

**Sh.S. Tashmuxamedova,
B. Jabborov**

AMALIY ENZIMOLOGIYA



O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIV VA O'RTA MAXSUS TA'LIM VAZIRLIGI

MIRZO ULUG'BEK NOMIDAGI
O'ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI

**Tashmuxamedova Shoxista Sabirovna,
Jabborov Baxrom**

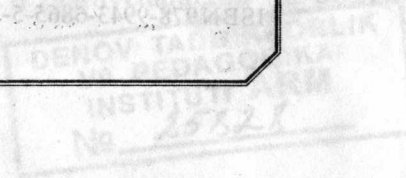
AMALIY ENZIMOLOGIYA

O'quv qo'llanma

Toshkent

«Donishmand ziyosi»

2020



UO'K 577.15(075)

KBK 28.072

T 29

Tashmuxeimedova Sh., Jabborov B.

T 29 Amaliy enzimologiya [Matn] / Tashmuxeimedova Shoxista, Jabborov Baxrom. – Toshkent: «Donishmand ziyosi» MCHJ, 2020. – 120 b.

Mas'ul muharrir:

Almatov K.T. – biologiya fanlari doktori, professor.

Taqrizchilar:

Kuchkarova L.S. – biologiya fanlari doktori, professor;

Artikova R.M. – biologiya fanlari nomzodi, dotsent.

«Amaliy enzimologiya» nomli o'quv qo'llanma biotexnologiya yo'nalishi bo'yicha tahsil olayotgan bakalavrlar, magistrilar va ushbu sohada faoliyat ko'rsatayotgan ilmiy izlanuvchilar uchun mo'ljallangan. Qo'llanmada biologik faol moddalar, oqsillar va fermentlar haqida ma'lumotlar keltirilgan. Fermentlarni ajratish va tozalash, ularning fizik-kimyoviy, kinetik xususiyatlari, fermentlarning barqaror shakllarini olish va ularni immobillashda ishlatiladigan tashuvchilar, biologik faol moddalar va rekombinant oqsillar olish haqidagi ma'lumotlar yoritilgan.

Mazkur o'quv qo'llanma O'zbekiston Respublikasi Oliy va o'rta maxsus ta'lim vazirligi Muvofiqlashtiruvchi Kengashining 2018-yil 27-martdagi 274-sonli buyrug'iga asosan nashrga tavsiya etilgan.

ISBN978-9943-6865-5-7

© Tashmuxeimedova Sh.S., Jabborov B., 2020.

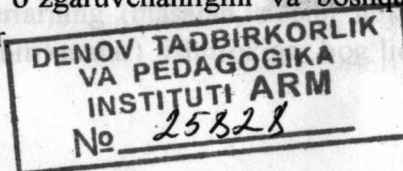
© «Donishmand ziyosi», 2020.

KIRISH

Biotexnologiya fanining yo'nalishlaridan biri – bu fermentlar muhandisligi bo'lib, ushbu yo'nalish turli sohalarining rivojlani-shida muhim rol o'ynaydi. Fermentlar, ya'ni enzimlarning kim-yoviy reaksiyalardagi ko'plab yangi xususiyatlarining ochilishi, biotexnologik yo'l bilan ularning barqaror shakllarining yaratili-shi bir nechta yo'nalishlarning paydo bo'lishiga va taraqqiy eti-shiga imkon yaratdi. Enzimologiya muhandisligi sohasining jadal tusda rivojlanishi asosida enzimologiyada fundamental tadqiqot-lar bilan birga, natijalarni amaliyotga tatbiq etish birgalikda olib borildi. Biologik faol moddalarni ma'lum manbalardan ajratish, tozalash va amaliyotda qo'llash sohasidagi yutuqlar yuqori da-rajada katta ahamiyat kasb etdi. Biokatalizatorlarning noyob xu-susiyatlari, ya'ni ularning spetsifikligi va yuqori katalitik faolligi hamda ferment molekulalari strukturasi 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 biotexno-logiya va tibbiyotning turli sohalarida keng qo'llanilib kelinmoq-da. Yuqori fermentativ faollik, mukammal substrat spetsifiklik kabi fermentlarning noyob xususiyatlari, ulardan amaliy foyda-lanish imkoniyatlarini aniqlab berdi. Tibbiyotda va sanoatda tur-li fermentlardan foydalanishning samarasi yuqoriligiga qaramay, turli biologik faol moddalarning o'zgaruvchanligini va boshqa xususiyatlarini hisobga olish zarur.

3



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'lmisligi to'g'risidagi ma'lumotlar ko'plab ilmiy adabiyotlarda keltirilgan. Shuning uchun ham fermentlarning 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 ishlab chiqilib, amaliyotga joriy etilmoqda.

Enzimologiyaning jadal rivojlanishi uning tibbiyot va farmatsevtika sohasiga tez sur'atlarda kirishida muhim asos bo'ldi. Faol moddalarning yangi xususiyatga ega bo'lishini modifikatsiyalash orqali hal etilishi, nazariy va amaliy masalalarni uzilkesil 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.

№ 1522
INSTITUTI ARMA
VA PEDAGOGIKA
DENOVA TABIIKORLIK

1-BOB. FERMENTLAR

1.1. 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 – kof fermentlardan 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 strukturasining fazoviy tuzilishi ham muhim ahamiyatga ega bo'lib, buning asosida uning faolligi xarakterlanadi. Ushbu holat fermentlar ta'sir tezligining 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 biosintezi genlar nazorati ostida bo'ladi. Hujayra tarkibida doimiy uchraydigan konstitutiv fermentlar va biosintezga muvofiq substratlar orqali faollanuvchi indutsirlanuvchi 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 membrani yoki organoidlari (mitoxondriya, lizosoma, mikrosoma) bilan mustahkam bog'langan bo'ladi va moddalarning membrana orqali faol 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 molekulalaridan 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 molekulasini konformatsion o'zgarishlarining ortishi bilan bog'liq emas. Fermentning o'z faolligini maksimal namoyish etish harorati uning optimum harorati deb yuritilib, ferment molekulasini faolligining ortishi uning harorat ta'sirida ferment molekulasini harakatining kuchayishi bilan xarakterlanadi. Fermentning optimum harorati uning qanday manbadan ajratib olinganiga qarab, turlicha bo'lishi mumkin.

Umumiy holda hayvon organizmidan ajratib olingan fermentlar uchun harorat ko'rsatkichi 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 ajratib olingan, oqsil gidrolizini tezlashtiruvchi ferment) optimumi 80° ni tashkil etadi. Katalaza fermentining (H_2O_2 ning H_2O va O_2 ga parchalanishini tezlashtiruvchi ferment)

optimal harorati esa 0 va 10° C oralig'ida, yuqori haroratlarda esa fermentning energetik oksidlanishi va uning inaktivatsiyasi kechadi.

Fermentlar faolligi pH muhitga bog'liq bo'lib, ushbu omilning 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 faolligining 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 (α - va β -metilglukozidlar) efir bog'larining uzilishi, ikkita biologik faol moddalar yordamida amalga oshirilishi aniqlangandan so'ng ma'lum bo'lgan. Fermentlar spetsifikligi haqidagi ma'lumotlar, ayniqsa, fermentlar bir-biridan sezilarsiz farqlarga ega kimyoviy birikmalarni ham, masalan, metilglukozid molekularidagi 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 strukturasi 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 faolligining turli omillar 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 farazining 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'zgarimas qismi va fermentning substrat markazi orasida ko'p sonli gidrofob bog'lanishlar va vodorod bog'lar paydo bo'lishi bilan xarakterlanadi.

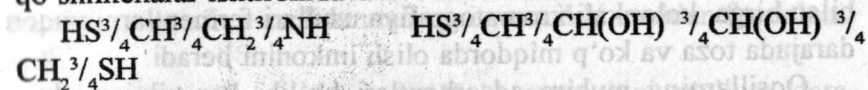
1.2. Fermentlarni ajratish, tozalash texnologiyalari

Uzoq yillar davomida barcha fermentlar oqsil tabiatli moddalar deb sanalib kelingan. 80-yillarga kelib, quyimolekular ribonuklein kislotalarni turli holatlarga o'tish reaksiyalarini tezlash-tirishda 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, sitoxrom S kabi fermentlarning laboratoriya sharoitidagi sintezi amalga oshirildi. Sintetik fermentlarning olinishi murakkab va qimmat bo'lganligi sababli, hozirgi kunda fermentlarni olishning eng samarali yagona 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 fermentlarning nativ xususiyatlarini tozalash jarayonida yaxshi saqlanuvchi usullardan biri, bu glitserin bilan ekstraksiya qilish, shuningdek, 10° 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.Y.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 izoelektrofokushlash 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 ferment-gina kolonkada ushlab qolinadi, qolgan moddalar esa kolonkadan chiqib ketadi. Ushbu metod asosida faqatgina bir qavatli (affin sorbsiya – elutsiya)ni qo'llagan holda, ferment molekulasini bir necha ming marotabagacha tozalash mumkin.

Hujayradan, subhujayraviy 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 -NS- guruhni tutuvchi birikmalarni (sistein, glutation, merkaptolanol, sisteamin, ditiotreitol va boshq.) 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, harorat yuqori bo'lsa o'z faolliklarini yo'qotishlari mumkin.

Ferment preparatining tozalik darajasini, ya'ni gomogenligini baholash uchun oqsil kimyosida mavjud metodlarga taylaniladi. 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 fermentning kristall (turpdan oksidaza fermentini ajratib, kristallar ko'rinishida taqdim etgan edi) holatda bo'lishi mumkinligining ko'rsatilishi

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 moddalar har xil erimaydigan birikmalarga adsorbsiyalanishi (so'rilishi) 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 ion almashuvchilar, ya'ni kalsiy fosfat, aluminiy gidroksid gellari va ma'lum tipdagi fermentlar uchun maxsus bo'lgan har xil affin adsorbent moddalar hisoblanadi. Fermentlarni tozalash va oqsillarni ajratish texnologiyasi quyidagicha amalga oshiriladi. Bunda ferment preparatining oqsil aralashmasi fermentga xos va mos bo'lgan erituvchida (bufesda) eritiladi va shu erituvchi bilan muvozanatlangan kolonkaga yuboriladi. Keyin esa shu kolonkadan bufer yoki konsentratsiyasi ortib boruvchi gradiyentli 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.

1.3. Ionalmashuv xromatografiya usuli

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

Tipik ionalmashuvchi sifatida bo'ktirilgan dietilaminoetilni (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 «ionalmashuv» deb yuritiladi.

Kolonkada adsorbsiyalangan kerakli oqsilni yuvish uchun affinxromatografiya 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 birikmalarining 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 gradiyent 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 chiqa 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.

Ionalmashuvchiga 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'z ionalmashuvchiga bog'lanib qolishi mumkin.

1.4. Affinli (biospetsifik) xromatografiya usuli

Affinli (biospetsifik) xromatografiya usuli oqsil va fermentlarni tozalash va ajratishning adsorbsiya hodisasiga asoslangan usullari ichida alohida o'rin egallaydi. Ko'pincha ushbu usul affin xromatografiya yoki bioaffin, yoxud biospetsifik 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 orqali desorbsiyalash yo'li bilan bitta

yuqori tozalikka ega bo'lgan ferment preparatini olish mumkin. 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 xromatografiyada 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.

Xromatografiyada ishlatiladigan ligandlarga juda katta talblar qo'yiladi. Jumladan, ular matritsaga shunday bog'langan bo'lishi kerakki, oqsil moddalar hech qiyinchiliksiz ularga kelib bog'lanishi va buning uchun esa matritsa bilan ligand o'rtasida hech qanday qo'shimcha komponent ko'priqcha vazifasini o'tamasligi 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 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'llash uchun, biologik faol moddalarga xos va ularga spetsifik bo'lgan yangi ligandlarni topish, shuningdek, suvli eritmalarda erimaydigan, bo'kmaydigan

va boshqa ijobiy xususiyatlarga ega bo'lgan sorbentlarni sintez qilish kerak bo'ladi.

1.5. 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 modda makromolekularini ajratish amalga oshiriladi.

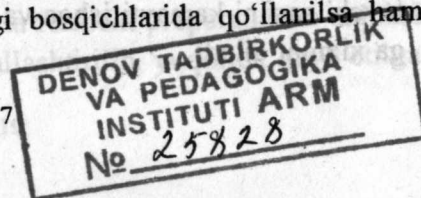
Gelfiltratsiya jarayonida ishlatiladigan gel, kolonkalarini oson to'ldirish uchun yumaloq donachalar (granula) ko'rinishida bo'ladi. Donachalarda mayda teshikchalar mavjud bo'lib, ularga faqat juda kichik molekulali birikmalar kiradi, yirik molekulalar esa kirmaydi va natijada kirmay qolgan molekulalar gel yuzasidan tezda yuvilib, kolonkadan fraksiyalarga ajralib chiqib boshlaydi.

Gelfiltratsiya jarayoni esa shu sababdan ham, moddalarning molekular 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 (sefodekslar va sefakrillar) gellaridan, poliakrilamid (biogellar), akrilamid, agaroz gellaridan (ultragellar), boshqa qattiq *CL*-sefaroza va *S*-sefakril kabi gellardan foydalaniladi. Kolonkada ferment eritmasining bir qismi gel donachalar orasida va bir qismi 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 kira olish qobiliyatiga bog'liqdir. Shuningdek, gelfiltratsiya jarayonida kolonkadan avval yuqori molekulali moddalar va keyin esa kichik molekulalari birin-ketin chiqib boshlaydi, bunda gel molekular to'rt 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 sefakrillarni 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.



1.6. 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 xoliligiga 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, glukoamilaza 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 aralashirilganda issiqlik ajralib chiqadi va aralashma harorati $5-10^{\circ}\text{C}$ ga ko'tariladi. Agarda organik erituvchi (etanol) oldindan sovutilgan bo'lmasa, fermentlarning inaktivatsiyasini kuzatish mumkin. Ushbu holat nafaqat termoinaktivlanishga, hattoki ferment molekulasining 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, erituvchining kam miqdorda sarflanishiga yordam beradi. Bordi-yu, 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 fermentlarning, quruq moddaning eng mo'tadil miqdori 10% bo'lishi kerak.

Yuqorida qayd qilingan omillar bilan bir qatorda ferment eritmalarini 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 eritmalari 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.

Separatorada 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. Separatorada 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, produktent o'stirilgan oziqa muhiti tarkibiga va ferment preparatining quyushtirilganlik darajasiga ham bog'liqdir.

1.7. Enzimlarni 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 guruhga ajratiladi: 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 uning substrati uchun o'tkazuvchanlik;
- texnologik jarayonlar uchun zarur bo'lgan shaklda olish mumkinligi;
- faol guruhlarning 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 talablarning 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 xossalari qarang guruhlarga bo'lish mumkin: polisaxaridlar, oqsil, lipid tabiatli tashuvchilar. Sun'iy, ya'ni sintez yo'li bilan olingan polimerlar ham guruhlarga bo'linadi, masalan, makromolekulalarni asosiy zanjirning kimyoviy tuzilishiga qarab, polimetilen, poliamid, poliefir tashuvchilarga va h.k.

Immobilizatsiya qilish usulini amalga oshirish jarayonida, fermentning 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 bloklanmasligi 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'lsalar, immobilizatsiya jarayoni tez va mustahkam kechadi, aksincha, bir xil zaryadga ega bo'lsalar jarayon kiyin kechadi; «tashuvchi» granulari 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 kremnezyom, 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, granular, membrana, ipsimon shakllarda ishlatilishi mumkin. Ba'zi hollarda tashuvchilar gidrodinamik qarshilikni pasaytirish maqsadida, tor parallel kanallar saqlovchi monolitlar sifatida ham chiqariladi. Tashuvchilarning eng asosiy xususiyati sorbsiya qilish xususiyati hisoblanib, bunda 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 molekulari har xil kuchlar hisobiga, masalan, nospetsifik Van-der-Vaals, elektrostatik, o'zaro ta'sirlar, vodorod bog'lari va gidrofob bog'lar orqali amalga oshiriladi. Sannab o'tilgan bog'larning nisbiy ishtiroki, ferment molekulasidagi faol guruhlarga 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 granulariga adsorbsiya qilinganda hujayra devori deformatsiyaga uchrangani kuzatilgan.

1.8. Fermentlarni fizikaviy usulda immobillash

Tashuvchilar bilan bog'langan «immobillangan fermentlar» deb nomlanuvchi bioorganik «katalizatorlar»ning yangi barqaror ferment preparatlari yaratilishi natijasida, amaliy enzimologiya oldida yangi istiqbollar ochildi. Nilson va Griffin 1916-yilda invertaza fermentini toshko'mir yoki alumogelda 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 globularining quyi molekular bifunksional reagentlar bilan ichki molekular «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 mumkin:

- 1) reaksiyani to'xtatish;
- 2) katalizatorni qaytadan qo'llash;

3) ifloslanmagan ferment asosida mahsulot olish.

Qayd etilgan yuqori ko'rsatkichlarga 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 makromolekular substratlarga munosabatiga ko'ra), muhit pH ko'rsatkichining o'zgarishiga va uni denaturlovchi omillarga barqarorligini maqsadga muvofiq o'zgartirishga imkon yaratadi.

Aynan mana shu uch jihat «enzimologiya muhandisligi» deb ataluvchi ilmiy-texnikaviy yo'nalishning asosini tashkil etadi.

Enzimologiya muhandisligining vazifasi fermentlar asosida ma'lum xususiyatlarni ko'zlagan holda bioorganik katalizatorlarni (shu jumladan, o'sish xususiyatiga ega bo'lmagan sun'iy poliferment komplekslarni va hatto hujayralarni qo'llagan holda) ishlab chiqarishdan iborat. Enzimlar xususiyatlari amaliyot uchun zarur ekanligini yodda tutish kerak. Masalan, ma'lum reaksiya sharoitlarida katalizatorning barqarorligi (termo va kislotaga barqarorligiga bog'liqligi), o'ziga xos reaksiyalarni katalizlashi (spetsifiklik), katalitik faoligi, ba'zi ta'sirlarga chidamliligi va boshqalar.

Immobillash metodlari. Fermentlarni tashuvchilar bilan bog'lash imkoniyatini beruvchi asosan uch yo'l mavjud bo'lib, bularga adsorbsion usullarni, mexanik bog'lanish va kimyoviy (kovalent) immobillashni kiritish mumkin.

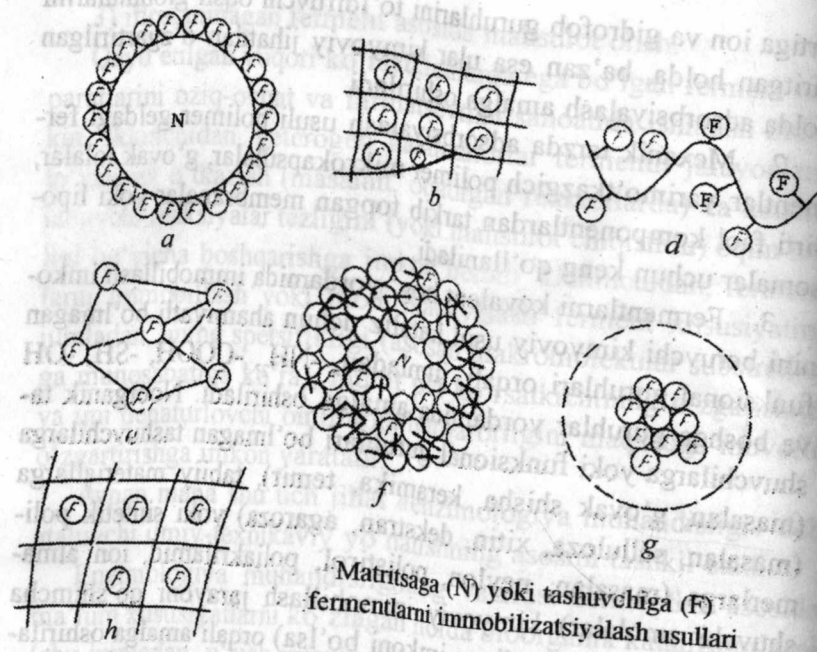
1. Fermentlarni (fizik yoki ion bog'lanishlar natijasida) keramikaga, shisha, silikagel, metall oksidlari va gidroksidlari, polisaxaridlar, organik smolalar va boshqa tashuvchilarga adsorbsiyalash mumkin. Adsorbsiyani tezlashtirish uchun fermentlarning

sirtiga ion va gidrofob guruhlarini to'ldiruvchi oqsil globularini kiritgan holda, ba'zan esa ular kimyoviy jihatdan o'zgartirilgan holda adsorbsiyalash amalga oshiriladi.

2. Mexanik tarzda adsorbsiyalash usuli polimer geldagi fermentlar, yarimo'tkazgich polimer mikrokapsulalar, g'ovak tolalar, sirti faol komponentlardan tarkib topgan membranalar yoki liposomalalar uchun keng qo'llaniladi.

3. Fermentlarni kovalent bog' yordamida immobillash imkonini beruvchi kimyoviy usul kataliz uchun ahamiyatli bo'lmagan funksional guruhlar orqali, jumladan, $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$, $-OH$ va boshqa guruhlar yordamida amalga oshiriladi. Noorganik tashuvchilarga yoki funksional guruhlar bo'lmagan tashuvchilarga (masalan, g'ovak shisha, keramika, temir), tabiiy materiallarga (masalan, selluloza, xitin, dekstran, agaroz) yoki sintetik polimerlarga (masalan, neylon, polistirol, poliakrilamid, ion almashuvchi smolalar) kimyoviy immobillash jarayoni qo'shimcha bog' hosil qilish (bordi-yu imkoni bo'lsa) orqali amalga oshiriladi.

Yuqorida ko'rsatib o'tilganidek, fermentlarni immobillashda, ular o'z xususiyatlarini saqlagan holda substrat yoki effektorlar bilan o'zaro reaksiyaga kirishish qobiliyatlarini yo'qotmasliklari zarur. Shu sababdan ham fizikaviy usulda immobillashda, bir necha usullardan foydalanish mumkin. Masalan, suvda erimaydigan «tashuvchi»larga adsorbsiya qilish; gel g'ovaklariga kiritish; yarimo'tkazgich membranalar yordamida fermentni immobillab, reaksiyon tizimni boshqa qismidan ajratish; liposomalarga immobillash yoki kiritish. Bunday sharoitda ferment ikki fazali reaksiyon muhitga kiritiladi va ushbu sharoitda ferment suvda eruvchan bo'ladi va ikkinchi fazaga o'ta olmaydi.



1-rasm. Fizik usulda immobilizatsiya qilish.

Keltirilgan klassifikatsiya shartlidir, chunki bu usullar orasida aniq ajrimlarni o'rnatish mumkin emas. Masalan, gel g'ovaklariga kiritish usuli bilan immobilizatsiya qilishni, yarimo'tkazgich membranalar orqali ajratib turish, deb qarash mumkin. Shunga qaramasdan, yuqorida qayd etilgan usullar fizikaviy usullar bilan immobilizatsiya qilishni bir tizimga solishda yordam bera oladi.

Adsorbsiya qilish orqali immobilizatsiya qilish eng qulay usullardan hisoblanadi. Shu sababdan ham yuqorida aytib o'tilganidek, 1916-yilda J.Nilson va E.Griffinlar adsorbsion usulda invertaza fermentini faollashtirilgan ko'mirga va aluminiiy gidroksid gelida immobilizatsiyalashni amalga oshirganlar.

Aynan ushbu usuldan foydalangan holda keyinroq, 1969-yilda I Shibata L-aminoatsilaza fermentini immobillab, N-atsetil-DL-aminokislotalarni bir-birlaridan ajratishni ko'rsatib bergan. Ushbu usul sanoat miqyosida hozirgacha ishlatilib kelinmoqda. Umuman, adsorbsiya usulida immobilizatsiya qilish boshqa usullardan osonligi, vazifani tez bajarish mumkinligi, tashuvchilarning arzonligi va boshqa bir qator ustunliklari bilan boshqa usullardan ajralib turadi va shu sababdan ham fermentlar muhandisligida keng qo'llanilib kelinmoqda.

1.9. Adsorbsion immobilizatsiya qilish usullari

Adsorbsiya qilish yo'li bilan immobilizatsiya qilish eng sodda usullardan biri bo'lib, ferment eritmasini «tashuvchi» bilan aralashtirish yo'li bilan amalga oshiriladi. Yopishmasdan fermentni yuvib tashlagach, immobilizatsiya qilingan ferment ishlatilishga tayyor bo'ladi. Adsorbsion immobilizatsiya qilingan fermentlarni olish uchun quyidagi uslubiy ko'rsatmalardan foydalaniladi.

Statistik usul eng oson yo'l bo'lib, «tashuvchi» ferment eritmasiga tashlanib (solinib) hosil bo'lgan aralashma, ma'lum vaqtgacha inkubatsiya qilinadi. Immobilizatsiya fermentning o'z-o'zidan diffuziyasi tufayli boshlanib, adsorbsiya bilan tugallanadi. Ushbu usulning kamchiligi, ferment eritmasi bilan «tashuvchi» aralashmasi uzoq vaqt (bir necha kungacha) inkubatsiya qilinishi lozim. Laboratoriya sharoitida ko'proq aralashtirish, ya'ni mexanik usul ishlatiladi. Bu usulda statistik usuldan farqli o'laroq ferment eritmasi bilan «tashuvchi» doimiy ravishda aralashtirib turiladi.

Aralashtirish uchun magnit aralashtirgich, mexanik aralashtirgich yoki mikrobiologik tebratgichdan foydalanish mumkin. Bu usul oldingisidan ancha ustun bo'lib, «tashuvchi» yuzasida

fermentning bir tekis joylanishini ta'minlab beradi. Ba'zida adsorbsion immobilizatsiya qilish uchun elektr cho'ktirish usulidan foydalaniladi. Buning uchun ferment eritmasiga ikkita elektrod tushiriladi, ulardan bittasining yuzasida bir qatlam «tashuvchi» joylashtirilgan bo'ladi. Elektrodlar tokka ulanganda ferment yuzasidagi faol guruhlar ($-NH_2$, $-COOH$ va h.k.) harakatlanadi va tashuvchi yuzasida cho'kadi.

Ishlab chiqarishda foydalanish uchun eng qulay usul kolonkalaridan o'tkazish usuli hisoblanadi. Ushbu usulni kolonkaning ikki tomonidan tepadan pastga qarab, mikronasoslar yordamida ferment eritmasi haydaladi va teskarisi, pastdan tepaga qarab ferment eritmasi yo'naltiradi. Kolonkadan o'tkazish usulida fermentni haydash, yuvish, tozalash va shu bilan birga toza mahsulot olish jarayonlarini birgina kolonkaning o'zida amalga oshirish mumkin. Ushbu usulda hech qanday manipulatsiya jarayonlari amalga oshirilmaydi.

1.10. Fermentlar adsorbsiyasiga ta'sir etuvchi omillar

Adsorbsiya o'tish jarayoni va ferment bilan «tashuvchi» orasidagi bog'ning mustahkamligi, ko'pchilik hollarda immobilizatsiya qilish sharoitiga bog'liq bo'ladi. Ferment adsorbsiyasiga ta'sir etuvchi omillarga quyidagilar kiradi: tashuvchining g'ovakligi va uning sirt faolligi.

Tashuvchini sorbsiya qilish hajmi uning sirtining faolligiga to'g'ri proporsional oqsil yoki fermentga kelganda bu qonuniyat faqatgina tashuvchining g'ovakligi oqsil molekulasidan anchagina katta bo'lgandagina o'z kuchini saqlaydi. Tashuvchining g'ovakligi juda kichik bo'lganda, fermentlar g'ovaklarga kira olmasa, fermentlar uchun tashuvchilar sathining ma'lum bir qismigina foydali bo'ladi, xolos. Bunday vaqtlarda tashuvchining sorb-

siya qilish imkoniyatlari juda kam bo'ladi, boshqacha qilib aytganda, g'ovaklar qancha kichik bo'lsa, tashuvchining adsorbsiya qilish imkoniyatlari shuncha kam bo'ladi. G'ovaklarning mo'tadil hajmini hisoblashni birinchilardan bo'lib 1976-yilda R. Messing taklif etgan. U shisha va sopol materiallardan tashuvchi sifatida foydalanib, ularning g'ovaklari kattaligini (hajmini) o'lchab chiqdi va g'ovaklarning kattaligi ferment molekulasidan taxminan 2 marotaba katta bo'lgan hollarda tashuvchining adsorbsion imkoniyatlari maksimum bo'lishini tajribalarda isbotlab berdi.

Bunday holda substratning molekular o'lchami fermentdan ancha kichik bo'lmog'i va sorbsiya qilingan ferment g'ovaklariga bemalol kirib turishi lozim.

Substrat molekulasining hajmi fermentnikidan katta bo'lgan hollarda tashuvchining g'ovakligi substrat molekulasi bilan belgilanadi. Ba'zi bir hollarda substratning o'zi tashuvchi vazifasini bajarishi ham mumkin. Masalan, sellulaza fermentini immobilizatsiya qilish uchun, uning substrati bo'lgan sellulozadan keng foydalaniladi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, enzimlarni immobilashda tashqi omillar katta ta'sir ko'rsatadi. Masalan, pH reaksion muhit immobilizatsiya qilish jarayonida, ayniqsa, sorbsiya, elektrostatik o'zaro ta'sir yordamida amalga oshirilgan holatlarda muhim rol o'ynaydi.

Bunga asosiy sabab, pH o'zgarishi bilan oqsil yoki tashuvchining sorbsiya uchun javobgar bo'lgan ionogen guruhlarining ionlashuvi o'zgaradi. Ionalmashuv xossalriga ega bo'lmagan tashuvchilardan foydalanganda, sorbsiya oqsil yoki fermentning izoelektrik nuqtasida amalga oshirilsa yaxshi natija beradi.

Ammo ushbu qonuniyatni chetlab o'tish hollari ham uchrab turadi. Masalan, albuminning lateksga sorbsiya bo'lishini har xil pH da o'rganib chiqilganda bu jarayonning pH muhitga bog'liqligi aniqlangan, ko'mirga albumin adsorbsiya qilinganda esa, mo'tadil

pH 3 dan 6 gacha o'zgarishi, bu o'zgarish ko'mirning tabiatiga bog'liqligi isbotlangan.

Ion kuchi ferment bilan tashuvchi orasidagi bog'lanish kuchiga ta'sir ko'rsatuvchi omil hisoblanadi. Ushbu holda, bordiyu, tuzlarning konsentratsiyasi yuqori miqdorda bo'lsa, bunda tuz ionlari tashuvchi sirtidan elektrostatik yo'l bilan bog'langan fermentni siqib chiqaradi.

Boshqacha qilib aytganda, ion kuchining oshishi bilan fermentning desorbsiyalanishi oshib boradi. Ba'zi hollarda bunga aksincha ta'sir ham bo'lishi mumkin. Bunday hollarda oqsilning «tuzlanishi» sodir bo'lishi mumkin.

Fermentning miqdoriy konsentratsiyasi. Eritmada fermentning miqdori oshib borgan sari, uning sorbsiya bo'lishi va immobilizatsiya bo'lgan fermentning katalitik faolligi ortib boradi.

Immobilizatsiya bo'lgan ferment faolligini, eritmadagi ferment miqdoriga nisbatan taqqoslab o'rganilganda, shu narsa ma'lum bo'ldiki, fermentning eritmadagi miqdorining oshib borishi bilan immobilangan fermentning katalitik faolligi ham oshib boradi, keyin esa faollik o'zgarmasligini va hatto kamayishini ham kuzatish mumkin.

Tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, fermentning faolligi tashuvchi sathini butunlay qoplab olgunga qadar ortar ekan. Shundan so'ng esa, tashuvchi yuzasida ferment molekulalarining qavatma-qavat joylashishi sodir bo'ladi. Bunda tashuvchi yuzasining eng yuqori qismida joylashgan fermentlarga faollik ko'rsata oladi. Quyi qismida, ya'ni ferment molekulasining molekula ostida joylashganlari esa substrat bilan reaksiyaga kirisha olmaydilar. Shu sababdan, ferment konsentratsiyasini muttasil oshirish, immobilash jarayoniga ijobiy ta'sir etmay, ferment molekulasining ortiqcha sarf bo'lishiga olib keladi.

Haroratning oshishi adsorbsiya jarayoniga ikki xil ta'sir qiladi. Birinchidan, haroratning oshishi fermentning inaktivatsiya

(denaturatsiya)siga olib keladi, ikkinchi tomondan esa haroratning oshishi ferment molekulalarini tashuvchi g'ovaklariga diffuziyasini kuchaytirishi natijasida, ferment faolligining oshishiga olib keladi. Demak, adsorbsiya yo'li bilan immobilizatsiya qilishning mo'tadil sharoiti bo'lish zarur.

Adsorbsiya jarayonida tashuvchi yuzasiga bog'liq bo'lib, har bir ferment yoki tashuvchi uchun ushbu omil tajribalar asosida aniqlanadi. Shunday qilib, fermentlarni adsorbsiya yo'li bilan immobilizatsiya qilish bir qator omillarga bog'liq bo'lib, adsorbsiya jarayonida yuqorida qayd etilgan omillar albatta inobatga olinishi kerak.

1.11. Fermentning tashuvchi bilan bog'lanish kuchini oshiruvchi usullar

Tashuvchi yuzasini oldindan modifikatsiya qilish adsorbsiya kuchini keskin oshirishga olib keladi. Bundan tashqari, ferment molekulasi atrofida maxsus sharoit yaratilishi natijasida, oldindan modifikatsiya qilingan tashuvchida immobilizatsiya qilingan fermentning katalitik faolligi ortadi.

Modifikatsiya qilmasdan adsorbsiya qilish, ferment faolligining butunlay yo'qolishigacha olib kelishi mumkin. Masalan, agar fermentning barqarorligi nordon sharoitda past bo'lsa, silikagelga sorbsiya qilingan fermentning faolligi butunlay yo'qoladi, chunki silikagelning yuzasi nordon muhitga ega (pH 4,0).

Bunday sharoitda, immobilizatsiyadan oldin silikagelni ma'lum pH ga ega bo'lgan buferda, fermentni esa mo'tadil pH da saqlab turish lozim bo'ladi.

Xuddi shunday muammo, fermentlar faol markazida metall mavjud bo'lgan holatlarda, olib borilayotgan tadqiqotlarda kelib chiqishi mumkin. Bunga sabab, ba'zi bir tashuvchilar o'zlariga

metall ionlarini tortib olish xususiyatiga egalar. Bunday tashuvchilarda adsorbsiya qilingan fermentlar, o'z faol markazidagi metallning chiqib ketishi hisobidan faoliyatlarini yo'qotishlari mumkin. Ushbu holni bartaraf etish uchun, tashuvchini maxsus metall ionlari saqlagan eritmalarda uzoq vaqt ushlab turish va shu tufayli uning metall ioniga nisbatan bo'lgan ehtiyojini qondirish mumkin bo'ladi.

Tashuvchilarni metall ionlari bilan to'yintirish adsorbsiya yo'li bilan immobilizatsiya qilishni mo'tadillashtirishda ham ishlatiladi. Tashuvchi sirti metall ionlari bilan to'yintirilganda (buning uchun Ti, Sn, Zr, V va Fe ishlatiladi), fermentni sorbsiya qilish xususiyati ortadi, bunga sabab metall ioni ferment bilan tashuvchi orasida ko'prik bo'lib xizmat qilishidir. Immobilizatsiyaning bu usuli selluloza, neylon, shisha, filtr, qog'oz kabi tashuvchilardan foydalanilganda yaxshi natijalar berishi isbotlangan.

1.12. Modifikatsiya qilingan fermentlarni immobilizatsiya qilish

Fermentlarni ionalmashuvchi tashuvchilarga adsorbsiya yo'li bilan immobilizatsiya qilishda, fermentlarning izoelektrik nuqtasi va pH muhit mo'tadilligi bir-biriga yaqin bo'lgan holatlarda tajriba o'tkazilsa, bir qator muammolar paydo bo'lishi mumkin. Bunday holatda ferment bilan tashuvchi orasidagi mustahkam bog'lanish faqatgina izoelektrik nuqtadan uzoqroq bo'lgan pH muhitda, ya'ni fermentning katalitik xususiyati past bo'lgan sharoitda amalga oshiriladi.

Shuning uchun ham fermentni oldindan modifikatsiya qilish, ya'ni ferment molekulasiga yangi ionogen guruhlar kiritish maqsadga muvofiq bo'ladi. Masalan, L-ximotripsin xlortriazin bilan aralashtirilganda, uning izoelektrik nuqtasi ishqoriy tomonga siljishi va shu tufayli ferment ko'pgina tashuvchilarga adsorbsiya

bo'lishi, natijada esa katalitik faolligi saqlanib qolishi isbotlangan.

Boshqa bir misol, L-ximotripsin KM-selluloza bilan modifikatsiya qilinsa, ferment neytral pH muhitda DEAE-sellulozaga yoki DEAE-sefodoksga o'z faolligini saqlagan holda immobilizatsiyalanishi muvaffaqiyatli amalga oshadi.

Immobilizatsiya bo'lgan fermentni tashuvchi yuzasidan oson yuvilib ketmasligi uchun adsorbsiya qilingan ferment qatlamiga bifunksional agentlar bilan ishlov berish kerak bo'ladi. Natijada tashuvchi yuzasida fermentlarning bir-birlariga bog'langan holatidan iborat yupqa plyonka hosil bo'ladi. Bifunksional agent sifatida glutaraldegid, gossipol va boshqalarni ishlatish mumkin.

Immobilizatsiya qilishning original yo'li professor K.Martinek tomonidan amalga oshirilgan. Bunda tadqiqot davomida qisman kimyoviy destruksiya uchragan neylon iplaridan foydalanilib, ushbu tashuvchi ferment eritmasiga solinadi va mexanik ravishda tortiladi. Natijada neylonning g'ovaklari yiriklashib, unga fermentning joylashishi osonlashadi. Ma'lum vaqtdan keyin tashuvchini tortish jarayoni to'xtatiladi. Bunda neylon yana o'z holatiga qaytadi, ferment molekulalari esa g'ovaklarga siqilib kirib adsorbsiyalanadi.

Elektr toki yordamida faol moddani adsorbsiyalash usuli immobilizatsiyaning yangi usullaridan bo'lib, membranalar yordamida ajratilgan elektrodlar bilan kollektorlarda elektr maydoni hosil qilish orqali amalga oshiriladi. Tashuvchi sifatida silikagel, ionalmashuv smolalarini, turli minerallarni ishlatilish mumkin.

Ferment kollektordagi tashuvchida elektrostatik va dipol-dipollik o'zaro ta'sir kuchlari orqali ushlab turiladi. Ushbu usulning salbiy jihati shundan iboratki, immobilizatsiya jarayoni butkul elektr toki ta'sirida bo'lishi shart. Elektr tokining uzatilishi to'xtatilsa, bunday holatda ferment tashuvchidan tezda yuvilib ketadi.

Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, adsorbsiya yo'li bilan immobilizatsiya qilishning o'ziga xos afzalliklari va kamchiliklari mavjuddir. Adsorbsiya jarayonining ijobiy xususiyatiga sorbentning arzonligi, tadqiqot o'tkazishning osonligi, bir vaqtning o'zida ferment preparatini tozalash mumkinligini kiritish mumkin. Ushbu usulning kamchiliklariga esa, ferment va tashuvchi orasidagi bog'ning mustahkam emasligi, umumiy yagona yo'riqnomaning yo'qligini kiritish mumkin.

1.13. Fermentlarni gel ichiga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilish

Fermentlarni gel ichiga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilish usulining mohiyati shundan iboratki, ferment molekulasi, qattiq to'qilgan polimer zanjirlaridan iborat bo'lgan gel hosil qiluvchi elaklarga o'rnatiladi. Zanjir bog'lari orasidagi masofa ferment molekulasidan kichik bo'lgani uchun, u mahkam siqilib turadi va polimerdan chiqib keta olmaydi. Ferment bilan tashuvchi orasidagi bog'ning mustahkamligini oshiruvchi omil rolini ferment va tashuvchi gel orasida paydo bo'lgan vodorod bog'lari ham o'ynashi mumkin. Bunda polimer zanjirlari orasidagi bo'shliq suv bilan to'ldirilgan bo'ladi. Masalan, akril kislotasi hosilalari asosida paydo bo'lgan gelda, uning miqdoriga qarab, 50 dan 90% gacha suv bo'lishi mumkin.

Fermentlarni gelda immobilizatsiya qilishning ikki usuli bor. Birinchisi, ferment monomer eritmasida eritiladi, so'ngra polimerizatsiya qilinadi. Bunday eritmaga ko'pchilik hollarda bifunksional agentlar ham qo'shiladi.

Ikkinchisi, P.Bertfeld va J.Uenlar ishlatgan N-N' metilen-biakrilamidni polimerizatsiya qilish asosida olinadigan immobilizatsiyalangan fermentlardir.

Gelga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilish usuli o'zining soddaligi bilan ajralib turadi. Bu usul bilan fermentni xohlagan

geometrik konformatsiyada (sferik zarrachalar va h.k.) olish va fermentning tashuvchi ichida bir tekis tarqalishiga erishish mumkin.

Ko'pchilik polimer gellar o'zlarining mexanik va kimyoviy issiqqa chidamliligi bilan ajralib turadi. Bu xususiyatlar esa fermentlarni bir necha marotaba ishlatish imkonini beradi. Bu usul universal usul bo'lib, nafaqat barcha xildagi fermentlar, balki poliferment tizimlar, hujayra va hujayra fragmentlarini immobilizatsiya qilishda ham qo'llash mumkin. Bu usulning ijobiy tomonlaridan yana biri – immobillangan fermentning barqaror holatga o'tishidir. Ushbu usulda immobilizatsiya qilingan ferment bakteriologik zararlanmaydi. Sababi bunday holatda ferment molekulasidan katta bo'lgan bakteriyalar gelning ichiga kira olmaydi.

Usulning eng katta kamchiligi ba'zi bir holatda, polimer matrxilari substratning diffuziyasiga xalaqit beradi va shu tufayli ferment faolligi past bo'lishi mumkin. Jarayon davomida ferment substratlari yuqori molekularli moddalar bo'lsa, u holda ushbu usul yaxshi natija bermaydi.

1.14. Faol moddalarni yarimo'tkazgich membranalar va mikrokapsullash asosida immobilizatsiya qilish

Yarimo'tkazgich membranalar yordamida immobilizatsiya qilish kichik molekularli substratning suvdagi eritmasi, katta molekulaga ega bo'lgan ferment eritmasidan yarimo'tkazgich membrana yordamida ajralib turishiga asoslangan. Yarimo'tkazgich membrana substratni oson o'tkazadi, ferment esa membranadan o'ta olmaydi.

Mikrokapsulalash usuli birinchi bo'lib 1964-yilda T.Chang tomonidan yaratilgan. Bu usul fermentning suvdagi eritmasini mikrokapsulalar ichiga joylashtirishdan iborat. Mayda teshikli polimer plyonkalardan tashkil topgan kichik ko'ptokchalar ichida-

gi fermentlarning tashqariga chiqishi ancha mushkul. Kapsulalarni olish usuliga qarab, ularning o'lchami har xil bo'ladi (10 dan 100 mikrometrgacha).

Mikrokapsulalar olishning bir necha usuli mavjuddir. Bunda fermentning suvdagi eritmasi PAV (sirti faol moddalar) saqlovchi dietilefiri bilan kuchli aralashtirish natijasida dispers holatga o'tkaziladi. Bu yerda PAV emulgator vazifasini bajaradi. Hosil bo'lgan emulsiyaga to'xtatmasdan polimerning efitrdagi eritmasi qo'shib boriladi.

Polimer (nitrat selluloza) suvda erimasligi sababli, emulsiyaga tekkan joyida yupqa membrana, mikrokapsula hosil qiladi. Tayyor bo'lgan mikrokapsula sentrifuga yordamida yoki filtrlash yo'li bilan ajratib olinadi.

Mikrokapsula hosil qilishning ikkinchi yo'li - ikki moddaning fazalararo polikondensatsiya qilishiga asoslangan. Moddalardan biri suvning mayda emulsiyalarida, ikkinchisi esa organik fazada erigan bo'ladi. Ko'p tarqalgan va tadqiqotlarda qo'llaniladigan mikrokapsulalardan biri poliamiddir.

Poliamid mikrokapsula 1,6-geksametilendiamin (suv fazasi) va sebatsin kislotasining xlor gidridi (organik faza) asosida olinadi. Bu usul faqatgina yuqori pH ga chidamli bo'lgan (diamin eritmasi) fermentlar uchun qo'llanilishi maqsadga muvofiq bo'ladi. Mikrokapsula hosil qilish uchun ishlatiladigan ferment eritmasi 10% atrofida inert oqsil moddasi (gemogloblin) saqlashi lozim. Bu oqsil kapsula ichida kerakli bosim bo'lishini hamda fermentning mo'tadilligini ta'minlaydi. Fermentning mo'tadilligini oshirish uchun glutaraldegid bilan ishlov beriladi, ba'zida esa adsorbsiya yoki gelga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilinadi.

Ba'zi holatlarda immobilizatsiya qilish uchun molekularlari kovalent bog'langan oqsillardan tashkil topgan membranalardan ham foydalanish mumkin.

1.15. Fermentlarni emulgirash asosida immobilash

Fermentlarni emulgirash asosida immobilash usuli bir qator usullarga ega hisoblanib, enzimlarni immobilashning mavjud usullaridan o'ziga xos ustunliklari bilan farq qiladi. Ushbu usul bilan ferment preparati immobilizatsiya qilinganda, avvalo, ferment suvdagi eritmasining organik polimerdagi emulsiyasi tayyorlanadi. Tayyor emulsiya yana bir bor suvda dispersiya qilinadi. Natijada, fermentning suvdagi eritmasini saqlagan organik moddaning (polimerning) emulsiyasi hosil bo'ladi. Vaqt o'tishi bilan organik eritma qotadi va immobilangan ferment saqlovchi polimer zarrachalari hosil bo'ladi.

1972-yilda S.Mey va N.Li kabi olimlar ushbu usulni modifikatsiya qilganlar va membrana hosil qiluvchi materiallar sifatida suvda erimaydigan polimer o'rniga, katta molekular massaga ega bo'lgan suyuq uglevodorodlardan foydalanishni tavsiya etganlar. Ushbu usul suyuq membranalarda immobilizatsiya qilish deb ataladi. Bundan tashqari, tolaga kiritish, liposomaga kiritish, mikroemulsiya hosil qilish kabi bir qator usullar ham mavjud. Fermentlarni emulgirash asosida amalga oshiriladigan immobilash oqsil tabiatli biologik faol moddalarni tashqi ta'sirlardan saqlash bilan birga, preparatlar uzoq saqlanganda (oylar va yillar davomida) ularning faolliklarini juda ham kam miqdorda yo'qolishiga olib keladi.

1.16. Fermentlarni kimyoviy immobilash

Fermentlarni kimyoviy immobilash usulining boshqa usullardan asosiy farqi shundaki, bunda immobilizatsiya jarayonida, kimyoviy ta'sir natijasida, ferment bilan tashuvchi orasida qo'shimcha kovalent bog' paydo bo'ladi. Ushbu usulda immo-

bilizatsiya qilingan fermentlar yuqorida qayd etilgan usullar yordamida immobillangan fermentlardan ba'zi ustun jihatlari bilan farq qiladi. Birinchidan, ferment va tashuvchi orasidagi kovalent bog', hosil bo'lgan konyugatni yuqori darajada mustahkam qiladi. Boshqacha qilib aytganda, ferment ishtirokida o'tadigan reaksiyalarda pH muhitning o'zgarishi, shuningdek harorat ortishi va boshqa ko'rsatkichlarning texnologik jarayonda o'zgarishi, ferment molekulasi desorbsiyalanishiga va shu bilan birga olinadigan mahsulotning ifloslanishiga olib kelmaydi.

Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, ferment molekulalarini va shu bilan birga boshqa biologik faol moddalarni immobillash yo'li bilan barqaror formalarini olish va yaratish, ayniqsa, tibbiyotda, oziq-ovqat sanoatida, analitik ishlar uchun reaktivlar olishda o'ta muhim ahamiyat kasb etadi. Ikkinchidan, kimyoviy modifikatsiya fermentning faolligi va mo'tadilligining oshishiga olib keladi. Faqatgina kimyoviy yo'l bilan, ko'p nuqtalik bog'lanishlar natijasida fermentning mo'tadilligini oshirish o'z o'rnida bir qator ehtiyotkorlikni va o'ziga xos yondashuvni talab etadigan usul hisoblanadi. Sababi, ba'zi holatlarda fermentlarni tikuvchi yordamida modifikatsiya qilish ferment molekulasi faolligining qisman, ba'zida esa butkul yo'qolishiga olib kelishi mumkin. Shu sababli, fermentlarni tikuvchi reagent yordamida modifikatsiya qilishda tikuvchi konsentratsiyasini tanlash muhim rol o'ynaydi.

Tashuvchilarga yetarli darajadagi yuqori bog'lanuvchanlik xususiyatini berish uchun ba'zan uning sirtini «faollashga» to'g'ri keladi. 2-rasmda oqsilning polisaxarid matritsasidagi immobillashning klassik metodlari keltirilgan. Birinchi bosqichda tashuvchi kaliy periodat asosida aldegid guruh paydo bo'lgunga qadar oksidlanadi. So'ngra esa ferment molekulasi, faollangan tashuvchi hamda azometin bog'lari bilan bog'lanadi. Bunda oqsil hamda tashuvchi orasidagi bog'larning barqaror bo'lishi uchun natriy borgidrid yordamida ishlov beriladi.

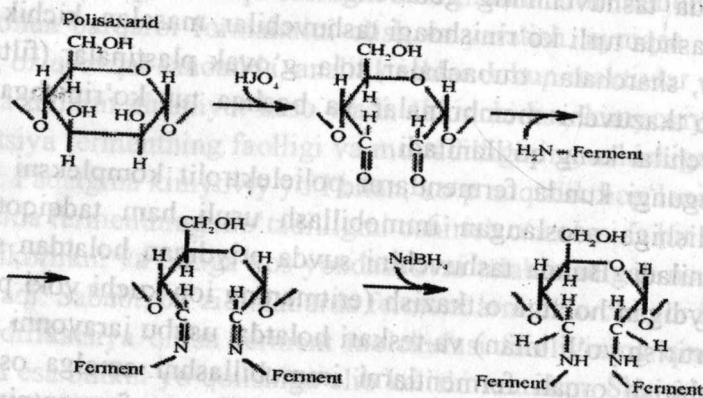
Faol moddalarni kimyoviy immobillash usullaridan biri – bu sopolimerizatsiya metodi (3-rasm). Birinchi bosqichda sopolimerizatsiyalanishga qulaylik uchun ferment molekulasi qo'shbog'lar kiritiladi. Masalan, ferment akriloklorid bilan atsillanadi. Keyin akrilolirlangan fermentni monomer eritmasiga kiritish orqali sopolimerizatsiyalanadi. Natijada ferment gelning polimer to'riga kimyoviy «tikilgan» ko'rinishda joylashadi. Faol moddalarni immobillashda tashuvchini tanlash va immobillash usuli va shu bilan birga fermentning tabiati muhim ahamiyatga ega.

Bu o'rinda shuni qayd etish kerakki, faol moddalarni immobillashda tashuvchining geometrik ko'rinishlari muhimdir. Immobillashda turli ko'rinishdagi tashuvchilar, masalan, kichik granulalar, sharchalar, trubachalar, tola, g'ovak plastinalar (filtrlar), yarimo'tkazuvchi membranalar va boshqa tur ko'rinishga ega tashuvchilar keng qo'llaniladi.

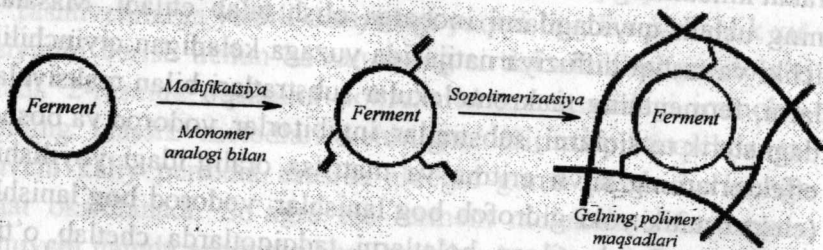
Bugungi kunda fermentlarni polielektrolit kompleksni egalab olishiga asoslangan immobillash usuli ham tadqiqotlarda qo'llaniladi. Bunda tashuvchini suvda eriydigan holatdan suvda erimaydigan holatga o'tkazish (eritmaning ion kuchi yoki pH ini o'zgartirish yo'li bilan) va teskari holatda, ushbu jarayonni amalga oshirish orqali fermentlarni immobillashni amalga oshirish mumkin. Usulni bajarish vaqtida immobillangan fermentning harakat kinetikasiga tashuvchi jiddiy ta'sir ko'rsatishi mumkin. Shuning uchun quyidagilarni inobatga olish talab etiladi. Masalan, ichki va tashqi diffuziya natijasida yuzaga keladigan qiyinchiliklarni, fermentning makromolekular substratlari bilan reaksiyalardagi sterik to'siqlarni, substratlar, ingibitorlar, vodorod va boshqa effektorlarning suvli eritma va matritsa oralig'idagi yoyilishini (elektrostatik yoki gidrofob bog'lanishlar, vodorod bog'lanishlar hisobiga). Qayd etilgan holatlarni tadqiqotlarda chetlab o'tish uchun, texnologik jarayonda tashuvchini yoki immobillanish sharoitini tanlash orqali erishish mumkin. Ba'zida, masalan, yoyilish

effektlaridan katalizatorga boshqa bir xususiyat berish maqsadida foydalanish mumkin.

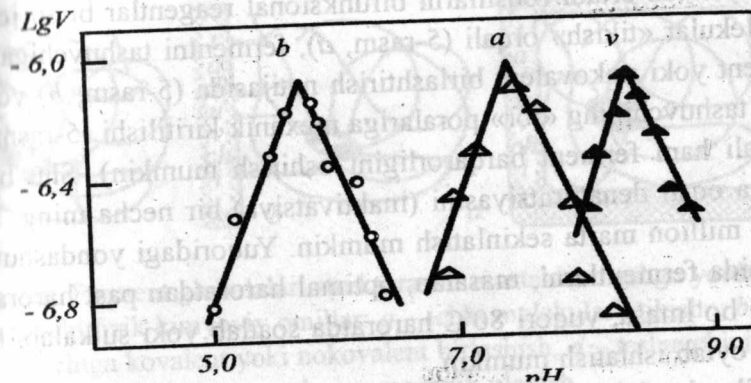
Anionli polielektrolitlarda boradigan immobillanish jarayonida esa (4-rasm, *a*) manfiy zaryadga ega matritsa zonasidagi gidroksil ionlarining konsentrlanishi sodir bo'ladi, bu esa eritma bilan solishtirilganda ferment mikroo'ramini xarakterlovchi pH ning lokal qiymati «kislotali tomonga» siljishini ta'minlaydi. Natijada kuzatilayotgan katalitik faollikning pH profili, bufer pH ning yuqori qiymati tomon o'zgaradi. Kation polielektrolitdagi immobillashda esa, teskari bog'liqlik uchun yuz beradi (4-rasm, *b*).



2-rasm. Fermentning polisaxaridli tashuvchiga kovalent birikishi.



3-rasm. Fermentning polimer geldagi immobillanishi uchun sopolimerlanish metodi.



4-rasm. Benzilpenitsillinning penitsillinamidaza bilan gidrolizi maksimal tezligining pH muhitga bog'liqligi: a - nativ ferment; fermentning polikation (*b*) va polianion (*a*) bilan kompleksi.

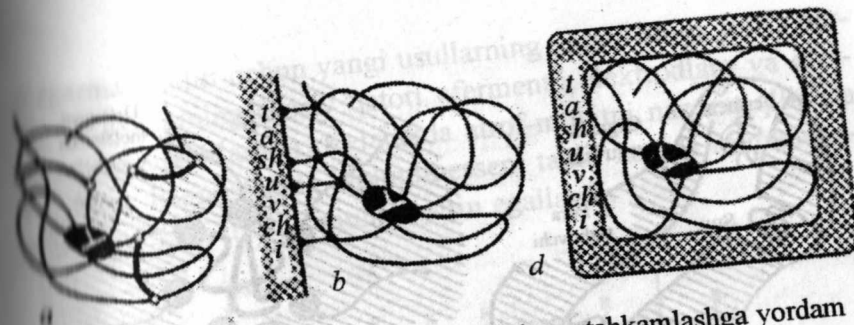
Ma'lumki, fermentlarni va bir qator faol moddalarning faolliklari va o'ziga xos xususiyatlari yuqorida ta'kidlanganidek, atrof-muhitda deyarli doim uchraydigan mikroorganizmlar, shuningdek harorat, pH muhitning keskin o'zgarishi, mexanik ta'sirlar natijasida o'zgarishi mumkin. Shu sababli, fermentlarni uzoq muddat saqlashda mikroo'vakli tashuvchilarga biriktirish orqali ekranlash bilan muhofazalash mumkin. Natijada, fermentning tashuvchi bilan bog'lanishi, shuningdek, turli ferment-fermentli bog'lanish tipidagi polimolekular inaktivatsion jarayonlar, agregatsiya yoki proteolitik fermentlar mavjud muhitlarda, avtoliz jarayonining kechish imkoniyati bloklanadi (yoki qiyin kechadi).

Fermentlarning inaktivatsiyasi va denaturatsiyasini, molekulaning faol konformatsion o'zgarishini, ferment molekulasini sun'iy mahkamlash orqali to'sib qo'yish mumkin. Bu o'rinda o'zini oqlagan bir qancha prinsiplar va yondashuvlarni keltirish mumkin (5-rasm). Rasmda ko'rsatilganidek, oqsil molekulasining fazoviy tuzilishiga halqalar kiritilganda, molekulaning barqaror-

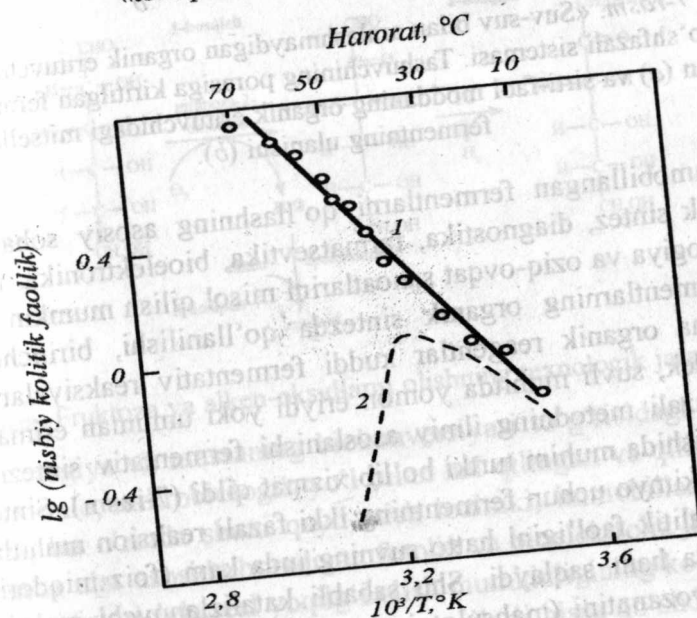
ligi yanada ortadi (oqsillarni bifunksional reagentlar bilan ichki molekular «tikish» orqali (5-rasm, *a*), fermentni tashuvchiga kovalent yoki nokovalent birlashtirish natijasida (5-rasm, *b*) yoxud uni tashuvchining «tor» poralariga mexanik kiritilishi (5-rasm, *d*) orqali ham ferment barqarorligini oshirish mumkin). Shu bilan birga oqsil denaturatsiyasini (inaktivatsiya) bir necha ming, hatto ki million marta sekinlatish mumkin. Yuqoridagi yondashuvlar asosida fermentlarni, masalan, optimal haroratdan past haroratda yoki bo'lmasa, yuqori 80°C haroratda soatlab yoki sutkalab, hatto ki oylab ishlatish mumkin.

Shuningdek, tarkibida suv kam bo'lgan organik erituvchilarda fermentlarni ishlatish masalasi ham hal etildi. Bunday holatda ikki fazali sistemalar, jumladan suv-suv bilan aralashmaydigan organik erituvchidan foydalaniladi (7-rasm).

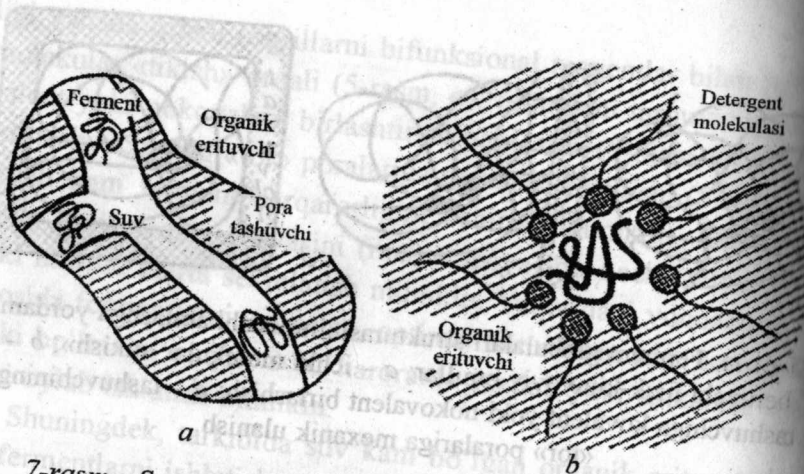
Geterogen reaksiyon muhitni, odatda, fermentning organik muhitdagi suvli eritmasi, mikroemulsiya singari yoki metodik va texnologik jihatdan yanada qulay fermentning suvli eritmasi bilan to'yintirilgan organik fazadagi (shisha, keramika va boshqalar) g'ovaksimon tashuvchilarning suspenziyalari ko'rinishida hosil qilinishi mumkin. Bunday reaksiyon muhitda ferment sirti faol moddaning (detergent, lipid) mitsellasiga bog'langan holda bo'lib, bir necha yuz ming suv molekularini tutuvchi o'ziga xos mikroreaktorda harakat qiladi (7-rasm, *b*). Ushbu jarayon bugungi kunda turli tadqiqot va texnologik jarayonlarda keng qo'llanilib kelinmoqda. Fermentlarni barqarorlashning ilmiy asoslari yaratilishi, denaturatsiyalangan fermentlarning qayta faollanishi va kofaktorlarning regeneratsiyasi, ularni bir necha marotaba qayta ishlatish bilan birga, ularning fizik-kimyoviy xususiyatlarini o'rganishda, texnologik jarayonda qo'llashda va ishlab chiqarishda ulardan keng foydalanish imkoniyatini ochib bermoqda.



5-rasm. Ferment globulari strukturasi mustahkamlashga yordam beruvchi fizik-kimyoviy omillar: *a* – ichki molekular «tikish»; *b* – tashuvchiga kovalent yoki nokovalent birlashish; *d* – tashuvchining «tor» poralariga mexanik ulanish.



6-rasm. Ferment faolligining haroratga bog'liqligi: 1 – sopolimerlanish usulida poliakrilamid gelida immobilangan ximotripsin (3-rasmga qarang); 2 – erkin ferment.

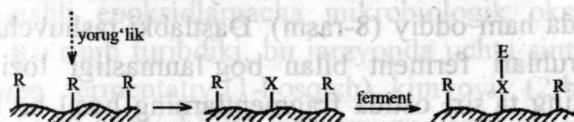


7-rasm. «Suv-suv bilan aralashmaydigan organik erituvchi» qo'shfazali sistemasi. Tashuvchining porasiga kiritilgan ferment bilan (a) va sirti-faol moddaning organik erituvchidagi mitsellasiga fermentning ulanishi (b).

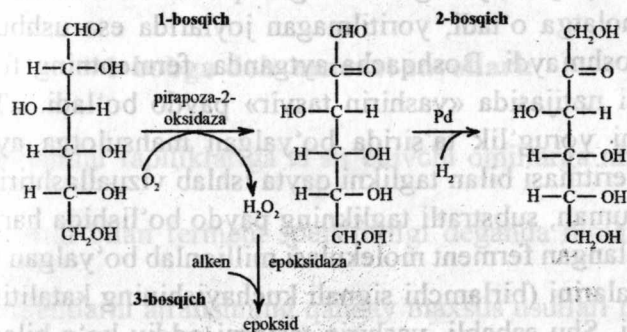
Immobilangan fermentlarni qo'llashning asosiy sohalariga organik sintez, diagnostika, farmatsevtika, bioelektronika, nanotexnologiya va oziq-ovqat sanoatlarini misol qilish mumkin. Fermentlarning organik sintezda qo'llanilishi, birinchidan, ko'pgina organik reagentlar xuddi fermentativ reaksiyalarning muhitdek, suvli muhitda yomon eriydi yoki umuman erimaydi. Qo'shfazali metodning ilmiy asoslanishi fermentativ sintezning rivojlanishida muhim turtki bo'lib xizmat qildi (7-rasm). Sintetik organik kimyo uchun fermentning ikki fazali reaksiyon muhitlaridagi katalitik faolligini hatto suvning juda kam (foiz miqdorini) miqdorida ham saqlaydi. Shu sababli katalizlanuvchi reaksiyaning muvozanatini (mahsulotning chiqishini) tadqiqotchi kerakli organik erituvchini tanlagan holda, katta diapazonda nazorat qilishi mumkin.

Immobilangan fermentlar ko'p komponentli organik birikmalar (ba'zi holatlarda noorganik) sistemalarining «reagentsiz»

uzgarmas tahlili uchun yangi usullarning yaratilishiga turtki berdi. Bu usullarning asosiy qatori «fermentli elektrodlar» va «fermentli termistorlar»dir. Kelajakda atrof-muhitni nazorat qilishda va klinik diagnostikada bioluminescent tahlil hamda immunoensim tahlili kabi usullar muhim o'rin egallaydi.



8-rasm. Fermentning fotoimmobillanish sxemasi.



9-rasm. Fruktosa va alken-oksidlarni olishning texnologik jarayonlari.

Energiya va massaning biokonversiyasi to'g'risidagi masalalar, avvalo, mikrobiologik yo'l bilan hal qilingan va qilinmoqda. Biroq bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, immobilangan fermentlar ular asosida boradigan fotoliz va bioelektroliz jarayonini amalga oshirishda real yoqilg'i olish mumkinligining ko'rsatilishi biotexnologiya sohasining rivojiga sezilarli hissa qo'shdi.

Kuchsiz signallarning sun'iy fermentativ kuchaytirish immobilangan fermentning faol markaziga tashuvchi orqali, ultratovushli qayta ishlash va fotokimyoviy aylanishlar yordamida ta'sir qilish amalga oshirilishi ma'lum. Ushbu holat ferment-tashuvchi

sistemaning katalitik faolligini mexanik, ultratovush va yorug'lik signallari ta'sirida boshqarish imkonini berdi. Ushbu jarayon asosida mexano- va ovoz sezuvchi datchik qurilmalari yaratildi va kumushsiz fotografiyaga keng yo'l ochildi.

Fermentlarni immobillash usuli yordamida tasvirlarni olish g'oyasi juda ham oddiy (8-rasm). Dastlabki tashuvchining funksional guruhlari ferment bilan bog'lanmasligi lozim, birgina yorug'likning ta'siri ostida fragmentlarning hosil bo'lishi (K-X) natijasida fermentni kimyoviy biriktirib olish xususiyatini paydo qiluvchi kimyoviy o'zgarishlar amalga oshadi.

Shunday qilib, yorug'lik tushgan qismlarda ferment immobillangan holatga o'tadi, yoritilmagan joylarida esa ushbu jarayon amalga oshmaydi. Boshqacha aytganda, fermentning fotoimmobilanishi natijasida «yashirin tasvir» paydo bo'ladi. «Tikilgan» fermentni yorug'lik ta'sirida bo'yalgan mahsulotga aylanuvchi substrat eritmasi bilan taglikni qayta ishlab vizuallashtirish mumkin. Umuman, substratli taglikning paydo bo'lishida har bir fotoimmobillangan ferment molekulasi millionlab bo'yalgan mahsulot molekularini (birlamchi signali kuchayishining katalitik effekti) to'playdi. Shu sababli, yashirin tasvirni oddiy ko'z bilan ko'rish mumkin bo'lib qoladi. Ushbu jarayonning boshqa fermentativ-fotografik jarayonlardan farqi shundaki, fotoimmobillash usuli va immobillangan fermentni aniqlash, faol modda tabiatiga bog'liq bo'lmasligiga qaramay, universal hisoblanadi.

Immobilangan fermentlarga asoslangan texnologik jarayonlar birinchi navbatda oziq-ovqat va farmatsevtika sanoatida qo'llanilgan. Bu yerda biz aytib o'tmoqchi bo'lgan asosiy g'oya shundan iboratki, biokataliz oziq-ovqat va organosintetik texnologiyalar orasidagi birlamchi chegaralarni yo'qotadi. Yaqqol misol – AQSHda «CETUS Corporation» firmasi ishlab chiqaruvchi fruktoza va alken oksidlarning olinish jarayoni ishlab chiqilgan (9-rasm).

Birinchi bosqichda immobillangan piranozo-2-oksida ta'sirida D-glukoza D-glukozongacha oksidlanadi; ikkinchi bosqichda palladiy katalizatoridagi vodorod ta'siri ostida olingan D-glukoza bilan D-fruktozagacha qaytariladi. Birinchi bosqichning mahsuloti (vodorod peroksidi) D etilen yoki propilenning tegishli epoksidlargacha mikrobiologik oksidlanishiga sarflanadi. Ko'rinib turibdiki, bu jarayonda uchta sintetik metod birlashtirilgan: fermentativ (1-bosqich), kimyoviy (2-bosqich) va mikrobiologik (3-bosqich). Bu jarayonning yarmi ozuqaviy (fruktoza), yarmi organosintetik (epoksidlar), shuning uchun uni ta'komillashgan, kompleks va chiqindisiz biotexnologiya deb atash mumkin.

1-bobga doir nazorat savollari:

1. Fermentlar faolliklariga ta'sir etuvchi omillarga nimalar kiradi?
2. Substrat bilan ferment spetsifikligi deganda nimani tushunasiz?
3. Fermentlarni ajratishning qanday maxsus usullari mavjud?
4. Ferment preparatlarining tozalik darajasi qanday aniqlanadi?
5. Fermentlarni tozalash texnologiyasi qanday bosqichlardan iborat?
6. Fermentlarni biospetsifik xromatografiya usulida tozalashning qanday afzallik jihatlari mavjud?
7. Xromatografiyada ishlatiladigan ligandlarga qo'yiladigan talablar nimalardan iborat?
8. Biologik faol moddalarni cho'ktirishda organik erituvchilarning ta'siri qanday?
9. Immobillash jarayonida tashuvchilarga qanday talablar qo'yiladi?
10. Fermentlarni immobillashning qanday usullari mavjud?

2-BOB. SELLULOLITIK FERMENTLAR

2.1. Sellulolitik fermentlar, ularning funksiyalari va xususiyatlari

Tabiatda sellulolitik mikroorganizmlar mavjud bo'lib, ular selluloza tarkibidagi nafaqat amorf qismni, balki kristall holatdagi sellulozani glukozagacha parchalovchi fermentlar to'plamini, ya'ni sellulazalarni sintez qiladi.

Selluloza saqlovchi materiallarning sirtiga tushgan mikroorganizmlar dastavval ularga mustahkam yopishib oladi va keyin selluloza fermentlarini sintez qilib, sekin-asta ularni yemirib, glukozaga aylantirib boradi. Bunday mikroorganizmlar glukozadan asosiy ozuqa muhiti sifatida foydalanadi, ko'payadi va shu tufayli ko'proq maydonni egallab, yanada ko'proq selluloza fermentini ishlab chiqaradi. Bu hodisa, toki selluloza saqlovchi materiallar tamom bo'lguncha davom etadi. Biroq tabiiy sharoitda ushbu jarayonlar juda sekin amalga oshadi. Tuproqqa tushgan g'ozapoyaning to'liq parchalanishi uchun bir necha yillar kerak bo'ladi.

Agar ushbu mikroorganizmlardan selluloza fermentlari ajratib olinsa va sellulozaga qo'shilsa, bu jarayon tezlashadi. Bunda hosil bo'lgan glukozani mikroorganizmlar tomonidan iste'mol qilinmaydi va reaksiya mahsuloti to'planib boradi. Agar substrat sifatida toza sellulozadan emas, balki selluloza tutuvchi sanoat yoki qishloq xo'jalik chiqindilaridan foydalanilsa, yana bir eng muhim muammo – chiqindilarni yo'qotish – utilizatsiya muammosi hal bo'ladi.

Olingan glukozaning tozaligiga va jarayonning iqtisodiy samaradorligiga qarab, uni tibbiyotda, farmatsevtikada, oziq-ovqat sanoatida, kimyoviy texnologiyalarda yoki texnik mikrobiologiya amaliyotida qo'llash mumkin.

Ma'lumki, glukozani bijg'itib undan etanol olish, keyin esa undan har xil yo'llarda foydalanish mumkin. Masalan, yoqilg'i o'rnida ishlatish mumkin va shu bilan birga etanolning dehidratatsiyasi, zamonaviy «katta kimyo»ning asosi bo'lgan etilen olishda qo'llash mumkin.

Selluloza eng ko'p miqdorda hosil bo'ladigan xomashyo hisoblanadi. Ekspertlarning hisob-kitobiga qaraganda, har yili 100 mlrd. tonnaga yaqin selluloza hosil bo'lar ekan. Bu mahsulotning inson tomonidan ishlatilishi selluloza saqlovchi chiqindilarning to'planishiga olib keladi. Bunday chiqindilarning juda kam miqdorini fermentativ yo'l bilan foydali mahsulotga aylantirilgan ham anchagina ozuqa uglevodlari va neftni almashtiruvchi mahsulotlar tayyorlash mumkin bo'ladi. Shuning uchun ham bu muammoni yechish ustida oxirgi yillarda juda ko'p olimlar ishlatilmoqdalar.

Selluloza fermentining substratga ta'sir etishi bir necha bosqichda amalga oshadi. Sellulolitik fermentlarning o'z substratiga ta'sir qilishiga va sellulozaning parchalashiga qarab, fermentlarni 4 guruhga ajratish mumkin: birinchi guruhni endofermentlar tashkil etadi, keyingi ikki guruhga eksofermentlar va to'rtinchi guruhga sellulozani kichik fragmentlardan tortib, glukozagacha parchalovchi fermentlar kiradi. Eslatib o'tish kerakki, «endo-» va «ekzo-» qo'shimchalari polimer substratning katta yoki kichik qismini parchalaydigan fermentlar nomiga aniqlik kiritish maqsadida qo'yiladi.

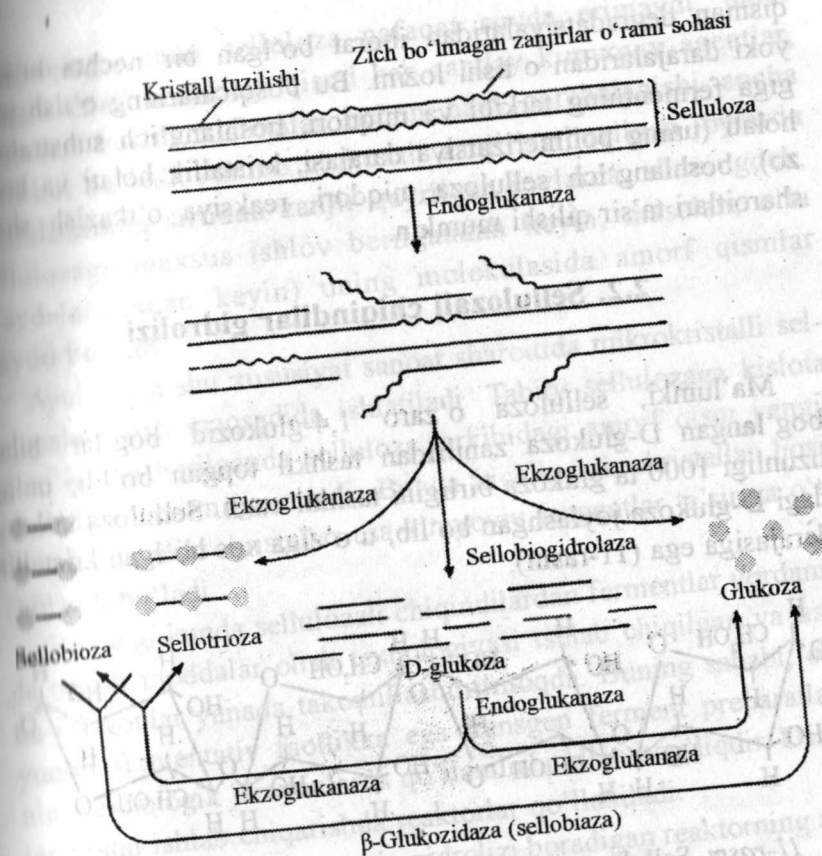
Agar ferment polimer substratning oxirgi qismidan bir polimer molekula uzoqlikda joylashgan bo'lakni parchalasa, bu ferment

endota'sirli ferment deyiladi. Agar oxirgi qismlarini parchalasa, ekzo ta'sirga ega fermentlar deyiladi.

Odatda, tabiatda polimer substratlarning degradatsiyasi tarkibida ham endo-, ham ekzofermentlarni tutuvchi poliferment komplekslar ta'sirida yuz beradi. Ularning hamkorlikdagi ta'siri polimer moddalarni optimal samaradorlik bilan monomerlargacha parchalaydi. Ushbu hosil bo'lgan moddalar organizm uchun kerak bo'lgan moddalarni hosil qilish uchun muhim qurilish materiallari bo'lib xizmat qiladi.

Sellulazani parchalashda birinchi bo'lib endoglukonaza kirishadi. Endoglukonazaning har bir muvaffaqiyatli hujumi polimer zanjirning uzilishiga va kaltalashgan selluloza molekulasida kichik fragmentlar va shu bilan birga ikkita so'nggi qism hosil bo'lishiga olib keladi. Oxirgi qismlar ko'paygan sari ekzofermentlar ta'siri kuchayadi. Boshqacha qilib aytganda, endofermentlar yordamida selluloza degradatsiyasi kuchaygan sari ekzofermentlarning ta'siri ham kuchayib boradi.

Qisman parchalangan sellulozaga ta'sir qiluvchi ekzofermentlar ikki turdan iborat selluloz kompleksida namoyon bo'ladi. Birinchi ferment oxirgi mahsulotgacha sellulozani parchalasa, ikkinchi ferment o'zining faol markazi xususiyatiga ko'ra sellulozani sellobiozagacha, ya'ni glukoza dimerigacha parchalaydi. Birinchi ferment ekzoglukozidaza fermenti, ikkinchisi esa ekzosellobiogidrolaza fermenti hisoblanadi. Nihoyat, sellobioza, selluloz kompleksining oxirgi fermenti – sellobiaza yordamida teng ikkiga bo'linib, ikki molekula glukoza, ya'ni oxirgi mahsulot hosil bo'ladi. Ushbu sellulozaning glukozagacha parchalanish jarayoni 10-rasmda ko'rsatilgan.



10-rasm. Selluloza biodegradatsiyasi.

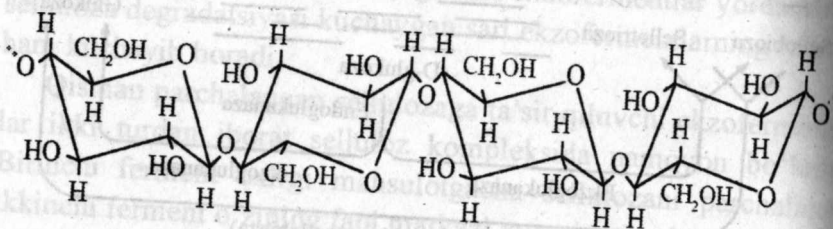
Zanjirlar gidrolizi endoglukanazaning 1,4-bog'larini zich bo'lmagan bloklarga parchalaydi. So'ng ekzoglukanazalar va sellobiogidrolazalar oligosaxaridlarning qisman gidrolizlangan zanjirlarini reduksiyalanmagan uchidan ajratadi. So'ngra glukozidaza sellobioza va sellotrioza glukoza aylinishini katalizlaydi.

Shunday qilib, reaksiya sistemada glukoza, ya'ni oxirgi mahsulot hosil bo'lishi uchun reaksiya boshlang'ich substratning

qisman degradatsiyalaridan iborat bo'lgan bir nechta bosqich yoki darajalaridan o'tishi lozim. Bu bosqichlarning o'tish tezligiga fermentning tarkibi va miqdori, boshlang'ich substratning holati (uning polimerizatsiya darajasi, kristallik holati va hokazo), boshlang'ich selluloza miqdori, reaksiya o'tkazish shart-sharoitlari ta'sir qilishi mumkin.

2.2. Sellulozali chiqindilar gidrolizi

Ma'lumki, selluloza o'zaro 1,4-glukozid bog'lar bilan bog'langan D-glukoza zanjiridan tashkil topgan bo'lib, uning uzunligi 1000 ta glukozaning birligini tashkil etadi. Selluloza tarkibidagi D-glukoza joylashgan bo'lib, u o'ziga xos bo'lgan kristallik darajasiga ega (11-rasm).



11-rasm. Selluloza polimer zanjirining segmentlarida glukozaning qoldiqlarining 1,4-bog'lar bilan bog'lanishi.

Glukozaning joylashishi va uning mustahkamligi o'zaro ko'ndalang joylashgan vodorod bog'lar bilan «tikilgan» bo'lib, ayni mana shu bog'lar sellulozaning mustahkamligini belgilab beradi.

Alohida olingan vodorod bog'lari unchalik mustahkam bo'lmas-da, ushbu zanjirda minglab bo'lganligi sababli, o'ta mustahkam blokni tashkil qiladi.

Shuning uchun selluloza nafaqat suvda erimaydi, balki uning kristall holatdagi qismi har qanday kimyoviy agentlar, jumladan kuchli kislotalar uchun ham parchalanishi ancha mushkul bo'ladi. Ammo glukozali zanjirlar buzilgan joylarda sellulozaning sirtidan zanjir qayrilgan joylarda, shuningdek, sellulozaga maxsus ishlov berilgandan keyin, masalan, o'ta maydalangandan keyin) uning molekulasida amorf qismlar paydo bo'ladi.

Ayni mana shu xususiyat sanoat sharoitida mikrokristalli sellulozalar olish maqsadida ishlatiladi. Tabiiy sellulozaga kislota bilan ishlov berilganda selluloza tarkibidagi amorf qism yengil parchalanib eritmaga o'tadi. Bunda kichik mikrokristallar hosil bo'ladi. Bu mikrokristallar esa kimyoviy reagentlar ta'siriga o'ta chidamli bo'ladi.

Bugungi kunda sellulozali chiqindilardan fermentlar yordamida qandli moddalar olish texnologiyasi ishlab chiqilgan va ushbu jarayonlar yanada takomillashtirilmoqda. Buning sababi, o'ta yuqori fermentativ faollikka ega transgen ferment preparatlarining texnologik jarayonlarda qo'llanilishi bilan bog'liqdir. Ushbu jarayonni ishlab chiqarishda reaktorlar qo'llaniladi.

Sellulozaning fermentativ gidrolizi boradigan reaktorning asosiy xususiyatlari quyidagilardan iborat:

1. Kolonkali reaktorning ishchi zonasi selluloza bilan zich qilib to'ldiriladi. Buning bilan gidroliz jarayonining tezligi 40–60% gacha oshiriladi;
2. Sellulozani – sellulozaga affin xromatografiyasi prinsipi bilan adsorbsiyalash yordamida reaktorda ushlab turiladi; bu bilan, qo'shimcha membranalarsiz fermentni reaktorda ushlab turishga erishiladi; bu esa jarayonning sezilarli darajada arzonlashishiga olib keladi;

3. Undan tashqari, kam miqdorda sellulaza fermentini saqlovchi kultural suyuqliklardan foydalanish mumkin. Ular reaktorlarda adsorbsiya hisobiga konsentrlanadi;

4. Proteazalar va boshqa sellulazalarni inaktivatsiya qiluvchi fermentlar reaktordan selluloza gidrolizi boshlanguniga qadar chiqarib yuboriladi. Chunki ular sellulazaga qaraganda sellulozaga yomonroq adsorbsiyalanadi;

5. Fermentativ gidroliz jarayoni muntazam ravishda selluloza qo'shib borilishi, ko'p martalab sellulaza ishlatilishi va doimiy fermentlar regeneratsiyasi hisobiga uzluksiz davom etadi.

Shunday qilib, selluloza bir qator sellulolitik fermentlar yordamida gidrolizlanadi. Ushbu texnologik jarayon maxsus reaktorlarda olib borilsa, maqsadga muvofiq bo'ladi. Bunda olingan toza glukoza asosida, glukoza siropini ham olish mumkin. Avval glukoza siropi ikki marotaba tozalanadi va keyin esa 60–70% gacha quyultiriladi. Olingan glukoza siropidan turli tarmoqlarda foydalaniladi.

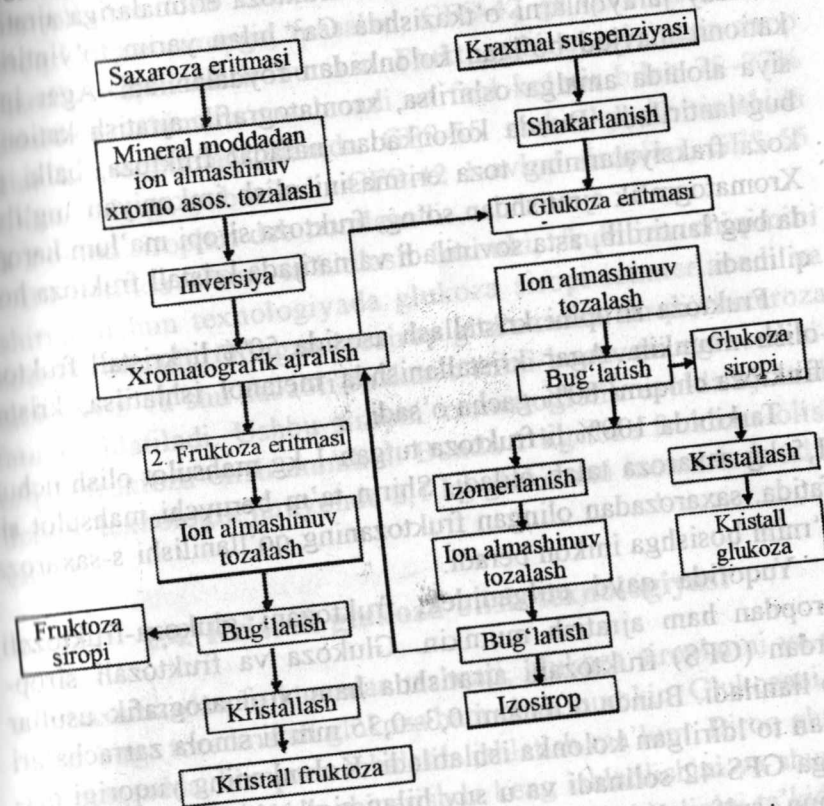
2.3. Kristall fruktoza olish texnologiyasi

Fruktoza ketogeksozalarga mansub uglevod hisoblanadi. Fruktoza glukoza nisbatan kislotalar va ishqorlar ta'siriga ancha labildir.

Fruktoza shirinlik darajasi va fiziologik ta'sir bo'yicha glukoza va saxarozadan ustun turadi. Odam organizmida fruktoza metabolismi, glukoza bilan farqli, boshqa mexanizm bo'yicha amalga oshadi, bu esa uni hatto qandli diabet bilan kasallangan bemorlarga ma'lum miqdorda iste'mol qilish imkonini beradi.

Fruktoza olishning bir necha usuli mavjud: saxarozani gidroliz qilish asosida, fruktoza-glukoza siropidan, glukoza izomerlash asosida.

Boshqa uglevodlarni tutuvchi eritmalar bilan ajratilishi mumkin. Ushbu usulda saxarozadan ajratish yanada samarali bo'lishi mumkin. Fruktoza ishlab chiqarilishining samarali usuli – ion almashinuv texnologiyasini qo'llash yordamida saxarozaning gidrolizi orqali amalga oshiriladi. Ushbu usulda saxarozaning gidrolizi ion almashinuv smola yordamida olib borilib, bunda texnologik va biokimyoviy jarayonning optimal sharoiti ishlab chiqilishi dar-



12-rasm. Fruktoza va glukoza olish texnologik sxemasi.

Fruktozani saxarozadan olish jarayoni 12-rasmda ko'rsatilgan. Keltirilgan sxemaga ko'ra, tarkibida 50% gacha shakar saqlagan eritma avval mineral moddalardan ionalmashinuv xromatografiya usulida tozalanadi. Tozalangan eritma inversiya qilinadi. Inversiya jarayonida moddalar avval biroz kislotali muhitda ushlab inkubatsiya qilinib ishlov beriladi. Bunday ishlov berilgan modda spektr nurini chap yoki o'ng tomonga burish xususiyatiga ega bo'lishi bilan farqlanadi. Shundan so'ng ushbu moddalar xromatografik usul asosida, glukoza va fruktoza eritmalariga ajratiladi. Bunday jarayonlarni o'tkazishda Ca^{2+} bilan yarim to'yintirilgan kationit mavjud bo'lgan kolonkadan foydalaniladi. Agar inversiya alohida amalga oshirilsa, xromatografik ajratish kationitda bug'lantiriladi. Bunda kolonkadan nafaqat fruktoza, balki glukoza fraksiyalarining toza eritmasini olish imkoniyati tug'iladi. Xromatografik ajratishdan so'ng, fruktoza siropi ma'lum haroratda bug'lantirilib, asta sovutiladi va natijada kristall fruktoza hosil qilinadi.

Fruktoza siropini kristallash asosida 50% li kristall fruktoza olish mumkin. Agar kristallanishda metanol ishlatilsa, kristall fruktoza chiqimi 80% gacha o'sadi.

Tarkibida 100% li fruktoza tutgan 1 kg mahsulot olish uchun 1,5 kg saxaroza talab etiladi. Shirin ta'm beruvchi mahsulot sifatida, saxarozadan olingan fruktozaning qo'llanilishi s-saxaroza o'rni bosishga imkon beradi.

Yuqorida qayd etilganidek, fruktozani glukoza-fruktozali siropdan ham ajratish mumkin. Glukoza va fruktozali sirop-lardan (GFS) fruktozani ajratishda ham xromatografik usullar qo'llaniladi. Bunda o'lchami 0,3–0,35 mm li smola zarrachalari bilan to'ldirilgan kolonka ishlatiladi. Kolonkaning yuqorigi qis-miga GFS-42 solinadi va u suv bilan siqib chiqariladi. Ajratish uchun sulfopolistiroil smoladan foydalaniladi. Sulfopolistiroil smolaga fruktoza yaxshi bog'lanishi uchun 4–6% li divinilben-

zol ishlatiladi. Sulfokislotali guruhlar kalsiy ionlarini tutadi. Fruktoza esa ushbu kalsiy ionlari bilan kompleks hosil qilish xususiyatiga egadir. Shu sababli, fruktoza sorbent qavatidan glukoza qaraganda sekinroq o'tadi. Glukoza esa kolonkadan tez yuviladi va izomerlanish jarayonini amalga oshirish uchun ishlatiladi. Kolonkadagi fruktoza fraksiyasi esa asta ajratiladi. Ajratish 60°C haroratda o'tkazilib, fruktozali fraksiya 90% ga yaqin (GFS-90) bo'lganda jarayonni to'xtatish zarur. Ushbu usulda olingan toza fruktoza fraksiyasi, tarkibida fruktozasi kamroq bo'lgan siropga, masalan, GFS-42 ga qo'shilsa, GFS-55 qandli siropini olish mumkin. Fruktoza bilan to'yingan sirop ionitlarda qo'shimcha tozalanadi va faol ko'mir bilan 75–77% gacha konsentrlanadi hamda GFS-55 mahsulot ko'rinishida iste'molchilarga yuboriladi. GFS-42 1-avlod siroplari, GFS-55 esa 2-avlod siroplari deb nomlanadi.

Bu o'rinda shuni ta'kidlash lozimki, fruktoza chiqimini oshirish uchun texnologiyada glukoza siropi izomerlanadi va izosirop olinadi. Olingan izosirop glukozadan farqli, saxaroza kabi shirin va shu sababli shakar o'rni bosuvchi uglevod sifatida ishlatiladi. Ushbu siropni xromatografik usulda ajratish orqali fruktoza olish mumkin. Bunda 1 kg toza fruktoza olish uchun, texnologik jarayonda 2,1 kg glukozani izomerlash talab etiladi.

2.4. Kristall glukoza olish texnologiyasi

Saxarozadan fruktozadan tashqari, glukoza siroplarini va shu bilan birga toza kristall glukoza ham olish mumkin. Glukozani har xil maqsadda, bir qator sohalarda ishlatish ma'lum. Biroq glukozani C vitamini ishlab chiqarishda keng ishlatilishini va shuning bilan uning o'rni turli sohalarda nihoyatda muhimligini ta'kidlash lozimdir. Shu sababli, bugungi kunda glukoza olish texnologik

jarayonlarini ishlab chiqish va shu bilan birga ularni takomillash- tirish, glukozani olishda dastlabki manba bo'lib xizmat qiladigan arzon xomashyo manbalarini topish o'ta dolzarb muammolardan hisoblanadi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, glukozani, ya'ni qandli moddalarni sellulozali chiqindilarni fermentativ gidroliz- lash asosida yoki tarkibida kraxmal tutgan xomashyolarni kerakli fermentlar yordamida parchalash yordamida olish mumkin. Qu- yida glukozani kraxmaldan olish texnologik jarayoni keltirilgan.

Kraxmal gidrolizi asosida glukoza olish. Kraxmalni gidroliz- lash asosida kristall glukoza olish jarayoni 12-rasmda keltirilgan. Ushbu jarayonni amalga oshirishda dastlabki xomashyo sifati- da jo'xori kraxmalini ishlatish mumkin. Buning uchun dastlab jo'xori kraxmalining 38–40% li suspenziyasi tayyorlanib, krax- mal quyultiriladi. Quyultirilgan kraxmal yaxshilab aralashtirila- di va ferment preparati bilan kraxmal ikki marotaba suyultiriladi (asosiy ferment – beta-amilaza). Kraxmal suti nasos yordamida to'plovchi uskunadan injektorga uzatiladi. Injektor suspenzi- yani o'tkir bug' bilan tez isitish uchun mo'ljallangan. Isitilgan kraxmal kleysteri (110°C) ushlab turuvchi uskunaga yuboriladi, u yerda kraxmal kleysteri 0,3–0,4 atm. bosim ostida ushlab tu- riladi. So'ngra asbobning suyultiruvchi qismiga yuboriladi. Bu yerda kraxmal kleysteri qaynab ketsa, uning destruksiyasi sodir bo'lishi mumkin. Shu sababli, suyultiruvchi asbobda kraxmal kleysteri 100°C haroratda inkubatsiya qilinadi. Bunda inkuba- tsiya vaqti 15–30 daqiqadan oshmasligi kerak. Birinchi bosqichda gidroliz darajasi 2–3% ni tashkil etib, qisman gidrolizlanish ja- rayoni amalga oshadi. Qisman gidrolizlangan kraxmal injektorga yuboriladi, bu yerda sirop 140 °C gacha isitiladi va bug'latgichda bug'lantiriladi. Bug'latgichdagi harorat 85–90°C ni tashkil etib, u yerdan sirop ba'zida dekstrinizatsiya bosqichi deb ataluvchi su- yultirishning ikkinchi pog'onasiga yuboriladi. Bug'latgichdan ke- yin siropga beta-amilaza fermenti qo'shiladi. Odatda, ushbu bos-

qichda ishlatiladigan fermentning miqdori, umumiy ishlatiladigan fermentning 2/3 qismini tashkil etadi. Suyultirishning 2-bosqichi- da shakarlanish darajasi 14–17% gacha yetadi.

Kraxmalni suyultirishdan keyin, olingan gidrolizat 34–35% qandli modda bo'lib, u yod bilan ko'k rang bermaydi. Ushbu erit- ma o'ta qovushqoqligi bilan xarakterlanadi. Qovushqoq mahsu- lotga glukoamilaza fermenti ta'sir ettirilib, shakarlanish jarayoni amalga oshiriladi. Ushbu jarayonni 50–60°C haroratda, pH mu- hit 4,5 da (4,2–4,7) 48–72 s davomida o'tkazish mumkin. Sirop- ning shakarlanishi, shakarlanish 97–98% ni tashkil etgunga qa- dar olib boriladi. Glukoza miqdori 97–98% gacha yetkazilganda kraxmalning shakarlanishi to'xtatiladi. Buning uchun sirop 90°C haroratgacha isitiladi. Shakarga aylangan siropni eriydigan bosh- qa moddalardan tozalash uchun, u mexanik filtrlash stansiyasiga yuboriladi.

Eritmani eriydigan moddalardan tozalash uchun esa, ion al- mashinuv va ko'mirli tozalash usullari qo'llaniladi. Ko'mir yor- damida tozalashda 10–15 kg ko'mir kukuniga yoki granulasiga, taxminan 1 t ga yaqin sirop tozalash uchun qo'shiladi. Tozalash jarayonida ishlatilgan granulali ko'mirni, ya'ni sorbentni 600– 800°C haroratda suv bug'i bilan regenerirlash mumkin. Buning natijasida ushbu sorbentni qaytadan qandli mahsulotlarni toza- lashda ishlatish mumkin bo'ladi.

Bo'yovchi va eruvchi moddalardan tozalangan glukoza si- ropi ion almashinuv tozalashga yuboriladi. Odatda, sulfostiroil kationitlar va kuchsiz asosli anionitlardan, masalan, KU-2-8 va ANT-E21 dan foydalaniladi. Kolonnalar ionitlar bilan, odatda, juft bo'lib ishlaydi – sirop kation va anion almashinuvdan ketma- ketlikda o'tadi va kolonkalaridan o'tgan sirop tozalangan qandli modda hisoblanadi.

Ushbu holatda aralashma holatidagi ba'zi fraksiyalar saxaro- za eritmasini tayyorlash uchun ishlatiladi. Glukoza eritmalarini

filtrlab, rangsizlantirilgandan keyin, sirop 50–70% li eritma hosil bo'lgunga qadar quyultiriladi va kerakli maqsadda ishlatiladi.

2.5. Glukoza-fruktozali sirop olish

Bugungi kunda turli sohalarda saxarozaning to'liq o'rnini bosa oladigan qandli moddalarga bo'lgan ehtiyoj tobora o'sib bormoqda. Ayniqsa, ushbu holat oziq-ovqat sanoatida ishlatiladigan glukoza-fruktozali siroplarga bo'lgan ehtiyojning ortishi bilan bog'liqdir. Glukoza-fruktozali siroplar (GFS) o'zining tarkibi va qimmatli xususiyatlari bilan saxarozadan ustun turadi va shunga muvofiq shakarining o'rnini bosishi, sharbatlar, qandolatchilik va boshqa mahsulotlarni ishlab chiqarishda shirin ta'm beruvchi asosiy komponent hisoblanadi. GFS va shakarining solishtirma tahlili, GFSning namni yaxshi ushlab turish xususiyatiga egaligini ko'rsatgan. Aynan ushbu xususiyat qandolatchilik sanoatida o'zining ta'mini, xususiyatlarini uzoq saqlab turish imkoniga ega bo'lgan turli kremlar tayyorlashda muhim rol o'ynaydi. GFS past kristallanish xususiyatiga ega bo'lganligi sababli, u murabbo, jem, povidlo tayyorlashda ham keng qo'llaniladi va ushbu mahsulotlarni tayyorlashda GFS ishlatilganligi sababli, ular shakarlanmaydi. GFSning yuqori osmotik bosimga chidamliligi uning asosida tayyorlangan mahsulotlarni, shuningdek sharbatlarni sterillash imkoniyatini tug'dirib, mahsulotlarni mikroorganizmlar ta'siridan saqlaydi. GFSli mahsulotlarni iste'mol qilish tishning kariyes bilan kasallanishining oldini oladi.

Tarkibida shakar o'rniga GFSni saqlagan mahsulotlar shakarga nisbatan 30–50% ga kamroq energetik qimmatga ega bo'lganligi sababli, organizm tomonidan tezroq o'zlashtiriladi. GFS yuqorida qayd etilgan noyob xususiyatlariga ko'ra, ko'pgina

mamlakatlarda oziq-ovqat mahsulotlarini tayyorlashda va ishlab chiqarishda qo'llaniladi. Masalan, AQSHda shakarni iste'mol qilish 1970-yildan 1986-yilga kelib 46 kg dan 28 kg gacha kamaydi. Ushbu davr mobaynida GFSning ishlatilishi 0,3 dan 18,3 kg gacha oshdi. Glukoza-fruktozali siroplarni ishlab chiqarish uchun asosiy xomashyo sifatida, tarkibida ikki xil uglevod tutuvchi polisaxarid, ya'ni kraxmal ishlatiladi. Kraxmal glukoza qoldiqlaridan iborat bo'lib, chiziqli (amiloza) va tarmoqlangan (amilopektin) dan iboratdir.

GFSni kraxmaldan ko'p bosqichli fermentativ yo'l bilan ajratib olish mumkin. Bunda bir qator amilolitik ferment preparatlari qo'llaniladi. Jumladan, amilaza, amiloglukozidaza va glukozomeraza fermentlaridan foydalaniladi. Ko'p hollarda ishlab chiqarishda tarkibida 42,6% li (ba'zi hollarda 90%) fruktoza tutuvchi GFS ishlab chiqariladi.

Izomerizatsiya uchun substrat sifatida 35–50% konsentratsiyali glukoza (sellulolitik chiqindilarni sellulaza fermenti asosida gidroliz qilish orqali olingan glukozadan ham foydalanish mumkin) eritmasidan foydalaniladi. Glukozaning fruktozaga izomerlanish reaksiyasi qaytar reaksiya hisoblanadi. Reaksiya natijasida hosil bo'lgan massa o'z tarkibida 48–52% fruktoza saqlaydi. Shuni qayd etish kerakki, ushbu texnologik jarayonni amalga oshirishda izomerlanish reaksiyasi haroratga o'ta bog'liqligi bilan xarakterlanadi (1-jadval). Jadvaldan ko'rinib turibdiki, haroratning 30°C dan 85°C gacha ko'tarilishi mahsulot chiqimiga, shu bilan birga izomerlanish reaksiyasiga ma'lum haroratgacha ijobiy ta'sir ko'rsatar ekan. Shu sababli, glukoza asosida GFS olishda haroratni nazorat qilish muhim omillardan biri hisoblanadi.

1-jadval

Haroratning glukoza izomerlanish jarayoniga ta'siri

Harorat, °C	Izomerlanishdan keyin fruktoza konsentratsiyasi, %
30	46,5
40	47,5
45	48,2
60	49,9
70	52,4
75	53,4
80	54,2
85	54,1

Glukozaning izomerlanishi. GFS ishlab chiqarishning asosiy jarayoni glukozaning fruktozaga izomerlanishi hisoblanadi. Bunda qattiq asosga (masalan, titan oksidi – 30%, DEAE-selluloza – 30%, polistirol – 40%) biriktirilgan (immobillangan) gluukoizomeraza ferment preparatlaridan foydalaniladi.

Glukoizomeraza hujayrachi, ya'ni endoferment bo'lib, ushbu ferment immobillangan shaklda ishlatilishi kerak. Immobilashning eng yaxshi usuli fermentni turli tashuvchilarga adsorb-siyalash yoki uni gelga kiritish hisoblanadi.

Izomerlanishni amalga oshirishda optimal sharoitni ishlab chiqish zarurdir. Masalan, ushbu jarayonni amalga oshirishda 55–57°C harorat va pH muhit $7,5 \pm 7,8$ ni tashkil etsa, maqsadga muvofiq bo'ladi. Adabiyotlardan ma'lumki, gluukoizomeraza

fermentining ingibitorlari kislorod, kalsiy, mis, nikel, rux ionlari va boshqa ba'zi moddalar hisoblanadi. Fermentni barqarorlash uchun magniy tuzlari va natriy gidrosulfit qo'shish kerak. Odatda, izomerlanishda 40–45% konsentratsiyali sirop ishlatiladi. Siropni ferment bilan inkubatsiya qilish davomiyligi 20–24 soatni tashkil qiladi. Izomerlanishdan oldin fermentni faollashtirish uchun siropga $MgSO_4$ (0,025–0,015 mol/l) yoki $CoSO_4$ (0,0003–0,003 mol/l), mikroflora o'sishini susaytirish uchun esa – natriy yoki kaliy bisulfit (0,008–0,016% massa) qo'shiladi.

Reaksiya qaytar bo'lgani uchun tenglik glukoza va fruktozaning ekvimolar mutanosibligida belgilanishi kerak. Amaliyotda reaksiya fruktoza konsentratsiyasi 40–42% ga yetganda to'xtatiladi. Glukoizomeraza fermenti 28–30 sutka davomida ishlatiladi, bunda u o'zining faolligini yo'qotishi mumkin. Bunday holatda ferment texnologik jarayondan olib tashlanib, qaytadan yangi ferment ishlatiladi. Izomerlanishdan keyin sirop ionitlar (kationit, anionit) yordamida ba'zi qattiq tuzlardan tozalanadi va faol ko'mir bilan rangsizlantiriladi. So'ngra eritma filtrlanadi va 70–74% gacha vakuum ostida konsentrlanadi, 25–30°C haroratgacha sovutiladi.

Ba'zi holatlarda glukoza kristallanishining oldini olish uchun siropga qo'shimcha fruktozali fraksiya qo'shib to'yintiriladi va GFS-55 olinadi. Shirinlik bo'yicha GFS-55 saxarozadan ustunroq turadi va keng foydalaniladi.

2.6. L va D aminokislotalar olish texnologiyasi

Aminokislotalar – organizmning asosiy qurilish materiali bo'lib, undan peptidlar va oqsillar shakllanadi. O'simlik va mikroorganizmlarning o'zlari ularga kerak bo'lgan barcha aminokislotalarni sintezlay oladi. Bunda ular sodda kimyoviy birikmalardan foydalanadi. Vaholanki, odam organizmi 20 ta aminokis-

lotadan hayotiy faoliyati uchun juda kerak bo'lgan faqatgina 12 tasini sintezlay oladi. Qolgan 8 ta aminokislota almashmaydigan aminokislotalar deb nomlanib, organizmga tashqaridan – ozuqa bilan kelishi kerak. Almashmaydigan aminokislotalarning bittasi yetishmasa ham organizm o'sishi sekinlashadi, patologiya namoyon bo'ladi. Shuning uchun bu aminokislotalarni davolash va profilaktika maqsadlarida, oziqlanish ratsioni va boshqalarni me'yorlashtirish uchun sanoat miqyosida sintezlash muhimdir. Bundan tashqari, aminokislotalar (almashadigan va almashmaydigan) ko'pgina biotexnologik jarayonlar uchun muhim xomashyo hisoblanadi.

Aminokislotalar sanoat miqyosida kimyoviy (oqsillar gidrolizi va kichik molekular birikmalardan sintezlash), mikrobiologik va shu bilan birga biotexnologik usullar bilan olinadi (2-jadval).

2-jadval

Aminokislotalarning sanoatda ishlab chiqarilishi

Aminokislotalar	Ishlab chiqarish, t/yil	Texnologik jarayon turi	Qo'llanilishi
L-alanin	130	1, 3c	Oziq-ovqat ishlab chiqarish
DL-alanin	700	2	Oziq-ovqat ishlab chiqarish
L-arginin	1000	1, 3a	Kosmetika
L-asparagin	50	1, 2	Tibbiyot
L-aspartat	4000	1, 3c	Oziq-ovqat ishlab chiqarish

L-valin	150	3a, 3c	Oziq-ovqat ishlab chiqarish
L-gistidin	200	3a	Tibbiyot
Glitsin	6000	2	Organik sintez
L-glutamat	370000	3a	Oziq-ovqat ishlab chiqarish
L-glutamin	500	3a	Tibbiyot
L-izoleysin	150	3a	Oziq-ovqat ishlab chiqarish
L-leysin	150	1, 3a	Oziq-ovqat ishlab chiqarish
L-lizin	70000	3a, 3c	Oziq-ovqat ishlab chiqarish
DL-metionin	70000	2	Oziq-ovqat ishlab chiqarish
L-metionin	150	3c	Tibbiyot
L-ornitin	50	3a, 3c	Tibbiyot
L-prolin	100	3a	–
L-serin	50	3a, 3b	Kosmetologiya
L-tirozin	100	1, 3c	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi, organik sintez
L-treonin	160	3a	Oziq-ovqat ishlab chiqarish
L-triptofan	200	3a, 3c	Oziq-ovqat ishlab chiqarish, tibbiyot

2-jadvalning davomi

L-fenilalanin	3000	3a, 3c	Tibbiyot, oziq-ovqat ishlab chiqarish, ozuqaviy qo'shimchalar
L-sistein	700	1	Oziq-ovqat ishlab chiqarish

Izoh: 1 – oqsillar gidrolizi; 2 – kimyoviy sintez; 3 – mikrobiologik sintez (a – to'g'ri fermentatsiya; b – mikrobiologik transformatsiya; c – fermentlar va immobillangan hujayralarning ishlatilishi).

Biotexnologik usullar bilan aminokislotalar olish texnologik jarayonini 3 ta asosiy guruhlariga birlashtirish mumkin:

- D, L-aminokislotalar aralashmasi va ularning hosilalarini optik faol izomerlarga fermentativ parchalanish usullari;
- aminokislotalarning enzimatik sintez usullari;
- aminokislotalarning mikrobiologik (fermentativ) sintez usullari.

Ratsematlarning fermentativ parchalanishi. Odatda, kimyoviy usul bilan olingan D- va L-shakldagi aralashmadan L-aminokislotalarni ajratib olish uchun aminokislotalar hosilalari olinadi, so'ng ularga ferment yoki fermentlar aralashmasi bilan ishlov beriladi (3-jadval).

3-jadval

Ratsematlarning gidrolizi bilan L-aminokislotalar olish

Xomashyo	Ferment	Mahsulot
N-atsetil-D, L-aminokislotalar	Aminoatsilaza	L-aminokislotalar (nordonlardan tashqari)

D,L-aminokaprolaktam	Gidrolaza	L-lizin
D,L-2-amino-2-tiazolin-4-karbon kislota (D,L-ATK)	Ratsemaza ATK, gidrolaza ATK, karbamoilgidrolaza	L-sistein
Gidantoin hosilalari	Digidropirimidinaza	D-aminokislotalar (alanin, valin, leysin, fenilalanin)
Gidantoin hosilalari	Gidantoinaza, karbamoilgidrolaza	L-aminokislotalar
D,L-aminokislotalar efirlari	Esterazalar	L-aminokislotalar

N-atsetil-D,L-aminokislotalarning fermentativ gidrolizi xomashyoni almashtirib turish va bir xil biokatalizatorlarni ishlatish sharoitida aminokislotalarning butun spektrini olish imkonini qamrab oladi.

Gidantoin hosilalarining gidrolizi qator faol aminokislotalarni olishga imkon beradi. Digidropirimidinaza qator mono-almashtiruvchi gidantoinlarni gidrolizlaydi va bunda N-karbamolaminokislotalar hosil bo'ladi. Ferment yordamida alanin, valin, leysin, serin, fenilalaninlarning gidantoinli hosilalari gidrolizlanadi; lizin va asparagin kislotalar hosilalarining gidroliziga ta'sir qilmaydi.

L-lizin olishning kombinatsion usuli «Toyo Reyon» yapon firmasi tomonidan taklif etilgan. Birinchi bosqichda kimyoviy reaksiyalar natijasida siklogeksan D,L-b-amino-e-kaprolaktamga aylanadi. Ikkinchi bosqichda fermentlar yordamida optik izomerlarning ajralishi amalga oshadi; bunda hosil bo'ladigan asimmetrik aminokaprolaktam gidrolaza fermenti ta'sirida L-lizinni hosil qiladi.

2.7. Enzimatik sintez

Ushbu usulga ko'ra aminokislotalar olish jarayoni aminokislotalarni keltirib chiqaruvchi old moddalarni enzimlar ta'sirida aminokislota olishga asoslangan. Ushbu sintezda aminokislotalarni hosil qila oladigan xomashyodan foydalanilib, uning transformatsiyalanishi natijasida aminokislotalar olinadi. Enzimatik sintez natijalari 4 va 5-jadvallarda keltirilgan.

4-jadval

Aminokislotalarni keltirib chiqaruvchi moddalarni biotransformatsiya asosida aminokislotalar olish

Aminokislotalarni keltirib chiqaruvchi modda	Mahsulot
b-Ketoizokapron kislota	L-Leysin
b-Ketomoy kislota	L-Izoleysin
D-Treonin	L-Izoleysin
Indol	L-Triptofan
Antranil kislota	L-Triptofan
Glitsin	L-Serin

5-jadval

Fermentlar yordamida L-aminokislotalar sintezi

Aminokislotalarni keltirib chiqaruvchi moddalar	Ferment	Mahsulot
Ammoniy fumarat	Aspartaza	L-asparagin kislota

Fenilpirouzum va L-asparagin kislotalar	Transaminaza	L-fenilalanin va pirouzum kislota
b-Keto va b-oksikislotalar	Degidrogenaza	L-aminokislotalar
L-Asparagin kislota	Aspartat-v-dekarboksilaza	L-alanin
Fenol, pirouzum kislota, ammiak	Tirozinfenolliaza	L-tirozin
Fenol, serin	Tirozinfenolliaza	L-tirozin
Indol, pirouzum kislota, ammiak	Triptofanindolliaza	L-triptofan
Indol, serin	Triptofanindolliaza	L-triptofan
v-Xlor-L-alanin, natriy sulfid	Sisteindesulfhidraza	L-sistein
Glitsin, metanol	Serindegidraza	L-serin
Glitsin, tetragidrofolat	Serintransmetilaza	L-serin

2.8. Mikrobiologik sintez

Aminokislotalar olishning mikrobiologik (fermentativ) sintezi ma'lum sharoitlarda mikroorganizmlarning barcha L-aminokislotalarni sintezlash xususiyatiga asoslangan. Bunda mikroorganizmlarning aminokislotalarni yuqori sintezlash sharoitlari ta'minlanadi.

«Gipersintezlash» effekti faqatgina boshqarish sistemasi buzilgan hujayralarda, ya'ni tabiiy shtamlarni yo'naltirilgan selek-

020-120 b

anadi. Shu tarzda davom etgan jarayon natijasida yagona mahsulot bo'lib L-aminokislota hosil bo'ladi. Shunisi aniqlandiki, aminoatsilaza uchun qaysi aminokislota ni gidrolizlashi hech qanday ahamiyatga ega emas. Bu ferment uchun atsil guruh muhim bo'lib, ferment o'ta spetsifik faol modda hisoblanadi. Buning natijasida immobillangan aminoatsilaza bilan bir xil reaksion kolonna turli L-aminokislotalarni ishlab chiqarishda qo'llanilishi mumkin.

Immobillangan fermentni tayyorlash oson, chunki u maxsus smolada oson adsorbsiyalanadi, so'ng uni reaksion kolonnaga joylashtiriladi. Immobillangan fermentning yarim inaktivatsiya muddati, sanoat sharoitida 65 sutkani tashkil etadi. Katalizator faolligi normadan pastroqqa tushadi, kolonnaga yangi ferment eritmasi qo'shiladi (bir necha oyda bir marta) va u yana tashuvchiga adsorbsiyalanadi. Shuni qayd etish lozimki, ba'zi sifatli polimer tashuvchilarning barqarorligi yuqori bo'lib, ularni texnologik jarayonda uzoq ishlatish mumkin. Masalan, «Tanabe Seyyaku» yapon kompaniyasi ishlatgan tashuvchi 8 yildan ko'proq vaqt mobaynida bir kolonkada aminokislota olish jarayonida ishlatilgani ma'lum.

2.9. Lizin olish texnologiyasi

Lizin (b, e-diaminokapron kislota, $H_2NCH_2CH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$) almashmaydigan aminokislotalarga kiradi. 2001-yilga kelib, jahon miqyosida lizin ishlab chiqarish miqdori 550 ming tonnani tashkil qildi. Bu lizin aminokislotasiga bo'lgan ehtiyojning yanada o'sib borayotganligini ko'rsatadi.

Lizinning sanoat produtsentlari bo'lib *Brevibacterium flavum* va *Corynebacterium glutamicum*, *Micrococcus* bakteriya turlarining auksotrof shtammlari hisoblanadi.

- ekish materialini olish;
- oziqa muhitini tayyorlash;
- havoni sterillash;
- fermentatsiya;
- lizin ajratish.

Dastlab kultura go'shtli peptonli agarda qattiq oziqa probirkalarida 28–30°C haroratda bir sutka davomida o'stirib olinadi. So'ngra mikroorganizm suspenziyasi steril suyuq oziqa muhitiga o'tkaziladi va tebratgichda 180–200 tez/min bir sutka o'stiriladi. Bu onalik ekish materiali deb ataladi. Onalik ekish materiali boshqa kolbalarga ko'chirib o'tkaziladi va o'stiriladi.

Muhit tarkibi. Lizinning barcha produtsentlari biotinga bog'liq mikroorganizmlar hisoblanadi. Shu sababli muhitda biotinning miqdori mikroob hujayraning normal o'sishi va rivojlanishi uchun kerak bo'lgan miqdorga (4–5 mkl) nisbatan yuqori (29 mkl/l) bo'lishi kerak. Agar biotin miqdorini 1–2 mkg/l gacha pasaytirilsa, lizin biosintezi sekinlashadi, lekin shu bilan bir vaqtda glutamin kislota hosil bo'lishi kuchayadi.

Biotin, vitaminlar va qator aminokislotalarning manbayi bo'lib, odatda, makkajo'xori ekstrakti va lavlagili melassada ularning miqdori katta bo'ladi. Lizinning maksimal biosintezi saxarozali muhitlarda kuzatiladi (6-jadval). 10–12% saxarozatutgan muhitdan ko'p miqdorda lizin olish mumkin. Saxarozaning yuqori konsentratsiyalarida produtsent o'sishining so'lishtirma tezligi pasayadi va shakar konversiyasi koeffitsiyenti (YP/S) kamayadi.

Sanoat sharoitlarida uglerod manbayi sifatida melassa, gidrol, selluloza tutuvchi xomashyo gidrolizatlar, kraxmal, shuningdek, sirka kislotadan foydalaniladi.

***Brevibacterium flavum* produtsenti bilan L-lizinning biosinteziga uglerod manbayining ta'siri**
(konsentratsiya 7,5 %)

Uglerod manbayi	ASB*, g/l	Lizin, g/l	Uglevod assimilatsiyasi, %	YP/S
Glukoza	15,2	22,0	7,6	0,37
Saxaroza	18,2	25,0	7,1	0,42
Galaktoza	2,0	1,0	0,7	0,02
Ksiloza	5,2	3,5	2,5	0,06
Mannoza	9,3	6,0	4,5	0,10
Ramnoza	3,6	2,0	1,3	0,03
Arabinoza	1,0	0,1	0,7	

Azot manbalari sifatida ko'pincha ammoniy tuzlari va makka-jo'xori ekstrakti, kazein yoki achitqilarning kislotali gidrolizatlari ishlatiladi. Achitqilar va kazein o'zida auksotrof shtammga kerak bo'lgan aminokislotalar va vitaminlarni tutadi. Muhitda uglerod va azotning optimal nisbati 11:1 ni tashkil qilishi zarur (uglevod miqdori oshib ketsa, lizin chiqishi pasayadi, kamaysa, alanin to'planadi). Ozuqa muhitida, shuningdek, kaliy, magniy va fosfor tuzlari bo'lishi kerak.

Ekuvchi material ikki bosqichda ko'paytiriladi: avval kolbalarda, so'ngra ekish apparatida. Fermenterning hajmi, odatda, 10 m³ ni tashkil qilishi lozim.

Fermentatsiya sharoitlari. Suyuq lizin olish jarayonida aseptika shartlariga qattiq rioya qilish kerak. Lizin produtsenti kul-

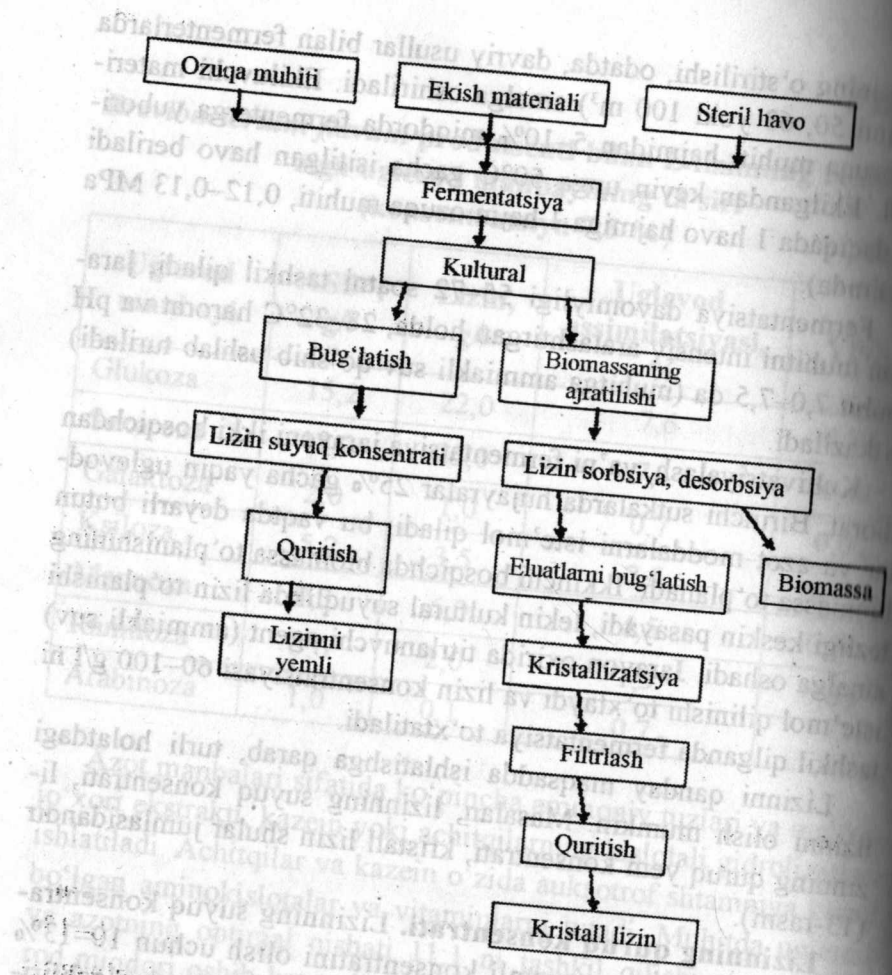
turasining o'stirilishi, odatda, davriy usullar bilan fermenterlarda (hajmi 50, 63 yoki 100 m³) amalga oshiriladi. Ekiluvchi material ozuqa muhiti hajmidan 5–10% miqdorda fermenterga yuboriladi. Ekilgandan keyin unga 50°C gacha isitilgan havo beriladi (1 daqiqada 1 havo hajmiga 1 hajm ozuqa muhiti, 0,12–0,13 MPa bosimda).

Fermentatsiya davomiyligi 55–72 soatni tashkil qiladi, jarayon muhitni intensiv aralastirgan holda, 28–32°C harorat va pH muhit 7,0–7,5 da (muhitga ammiakli suv qo'shib ushlab turiladi) o'tkaziladi.

Kultivatsiyalash, ya'ni fermentatsiya jarayoni ikki bosqichdan iborat. Birinchi sutkalarda hujayralar 25% gacha yaqin uglevodlar va azot moddalarni iste'mol qiladi; bu vaqtda deyarli butun biomassa to'planadi. Ikkinchi bosqichda biomassa to'planishining tezligi keskin pasayadi, lekin kultural suyuqlikda lizin to'planishi amalga oshadi. Jarayon oxirida titrlanuvchi agent (ammiakli suv) iste'mol qilinishi to'xtaydi va lizin konsentratsiyasi 60–100 g/l ni tashkil qilganda fermentatsiya to'xtatiladi.

Lizinni qanday maqsadda ishlatishga qarab, turli holatdagi lizinni olish mumkin. Masalan, lizinning suyuq konsentrat, lizinning quruq yem konsentrat, kristall lizin shular jumlasidandir (13-rasm).

Lizinning quruq konsentrat. Lizinning suyuq konsentratidan lizinning quruq yemli konsentratini olish uchun 10–13% li kultural suyuqlik HCl bilan pH 5,0 gacha nordonlashtiriladi va lizinni barqarorlash uchun 0,15% li natriy gidrosulfid eritmasi qo'shiladi. Barqarorlashtirilgan kultural suyuqlik vakuumda 35–40% gacha bug'lantiriladi. Ana shu usulda olingan lizin suyuk uniga, oziqa achitqilariga, bug'doy kepagiga qo'shib quritiladi. Bunda «sochiluvchan quruq oziqa lizinni» olish mumkin.



13-rasm. Lizin preparatlarini ishlab chiqarishning texnologik sxemasi.

Bundan tashqari, kristall lizinni ham olish mumkin. Bunda hujayra suyuqligidan biomassa ajratiladi va massa sentrifugalanadi. Shundan so'ng cho'kma filtrlanadi va tozalangan massa ajratib olinadi. Keyingi bosqichda biologik massani ionalmashinish xromatografiyasi usuli yordamida tozalash davom ettiriladi. Ion-

almashinish xromatografiyasidan so'ng, lizin 0,5–5,0% ammiak suvida yuvib olinadi. Xlorid kislota bilan nordonlashtirilib, so'ng bug'lantiriladi. Lizinga xlorid kislota ta'sir ettirilganda monoxloridrat lizin hosil bo'ladi va ushbu preparat 10–12 °C da sovutilganda sarg'imgir kristall lizin hosil bo'ladi. Yuqori tozalikka ega bo'lgan preparatni olish uchun tozalash jarayonida eritmaga faol ko'mir bilan ishlov berish zarur va shu bilan birga 50% li etanol yordamida qayta kristallantirish talab etiladi.

2.10. L-lizinning enzimatik sintezi va qo'llanilishi

L-lizinning enzimatik sintez orqali ishlab chiqarilishi DL-b-amino-e-kaprolaktam (AKL)ning kimyoviy sinteziga asoslangan. Bu modda L-AKLning L-lizingacha selektiv fermentativ gidrolizi uchun ishlatiladi; D-AKL fermentativ ratsematsiyaga uchraydi va gidroliz uchun yana substrat bo'lib ishlatiladi. Gidrolizlovchi ferment *Cryptococcus laurendii* hujayralaridan, ratsemizatsiyani katalizlovchi ferment esa *Achromobacter obae* hujayralaridan olinadi.

L-lizin olishda substratga ikki fermentning birgalikdagi ta'sirini ishlatish maqsadga muvofiqdir. Buning uchun DL-b-amino-e-kaprolaktam suvli eritmasiga gidrolaza va bakterial faollikni namoyon qiluvchi achitqi va bakterial hujayralarning kerakli miqdori kiritiladi. Ikkala fermentning ta'siri uchun optimal pH muhit ko'rsatkichi 8,0–8,5 va harorat 30–50 °C ni tashkil etishi kerak. Bu jarayonda L-lizinning chiqimi 99,8% ni tashkil qiladi.

L-lizin asosan yemga qo'shimcha sifatida ishlatiladi. Bu esa ushbu aminokislotaning o'simlik yemlarida kam miqdorda bo'lishi bilan bog'liq. Tozalangan lizin oziq-ovqat mahsulotlariga qo'shimcha siftida, shuningdek, tibbiyot preparatlarida va boshqa maqsadlar uchun ishlatiladi. Lizin tutuvchi preparatlar o'simlikshunoslikda ham keng qo'llaniladi. Aminokislotalardan tashqari boshqa biostimulatorlarni ham tutuvchi bunday prepa-

ratlarning qo'llanilishi issiqxona va dala qishloq xo'jalik ekinlar hosilining oshishiga olib keladi. Lizinning oksilizin shakli va fitin kislotali tuzlari anemiyaga qarshi va anabolik ta'sirga ega. Lizin atsetil-aspartati miokard, jigar kasalliklari, endogen yoki ekzogen kelib chiqishga ega bo'lgan intoksikatsiyalar va boshqa kasalliklarni davolashda qo'llanilishi mumkin.

2-bobga doir nazorat savollari:

1. Sellulolitik fermentlar deganda nimani tushunasiz, ushbu fermentlarning sanoat va qishloq xo'jaligidagi ahamiyati qanday?
2. Sellulozali chiqindilardan qandli moddalar olishning samarali usullari nimalardan iborat?
3. Sanoat miqyosida fruktoza olish texnologik jarayonining bosqichlarini tushuntiring.
4. Kraxmal gidrolizi asosida glukoza olish bosqichlari nimalardan iborat va bu jarayonda qanday xomashyolar ishlatiladi?
5. Glukoza-fruktozali siroplarni ishlab chiqarishda qanday fermentlar ishlab chiqariladi?
6. Aminokislotalar ishlab chiqarishning qanday biotexnologik usullari mavjud?
7. Lizin olish texnologiyasi bosqichlari va unda ishlatiladigan mikroorganizmlarga misollar keltiring.

3-BOB. FERMENTLARNING ANALITIK KIMYODA QO'LLANILISHI

Zamonaviy biotexnologiya – bu rekombinant oqsillar olish, transgen hayvon, o'simlik va mikroorganizmlar yaratish va ular asosida biologik faol moddalar olish jarayonlaridir. O'tkir raqobat ostida bugungi kunda biotexnologiya yo'nalishi muvaffaqiyatli rivojlanmoqda. Sababi, turli mahsulotlarga bo'lgan ehtiyoj, aholi sonining ko'payishi bilan keskin ortib bormoqda. Shuning uchun transgen hayvon zotlarini va o'simlik navlarini yaratish, rekombinant oqsillar olish uchun qat'iy sharoitlar va katalizatorlar zarur.

Biotexnologiyaning tirik hujayralardan (ma'lum kimyoviy reaksiyalarda katalizatorlar vazifasini bajaruvchi bakteriya sifatidagi achitqi zamburug'lari va alohida enzimlar kabi mikroorganizmlar) foydalangan holda farmatsevtika sanoati uchun biologik faol moddalarning olinishi va qo'llanilishi yangi imkoniyatlarni yaratdi. Birgina noyob spetsifiklikka ega bo'lgan enzimlarning immobilangan shakllari asosida chiqindisiz toza mahsulot olish texnologiyalari yaratildi.

Fermentlar o'zining noyob xususiyatlarini (samaradorligini, tanlovchanligini) hujayra tashqarisida ham saqlaydi. Kimyoviy katalizatorlarga qaraganda fermentlar zaharli emas, ularning sanoatda qo'llanilishi iqtisodiy va ekologik nuqtayi nazardan qulay hisoblanadi. Sanoat hajmiga ko'ra fermentlar aminokislotalar va antibiotiklardan keyin uchinchi o'rinni egallaydi va to'qimachilik,

teri, selluloza-qog'oz sanoati, tibbiyot, kimyo sanoatlarida keng qo'llanilmoqda. Turli sinf fermentlari atrof-muhitga tushuvchi antropogen organik birikmalarni parchalash va o'zgartirish uchun ishlatiladi.

Fermentlar tibbiyot sohasida ham muhim rol o'ynaydi. Proteolitik fermentlar (amilaza, lipaza) oshqozon-ichak, jigar va oshqozonosti bezi kasalliklarida qo'llaniladi. Oxirgi yillarda proteinazaning o'sma hujayralarni davolashda qo'llanilishi yaxshi samara berganligi ma'lum. Proteolitik fermentlar qon tomirlaridagi tromblarni yo'qotishda ham ishlatiladi. Kollagenaza chandiqlar hosil bo'lishini tarqatishda, elastaza esa ateroskleroz rivojlanishini to'xtatish uchun qo'llaniladi. Fermentlar diagnostik maqsadlarda, masalan, miokard infarktini yoki jigar kasalliklarini davolashda ishlatiladi.

Immobilangan fermentlar tibbiyotda, birinchidan, past darajadagi zaharli va allergik ta'sirga ega dori vositalarini yaratish uchun yo'l ochdi. Dunyodagi birinchi immobilangan ferment preparati (streptokinaza) qon-tomir kasalliklarida ishlatildi. Ikkinchidan, inkapsullangan ferment preparatlari organizmga dorilarning yo'naltirilgan transporti muammolarini yechdi. Fermentlar immobilanishi va ularning sanoatda qo'llanilishiga misol sifatida alanin aminokislota va model sistemalardagi koferment regeneratsiyasidagi (NAD) o'zgarish jarayonlarni misol qilib keltirish mumkin. Bu sistemada dastlabki substrat (sut kislota) dekstran NAD va ikkita NADga bog'liq degidrogenazalarda: laktat va alanindegidrogenazada immobilangan kameralaktat reaktorga nasos yordamida beriladi; reaktorning qarama-qarshi tomonida reaksiyaning mahsuloti ultrafiltratsiya metodi asosida yo'qotiladi.

Bu turdagi reaktorlar farmatsevtika sanoatida, masalan, gidrokortizon antirevmatoiddan prednizolon preparatini sintez qilishda

qo'llaniladi. Immobilangan fermentlar va kofermentlar yordamida bog'langan kimyoviy reaksiyalarni (almashinmaydigan metabolitlar biosintezini hisobga olgan holda) yo'naltirilganlik asosida amalga oshirish mumkin. Shu asnoda, yangi metodologik yondashuvlar yordamida fan «sintetik biokimyo» sohasiga o'zining birinchi qadamlarini qo'ymoqda.

Tadqiqotlarning yangi muhim yo'nalishlari bo'lib hujayraning immobilanishi va genotexnika metodlari (gen muhandisligi bo'yicha loyihalash) asosida mikroorganizmlarning sanoat shtammlarini, ya'ni vitaminlar va almashinmaydigan aminokislotalarning produtsentlarni yaratish mumkinligi hisoblanadi. Biotexnologiya yutuqlarining tibbiyotda qo'llanishiga misol sifatida biologik suyuqliklar yoki to'qima ekstraktlaridagi tireotrop gormonini aniqlash uchun, qalqonsimon bez hujayrasining immobilangan shakllari yaratilishini ta'kidlash mumkin.

Yana shuni ta'kidlash lozimki, kaloriyasiz shirinliklar, jumladan, yuqori kaloriyaga ega bo'lmagan, shirinligini his qilish mumkin bo'lgan, shakarining o'rnini bosa oladigan qandli moddalarni olishning biotexnologik usuli yaratilishini aytish lozim. Shunday istiqbolli moddalardan biri tarkibida dipeptid metil efiri – aspartilfenilalanin tutgan aspartam hisoblanadi. Aspartam shakardan ko'ra 300 marta shirinroq, zararsiz va organizmda uchraydigan tabiiy erkin aminokislotalar: asparagin kislota (aspartat) va fenilalanin ko'rinishida tarqaladi. Aspartam, shubhasiz, tibbiyotda ham, oziq-ovqat sanoatida ham keng qo'llaniladi. Masalan, AQSHda uni bolalar ozuqalarini tayyorlashda va parhez bop koka-kola tayyorlashda ishlatiladi. Genotexnika metodlari asosida aspartamni ishlab chiqarish uchun faqatgina erkin asparagin kislota va fenilalaninni emas, balki bu dipeptidning biosintezini katalizlovchi bakterial fermentni ham olish zarurdir.

3.1. Test-sistemalarda, mikroanalizda va biologik qurilmalarda fermentlarning qo'llanilishi

Biosensorlar – analitik qurilma bo'lib, ulardagi sezuvchi qatlam biologik materiallardan iborat va u ma'lum bir komponentning mavjudligi yoki aniq bir konsentratsiyaga funksional bog'langan holda elektr signal orqali reaksiyani amalga oshiradi. Biologik material sifatida fermentlar, to'qimalar, bakteriyalar, zamburug'lar, antigen va antitanalar, liposomalar, organellalar, retseptorlar, DNK va shu bilan birga fizik datchiklarga immobilizatsiya qilingan hujayralar ham ishlatiladi. Biosensor texnologiyasi biologiya va mikroekologiya fanlari asosida yaratilgan.

Bunday qurilmani yaratish g'oyasi deyarli yaqinda, 1960-yillarda ilgari surildi. Birinchilardan bo'lib buni 1967-yilda L. Klark va K. Liney ushbu yo'nalishga asos solishdi. Klark o'zining g'oyalarida fermentli elektroddan, ya'ni yuzasiga ferment immobilizatsiya qilingan elektr kimyoviy datchikdan foydalangan holda, biror biologik faol moddani juda kichik miqdorda aniqlash mumkinligini ta'kidlagan va ushbu jarayonni ilmiy asoslab berdi. Shundan so'ng «biosensor» tushunchasi fanda paydo bo'ldi.

Ko'pchilik biosensorlar biologik suyuqliklarning tahlilida qo'llaniladi. Masalan, qon tarkibida 1000 dan ortiq turli faol moddalar mavjud bo'lib, ushbu moddalarning konsentratsiyasini tez va sezuvchan usul yordamida aniqlash talab etiladi. Diabet bilan xastalangan kishilar uchun glukozaning konsentratsiyasini aniqlash juda muhim hisoblanadi. Bugungi kunda biosensorlar yordamida ushbu muammoni tez hal etish mumkin.

Biosensorlarni turli maqsadlarda yaratish mumkin. Biosensorlar ikkita – biokimyoviy va fizik transduserlardan iborat bo'lib, ular biokimyoviy jarayonlarda o'zaro qisqa kontaktlashadi. Biokimyoviy biotransduser yoki biosektor aniqlashning biologik elementi vazifasini bajarib, aniqlanayotgan komponentning

(aniqrog'i, kimyoviy bog' haqidagi ma'lumotni) fizik yoki kimyoviy tarkibi haqidagi ma'lumotni signalga aylantirib beradi. Biokimyoviy biotransduser sifatida biologik strukturalar, jumladan, fermentlar, antitana, retseptorlar, nuklein kislotalar va hatto tirik hujayralarni ishlatish mumkin. Fizik transduser aniqlanayotgan komponentni aniqlash asosida hosil bo'lgan signalni maxsus qurilma yordamida elektron signalga aylantiradi. Axbotni o'qish va yozish uchun signalni registratsiya qiluvchi va tezlashtiruvchi elektron sistemalar qo'llaniladi. Fizik transduserlarning ko'pgina turlari mavjud: elektr kimyoviy, spektroskopik, termik, gravitatsion, pluzoelektrik, kalorimetrik, rezonans sistemalar va boshqalar.

Biosektor elementlarning barcha turlarini turli xil transduserlar bilan kombinatsiya qilib, biosensorlarning turli-tuman tipini yaratish mumkin. Biosensor bioasbobi tahlilini zamonaviy metodlar bilan taqqoslash shuni ko'rsatdiki, tahlilning tezligi, yuqori spetsifiklikka egaligi, qimmatbaho asbob-uskunalariga ehtiyoj yo'qligi va shu bilan birga murakkab aralashmadagi kerakli birikmalarni yuqori selektivlik bilan aniqlash imkonini berishi, ushbu bioqurilmaning har tomonlama qulayligini ko'rsatdi. Shu sababdan ham, biosensorlarni yaratish va ularning qo'llanish doirasini kengaytirish hozirgi zamonaviy biotexnologiyaning asosiy vazifalaridan biri hisoblanadi.

3.2. Fermentli biosensorlar

Bugungi kunda xemi va bioluminessensiya asosida fermentli elektrodlar, fermentli mikrokalorimetrik uzatgichlar, biouzatgichli biosensorlar yaratilgan.

Fermentli yoki reagentsiz elektrodlar fermentativ o'zgarish jarayonida hosil bo'luvchi moddani elektrokimyoviy usul yordamida aniqlashga asoslangan moslamalar hisoblanadi. Ushbu

biomoslamalar tuzilishi jihatidan bir yoki bir necha immobillangan fermentlardan (ba'zida ferment erigan holda membrana qurshovida elektrodga yaqin holda joylashishi mumkin) iborat qatlamlar bilan o'ralgan elektrodan iborat bo'ladi. Elektrod asosi qanday uslubga asoslanganiga qarab, moslama potensiometrlik yoki amperometrik turlarga bo'linadi.

Fermentli mikrokalorimetrik datchiklar, ya'ni uzatgichlar fermentativ reaksiyalarning issiqlik effektidan foydalanishga asoslangan moslamalardir. Fermentli biosensorlar tashuvchiga immobillangan fermentli va termistor qismdan tashkil topgan. O'lchovchi qism orqali tahlil qilinayotgan namuna o'tkazilganda issiqlik effekti namoyon bo'ladigan kimyoviy reaksiya amalga oshadi. Aynan o'sha issiqlik effekti o'lchagichda qayd etiladi va reaksiya natijasi aniqlanadi.

Xemi va bioluminescentli datchiklar fermentativ reaksiya mahsulotlarini turli to'lqin uzunligida yorug'lik nurlarining sinishi asosida olinadigan ma'lumotni qayd qilishga asoslangan. Tuzilishi bo'yicha ushbu bioslamalar ferment preparatlari immobillangan (lutsiferaza yoki peroksidaza bilan) tashuvchi hamda yorug'lik qabul qiluvchi moslamadan iborat. Bu sistemada qo'llaniladigan datchik tipiga asoslangan analitik uslub yuqori sezgirligi bilan ajralib turadi va, o'z navbatida, juda kichik konsentratsiyali moddaning (10^{-12} M) miqdorini aniqlash imkoniga ega.

Immobillangan fermentlar qo'llanilgan elektrodlar chidamli bo'lib, ular yordamida bir necha yuz namunani o'lchash mumkin. Tabiiy ferment preparatlari qo'llanilgan elektrodlar asosida esa 50 tagacha namunani o'lchashni amalga oshirish mumkin.

Hozirgi davrda qon tarkibida qandni aniqlashda (immobillangan glukozoksidaza asosida) qo'llaniladigan amperimetrik biosensor keng tarqalgan. Ushbu biosensor yaratilgan bioqurilmalar ichida birinchi yaratilgan biosensor hisoblanadi.

Bu o'rinda yana shuni qayd etish lozimki, bugungi kunda fermentli sensorlar quyi molekulyar moddalar konsentratsiyasini aniqlashda ham keng qo'llaniladi. Masalan, penitsillin antibiotigining produtsentlari ishlab chiqargan ozuqa muhitidagi penitsillin miqdorini nazorat qilish uchun, penitsilaza fermenti asosida yaratilgan elektrod qo'llaniladi.

Kislorodli elektrodga (fizikaviy transduser) asoslangan biosensorlar esa, turli moddalarni, masalan, fermentlarning substratlarini, laktatlarni, L-aminokislotalarning salitsilatlarini, aksolatlarini, ayni karbon kislotalarning anionlarini aniqlash imkonini beradi.

Biosensorlar yordamida muammoli holatlarni hal qilish mumkin. Xususan, substratning ma'lum konsentratsiyasida aniqlanayotgan signal (potensial) asosida, aynan bir fermentning faolligini aniqlash. Bunda reaksiya natijasida hosil bo'lgan signal asosida nafaqat substrat konsentratsiyasini, balki ferment katalitik faolligini ham aniqlash mumkin. Biosensorlarning ana shunday xususiyatga egaligi qon tarkibidagi fermentlarning faolligini va konsentratsiyani aniqlash imkonini yaratadi. Yurak faoliyati bilan bog'liq ba'zi fermentlarning (aspartataminotransferaza, kreatinkinaza kabilar) faolligini aniqlash, o'z navbatida, klinik sharoitda miokard infarktini aniqlab, tashxis qo'yishda qo'llaniladi.

3.3. Hujayrali biosensorlar

Biotexnologiya fanining yutuqlaridan yana biri, tirik hujayralarni polimerlar va turli tabiatga ega bo'lgan qattiq tashuvchilar tarkibiga kiritib, ularni turli sohalarda ishlatish bilan bog'liqdir. Bunday tipda yaratilgan bioslamalarni hujayrali biosensorlar deb atash mumkin. Ushbu sensorlar tibbiyotda, mikrobiologiya sanoatida va boshqa tarmoqlarda keng qo'llaniladi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, hujayrali biosensorlar mikroorganizm hujayralarini turli tashuvchilarga immobillashga asoslangan. Mik-

roorganizm hujayralarini turli fizikaviy va kimyoviy usullarda immobillash mumkin. Imobillangan hujayralarning barqarorligi ularning metabolizmi, shuningdek, tashuvchining va muhitning xossalari bilan belgilanadi.

Immobilizatsiya uchun yengil kultivatsiyalanadigan, qayta tiklanadigan mikroorganizm hujayralari, shuningdek o'simliklar, hayvon va odam hujayralari keng qo'llaniladi.

Fermentlardan farqli ravishda immobillangan hujayralarni qo'llashda tozalash bosqichini qo'llash talab etilmaydi. Mavjud uslublar ferment faolligini 100% saqlagan holda uzoq vaqt oralig'ida (ba'zi holatlarda bir necha yillar davomida) faoliyat ko'rsatadigan hujayralar yaratishga imkon beradi. Ko'p turdagi hujayralar uchun, ayniqsa, mikrobl hujayralar uchun tarkibida yuqori darajada oqsil va ferment ishlab chiqish xususiyatiga ega-dir. Bunda hujayra oqsilni sintez qilish xossasini saqlab qolgan holda, sensor yordamida turli namunalarni aniqlashning yuqori samarali uslublarini yaratish mumkin.

Hujayrali biosensornlarning asosiy kamchiliklaridan biri, qo'llanilayotgan elektrod sekinlik bilan javobni amalga oshiradi hamda hujayra yoki to'qimada bir necha ferment sistemalar ishtirok etishi sababli, namoyon bo'ladigan javob reaksiyasi past selektivlikka va spetsifiklikka ega. Bundan tashqari, o'sish va ko'payish jarayonida intakt hujayralar tashuvchini parchalashi va shu bilan birga hosil bo'layotgan mahsulotni ifloslantirishi mumkin. Biroq yuqorida qayd etilgan muammolar, o'z navbatida, bakteriya hujayralarini qo'llash jarayonida antibiotiklarni qo'shish yoki immobillangan o'simlik hujayralari uchun fitogormonlar tanqisligini sun'iy yaratish asosida, o'sish jarayonini sekinlashtirish yo'li bilan hal etish mumkin. Shu sababli, bugungi kunda mikroorganizm hujayralari asosidagi biosensornlarni yaratish uchun turli mikroorganizmlar qo'llaniladi. Chunonchi, *Nigros-pora eyropea* ammiakni aniqlash uchun, *Azotobacter vinebudii* –

nitratlarni aniqlash uchun. *Aspergillus niger* zamburug'i asosida bir guruh yapon olimlari tomonidan go'sht mahsulotlari tarkibidagi aminlarni aniqlashga mo'ljallangan biosensornlar yaratilgan. Shuning bilan birga cho'chqa jigari va buyragi kesmalari, qovoq va banan kesmalari to'qimali elektrod yaratishda qo'llanilmoqda.

Boshlang'ich davrlarda faolligi saqlangan holatda hujayralarni immobillash uchun tabiiy materiallar: jelatin, agar, alginat kalsiy, karraginanlar qo'llaniladi. Hozirgi vaqtga kelib, hujayralarni sintetik polimer gellariga kiritish usullari ishlab chiqildi va rivojlantirildi.

Oziq-ovqat, farmatsevtika, to'qimachilik, kimyo-metallurgiya va sanoatning boshqa ko'p sohalarida turli kimyoviy birikmalarni tashuvchi sifatida qo'llab, sensorlar yaratish mumkin. Ushbu immobillangan hujayralar asosida yaratilgan sensorlar xalq xo'jaligining turli sohalarida, shuningdek, biotexnologiya usulida aminokislotalarni sintez qilishda ham keng qo'llanilmoqda. Bundan tashqari, biosensornlarni quyidagi maqsadlarda ham qo'llash mumkin:

- oziq-ovqat mahsulotlarining ozuqaviy qiymatini, yangiligini va xavfsizligini aniqlashda;
- bevosita bemorning qonini ekspres tahlil qilishda;
- atrof-muhitning zararlanganligini, ifloslanganlik darajasini aniqlashda;
- quyi molekulari moddalar, toksinlarning konsentratsiyasini aniqlashda;
- oqova suvlardan metallarni ajratib olishda;
- tabiiy va oqova suvlarni tozalashda va h.k.

Umuman olganda, immobillangan biomateriallarga asoslangan bioqurilmalar bugungi kunda juda kichik konsentratsiyali moddalarni aniqlashda, zamon talabiga javob beradigan o'ta sezgir usullardan biri bo'lib qoldi. Ba'zi biosensornlar uy sharoitida individual qo'llash uchun (asosan qon tarkibidagi qandni aniq-

lashda) keng tarqalmoqda. Navbatda hid bilish va ta'm bilish «sun'iy organlarni» yaratishga imkon beradigan tirik organizmlarning retseptorlari o'rmini egallay oladigan hamda qator kasalliklarga aniq tashxis qo'ya oladigan biosensornlarni yaratish kabi bir qator vazifalar turibdi.

Molekular biologiya va mikroelektronika sohasida yaratilgan yutuqlar biosensornlar tuzilmalarini yaratuvchilarni yangi yechimlarga ildamlamoqda. Analitik signal va tahlil natijalarini hisoblash maqsadida, sensor-transduser, raqamli ko'rsatgich va mikroprotsessorni birlashtirgan biochip yaratish texnologiyasini (fotolitografiya, qoplamalashning yarimo'tkazgichli texnikasi) ishlab chiqish istiqbolli rejalar hisoblanadi. Zamonaviy biochip-larning yaratilishiga 1975-yilda E.Sauzern tomonidan yasalgan Sauzern-blot asos bo'ldi. Buning uchun E.Sauzern qattiq tashuvchiga birlashtirilgan DNK fragmentlarining xususiy ketma-ketligini aniqlash uchun belgilangan nuklein kislotalar qatoridan foydalandi. Rossiyada biochiplar A.D. Mirzabekov rahbarligida RFA molekular biologiya institutida 1980-yillar oxirida yaratila boshladi.

Mikrochiplar texnologiyasi laboratoriya tadqiqotlarining prinsipial jihatdan yangi bosqichi bo'lib, bir vaqtning o'zida 1000 ta namunani testdan o'tkazish imkonini beradi. DNK yoki oqsilli chiplarni yaratish uchun aynan DNK yoki oqsillarning minglab molekulalari plastinkalarga joylashtiriladi. Hosil bo'lgan bunday kichik moslamalar biologik makromolekulalarning spetsifik o'zaro ta'sirlashuvini tahlil qilish uchun qo'llaniladi. Bunday chiplarda zondlar sifatida oligonukleotidlar, genomli DNK, RNK fragmentlari, oqsillar, retseptorlar, ligandlar va boshqalar xizmat qiladi.

Qisqa vaqt mobaynida biochiplar yordamida molekular biologiya, molekular genetika, molekular biotexnologiya sohalaridagi fundamental tadqiqot muammolari hal qilindi va shu bilan birga

abbiyotda, farmakologiya, ekologiya, sud-tibbiyot ekspertizasida amalda qo'llanila boshladi.

Biochiplarning hozirgi vaqtda bir qator turlari mavjud:

- matritsali (immobilangan DNK bilan) biochip;
- mikrofluidli (kapillarli) biochip;
- rangli kodga ega bo'lgan mikrosferalar qo'llanilgan biochiplar.

Zamonaviy mikrochiplarda yacheyka o'lchamlari 50–200 mikron oralig'ida yotadi va har bir yacheykaning hajmi esa 1 ml dan 1 mkl ni tashkil qiladi; tahlil qilinayotgan makromolekula konsentratsiyasi esa 10 mkM gacha bo'ladi. Chipdagi yacheykalarining umumiy miqdori 10^3 – 10^5 ni tashkil etadi. Uning chiziqli o'lchamlari esa taxminan 1 sm ga teng. Namuna bilan ta'sirlashadigan mikrozonlar pochta markazi o'lchamidan katta bo'lmagan tashuvchiga joylashtiriladi. Har bir mikrozon tomchi shaklida bo'lib, ko'ndalang kesimi bo'yicha 100 mikronni tashkil qiladi. Bitta mikrozonning yacheykalari o'lcham bo'yicha bir xil bo'lib, 1 mm da 10–30 gacha tomchilar joylashadi. Fermentativ reaksiyalar amalga oshadigan chiplarda, yacheykalar sayozroq bo'ladi. DNK reaksiyalar amalga oshadigan chiplarda esa, yacheykalar zichroq joylashgan bo'ladi. Bunday texnologiya bitta biochipda, 30 dan 100 mingtagacha genni tahlil qilish imkonini beradi. Bunda qo'yilgan maqsadga qarab, 6 tadan bir necha minggacha nukleotidlardan tashkil topgan DNK uchastkalarini aniqlash mumkin.

Chiplar tayyorlash uchun ko'p hollarda shisha, plastik, yarimo'tkazgich yoki metall plastinkalar qo'llaniladi. Ularning sirtlariga tahlil qilinayotgan eritma tarkibida bo'lgan moddalarni tanlab bog'lash qobiliyatiga ega bo'lgan biologik makromolekulalar (DNK, oqsillar, fermentlar) joylashtiriladi.

Barcha bir necha faol moddalar asosida boradigan jarayonlarni aniqlashda ishlatiladigan biochiplarda ma'lum bir kimyo-

– genda turli kasalliklar bilan bog‘liq bo‘lgan mutatsiyalarni aniqlash;

– genlarning faolligini kuzatish;

– infeksiyon kasalliklarning diagnostikasi va ularni davolashning samarali uslublarini aniqlash;

– qishloq xo‘jaligi ekinlari hosildorligiga mas‘ul bo‘lgan genlarni aniqlash;

– patogen hamda foydali mikroorganizmlarni skrining qilish.

Turli «sezgir» oqsilli biochiplar yaqin kelajakda keng ko‘lamdagi dorivor moddalarni, jumladan gormonlarni, narkotiklarni, zaharlarni, tahlil qilinayotgan namuna (qon, suv, oziq-ovqat yoki tuproq)dagi pestitsidlarni hamda turli allergenlarni, onkogenlarni, biologik faol moddalarni, hatto genetik defektlarni aniqlash imkonini beradi. Oqsilli bochiplar yaqin kelajakda butun bir immunologik laboratoriyalarning vazifasini o‘z zimmasiga olib, ko‘pchilik diagnostik uslublarning samaradorligini bir necha marta oshirib, tahlilning tannarxini sezilarli darajada pasaytirishi kutilmoqda.

Oqsilli mikrochiplar quyidagi maqsadlar uchun qo‘llanilishi taklif qilinmoqda:

– turli kasalliklar, hatto ularning turli bosqichlari uchun xos bo‘lgan oqsilli bimerklarni aniqlashda;

– dori vositalarining sifatini baholashda;

– oqsillarning alohida turdagi hujayralar tomonidan sintezlanishidagi tafovutlarini aniqlashda;

– oqsillarning tuzilishi va funksiyalari orasidagi o‘zaro bog‘liqlikni o‘rganishda;

– yangi dorivor moddalar uchun nishonlarni aniqlash maqsadida oqsillarning ekspressiyasini baholashda;

– oqsillar va boshqa molekulalar orasidagi o‘zaro ta’sirlashuvni o‘rganishda.

3-bobga doir nazorat savollari:

1. Biosensornlarning qanday turlari mavjud va ular qanday maqsadlarda ishlatiladi?
2. DNK mikrochiplari qanday kasalliklarni aniqlashda ishlatiladi?
3. Oqsilli mikrochiplar qanday kasalliklarni aniqlashda ishlatiladi?

viy ta'sirlashuv mexanizmi kuzatiladi. Chipning bir necha ming yacheykalaridan biriga joylashtirilgan tadqiq qilinayotgan namuna molekulalari o'z «jufti» (mikrozond) bilan bog'lanadi va reaksiya amalga oshadi. Masalan, DNK tolalari o'zining komplementar jufti bilan bog'lanadi, antigen o'zining antitanasi bilan, substrat esa o'ziga xos ferment molekulasi bilan bog'lanadi. Namunani aniqlashda luminessentli usuldan foydalaniladi. Gibratlanishni o'rganishda fluoressensiya usuli asosiy uslub bo'lsa-da, yagona usul hisoblanmaydi. Gibratlanishni tavsiflovchi ma'lumotlarni mass-spektrometriya, atom kuchlanish, mikroskopiya kabi usullar asosida ham aniqlash mumkin.

Qo'llanilayotgan makromolekulalarga qarab, ma'lum maqsadlarga yo'naltirilgan turli biochiplar mavjud. Hozirgi vaqtda DNK molekulalari adsorbsiyalangan tashuvchi matritsali DNK-chiplar ishlab chiqarishda ishlatilayotgan chiplarning 94% ini tashkil qiladi. Qolgan 6% ini esa oqsilli chiplar tashkil qiladi.

DNK bilan immobillangan barcha turdagi biochiplarni ishlash prinsipi (tamoyili) asosida Uotson-Krik qoidasi bo'yicha (A/T yoki G/S) to'g'ri va komplementar DNK oralg'ida aniq mutanosiblik yotadi. Gibratlanayotgan DNK, odatda, polimeraza zanjiriy reaksiya (PZR) yordamida aniqlanadi. Keyinchalik reaksiya jarayonida chipda komplementar zanjirlarning ta'sirlashuvi amalga oshadi: ulardan biri nukleotidlarning ma'lum ketma-ketligiga ega bo'lib, plastinkada joylashtirilgan bo'ladi, bir zanjirli DNK-nishon esa fluoressentli nishon bilan nishonlangan bo'lib, DNK chipga joylashtiriladi.

Immobillanayotgan DNK sirt sathiga mexanik robotning ninasimon printeri yordamida joylashtiriladi. Gibratlanayotgan DNK, eritmada fluoressentli yoki radioaktiv nishon yordamida nishonlanadi. Fluoressentli bo'yoqning xossalari DNK tarkibi (A/T yoki G/S) temperaturaga juda ham bog'liq bo'lishi kerak emas. Tadqiq qilinayotgan modda oldindan shu'lalanadigan (fluo-

ressent) bo'yoq bilan ishlanadi va o'rganilayotgan modda biochip bilan o'zaro ta'sirlashganda o'ziga mos yacheykalarda kimyoviy reaksiyalar amalga oshadi va aynan shu vaqtda yacheykalar shu'lalanadi. Sodir bo'layotgan reaksiya qanchalik kuchli bo'lsa, shu'lalanish ham shunchalik kuchli bo'ladi. Ta'sirlashgan chiplarning analizi analizator chip-detektor yordamida avtomatik ravishda amalga oshadi. Analizator kompyuter va videokamera ulangan keng maydonli mikroskopdan tashkil topgan. Xususan, biochip analizatorining ishlash mohiyati kuchli shu'lalangan yacheykalarini aniqlab solishtirishdan iborat. Bunday usul bilan namunaning turli xarakteristikalari aniqlanadi. Masalan, organizmda u yoki bu infeksiya qo'zg'atuvchilarning mavjudligini yoki genomda mavjud bo'lgan o'zgargan genlarni aniqlash va boshqalar.

Gelli biochiplarda DNK shishaning maxsus ishlangan sirtiga qotirilgan, qalinligi 10–20 mikron bo'lgan poliakrilamidli gel qatlamiga immobilizatsiya qilinadi. Bunda immobilizatsiya ultrabinafsha nuri bilan nurlantirilganda, amalga oshadigan fotoreaksiya natijasida, kovalent bog'lar hosil bo'ladi. Gelli biochiplarda DNK molekulalari orasidagi o'zaro ta'sirlashuv eritmada kabi bo'ladi. Bundan tashqari, yacheyka uch o'lchamga ega bo'lgani uchun bunday turdagi biochiplarda immobillanadigan DNK molekulalar soni boshqa turdagi mikrochiplardagidan ko'proq bo'lib, yacheykadagi fluoressensiya signalining kuchliroq bo'lishiga olib keladi. Tadqiqotchilar DNK-chiplar yaratish uchun, kremniyli protsessorlarni ishlab chiqarish jarayoniga o'xshash fotolitografiya jarayonini yaratishdi. Masalan, «Affimetrix» (AQSH) kompaniyasi tarkibida DNK ketma-ketligini tutgan yuqori zichlikdagi chiplar asosida, «Gene chip» texnologiyasini yaratdi.

DNK-mikrochiplari bugungi kunda odam va boshqa tirik organizmlarning genomini tahlil qilish va olingan natijalarni amalda qo'llash maqsadida ishlatiladi. Chunonchi:

4-BOB. BIOCHIPLARNING O'RNI VA AHAMIYATI

Biochiplar ilmiy maqsadlar bilan birga, amaliy tibbiyotda ham qo'llanilmoqda. Ular turli genlarni aniqlashda va funksiyalarini baholashda yordam beradi. Qisqa muddat oralig'ida genetik mutatsiyalarni tavsiflash hamda odamning ma'lum bir kasallikka, masalan, onkologik kasalliklarga moyilligini (60 % saraton bilan kasallanganlarda aniqlanadi) aniqlashga imkon beradi. Hozirgi vaqtda leykemiya kasalligining diagnostikasi uchun mo'ljallangan biochip sertifikatlashtirish jarayonidan o'tmoqda.

Genli onkomarkerlardan tashqari, oqsilli onkomarkerlar (saraton haqida signal beruvchi molekulalar) ham mavjud bo'lganligi sababli, ushbu markerlarga xos biochiplar ishlab chiqildi. Bemor organizmi gepatit va OITSGa tekshirilayotganda, qon quyish jarayonida moyillikni aniqlashda qo'llaniladigan biozondlar ham yaratildi.

Biochiplar yordamida irsiy kasalliklarni diagnostika qilishdan tashqari, hayot davomida genetik koddagi mutatsiyalar natijasida yuzaga keladigan kasalliklarni ham aniqlash mumkin. Mikrochiplar molekular mexanizmlarni o'rganishda va turli dori vositalarining ta'sirini tadqiq qilishda qo'llaniladi. Organlarni qayta ko'chirib o'tkazishda biochiplar alohida o'rin egallaydi. Gistomoyillikning asosiy omillarini oqsillar tashkil qilib, ular, o'z navbatida, odam organizmidagi hujayralarni identifikatsiyalaydigan mikrochip vazifasini bajaradi. Implantatsiya qilingan donor organ qabul qilishi uchun, donor organ to'qimalaridagi oqsil markerlar iloji boricha bemorning oqsil markerlaridan kamroq farqlanishi

kerak. Shu nuqtayi nazardan immun sistemasining salbiy reaksiyalarini kamaytirish maqsadida, moyilligi yuqori bo'lgan organ tanlash vazifasini biochiplar yengillashtirib beradilar.

Bundan tashqari, silning turli shakllarini tashxis qilish uchun biochiplar yaratilmoqda. Ma'lumki, hozirda antibiotik ta'siriga barqaror bo'lgan bir necha turdagi sil tayoqchalari aniqlangan. O'z navbatida, biochip barcha ma'lum bo'lgan sil qo'zg'atuvchilarini aniqlab, kasallikning aynan shaklini davolash uchun qandan antibiotiklarni ishlatish mumkinlik imkoniyatini yaratadi. Tashxis jarayonini, uzoq muddatli uslublardan farqli ravishda, qisqa muddat ichida amalga oshirish mumkin bo'ladi.

Biochiplarni o'ta xavfli bakteriyalarni – qorason, o'sma, brutselloz va o'latni aniqlashda, gripp diagnostikasida qo'llash maqsadga muvofiqdir. Biochiplar bo'yicha olib borilgan tadqiqotlarning natijalari asosida, masofadan turib ishlaydigan moslamalar yaratildi. Xususan, Rossiya va AQSH olimlari hamkorlikda biochiplardan tashkil topgan avtonom sistemalar yordamida, yer sharidan tashqaridagi obyektlarda (sayyoralar, yulduzlar va boshqalar) tiriklik va hayot belgilari mavjudligini aniqlashga mo'ljallangan dasturni ishlab chiqdilar.

Yuqorida keltirilgan misollar yaqin vaqt ichida biochiplar texnologiyasi ildamlilik bilan rivojlanishini va ularning turli sohalarda keng ko'lamda qo'llanilishi mumkinligini ko'rsatadi.

4-bobga doir nazorat savollari:

1. Tibbiyotda biozondlar nima uchun ishlatiladi?
2. Biochiplar yordamida qanday kasalliklar diagnostika qilinadi?
3. Genetik koddagi mutatsiyalar natijasida yuzaga keladigan kasalliklarni qanday aniqlash mumkin?

5-BOB. EUKARIOT ORGANIZMLAR ASOSIDA REKOMBINANT OQSIL OLISH

Eukariot organizmlardagi DNK geterolitik oqsil rekombinatsiyasini olish uchun prokariot organizmlar ekspresiyasidan foydalaniladi. Ba'zi holatlarda eukariot oqsili bakteriyalardan sintezlanadi, biologik jihatdan faol yoki mustahkam bo'lmaydi. Bundan tashqari, toksinlardan tozalanganiga qaramay, bu moddalar odam va hayvonlarda yuqori temperaturada kasallik keltirib chiqaradi. Bu muammolarni hal qilish uchun oqsillarning rekombinatsiyasi tibbiyotda ishlatilishga mo'ljallangan eukariot organizm ekspresiyasida amalga oshiriladi. Bunday oqsillarning jismoniy va funksional tarkibi biokimyoviy yo'l bilan identifikatsiya qilinadi. Eukariot hujayralaridagi oqsillar posttranslatiya jarayonidan keyin o'zgarishlarga chidamli bo'ladi.

Disulfid bog'larining shakllanishi. Bu reaksiyani disulfidizomeraza fermenti katalizlaydi. Noto'g'ri ulanishi natijasida oqsil nobarqaror va nofaol bo'lib qoladi. Promotor poliedr geni juda kuchli, virus genini muallaq ushlab turmaydi.

Glikolizlanish: asosiy oqsil modifikatsiyasi stabilanadi. Glikolizlanish reaksiyalarini ommalashtirish – bu spetsifik oqsilning serin yoki treonin yoki bo'lmasa asparagin aminokislotalarining qoldig'idir.

Oqsil tarkibidagi aminokislotalarning modifikatsiyasi: fosforlanish, atsetillanish, atsillanish, gamma-karboksillanish, sulfatlanish, mirsillanish va palmitillanish.

Bularning barchasi prokariot xo'jayin hujayrasi barcha geterolitik aminokislotalardan oqsillarni to'g'ri glikoliz qilishi va

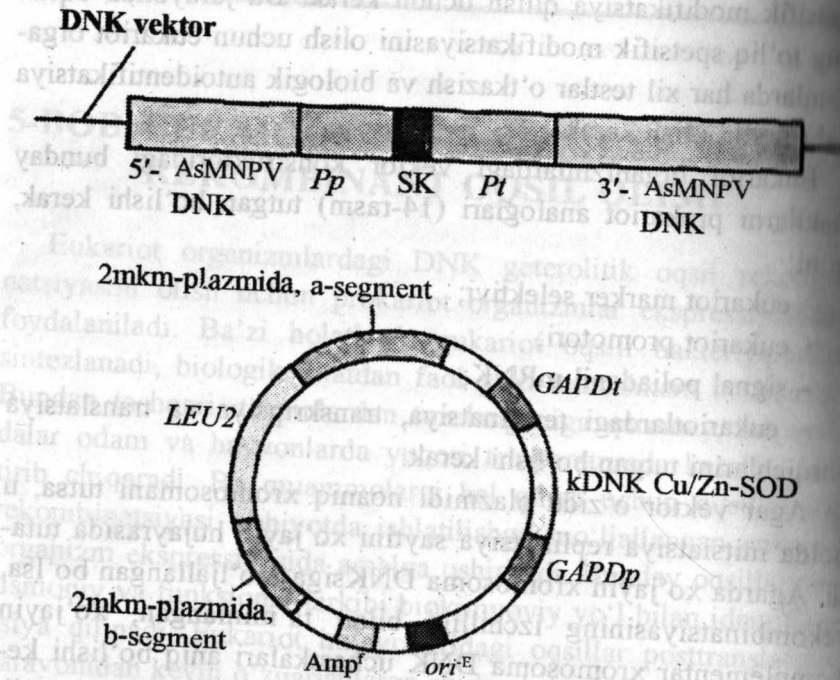
spetsifik modifikatsiya qilish uchun kerak. Bu jarayonda oqsilning to'liq spetsifik modifikatsiyasini olish uchun eukariot organizmlarda har xil testlar o'tkazish va biologik autoidentifikatsiya mahsulotini olish kerak.

Eukariot organizmlardagi vektor konstruktoridagi bunday shakllarni prokariot analoglari (14-rasm) tutgan bo'lishi kerak, ya'ni:

- eukariot marker selektivi;
- eukariot promotori;
- signal poliadenil mRNK;
- eukariotlardagi terminatsiya, transkripsiya va translatsiya bosqichlarini tutgan bo'lishi kerak.

Agar vektor o'zida plazmidi noaniq xromosomani tutsa, u holda initsiatsiya replikasiya saytini xo'jayin hujayrasida tutadi. Agarda xo'jayin xromosoma DNKsiga mo'ljallangan bo'lsa, rekombinatsiyasining izchilligi bilan ta'minlangan, xo'jayin komplementar xromosoma DNK uchastkalari aniq bo'lishi kerak (xromosoma saytining integratsiyasi). Ko'pchilik texnik operatsiyalarda prokariotlarga nisbatan eukariot hujayralardan rekombinant DNKlar olish qiyin. Boshqacha qilib aytganda, bu vektorda ikki xil initsiatsiya translatsiyasi va ikki xil selektiv marker geni bo'lib, ulardan bittasi *e.coli* da bo'ladi; boshqasi esa eukariot xo'jayin hujayrasida bo'ladi. Bunday vektor ekspresiyasi hasharotlar va sutemizuvchilar uchun achitqi hisoblanadi.

Bakteriya hamda achitqi hujayrasida bu jarayon DNK transformatsiya deyiladi. Mikrobiologlar bu terminni nasl o'zgarishidan keyingi kirgan ekzogen (boshqa) DNK deb atashadi. Tirik hujayralardagi transformatsiya ma'lum muhitda normal hujayralarning saraton hujayralariga aylanishini anglatadi.



14-rasm. Eukariot organizmlarning umumiy vektor ekspressiyasi.

Ularning asosiy elementlari: eukariotlarning promotor bilan transkriptoni (p), klonlangan sayt (KS) va terminatsiya signali va poliadenillanishi (t); eukariot marker seleksiyasi (CM); eukariot hujayrasidagi funksiyalanuvchi initsiatsiya saytining replikatsiyasi (ori); e.coli dagi initsiatsiya saytining replikatsiyasi (ori e); e.coli marker seleksiyasi (Amp).

Transformatsiya uchun achiqning 3 xili ishlatiladi. Birinchidan, ekzogen DNK achiqi hujayrasidan olinadi, hujayra devori kimyoviy yoki enzymatik (protoplast) (1) yo'li orqali yo'qotiladi. Begona organizm hujayra DNKsi olinib atsetat litiy (2) bilan ishlanadi yoki elektroporatsiya qilinadi (3). Transfeksiyalash –

hujayra DNKsini ma'lum muhitda tirik organizm hujayrasidan inkubatsiyalash, kalsiy fosfat qoldig'i yoki DeAe-dekstrakti (1) elektroporatsiyada DNK transformatsiyasini tozalab yaratish (2). 4-bobda aytib o'tilganidek, elektroporatsiya hujayraga qisqa kuchli elektr toki impulsining ta'siri bo'lib, tashqi membranada yoki hujayra devorida kovakchalar hosil qiladi, bir qancha vaqtdan so'ng DNK hujayradan chiqishi mumkin. Bir qancha eukariot organizmlarda retsiyent hujayraga DNKni yetkazib berish uchun viruslardan foydalaniladi.

5-bobga doir nazorat savollari:

1. Rekombinant oqsillar olish tibbiyotda qanday muammolarni hal qilishga yordam beradi?
2. Eukariot organizmlarning vektor konstruksiyasi qanday qismlardan iborat?
3. Transformatsiya bosqichlarini tushuntiring.

6-BOB. SACCHAROMYCES CEREVISIAE TIZIMINING EKSPRESSIYASI

Ekspressiya qilish uchun oddiy *Saccharomyces cerevisiae* eukariot organizm klonlangan geni ishlatiladi. Bunga bir qancha sabablar bor. Birinchidan, bu bir hujayrali organizm, genetik va fiziologik jihatdan o'rganilib chiqilgan, laboratoriyalardagi kolbalarida va bioreaktorlardan ham olish mumkin.

Ikkinchidan, bu achitqiga xos bo'lgan bir qancha kuchli promotorlar ajratilgan va tavsiflangan.

Uchinchidan, *Saccharomyces cerevisiae* hujayrasining katta qismi posttranslatsiya qilish bilan modifikatsiyalangan.

To'rtinchidan, uncha kam bo'lmagan achitqi oqsillari xususiy muhitda sekretsiyalanadi; agar geterolitik oqsil hujayradan sekretsiya qilinsa, uning tarkibini tozlash keyinchalik qiyin bo'lmaydi.

Beshinchidan, qancha yillardan beri achitqi non va pivo ishlab chiqarishda ishlatiladi. Oziq-ovqat sifati Ishki ishlar bo'limining nazorati ostida bo'lib, tibbiyot va kosmetologlar vositasi faollashtirilgan (AQSH) *S.cerevisiae* ro'yxatidan «organizm uchun zararsiz» (GRAS, generally recognized as safe) deb topilgan. Ko'pchilik oqsillar *S.cerevisiae* dan sintezlangan, diagnostika uchun ham allaqachon sifatli vaksinalar va farmatsevtik preparatlar yaratilgan.

Vaksina:

B hepatiti virusining antigeni

Plazmodiya oqsili

HIV-1 oqsili

Diagnostika:

C hepatiti virusining oqsili

Antigen HIV-1

Dorivor moddalar:

Epidermisning o'sishiga ta'sir qiluvchi omili

Insulin

Insulinga ta'sir qiluvchi omil

Trombotsitga ta'sir qiluvchi omil

Proinsulin

Fibroblastlarga ta'sir qiluvchi omil

Granulotsitlarga va makrofaglarga ta'sir qiluvchi omil

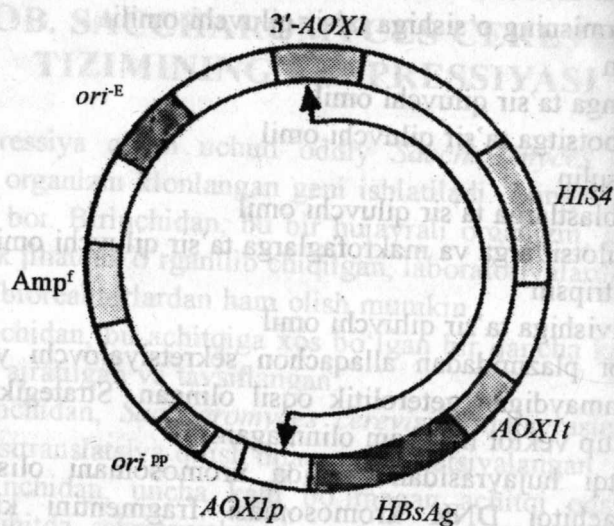
a-antitripsin

Qon ivishiga ta'sir qiluvchi omil

Vektor plazmidadan allaqachon sekretsiyalovchi yoki sekretsiyalanmaydigan geterolitik oqsil olingan. Strategik jihatdan ikkinchi tip vektor hali ham olinmagan.

Achitqi hujayrasidan alohida xromosomani olish uchun sun'iy achitqi DNK xromosomasi fragmentini klonlashga mo'ljallangan (100 t.p.n.). YS-vektor xromosomasi ketma-ketligini saqlab turishi qanchalik initsiatsiyada DNK replikatsiyasi vazifasini bajaradi, achitqi hujayrasida alohida xromosoma sifatida bo'ladi. YS-tizimi barqarordir. Uning yordamida odam DNK genomi fizik kartasi va transkripton analizi, genom bibliotekasi yaratildi va individual odam DNK xromosomasini o'z ichiga oladi. YS-vektor xromosomani eslatadi, o'zida ketma-ketlikni saqlaydi, DNK replikatsiyasi initsiatsiyasi singari funksiyani bajaradi, achitqi xromosomasi sentromeri va ketma-ketligidan iborat, oxirida ikkala DNK linearizatsiyasi olingan va amaldagi telomerazaga o'xshash bo'lib, xromosomaning barqarorligini ta'minlaydi. Boshqa begona DNKni joylashtirganda YS achitqining marker genini ushlab qoladi. Natijada mahsulot bu genni hosil qilmaydi va hujayrada maxsus muhitda rangli reaksiyani hosil qiladi.

***S.cerevisiae* to'g'ri ekspressiyasi.** «To'g'ri ekspressiya» termini vektor sistemasi uchun qabul qilingan, xo'jayin hujayra sitoplazmasida oqsil sintezlanishidan foydalaniladi.



15-rasm. YS-klonlangan sistemasi.

YS-plazmada (pYS) *e.coli* selektiv marker genini tutadi (Amp); *e.coli* (ori) funksiyasini bajaradi; achitqi DNK segmentli; URA3, CeN, TRP1 va ARS (CeN-sentromer funksiyasini bajaradi) uchastkalarini o'z ichiga oladi, ARS-achitqida avtonom replikatsiyasini bajaradi, achitqi initsiatsiya replikatsiyalanuvchi sayti, URA3-uratsil biosintez genining bir qismi, TRP1-triptofan biosintezining bitta geni. T-achitqi xromosomasining telomer qismi, SmaI-klonlangan sayt, pYS avval SmaI ni davolaydi, BamHI va ishqoriy fosfataza, keyin uzun DNK fragmentini tikadi. 100 t.p.n. oxirgi genetik konstruktsiya DNK klonini saqlaydi va achitqi hujayrasining barqarorligini ta'minlab beradi.

Superoksid-anioni – bu aerob nafas oluvchi organizmlardagi utilizatsiya jarayonidagi mahsuloti. U odamlarda immun tizimining stimulatsiyasida qatnashib fagotsitoz javob reaksiyasini beradi va infeksiyalarga qarshi leykotsitlar tomonidan qarab yo'nalish beradi. Sitotoksik potensialda kichik moddalarni tutadi va sitoplazmadagi Cu/Zn-dismustaz superoksidi (Cu/Zn-SOD) ferment qismlarini qabul qiladi. U superoksid anioni bog'ini katalizlaydi va vodorod peroksididan vodorod ioni shakllanadi, ketma-ketlik bo'yicha katalaza yoki peroksidaza substraktlari xizmat qiladi.

Birinchiidan, DNK Cu/Zn-SOD *e.coli* ekspressiya tizimidan klonlangan holda olingan. Achitqi hujayrasi intrinollarni kesib tashlash xususiyatiga ega emas, shuning uchun maxsus spetsifik gen mahsuloti tegishli DNKga javobgar yoki ketma-ket kimyoviy sintezlanadi. Achitqi vektor odamdagi DNK Cu/Zn-SOD (16-rasm) tutadi: 1. Achitqi gen biosintezi leysinni; 2. 2 mkm plazmid segmenti achitqi DNK instatsiya replikatsiyasi signali; achitqi hujayralaridagi plazmidani replikatsiyasi; 3. Selektiv marker *e.coli* geni ampitsillini (Amp) va replikatsiya initsiatsiyasi sayti; *e.coli* da faollashadi, o'rtacha gen manipulatsiyasida amalga oshiriladi, *e.coli* hujayrasida plazmidani yaratadi; 4. Odamdagi DNK Cu/Zn-SOD, achitqi genidagi promotor geni glitserilaldegidfosfatdehidrogenaza (GAPDp) va transkripsiyada signal terminatsiyasining o'zida tutadi va poliadenil mRNK genini ham o'zida saqlaydi (GAPDt).

Promotor (GAPDp) va poliadenil (GAPDt) signal terminatsiyasi geni glitserilaldegid *S.cerevisiae* DNK Cu/Zn-SOD odamda. LeU2 gen 2 mkm plazmid, biosintezda leysin bitta genini kodlaydi. Ampitsillin (Amp) geni va replikatsiya initsiatsiya sayti *e.coli* (ori) pBR322 plazmididan klonlangan.

Antigen B hepatiti virusining sintezlanishi.

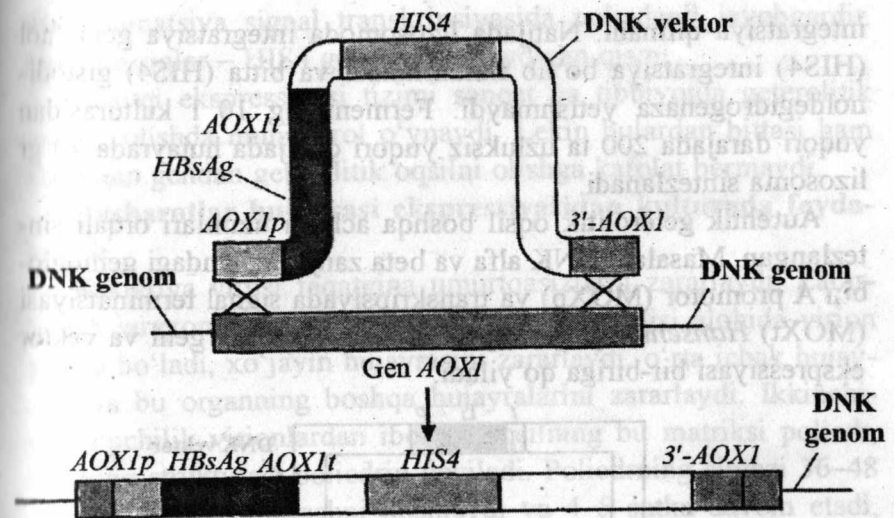
Metiltiofen achiqini *P.pastoris* katta qimmat bioreaktor sanoatida mehnatsiz olib bo'lmaydi. Geterolitik oqsillar xo'jayin organizmidan faol mahsulotlardan olinadi. Oldin HBsAg genidan alkogoloksidaza 1 (AOX1) promotor qo'yiladi va terminatsiya-poliadenil (AOX1t) signali ham gen. AOX1 *P.pastoris* genining faolligini metanol yordamida tartibga solinadi.

Promotor (AOX1p) va poliadenil (AOX1t) terminatsiya signali alkogoloksidaza geni. 1. *P.pastoris* HBsAg.HIS4-gen, gistidinning biosintezini kodlovchi ferment gistidinoldegidrogenaza *P.pastoris* (ori) initsiatsiya replikasiyasini tutuvchi vektor, chidamli ampitsillin (Amp) geni va initsiatsiya replikasiya sayti, faol *e.coli* (ori). 3-AOX1 – bu fragment 3-alkogoloksidaza fermentining oxirgi ketma-ketlikdagi 1 *P.pastoris* genini integratsiyalovchi segment ko'rsatilgan.

U hujayradagi barcha 30 % oqsilni alkogoloksidaza yordamida olib keladi, alkogoloksidaza metanolni umuman sintezlamaydi.

Vektor keyingi elementlar konstruksiyalash orqali o'rganiladi:

1. AOX1p-HBsAg-AOX1t.
2. *P.pastoris* funksiyasini initsiatsiyalovchi replikasiyalovchi sayti.
3. DNK fragmenti, initsiatsiya replikasiya saytini tutuvchi pBR322 plazmidi va *e.coli* selektiv sayti.
4. 3-AOX1 fragmenti, DNK klonlash jarayonida xromosoma saytini aniqlash.
5. Gistidinoldegidrogenaza (HIS4) faol geni, kodlovchi ferment, gistidin aminokislotasini sintez qilishda qatnashadi.



18-rasm. Alkogoloksidaza vektor genining integratsiyalanishi.

1 *P.pastoris*. Ikkilamchi crossingover natijasida AOX1 geni va AOX1p uchastkasi va 3-AOX1 DNK genomida vektor integratsiyasi bo'ladi va alkogoloksidaza 1 (AOX1) geni xo'jayin xromosomasida katta qismini egallaydi. HIS4 gen mahsulotining gistidinsiz muhitda o'sish imkonini beradi. AOX1p metanoli transkripsiya jarayonida HBsAg genini faollashtiradi, AOX1t transkripton terminatsiyasini ta'minlaydi va poliadenillaydi.

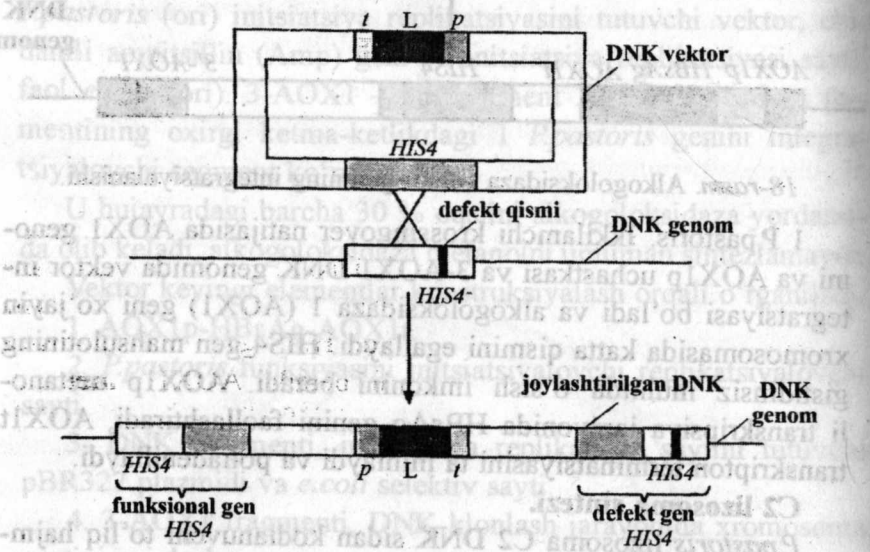
C2 lizosoma sintezi.

P.pastoris lizosoma C2 DNK sidan kodlanuvchi to'liq hajmli oqsil va asosiy peptid bog'larini, geterolitik oqsilni sekretsiyalaydi. Lizosoma – bu oshqozon fermenti, bakteriya hujayralari devorlarini eritadi; proteaza bilan pH diapazonida faolligini saqlaydi.

Vektor quyidagilar uchun yaratilgan: AOX1p-HBsAg-AOX1 t identifikatsiyasi bo'ladi, HBsAg bilan birgalikda kodlaydi. Barcha HIS4 plazmidi genining nusxasi *P.pastoris* xromosomasidan

integratsiya qilinadi. Natijada lizosomoda integratsiya geni faol (HIS4) integratsiya bo'lib flankirlanadi va bitta (HIS4) gistodinoldegidrogenaza yetishmaydi. Fermentning 10 l kulturasidan yuqori darajada 200 ta uzluksiz yuqori darajada hujayrada 20 gr lizosoma sintezlanadi.

Autentik geterolitik oqsil boshqa achitqi tizimlari orqali sintezlangan. Masalan, DNK alfa va beta zanjiri odamdagi gemoglobin A promotor (MOXp) va transkripsiyada signal terminatsiyasi (MOXt) *Hansenula polymorpha* metanoloksidaza geni va vektor ekspressiyasi bir-biriga qo'yiladi.



19-rasm. HIS4 *P.pastoris* xromosoma genning plazmid integratsiya ekspressiyasi vektori kamchiligi.

Krossingover natijasida HIS4 plazmid genomi va HIS4 genomi xo'jayin hujayrasida barcha plazmid genlarining integratsiyalanishi bo'ladi, flankirlash jarayonini ko'rsatadi va HIS4.p L geni yetishmovchiligi va t-promotor AOX1, DNK dagi C2 lizosomasi

va terminatsiya signal transkripsiyasida poliadenil javobgardir. Qora chiziqlar – HIS4 geni yetishmaydigan qismi.

Achitqi ekspressiyasi tizimi sanoat va tibbiyotda geterolitik oqsilni olishda muhim rol o'ynaydi. Lekin bulardan bittasi ham xohlagan gendan geterolitik oqsilni olishga kafolat bermaydi.

Hasharotlar hujayrasi ekspressiyasidan kulturada foydalanish.

Bakteriya virusi faqatgina umurtqasizlarni zararlaydi. Zararlanish jarayonining ikki xil shakli bor. Birinchisi alohida virion paydo bo'ladi, xo'jayin hujayrasini zararlaydi, o'rta ichak hujayrasi va bu organning boshqa hujayralarini zararlaydi. Ikkinchisi ko'pchilik virionlardan iborat. Oqsilning bu matriksi poliedr, o'zining strukturasi poliedrin deyiladi. Poliedrning sintezi 36–48 soatdan keyin zararlashni boshlaydi va 4–5 sutka davom etadi, zararlangan hujayra lizislanmaydi va xo'jayin organizmi halok bo'lmaydi.

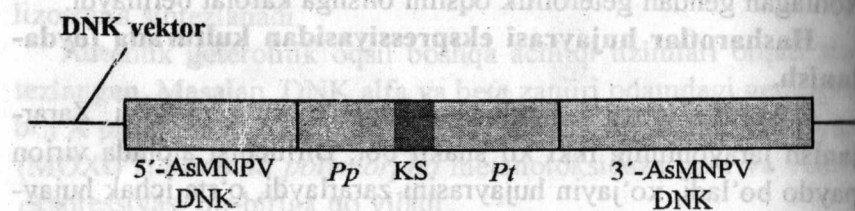
Poliedr promotor geni juda ham kuchli, virus oldingi genga bog'liq emas.

A.sal (AsMNPV) poliedroza ko'pchilik atom viruslarida foydalaniladi. Bu bakteriya virus boshqa turdagi 30 mingdan ortiq hasharotlarni zararlaydi, ko'pchilik hujayralar liniyasi kulturada yaxshi o'sadi. Hujayra liniyasi AsMNPV rekombinatsiyasi uchun ishlaydi, *Spodoptera frugiperda* kapalak qurtidan olinadi. Promotor geni bunday hujayralarda juda ham faoldir va bakteriya virusning yovvoyi turi bilan zararlanishi ko'pchilik oqsillarni sintezlaydi.

Bakteriya virusidagi asosiy ekspressiyalanuvchi viruslar.

Rekombinant bakteriya virus AsMNPV konstruksiyasining birinchi bosqichi yaratilgan transport vektoridan iborat. Transport vektor *e.coli* plazmidining hosili, o'zida AsMNPV DNK fragmentini tutadi (20-rasm), buning uchun quyadilar qo'shiladi:
1. Promotor zonalari va AsMNPV DNK ga birin-ketin kirib bo-

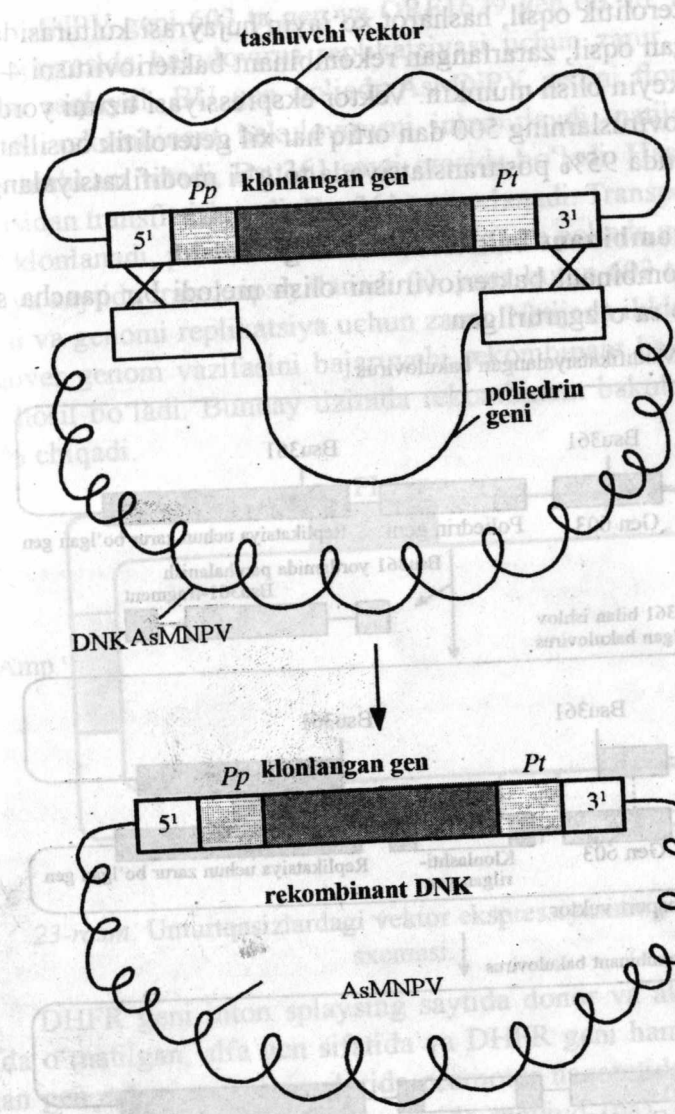
rishi. 2. Klondash uchun sayt. 3. Terminatsiya sayti – poliedrin poliadenillangan gen va ikkinchi zonadan AsMNPV DNK birin-ketin kelishi.



20-rasm. Bakteriya virusi (AsMNPV) asosidagi vektor transport ekspressiyasining sxemasi.

Oqsil geni – biriktiruvchi vazifasini bajaruvchi klondangan sayt (KS) poliedrin promotori (Pp) geni va transkripsiyada saytning terminatsiyasi (Pt). Promotordan oldin va terminatsiyadan keyingi sayt transkripsiyada DNK AsMNPV (5-AsMNPV DNK va 3-DNK AsMNPV javobgar) fragmenti oʻrnatilgan, hasharotlar hujayrasidagi DNK AsMNPV gomologik rekombinatsiyasi.

Hasharot hujayrasi kulturasi, transfitsirlangan AsMNPV DNKsi, keyin transport vektorini transfitsirlaydi, klondangan geni tutib turadi. Koʻpincha ikki marta transfitsirlangan hujayralarda ikkita crossingover boʻladi, natijada klondangan gen bilan birgalikda promotor va AsMNPV DNKsi poliedr geni transkripsiyalangan signal terminatsiyasiga oʻrnatiladi. Virionlar bu genni tutmaydi, hujayra lizidan hosil boʻlgan, ularni rekombinant bakterioviruslardan olish mumkin.

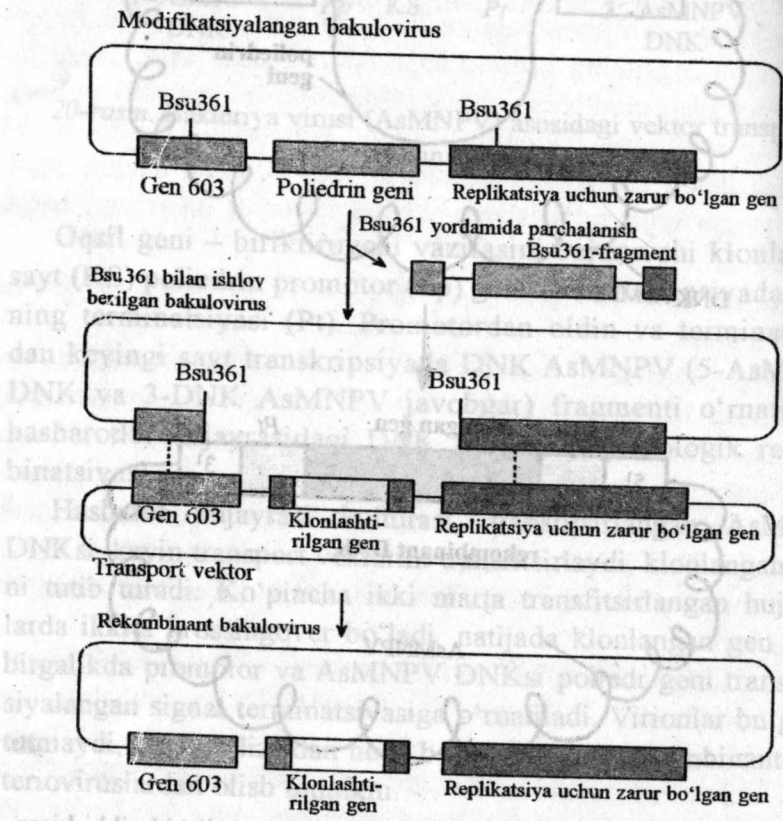


21-rasm. AsMNPV poliedr genini oʻzgartirish natijasida ikki hissa crossingover 5-3-fragmentlarining vektor transport ekspressiyasi.

Geterolitik oqsil, hasharot xo'jayin hujayrasi kulturasidan sintezlangan oqsil, zararlangan rekombinant bakteriovirusni 4-5 sutkadan keyin olish mumkin. Vektor ekspressiyasi tizimi yordamida bakterioviruslarning 500 dan ortiq har xil geterolitik oqsillari olingan, bunda 95% posttranslatsiyada to'g'ri modifikatsiyalangan.

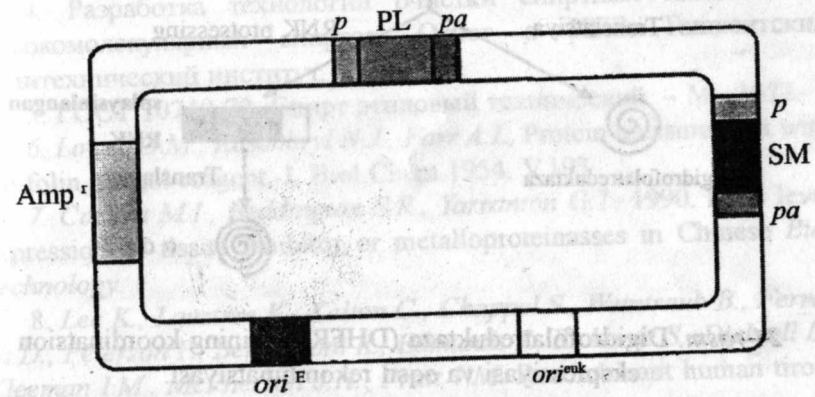
Rekombinant bakteriovirusning olinishi.

Rekombinant bakteriovirusni olish metodi bir qancha sabablarga ko'ra o'zgartirilgan.



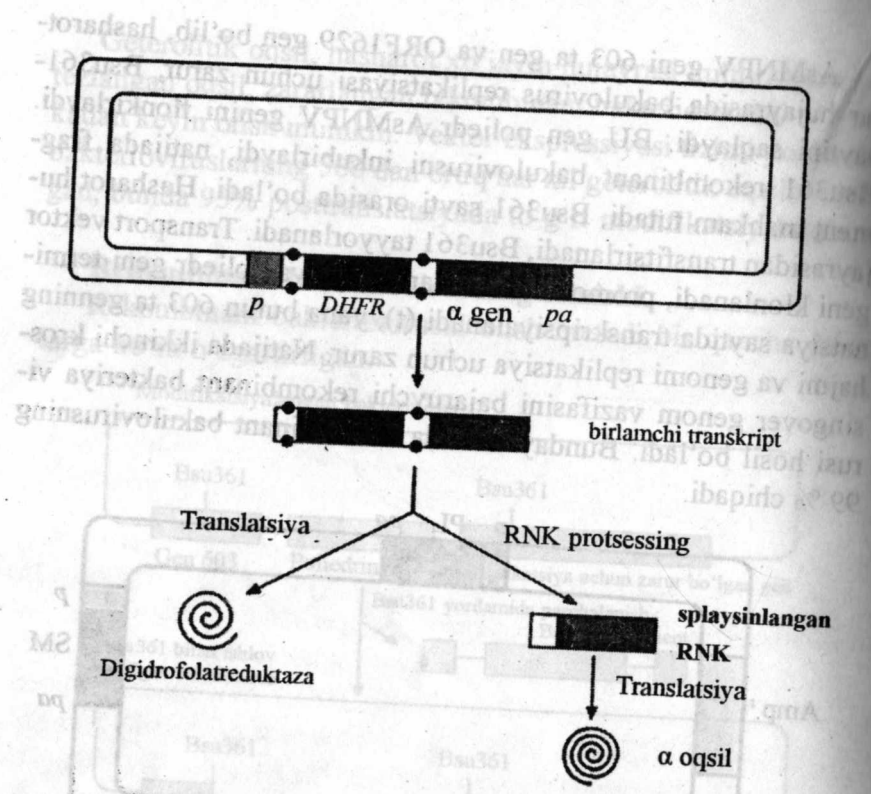
22-rasm. Rekombinant bakulovirusning olinishi.

AsMNPV geni 603 ta gen va ORF1629 gen bo'lib, hasharotlar hujayrasida bakulovirus replikasiyasi uchun zarur, Bsu361-saytini saqlaydi. BU gen poliedr AsMNPV genini flonkirlaydi. Bsu361 rekombinant bakulovirusni inkubiraydi, natijada fragment mahkam tutadi, Bsu361 sayti orasida bo'ladi. Hasharot hujayrasidan transfitsirlanadi, Bsu361 tayyorlanadi. Transport vektor geni klonlanadi, promotor flankirlanadi (p) va poliedr geni terminatsiya saytida transkripsiyalanadi (t), yana butun 603 ta genning hajmi va genomi replikasiya uchun zarur. Natijada ikkinchi krossingover genom vazifasini bajaruvchi rekombinant bakteriya virusi hosil bo'ladi. Bunday tizimda rekombinant bakulovirusning 99 % chiqadi.



23-rasm. Umurtqasizlardagi vektor ekspressiyasining umumiy sxemasi.

DHFR geni inton splaysing saytida donor va akseptor sifatida o'rnatilgan, alfa gen sifatida va DHFR geni hamda klonlangan gen eukariot organizmlarida promotor nazoratida bo'ladi (p) va poliadenil umumiy signal sifatida mavjud (pa). transkriptida splaysinglanmagan DHFR translatsiyalaydi, geterolitik oqsil-tajriba transkriptonida protsessinglanadi.



24-rasm. Digidrofolatreduktaza (DHFR) genining koordinatsion ekspressiyasi va oqsil rekombinatsiyasi.

6-bobga doir nazorat savollari:

1. Ekspressiya qilish uchun ishlatiladigan *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmining sabablari nimalardan iborat?
2. *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmidan qanday sifatli vaksinalar va farmatsevtik preparatlar yaratilgan?
3. Rekombinant bakteriya virusini olishning qanday usullari mavjud?
4. Umurtqasizlardagi vektor ekspressiyasini tushuntiring.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR

1. Мирзарахметова Д.Т., Абдуразакова С.Х., Ахмедова З.Р., Буриханов Ш.С. Субстратная специфичность инвертазы. Химия природных соединений, 2000, №1.
2. Афанасьева Г.А., Щербукин В.Д. Модификация ферроцианидного варианта глюкоксидазного метода определения глюкозы. Прикладная биохимия и микробиология. 1975. Вып. 3.
3. Скоупс Р.К. Методы очистки белков. – М.: МИР, 1985.
4. Разработка технологии очистки спиртных напитков от высокомолекулярных спиртов. Отчет о НИР. Ташкентский политехнический институт. – Т., 1978.
5. ГОСТ 10749-72. Спирт этиловый технический. – М., 1972.
6. Lowry O.M., Rosenbryl N.J., Farr A.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol.Chem.1954. V.193.
7. Cockett M.I., Beddington S.R., Yarranton G.T.:1990. High level expression of tissue inhibitor or metalloproteinases in Chinese *Bio/Technology*.
8. Lee K., Lauziere K., Kelton C., Chappel S., Weintraub B., Ferrara D., Peterson P., Bernasconi R., Edmunds T., Richards S., Dickrell L., Kleeman I.M., McPherson J.H., Pratt V.M. Recombinant human tiroid stimulating hormone/ *Bio/Technology* 11: 1993.
9. Cregg J.M., Tschopp J.F., Stillman C., Siegel R., Akong M., Craig W.S., Buckholz R.G., Madden K.R., Kellaris P.A., Davis G.R., Smiley L., Cruze J., Torregrossa R., Velicelebi G., Thill P. High level expression and efficient assembly of hepapitus, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5: 1987.
10. Davies A.H. 1994. Sorrent methods for manipulating baculovirus/ *Bio/Texnolog* 12.
11. Rolton A.E., Muntez W.M. The use of antisera covalent coupled to agarose, cellulose and sephocles in radioimmunoassay system for proteins and haptens // *Bioch. Biophysic Acta*. – 1973. – v. 162.

12. Gracher M.A., Dovrikow M.J., Knorre V.D. A new system for ATP-metric immunoanalysis // FEBS Lett. - 1983. -V.162.
13. Оксененко О.И. Закономерности удерживания цефалоспориновых антибиотиков в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращёнными фазами. Автореферат канд. хим. наук. - Курск, 1999.
14. Препараты ферментные./ Методы определения амилолитической активности. - М., 1975.
15. Gosling J.P. (1990). A decade of development in immunoassay methodology. Clin. Chem. 36.
16. Haga M., Hoshino S., Okada H., Hazemoto N., Kato Y., Suzuki Y. An improved chemiluminescence-based liposome immunoassay involving apoenzyme.// Chem Pharm. Bull.- 2010.- V.38.
17. Haga M., Itagaki H., Sugawara S., Okano T. Liposome immunosensor for theophylline.// Biochem. Biophys Res. Comm.- 1980.- V.95.
18. Haga, M., Hoshino, S., Okada, H., Hazemoto, N., Kato, M. Y., and Suzuki, Y. (1990) An improved chemiluminescence-based liposome immunoassay involving apoenzyme. Chem. Pharmacol. Bull. 38(1).
19. Kubotsu K., Goto S., Fujita M. et al. Automated homogeneous liposome immunoassay systems for anticonulsant drugs.// Clin. Chem.-1992.-V.38.
20. Kubotsu K., Goto S., Fujita M., Tsuchiya H., Kiada M., Takano S., Matsuura S., Sakurabayashi I. Automated homogeneous liposome immunoassay systems for anticonulsant drugs.// Clin. Chem.-1992.- V.38.
21. Kung V.T., Canova-Danvis E. Liposome immunoassay reagent and method.// Пат. 4622294 США, - N 699860; Заявл.8.02.85; Оpubл. 11.11.86; НКИ 435/7
22. Мешандин А.Г., Шмакова С.В. Хемосорбция в синтезе твердофазных биополимеров для гетерогенного иммуноферментного анализа.//Биотехнология . -1994, N 4.

MUNDARIJA	
KIRISH	3
1-BOB. FERMENTLAR	5
1.1. Fermentlar va ularning xossalari	5
1.2. Fermentlarni ajratish, tozalash texnologiyalari.....	10
1.3. Ionalmashuv xromatografiya usuli.....	13
1.4. Affinli (biospetsifik) xromatografiya usuli	14
1.5. Gel xromatografiya usuli	16
1.6. Biologik faol moddalarni organik erituvchilar yordamida cho'ktirish	18
1.7. Enzimlarni barqarorlashda ishlatiladigan tashuvchilar.....	20
1.8. Fermentlarni fizikaviy usulda immobillash	23
1.9. Adsorbsion immobilizatsiya qilish usullari	27
1.10. Fermentlar adsorbsiyasiga ta'sir etuvchi omillar.....	28
1.11. Fermentning tashuvchi bilan bog'lanish kuchini oshiruvchi usullar	31
1.12. Modifikatsiya qilingan fermentlarni immobilizatsiya qilish	32
1.13. Fermentlarni gel ichiga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilish.....	34
1.14. Faol moddalarni yarimo'tkazgich membranalar va mikrokapsullash asosida immobilizatsiya qilish.....	35
1.15. Fermentlarni emulgirash asosida immobillash	37
1.16. Fermentlarni kimyoviy immobillash	37
2-BOB. SELLULOLITIK FERMENTLAR.....	48
2.1. Sellulolitik fermentlar, ularning funksiyalari va xususiyatlari....	48
2.2. Sellulozali chiqindilar gidrolizi	52
2.3. Kristall fruktoza olish texnologiyasi.....	54
2.4. Kristall glukoza olish texnologiyasi	57
2.5. Glukoza-fruktozali sirop olish	60
2.6. L va D aminokislotalar olish texnologiyasi.....	63
2.7. Enzimatik sintez	68

2.8. Mikrobiologik sintez	69
2.9. Lizin olish texnologiyasi	72
2.10. L-lizinning enzimatik sintezi va qo'llanilishi	77
3-BOB. FERMENTLARNING ANALITIK KIMYODA	
QO'LLANILISHI	79
3.1. Test-sistemalarda, mikroanalizda va biologik qurilmalarda fermentlarning qo'llanilishi	82
3.2. Fermentli biosensorlar	83
3.3. Hujayrali biosensorlar	85
4-BOB. BIOCHIPLARNING O'RNINI VA AHAMIYATI	94
5-BOB. EUKARIOT ORGANIZMLAR ASOSIDA	
REKOMBINANT OQSIL OLISH	96
6-BOB. SACCHAROMYCES CEREVISIAE TIZIMINING	
EKSPRESSIYASI	100
Foydalanilgan adabiyotlar	115

O'quv qo'llanma

**Tashmuxamedova Shoxista Sabirovna,
Jabborov Baxrom**

AMALIY ENZIMOLOGIYA

Muharrir T. Mirzayev
Rassom D. Mulla-Axunov
Texnik muharrir R. Axmedov
Musahhih S. Saydamirova
Kompyuterda tayyorlovchi S. Azizto'yeva

2.8. Mikrobiologik sintez
 2.9. Lizin olish texnologiyasi
 2.10. L-lizinning enzimatik sintezi va qo'llanilishi
 3-BOB. FERMENTLARNING ANALITIK KIMYODA
 QO'LLANILISHI
 3.1. Test-sistemalarda, mikroanalizda va biologik qurilmalarda
 fermentlarning qo'llanilishi
 3.2. Fermentli biosenzorlar
 3.3. Hujayrali biosenzorlar
 4-BOB. BIOCHIPLARNING QO'LLANILISHI
 5-BOB. EUKARIOT ORGANIZMLAR ASOSIDA
 REKOMBINANT OQSIL OLIISH
 6-BOB. SACCHAROMYCES OSMOTICUSNING
 EKSPRESSIYASI
 Foydalanilgan adabiyotlar

Kompyuterdagi tayyorlovchi S. Azizov
 Maslahat S. Saydaminova
 Texnik muharrir R. Azimov
 Rassom D. Milla-Axmedov
 Muharrir T. Muzayev

Nashriyot litsenziyasi AA № 0049, 18.03.2020-y.

Bosishga ruxsat etildi 21.12.2020. Bichimi 60x84¹/₁₆.
 Bosma tabog'i 7,5. Shartli bosma tabog'i 6,98.
 «Times New Roman» garniturasida.
 Ofset qog'ozida bosildi. Adadi 100 nusxa.
 Buyurtma raqami № 25.

«Donishmand ziyosi» MCHJ, Toshkent sh., Navoiy ko'chasi, 30.
 Tel: +998-71-244-40-91, 99-808-19-49

«Kamalak-PRESS» MCHJ bosmaxonasida chop etildi.
 Manzil: Toshkent sh., Navoiy ko'chasi, 30-uy.

«DONISHMAND ZIYOSI»

ISBN 978-9943-6865-5-7



9 789943 686557