa donachalarning teshikchalari ichida joylashadi.

Gelfiltratsiya — jarayoni eritilgan moddalar eritmaning yuzasida joylashgan harakatchan va ichki tomonida joylashgan kam harakatli qismlarida amalga oshadi. Kolonkada eritilgan moddaning ushlab qolinish darajasi, uning gel teshikchalariga kirib olish qobiliyatiga bog'liqdir. Shuningdek, gelfiltratsiya jarayonida kolonkadan avval yuqori molekulali moddalar va keyin esa kichik molekulalilari birin-ketin chiqa boshlaydi, bunda gel molekulyar to'r vazifasini bajaradi. Bu jarayon mukammal ravishda olib borilishi uchun, gel tayyorlangan komponent, erigan birikmalar ta'siriga juda ham inert bo'lishi kerak.

Afsuski, bugungi kunda ishlatilayotgan barcha gellar inert emas va ba'zan ma'lum pH ko'rsatkichida, salbiy jihatlarni namoyon qilishi mumkin. Masalan, shunday gellarga

sefaakrillarni kiritish mumkin. Biroq, ba'zi jarayon davomida uchraydigan kamchilik, qiyinchiliklarga qaramasdan gelfiltratsiya usuli ajratish mushkul bo'lgan, turli xil moddalarni mayda gel donachalarida yuqori bosim ostida ajratish imkonini beradi. Yuqori bosim ostida amalga oshirish mumkin bo'lgan ushbu suyuq xromatografiya uslubi qisqa vaqt ichida ko'p komponentli moddalarni ajratish mumkinligi bilan ajralib turadi va shu bilan birga ushbu usul biologik faol moddalarni tozalashning so'nggi bosqichlarida qo'llanilsa ham juda samarali hisoblanadi.

Nazorat savollari

1. Gel xromatografiya usulida qanday sorbentlar ishlatiladi?
2. Fraksiyalarga ajratish bosqichlarini tushuntiring.

Test savoli

1. Oqsil tabiatli biologik faol moddalar qanday organik moddalar yordamida cho'ktiriladi?

- A) Etanol, atseton
- B) Atseton, antronil
- C) Xloroform, atseton
- D) Ekdisteron, atsenonitril

Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Affinli xromatografiya usulida fermentlarni tozalash.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

2.4. Biologik faol moddalarni organik erituvchilar yordamida cho'ktirish

Biologik faol moddalarni, jumladan fermentlarni organik erituvchilar yordamida cho'ktirish uchun ishlatiladigan organik erituvchi suv bilan to'liq aralasha oladigan bo'lishi zarur. Asosan bu jarayon uchun etil spirti, aseton va izopropil spirti keng qo'llaniladi. Metanol, n-propanol, dioksan, 2-metoksietanol va boshqa spirtlar, shu bilan birga ketonlar, efirlar va ularning aralashmalari kamroq ishlatiladi. Erituvchilarni tanlashda ularning toksikligiga, portlash xavfidan xolisligiga va regeneratsiya bo'la

olish xususiyatiga e'tibor berish kerak. Ishlab chiqarishda fermentlarni cho'ktirish uchun etil spirti va izopropanol ko'p qo'llaniladi. Aseton esa biroz kamroq ishlatiladi.

Yuqorida qayd etilgan erituvchilar yordamida ferment preparatlarini komplekslarga ajratish yoki fraksiyalar holida cho'ktirib olish mumkin.

Ferment preparatlarini cho'ktirish uchun nafaqat erituvchining tabiati va konsentratsiyasi balki, elektrolitlar ishtiroki, cho'ktirish vaqtidagi harorati, muhit pH ko'rsatkichi, quruq moddalarning tarkibi va miqdori kabi bir qancha omillarga e'tibor berish kerak.

Cho'ktirish vaqtida eritmadagi ba'zi ionlar ferment mo'tadilligiga ta'sir qilishi mumkin. Masalan, Ca^{+2} ionlari α -amilaza, proteinaza, glyukoamilaza fermentlari faolligiga ijobiy ta'sir qilsa, magniy, marganes, kobalt kabi metall ionlari ferment faol markazini himoyalash vazifasini bajaradi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, ba'zi metallarning (Fe^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+2} , Ni^{+2} , Al^{+3} , Hg^{+} va h.k.) ionlari ferment molekulasiga salbiy ta'sir ko'rsatadi. Shuning uchun ham ularning eritmada bo'lishi maqsadga muvofiq emasdir. Eritmada elektrolitlarning bo'lishi erituvchi sarfini kamaytirishga va cho'kma strukturasi yaxshilashga xizmat qiladi.

Ferment eritmasi va erituvchining harorati fermentni cho'ktirish jarayonida past bo'lishi kerak. Sababi, etanol va fermentning suvli eritmasi aralashtirilganda issiqlik ajralib chiqadi va aralashma harorati $5-10^0 \text{ C}$ ga ko'tariladi. Agarda organik erituvchi (etanol) oldindan sovutilgan bo'lmasa, fermentlarning inaktivatsiyasini kuzatish mumkin. Ushbu holat nafaqat termoinaktivlanishga, hattoki ferment molekulasini denaturatsiyalanishiga olib keladi.

Ferment preparatlarini cho'ktirishda muhit pH ko'rsatkichi juda katta ahamiyatga ega. Ba'zi ferment eritmalarida har xil muhit pH ko'rsatkichi ta'sirida bir-biridan cho'kma miqdori va ferment faolligi bilan farq qiluvchi preparatlar olish mumkin. Ma'lumki, fermentlar o'zlarining izoelektrik nuqtalarida oqsil agregatlarini hosil qilib, to'liq cho'kmaga tushadilar. Oqsillarni

izoelektrik nuqtalarida cho'ktiruvchi reagentlar ishlatmay, cho'ktirish jarayoni izoelektrik cho'ktirish deyiladi.

Organik cho'ktiruvchilar yordamida ferment preparatlarini izoelektrik nuqtasida cho'ktirish, erituvchini kam miqdorda sarflanishiga yordam beradi. Bordini, cho'ktirish jarayonida muhit pH ko'rsatkichi izoelektrik nuqta bilan bir xil bo'lmasa, cho'kma miqdori va ferment faolligi 30–50% gacha kamayishini kuzatish mumkin.

Organik cho'ktiruvchilar yordamida faol ferment preparatini olish uchun eritmada 10–12% atrofida quruq modda bo'lishi kerak. Ko'p tadqiqotlardan ma'lumki, fermentlarni cho'ktirishda, ayniqsa proteolitik fermentlar, quruq moddaning eng mo'tadil miqdori 10% bo'lishi kerak.

Yuqorida qayd qilingan omillar bilan bir qatorda ferment eritmalarining erituvchi bilan ta'sir etish muddati ham katta ahamiyatga ega. Ishlab chiqarish sanoatida ferment preparatlarini uzluksiz ishlab chiqarish jarayoni optimallashtirilib, yuqorida qayd etilgan salbiy ta'sir etuvchi omillarni chetlab o'tuvchi usullari ishlab chiqilgan.

Organik erituvchilar bilan cho'ktirishda uning samaradorligi ushbu jarayonda ishlatiladigan asbob-uskunaga ham uzviy bog'liqdir. Bunday asbob-uskunalar asosan ferment eritmalarini solinadigan kolonka, to'xtovsiz aralashtirgich, ferment eritmasi va erituvchini to'xtovsiz ravishda uzatuvchi konturlar, separator va avtomatizatsiya tizimlaridan iborat bo'ladi. Silindr shaklidagi aralashtirgichdan ferment eritmasi va erituvchi murakkab harakat yo'nalishi bo'ylab qisqa vaqt ichida aralashib o'tadi va natijada hosil bo'lgan aralashma separator qismiga uzatiladi.

Separatorlarda cho'kmaga tushgan oqsil moddalar ajratib olinadi. Bunday qurilmada ferment bilan erituvchining o'zaro ta'sir muddati o'n marotabagacha qisqartiriladi va fermentning cho'kmaga tushish unumi 15–20% gacha ortadi. Separatorlarda ajratilgan cho'kma har xil usullar bilan mo'tadil sharoitda quritib olinadi. Cho'kma tepasida qolgan suyuqlik tarkibida 50–75% gacha erituvchi modda bo'lib, u rektifikatsiya bo'limida regeneratsiya qilinadi.

Organik erituvchilar bilan cho'ktirish samaradorligi, produsent o'stirilgan oziqa muhiti tarkibiga va ferment preparatining quyushtirilganlik darajasiga ham bog'liqdir.

Nazorat savollari

1. Biologik faol moddalarni biotexnologiya usullari yordamida olish qanday texnologik jarayonlardan iborat?
2. Biologik faol moddalar olishda ishlatiladigan qanday eritmalarni bilasiz?

Test savollari

1. Oziq-ovqat sanoatida ishlatiladigan faol moddalarni cho'ktirish qanday moddalar asosida amalga oshiriladi?

- A) Etanol, natriy xlor
- B) Natriy xlor, ammoniy sulfat
- C) Atseton, etanol
- D) Metanol, organik kislotalar

2. Oqsil tabiatli biotik faol moddalar qanday organik moddalar yordamida cho'ktiriladi?

- A) Etanol, atseton
- B) Atseton, antropiya
- C) Xloroform, atseton
- D) Ekdisteron, atsetonitril

3. Zamon talabiga javob beruvchi biologik faol moddalar qanday usulda olinadi?

- A) Gen muhandisligi yordamida
- B) Mikrobiologik usul bilan
- C) Kimyoviy sintez qilish bilan
- D) Biotexnologiya asosida

Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Organik erituvchilar yordamida fermentlarni tozalash.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

III BOB. FERMENTLARNI IMMOBILASH USULLARI VA IMMOBILASHGA TA'SIR ETUVCHI FAKTORLAR

3.1. Fermentlarni immobilashda (barqarorlashda) ishlatiladigan tashuvchilar

Immobilizatsiya qilish usullarida avvalo "tashuvchilar" (sorbentlar)ning tabiati va fizik-kimyoviy xususiyatiga e'tibor berish talab etiladi. Ma'lumki, sorbentlar tabiatan 2 ta guruhga ajratiladi: masalan, organik va noorganik tashuvchilarga.

Immobilizatsiya jarayonida "tashuvchi" sifatida ishlatiladigan sorbentlarga quyidagi talablar qo'yiladi:

- kimyoviy va biologik mo'tadillik;
- mexanik nuqtayi nazardan mustahkamlik;
- ferment va uni substrati uchun o'tkazuvchanlik;
- texnologik jarayonlar uchun zarur bo'lgan shaklda olish mumkinligi;
- faol guruhlar yuzasida mavjudligi (granula, membrana, kukun va boshqa holatlarda yuzasida guruhlar bo'lishi);
- reaksiya muhitida o'zgarmasligi;
- yuqori gidrofilligi (immobilizatsiya jarayonini suvli muhitga o'tkazish uchun);
- arzonligi.

Tabiiyki, bu talablarni barchasiga javob bera oladigan tashuvchilar yo'q. Shu sababli, immobilizatsiyani amalga oshirish jarayonida obyekt uchun mos va o'ziga xos bo'lgan tashuvchilardan foydalanish zarur.

Organik polimerli tashuvchilarni ikki sinfga bo'lish mumkin: tabiiy polimerlar va sun'iy polimerlarga. O'z navbatida tabiiy polimerlarni ham biokimyoviy xossalriga qarab guruhlarga bo'lish mumkin; polisaxaridlar; oqsil, lipid tabiatli tashuvchilar. Sun'iy, ya'ni sintez yo'li bilan olingan polimerlar ham guruhlarga bo'linadi, masalan, makromolekularni asosiy zanjirni kimyoviy tuzilishiga qarab, polimetilen, poliamid, poliefir tashuvchilar va h.k.

Immobilizatsiya qilish usulini amalga oshirish jarayonida, fermentni xususiyati va ishlatilishiga qarab, "tashuvchi"larga bir

qator qo'shimcha talablar qo'yiladi: masalan, kovalent immobilizatsiya qilinganda "tashuvchi" fermentning faolligini ta'minlovchi markaz qismi bilan bog'lanmasligi lozim; (fermentning faol markazi o'zgarmasligi va jarayon davomida blokirlanmasligi kerak), ferment faolligini kamaytiradigan xususiyatlari bo'lmasligi shart.

Immobilizatsiya qilish jarayonida bir qator omillarga e'tibor berish kerak bo'ladi. Masalan: "Tashuvchi" va ferment har xil zaryadlarga ega bo'lsa, immobilizatsiya jarayoni tez va mustahkam kechadi, aksincha bir xil zaryadga ega bo'lsalar jarayon qiyin kechadi; "tashuvchi" granulalari qancha kichik bo'lsa, sorbsiya qilish xususiyati shuncha katta bo'ladi. Immobilizatsiya jarayonida ko'proq polimetilen tipidagi "tashuvchi"lar boshqalarga nisbatan kengroq ishlatiladi.

Noorganik tashuvchilar sifatida kremnezem, alumin, titan va boshqa elementlar oksidlari, alumosilikatlar (loylar), shisha, sopol, faollashtirilgan ko'mir va boshqalar keng ishlatiladi.

Organik tashuvchilar orasida keng tarqalganlariga har xil polisaxaridlarni, polimerli ionalmashuv smolalarni, kollagen, tovuq suyaklari asosidagi tashuvchilarni va boshqa turdagi tashuvchilarni kiritish mumkin. Tashuvchilar turli ko'rinishda, kukun, kichik sharchalar, granulalar, membrana, ipsimon shakllarda ishlatishi mumkin. Ba'zi hollarda tashuvchilar gidrodinamik qarshilikni pasaytirish maqsadida, tor parallel kanallar saqlovchi monolitlar sifatida ham chiqariladi. Tashuvchilarning eng asosiy xususiyati sorbsiya qilish qobiliyati hisoblanib, bunda ular teshikchalarining o'lchami, mexanik va kimyoviy barqarorligi eng muhim parametrlardan hisoblanadi. Ferment va "tashuvchi" orasidagi adsorbsion o'zaro ta'sirning tabiati "tashuvchi" yuzasiga adsorbsiya bo'lgan ferment molekulalari har xil kuchlar hisobiga, masalan, nospesifik Van-der-Vaals, elektrostatik, o'zaro ta'sirlar, vodorod bog'lari va gidrofob bog'lar orqali amalga oshiriladi. Sanab o'tilgan bog'larni nisbiy ishtiroki, ferment molekulasidagi faol guruhlariga yoki "tashuvchi"ning kimyoviy tabiatiga bog'liq bo'ladi. Ko'pchilik

hollarda adsorbsion bog‘lanish elektrostatik o‘zaro ta’sir va vodorod bog‘lar yordamida amalga oshadi.

Ba’zi vaqtlarda o‘zaro ta’sir kuchi natijasida "tashuvchi"ning tuzilishida o‘zgarish sodir bo‘lishi mumkin. Masalan, ba’zi o‘simlik hujayralarini sitodeks granulalariga adsorbsiya qilinganda hujayra devori deformatsiyaga uchragani kuzatilgan.

Nazorat savollari

1. Fermentlarni barqarorlashning afzallik jihatlari?
2. Fermentlarni barqarorlashda qanday tashuvchilar ishlatiladi?
3. Anorganik tashuvchilar qanday maqsadlarda ishlatiladi?
4. Organik tashuvchilar qanday maqsadlarda foydalaniladi?

Test savollari

1. Fermentlarni kimyoviy immobillashda tikuvchi sifatida qanday moddalarni ishlatish mumkin?

- A) Glutar aldegid, gossipol, karbodimid
- B) Gossipol, gidrozala, EDTA
- C) Karbodimid, gossipol, etilen
- D) Etilen, gossipol, lizin

2. Immobillangan fermentlarni mikroanalizda qo‘llashda necha xil ferment ishlatiladi?

- A) 2 xil
- B) 3 xil
- C) 4 xil
- D) A va B

Mustaqil ta’lim mavzulari

1. Immobillangan fermentlarning sanoatda ishlatilishi.
2. Immobillangan fermentlarning tibbiyotdagi ahamiyati.

3.2. Fermentlarni fizikaviy usulda immobillash

Tashuvchilar bilan bog‘langan “immobillangan fermentlar” deb nomlanuvchi bioorganik “katalizatorlar”ning yangi barqaror ferment preparatlarini yaratilishi natijasida, amaliy enzimologiya

oldida yangi istiqbollar ochildi. Nelson va Griffin Sujelar 1916-yilda invertaza fermentini toshko'mir yoki alyumogelda adsorbsiya qilishni muvaffaqiyatli amalga oshirib, fermentlarni immobillash yordamida katalitik faolliklarini saqlash usulini va ularni barqarorlashni ko'rsatib berdilar. Shundan so'ng, ferment preparatlari ustidagi ilmiy izlanishlar tez sur'atda rivojlanib ketdi. Geterogen katalizatorlarni ishlab chiqarishga yo'naltirilgan tadqiqotlar 50-yillarda katta istiqbollarga erishdi.

"Immobillangan fermentlar" atamasi rasmiylashtirilganligiga uncha uzoq vaqt bo'lmadi. Umuman "immobillanish" tushunchasini shunchaki, fermentning suvda erimaydigan tashuvchilar bilan bog'lanishidan ko'ra kengroq tushunish kerak. Bunga oqsil globularlarini quyi molekulyar bifunksional reagentlar bilan ichki molekulyar "tikilishi" yoki fermentning suvda eriydigan polimerga bog'lanishi orqali erishish mumkin. Lekin, bunday preparatlarni odatda immobillangan deb atalmaydi: ularni mos ravishda "tikuvchi" yoki polimer reagentlar bilan o'zgartirilgan fermentlarga kiritish maqsadga muvofiq hisoblanadi.

Immobillangan va o'zgartirilgan ferment preparatlari ularning "nativ" oldingi vakillari bilan solishtirilganda (amaliy maqsadlarda ishlatilishida) bir qator muhim afzalliklarga ega faol moddalar hisoblanadi. Birinchidan, reaksiyon muhitdan geterogen katalizatorni oson ajratish mumkin. Ushbu jarayon quyidagicha amalga oshirilishi mumki:

- 1) reaksiyani to'xtatish;
- 2) katalizatorni qaytadan qo'llash;
- 3) ifloslanmagan ferment asosida mahsulot olish.

Qayd etilgan yuqori ko'rsatgichlarga ega bo'lgan ferment preparatlarini oziq-ovqat va farmatsevtika sanoatida ishlatish mumkin. Ikkinchidan, geterogen katalizatorlar fermentli jarayonlarni to'xtovsiz o'tkazish (masalan, oqadigan reaktorlarda) va katalizlanuvchi reaksiyalar tezligini (yoki mahsulot chiqishini) oqim tezligi bo'yicha boshqarishga imkon beradi. Uchinchidan, fermentlarni immobillash yoki modifikatsiyalash ferment xususiyatini, jumladan, uning spetsifikligi (asosan