

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА
МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ**

**ФЕРМЕНТЛАР
ВА
ҲУЖАЙРА ИНЖЕНЕРЛИГИ**

фанидан маъруза матнлари

ТОШКЕНТ - 2013 й.

Тузувчилар:

Н.А.Хўжамшукуров – “Биотехнология” кафедраси мудири, б.ф.н., доцент.

Р.М.Артикова - “Биотехнология” кафедраси доценти, б.ф.н.

М.С. Тошимухаммедов – “Биотехнология” кафедраси профессори, к.ф.д.

Аннотация. Мазкур маърузалар матни 5320500-биотехнология (тармоқлар бўйича) йўналиши бўйича бакалаврлар тайёрлаш ўқув режасига кўра “Ферментлар ва хужайра инженерлиги” фани бўйича тузилган намунавий дастур асосида тайёрланган. Ушбу услубий қўлланма 5320500-биотехнология (тармоқлар бўйича) йўналиши бўйича таҳсил олаётган бакалавриатура талабалари учун мўлжалланган.

Тақризчилар:

Зухритдинова Нигора	биология фанлари номзоди, катта илмий ходим. ЎзР ФА
Йўлдошевна	Микробиология институти катта илмий ходими
	техника фанлари номзоди, доцент. Тошкент кимё-технология
Зокирова Муяссар	институти, “Озиқ-овқат маҳсулотлари технологияси” кафедраси
	доценти

Ушбу маърузалар матни ТКТИ, “Озиқ-овқат маҳсулотлари технологияси” факультети, “Биотехнология” кафедраси йиғилишида муҳокама қилинган ва факультет Илмий-услубий Кенгашига муҳокама учун тавсия этилган. Баённома №23, 12-январь 2013 й.

Кафедра мудири, доцент

Н.А.ХЎЖАМШУКУРОВ

Ушбу маърузалар матни ТКТИ, “Озиқ-овқат маҳсулотлари технологияси” факультети, Илмий-услубий Кенгашида кўриб чиқилган ва Институт ўқув услубий кенгашига муҳокама учун тавсия этилган. Баённома №4, 1-февраль 2013 й.

**Факультет Илмий - услубий Кенгаши раиси,
доцент**

О.Қ.ЮНУСОВ

Ушбу маърузалар матни Тошкент кимё технология институти, Ўқув-услубий Кенгашида кўриб чиқилган ва чоп этишга тавсия этилган. Баённома №____, ____-февраль 2013 й.

**Институт Ўқув-услубий кенгаши раиси,
доцент**

Ш.А.МУТАЛОВ

1-ҚИСМ. ФЕРМЕНТЛАР ИНЖЕНЕРЛИГИ

1-мавзу. Ферментлар ва уларнинг халқ хўжалигидаги аҳамияти

Режа:

1. Ферментлар (энзимлар) ҳақида тушунча;
2. Ферментлар классификацияси;
3. Гликозидаза ва пектиназалар;
4. Протеиназа ва амилазалар
5. Ферментларнинг халқ хўжалигидаги аҳамияти.

Ферментлар (энзимлар) - хилма-хил биокимёвий ва кимёвий реакцияларни амалга оширувчи оксил табиатига эга бўлган биокатализаторлардир.

Ферментлардан биологик катализатор сифатида одамлар, турли хил соҳадаги амалий фаолиятларида кенг фойдаланиб келишмоқда. Ферментлар манбаи ҳайвон тўқималари, ўсимликлар хужайралари ва микроорганизмлар бўлиши мумкин. ҳозирги замонда икки мингдан ортиқ ферментлар борлиги аниқланган, улардан бир неча юзтаси алоҳида модда сифатида тоза ҳолда ажратиб олинган.

Микроорганизмлар ферментлар ишлаб чиқарувчи манба сифатида алоҳида қизиқиш уйғотади, чунки улар арзон муҳитда тез ўсадилар. Ишлатиладиган озуқа таркибига қараб, керакли ферментни, хоҳлаганча тайёрлаш имкониятини берадилар. Бунинг устига кўпгина микроорганизмлар ферментларни ўз хужайра қобиқларидан ташқарига чиқарадилар, бу эса микроорганизмлардан янада фаолроқ фойдаланиш имкониятини яратади.

Метаболизмнинг катта интенсивлигидан ташқари микроорганизмлар биомассасини ўсиш тезлиги жуда каттадир. Бу қисқа вақт орлиқида айрим вақтлари 24-72 соат ичида фермент ажратиш учун жуда катта миқдорда ҳам-ашё олиш мумкин, уни ҳайвон ва ўсимлик хом ашёлари билан солиштириб бўлмайди.

Кўплаб микроорганизмларнинг муҳим хусусиятларидан яна бири улар озуқа сифатида ҳар хил чиқиндилардан фойдаланиб ўсиш қобилиятига эгадирлар (целлюлоза, нефт углеводородлари, метан, метанол ва бошқалар). Микроорганизмлар фойдалана оладиган айрим хом-ашёлар одам ва ҳайвонлар учун заҳарлидир. Шундай экан микроорганизмлар ферментлар синтез қилиш билан бир қаторда, атроф-муҳит муҳофазаси учун ҳам хизмат қиладилар.

Айрим ферментларнинг синтезланиш миқдори микроорганизмлар хужайрасида жуда юқори бўлиши мумкин. Масалан: рибулезобисфосфаткарбоксилазанинг миқдори айрим вақтларда фототроф бактериялар синтез қиладиган сувда эрийдиган оксилнинг 40-60% ни ташкил этади.

Юқорида таъкидланганидек кўп микроорганизмлар катта миқдорда культурал муҳитга чиқадиган ферментлар ҳосил қиладилар. Бу ферментлар асосан оксил, крахмал, целлюлоза, ёғларни ва бошқа сувда эримайдиган моддаларни парчалайдиган гидролазаларга таълуқлидир. Бир қанча ферментлар фақат микроорганизмлардагина учрайди. Молекула ҳолидаги азотдан аммиак ҳосил қилишда иштирок этадиган нитрогеназа ферменти азотни ўзлаштириш қобилиятига эга бўлган бактериялардагина учраши аниқланган.

Айрим бактерияларнинг ҳарактерли хусусиятларидан яна бири уларнинг аорганик субстратларни: аммиакни, нитритларни, сульфид ва олтингугуртни бошқа бирикмаларини, ва шунга ўхшаш икки валентли темирни оксидаш қобилиятидир. Бундай жараёнларни амалга ошиши микроорганизмларда алоҳида ферментларнинг мавжудлиги билан боғлиқдир. Бир қанча бактериялар ва сув ўтлари молекула ҳолидаги водород ҳосил қилиши ҳамда оксидланиш-қайтарилиш реакцияларини олиб боровчи дегидрогеназа ферментлари сақлаши аниқланган.

Кўпчилик бактериялар уларга метан, метанол, метилланган аминларни, углерод оксидини ва бошқа бир хил углеродли бирикмалардан субстрат сифатида фойдаланиб, ўсиш ва ривожланишга ёрдам берадиган ферментларни синтезлаш қобилиятига эга. Атроф муҳитни, уни ифлослантирувчи

бир қанча моддалардан тозалаш микроорганизмлар ишлаб чиқарадиган ферментлар ҳисобига амалга оширилади, улар пластмасса, пестицидларни ва бошқа захарли мураккаб бирикмаларни оддий таркибий қисмга парчалаб юборадилар.

Ферментлар классификацияси. қабул қилинган классификация тизимига биноан ҳамма ферментлар олти синфга бўлинади:

Оксидоредуктазалар;
Трансферазалар;
Гидролазалар;
Лиазалар;
Изомеразалар;
Лигазалар (синтетазалар).

Кенг миқдорда қўлланиладиган микроорганизмлар ферменти - гидролазалар синфига кирувчилардир (гликозидазалар, пептидазалар ва бошқалар).

Булар гликозид, пептид, эфир ва айрим бошқа боғларга сув иштирокида таъсир қилади. Гидролазалар кўпинча хужайра ташқарисидagi (экзоген) ферментлардир. хужайрадан чикиб, улар культурал муҳитда тўпланади. Бу ферментларни олиш хужайра ичидаги (эндоген) ферментларни ажратишга нисбатан қулай ва арзондир.

Гликозидазалар. *Гликозидазалар* -гликозид боғларини гидролиз қилувчи ферментлардир. Булар кўп вақтлардан бери ўрганилади ва ишлатилади. Бу гуруҳга крахмални гидролиз қилувчи амилаolitik ферментлар, β -амилазалар ва гликоамилазалар киради. Кўп микроорганизмлар α -амилаза ҳосил қилади, β -амилаза синтези эса кам кузатилади.

Амалий мақсадларда қўлланиладиган α -амилазани ажратувчи *Bacillus licheniformis*, *Bac.amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae* ва бошқа микроорганизмлардир. α -амилаза *Bac. licheniformis* дан олинадиган жуда юқори ҳароратга чидамли ва крахмални 100⁰С атрофидаги ҳароратда гидролиз қилиш қобилиятига эгадир. Микроорганизмларнинг экстремал шароитда тараккий қилиш қобилиятини, яъни паст ва юқори ҳароратда, молекуляр кислород мавжуд бўлмаганда, ишқорли ва кислотали муҳитда, тўзни юқори концентрациясида ўсиши кўпинча уларнинг ферментлари характери билан аниқланади.

Шундай қилиб, хулоса қилиб шуни айтиш мумкинки, микроорганизмларда жуда юқори фаол ферментатив реакция олиб бориш қобилияти мавжуд, микроорганизмлар, бошқа йўллар билан амалга ошириб бўлмайдиган жуда кўп жараёнларни ўзларининг махсус ферментлари туфайли амалга ошириш имкониятига эгалар.

Макро- ва микроорганизмларда бир хил функцияли ферментлар, ўзларининг хосса ва хусусиятлари жиҳатидан ҳар хил бўлиши мумкин ва микроорганизмларда ўзини фаоллигини юзага чиқариши учун алоҳида шароитга муҳтож бўлади. Шунинг учун турли хил микроорганизмлар ферментларини ўрганиш жуда муҳим вазифадир.

Глюкоамилаза - (1,4- α -D-глюкан-глюканогидролаза) асосан замбуруғларда кенг ўрганилган. *Asp.niger* замбуруғида у молекуляр массаси 100 000 дальтон атрофида бўлган иккита гликопротеинлардан иборат. Демак, бу ферментни хусусиятлари бир-биридан фарқ қиладиган иккита формаси (шакли) мавжуд.

Декстраназа - (1,6- α -D-глюкан-глюканогидролаза) декстриндаги 1,6-гликозид боғига таъсир қилади.

Лактоза ёки β -галактозидаза (β -D-галактозид-галактогидролазалар) лактозани глюкоза ва галактозага айлантиради. Бу фермент *E.Coli*, *Asp.niger*, *Sacch.cerevisiae*, *Curvularia inaequalis*, *Alternaria tenuis* ва айрим бошқа микроорганизмларда синтез бўлади.

Инвертаза - (β -D-фруктофуранозид-фруктогидролаза) саҳарозани глюкозага ва фруктозага парчалайди. Уни *Aspergillus* туркуми вакиллари (*Asp.awamori*, *Asp.batatae*, *Asp.niger*), ачитки замбурғи, *Bacillus subtilis* ва *Bac.diastaticus* ларнинг алоҳида штаммлари ҳосил қилади.

Целлюлолитик ферментлар (целлюлазалар) - фаол оқсилларнинг мураккаб комплекси, целлюлоза молекуласининг ҳар хил боғларига таъсир қилади, С компонент (экзонуклеаза) табиий ҳолдаги целлюлозага (пахта, филтр қогози) таъсир қилади. С_x -компоненти (эндонуклеаза)

эрийдиган шаклга ўтказилган клетчаткани (карбосиметилцеллюлозани) гидролизлайди.

Целлюлоза билан бир қаторда микроорганизмлар целлобиаза (β -глюкозидаза) ҳосил қилади, бу фермент целлюлозани ва гемицеллюлозани парчалайди. Целлюлозани гидролизининг охириги босқичи, глюкоза ҳосил бўлиши билан тугалланади.

Саноатда ишлаб чиқариладиган целлюлотик фермент препаратлари одатда C_1 ва C_x ва шунга ўхшаш целлобиаза ва гемицеллюлаза ферментлари бўлиб, бу препаратларнинг рН кўрсаткичи 3,0 дан 8,0 гача. Мана шу рН лар оралиғида улар турғундирлар. Целлюлазани ҳосил қилувчилар кўпинча мицеллиали замбуруғлардир, шулардан *Penicillium notatum*, *P.vuriabili*, *P.iriense*, *Trichoderma roseum*, *Verticillium alboatrum* ва бошқалардир.

Пектиназалар - пектинни парчаловчи ферментлар синтез қилади. Пектолитик ферментлар комплекс ҳосил қилади, уни алоҳида компонентлари пектин молекуласини ҳар хил жойларидан парчалайди.

Пектиназалар (полигалактуроиназалар) микроорганизм-ларда кенг тарқалган бўлиб ўсимликларда кам учрайди.

Протеиназалар. Протеиназалар ёки протеазалар - (пептид-пептид-гидролазалар) оқсил молекуласидаги пептид боғларини узиш реакциясини катализ қилади, натижада эркин аминокислоталар ди- ва полипептидлар ҳосил қилади.

Бундай ферментлар жуда кўп. Улардан айримлари кристалл ҳолатда олинган. Микроорганизмлар протеиназаси ўзларининг хоссалари билан тубдан фарқ қилиши мумкин. Улар нейтрал бўлиши мумкин (*Bacillus subtilis*, *Asp.terricola*), кислотали (*Asp.foetidus*) ва ишқорли, яъни рН нинг ҳар хил даражасида фаолдирлар. Айрим микроорганизмлар бир қанча протеиназалар синтезлаш қобилиятига эгадирлар. Масалан: *Actinomyces fradiae* 6 та протеиназа синтезлайди.

Амилазалар - бактерия ва замбуруғлардан олинадиган амилазалар крахмални кичик молекуляр шакллар: декстринлар, глюкозалар, мальтозаларгача парчалайди.

Бактериал протеазалар пишлоқ пиширишда ва тери ошлашда оқсилларни бузишда қўлланилади. *Bacillus sp.* дан олинадиган глюкозоизомераза ферменти глюкозани фруктозага айлантиришда ёрдамлашади. Кейинги вақтларда олимлар диққат эътиборини қуйидагилар ўзига тортмоқда: циклодикстринглюкозилтрансфераза (ЦДГТ) га мослашиш, циклодекстринлар бирикмаларининг ишлаб чиқарилиш: кимёвий ва фармакологик ишлаб чиқаришда, озиқ-овқат маҳсулотлари сифатини оширишда, косметика ва бошқалар ишлаб чиқаришда зарурдир.

Липазалар - (3.1.1.3-триацил глицеролода гидролазалар липид (ёғ) алмашинувида иштирок этадиган, катта амалий қизиқиш уйғотадиган ферментлар.

Култура ўсадиган муҳитга ажратадиган липазаларни ишлаб чиқарувчиларнинг кўпи мицелиали замбуруғлардир. Улардан *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, айрим ачитки замбуруғлар (*Candida*) ва бактериялардир (*Pseudomonas*). Липазалар триацилглицеролларни парчалаб ёғ кислоталари ва глицерин ҳосил қилади. Саноат асосида кўп миқдорда ишлаб чиқарилаётган ва кенг миқёсда халқ хўжалигида қўлланилаётган ферментлардан ташқари, кам миқдорда олинадиган ва кам соҳада қўлланиладиган бир қанча ферментлар ҳам бор, лекин буларнинг айримлари ўта даражада муҳимдир.

Булар қаторига рестриктазалар (эндонуклеазалар), нуклеин кислоталарни парчаловчи ферментлар ва лигазалар - уларни синтезида иштирок қиладиган ферментлар киради. Бу ферментлар ген муҳандислиги илмий ишларини олиб боришда зарурдир. Буларни ҳам ҳар хил микроорганизмлар ишлаб чиқаради.

ФЕРМЕНТЛАРНИНГ ХАЛҚ ХЎЖАЛИГИДАГИ АҲАМИЯТИ

Микроорганизмлар ферментларидан халқ хўжалигининг турли хил соҳаларида фойдаланиш жуда ҳам истиқболлидир. Ҳозирги вақтда микроорганизмлардан олинган фермент препаратлари саноатнинг кўп соҳаларида қишлоқ хўжалигида ва тиббиётда қўлланиб келинмоқда (1-жадвал).

Пиво ва вино тайёрлашда солод ўрнига замбуруғнинг амилаза фермент препаратидан фойдаланилади. Бу ишлаб чиқаришни арзонлаштиради ва қалла ҳаражатини камайтиради. Шунга

ўхшаш амилаза эрийдиган крахмал, декстрин олиш учун ҳам ишлатилади. Амилаза ферменти билан берилган, сабзавот ва мевалардан олинган маҳсулотлар ўзининг таркибида кўп миқдорда қанд моддалари сақлайди ва яхши ҳазм бўлади, айниқса, бу болаларга фойдалидир.

Нон ва нон маҳсулотлари тайёрлашда амилаза хамирни ачишини тезлаштиради ва ноннинг сифатини яхшилади. Кондитер саноатида ачитқи замбуруғининг инвертазасидан (сахарозаси) фойдаланилади, сахарозани глюкоза ва фруктозага айлантириб беради, у сахарозани юқори миқдорида кристалланишининг олдини олади.

Замбуруғларнинг пектиназаси мева ва узум шарбатини тиндириш учун ишлатилади. Вино ишлаб чиқаришда узум шарбати чиқиш миқдорини кўпайтириш учун ва кофе ишлаб чиқаришда қўлланилади. Глюкоамилазадан пиво тайёрлаш саноатида пиводан декстрин қолдиғини тозалаш учун ишлатилади. Глюкоизомераза сахарозани ўрнига глюкоза-фруктозали шарбат олишда фойдаланилади.

Лактоза, лактозасиз сут олиш учун ишлатилади. Лактозалар ёрдамида таркибида кўп миқдорда лактоза бўлган сут зардобидан қанд (глюкоза, галактоза) олинади. Замбуруғларни глюкозаоксидазаси катта аҳамиятга эга, чунки булар озик овқат маҳсулотларини глюкоза қолдиғидан ва молекуляр кислороддан озод қилади ва бу билан уларни сақлаш муддатини ўзайтиради.

Глюкозаоксидазани тухум кукунига, майонезга, пивога уларни узоқ муддатга сақлаш учун маълум миқдорда қўшилади. Бу фермент ёрдамида аскарбин кислотасининг (С-витамин) оксидланиши секинлашади.

Целлюлоза препаратидан картошкани қандлаштиришда, картошка ва ғалладан крахмал олишда, сув ўтидан агар-агар чиқаришни кўпайтиришда, сабзавот пастаси тайёрлашда, цитрус мевалари қобиғини ажратишда фойдаланилади. ўсимлик целлюлозасини қандгача парчалашда ишлатилмоқда.

Микроорганизмлардан олинган протеолитик ферментлар пишлоқ тайёрлашда, уни қуюклаштириш учун ишлатиладиган ренин ўрнини босиши мумкин, кейинчалик улардан гўшти юмшатиш (тендиризация) учун фойдаланила бошланди. Бундан ташқари, балиқ тузланганда унинг пишишини тезлатиш, вино ва пиво тайёрлашда ишлатилмоқда.

Липаза сутни куруқ ҳолда ишлаб чиқаришда ўз ўрнини топган, пишлоқ тайёрлашда, унинг пишишини тезлаштириш учун, пишлоққа махсус таъм ва ёқимли ҳид бериш учун ишлатилади.

Тўқимачилик саноатида микроорганизмларнинг ферментлари зиғирнинг самонига ишлов бериб, ундан тола олиш учун кўпдан бери ва кенг қўлланиб келинмоқда. Зиғирни намлаш жараёнида иштирок этадиган асосий микроорганизм сифатида *Clastridium* туркумига кирувчи анаэроб бактерия тан олинган. Намлаш вақтида кетаётган жараёнда зиғир самонидан пектин моддаси парчаланаяди ва унинг толаси ажралиб чиқади.

Тери ишлаб чиқариш саноатида микроб протеаза ферменти терини ошлашда ва уни майинлаштиришда ишлатилади. Таркибида протеаза ва липаза бўлган комплекс препаратни ишлатиш натижасида жараён тезлашади ва юқори сифатли жун олиш имконияти вужудга келади.

Ювиш воситалари ишлаб чиқаришда микроб ферментлари кенг миқёсда қўлланилмоқда. Одатда уларга протеолитик, амилиолитик ва липолитик фаолликка эга бўлган *Bac.subtilis* ферментлари қўшилади. Препаратлар сиртки фаол моддалар билан биргаликда ишлатилади. Таркибида фермент бўлган ювиш воситалари ювиш муддатини қисқартиради, тўқималарни сақланиш қобилиятини ўзайтиради, чунки ювиш 40-60⁰С дан ошмаган ҳароратда олиб борилади.

Ферментларни қишлоқ хўжалигида қўлланилиши икки йўналишда олиб борилмоқда:

1. *ҳайвонларни озукасида фойдаланилади.*
2. *фермент билан озуккага ишлов бериб, уларни ҳазм бўлишини оширилади.*

Aspergillus oryzae ни озуқа муҳити юзасида ўстириш усули билан амилоризин - препарати олинади, бу асосан ўстирилган замбуруғнинг қуригани бўлиб, таркибидан α-амилаза, декстриназа, мальтоза, глюкоамилаза ва протеаза бўлади. Глюкозаморин - кепакда ўстирилган *Asp.awamori* культурасининг қуригани, таркибий қисми α-амилаза, декстриназа, мальтоза, глюкоамилаза, нордон протеиназа ва гемицеллюлозадан иборат. Амилосубтиллин препарати таркибида α-амилаза, протеаза, β-глюконаза ва лизис қилувчи ферментлар бўлади.

Микроб ферментлари тиббиётнинг турли хил соҳаларида терапевтик восита сифатида ва клиник анализларни олиб боришда қўлланилади. яллиғланиш жараёнларини ва куйишни даволаш учун протеиназа препаратлари қўлланилади. Одам организмида айрим ферментларни синтезланиши бузилганда, алоҳида ва комплекс ҳолда ферментлар истеъмол қилинади. Масалан: ошқозон ости безини функцияси бузилганда, таркибида протеиназа, амилаза ва липаза комплекси бўлган препарат қабул қилинади.

1-жадвал.

**Ишлаб чиқариш саноатида баъзи бир ферментларни ишлаб чиқариш учун
фойдаланиладиган микроорганизмлар**

Фермент	Замбуруғлар	Бактериялар
α-амилаза	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
Глюкоамилаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus</i> <i>niveus</i> <i>mycopsis sp.</i>	
Пулланаза		<i>Clebsiella pneumoniae</i>
Лекстраназа	<i>Penicillium sp.</i>	
β-Глюконаза	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Глюкоизомераза		<i>Actinoplanes missouriensis</i>
Инвертаза	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Sacch. cerevisiae</i>	
Целлюлазалар	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma roseum</i> <i>Trichoderma viride</i>	
Лектиназалар	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus awamori</i>	
Протеиназалар	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus</i> <i>e</i> <i>Mucor mihei</i> <i>Mucor rouxii</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Endothia parasitica</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Липазалар	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Candida cylindrical</i> <i>Mucor mihei</i> <i>Rhizopus sp.</i>	
Глюкооксидаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium amagaskiense</i> <i>Penicillium vitale</i> <i>Penicillium notatum</i>	
Каталаза	<i>Aspergillus sp.</i>	
Ацетилаза	<i>Aspergillus sp.</i>	
Аспартаза		<i>Escherichia coli</i>
Гумараза		<i>Escherichia coli</i>
Ленициллинамидаза		<i>Escherichia coli</i>

Лактаза ва глюкоамилаза синтез қилиш қобиляти йўқолганда микроорганизмлардан олинган шу номли ферментлардан фойдаланилади. Овқат ҳазм қилиш жараёни бузилганда айрим вақтларда комплекс ферментлар (α-амилаза, целлюлаза, липаза ва протеиназа) истеъмол қилинади. Микроб ферментларини тиббиётда қўллаш жуда истикболдир.

2-мавзу. ФЕРМЕНТЛАР ИШЛАБ ЧИҚАРИШ ТЕХНОЛОГИЯСИ (6-соат)

Режа:

1. Ферментлар продуцентларини ўстириш жараёнига таъсир этувчи омиллар;
2. Ферментатив продуцентларни ўстириш усуллари;
3. pH, ҳароратнинг таъсири, микро- ва макроэлементлар таъсири;

4. Углевод ва азот манбалари;
5. Фосфор манбалари, витаминлар ва ўстириш моддалари

Ферментларнинг продуцентларини ўстириш уларни қаттиқ ва суюқ озиқа муҳитларига экиш усуллари билан олиб борилади. қаттиқ озиқа муҳитларининг юза қисмида фақат аэроб микроорганизмларни ўстириш мумкин.

Суюқлик ичида ўстириш усулида асосан микроорганизмлар суюқ озиқа муҳитларида ўстирилади ва бунда ҳам аэроб ҳам анаэроб микроорганизмларни ўстириш мумкин. Ферментларнинг аксарият продуцентлари аэроб бўлган микроорганизмлардир ва шунинг учун қаттиқ ва суюқ озиқа муҳитларида ўстирилганда узликсиз ҳаво билан таъминлаб турилади.

Ферментлар продуцентларини ўстириш жараёнига таъсир этувчи омиллар

Ферментларнинг ҳосил бўлиш жараёнига ташқи муҳит шароити, озиқа моддалари таркиби, уларнинг миқдори, метаболитларнинг чиқиши, муҳитда фаол кислотанинг ўзгариши, ҳарорат, муҳитнинг эриган кислород билан тўйиниши, продуцент культурасининг ҳолати ва ўстириш муддатлари, шунингдек бошқа омиллар таъсир этади.

Бу омилларнинг аҳамияти ва фермент биосинтези жараёнига бўлган таъсир даражаси турлича бўлиб, улар асосан микроорганизмни ўстириш усули ва продуцентларнинг физиологик хусусиятларига бўйсинган ҳолда кечади. Бироқ баъзи умумий қонуниятларга эътибор бериб ўтиш керак.

Микроорганизмларни ўстиришда қаттиқ ва қуруқ озиқа муҳитларининг намлиги жуда катта аҳамиятга эга. Агарда муҳитнинг намлиги 11-20% атрофида бўлса, микроорганизмлар умуман ўсмайди. Бирмунча кўпроқ ўсишни намлик 30% бўлганда кузатиш мумкин. Намликнинг 40-45% бўлиши микроорганизм культурасининг мўътадил ўсишига ва спора ҳосил қилишига жуда қулай шароит ҳисобланади. Бу ҳолат спора ҳосил қилувчи фермент продуцентларининг экиш материалларини олишда ишлатилади. Муҳитнинг намлиги 53-58% бўлганда ҳосил қилинган ферментларнинг тўпланиши кузатилади. Намлик 60-68% бўлганда ферментларнинг биосинтези пасая бошлайди ва бу ҳолат озиқа муҳити ичига кирадиган ҳавонинг ёмон ўтиши билан тушунтирилади.

Культураларни қаттиқ озиқа муҳитида ўстириш натижасида унинг таркибида қуруқ моддаларнинг миқдори камайиб, CO_2 ва сувга айланади. Шу сабабли, агарда микроорганизмни ўстириш ёпиқ идишларда (колба, махсус кюветалар ва ҳ.к.) олиб борилса, буғланиш натижасида намликнинг ортиши кузатилади. Агарда ўстириш жараёни очик идишларда олиб борилса, культурани ва озиқа муҳитининг қуриб қолиши ва ҳосил бўлган маҳсулот фаоллиги камайиши кузатилади. Намликнинг даражаси ва мўътадиллиги ҳар бир ўстирилаётган продуцентнинг физиологик хусусиятларига, озиқа муҳит таркиби ва бошқа омилларга боғлиқ бўлиб, ҳар бир омил тадқиқот йўли билан аниқланади.

Ўсаётган культурани ҳаво билан таъминлаш даражаси кўпинча ўстириш усули ва фермент продуцентларининг физиологияси билан белгиланади. Бу жараён асосан уч мақсадни ўз олдига қўяди:

- *Ўсаётган микроорганизмларни ўсиш ва ривожланиши учун зарур бўлган кислород билан таъминлаш;*
- *Газ қўринишидаги моддалар билан ифлосланган ҳавони чиқариб ташлаш;*
- *Микроорганизмларнинг ўсиш жараёнида ҳосил бўладиган иссиқликни қисман бартараф қилиш ёки чиқариб юбориш.*

Микроорганизмларни қаттиқ озиқа муҳити сиртида ўстиришда вужудга келган иссиқликни чиқариш масаласи катта аҳамиятга эга.

Шунинг учун микроскопик замбуруғларни ўстиришда уларнинг ўсиш босқичларига катта эътибор бериш керак, чунки айнан шу гуруҳ микроорганизмлар қаттиқ озиқа муҳити сиртида

ўстирилади.

Биринчи гуруҳ - замбуруғ спораси ёки конидияларини бўқиши ва ривожланишидир. Унинг муддати 10-12 соатга чўзилади. Бу босқич айтарли иссиқлик ажралиши билан кузатилмайди ва озика муҳит компонентлари ўзгармайди.

Озика муҳити сиртида пўпанак ҳосил бўлиши билан иккинчи босқич (тропофаза) мицелияларнинг фаол ўсиш босқичи бошланади. У одатда 12-40 соат ва шу билан бирга озика муҳитидаги моддаларни кўп миқдорда истеъмол қилиши, иссиқлик, ис ва сув ажратиши билан давом этади. Бунда микроорганизм озикани мицелиялари билан тўлиқ ўраб олади. Айнан мана шу босқичда кўп миқдорда иссиқлик ажралади ва умумий ажраладиган иссиқликнинг 75-80% ини ташкил қилади.

1 тонна, культура бир соат давомида фаол ўсиш босқичида $7,6 \text{ м}^3$ га яқин кислородни ўзлаштиради ёки ҳавога бўлган нисбатда эса $36,5 \text{ м}^3$ ни ўзлаштиради. Замбуруғларни мўътадил ўсиши умумий ҳавонинг сарфи ўрта ҳисобда 1 тонна культура учун $600-650 \text{ м}^3$ ни ташкил қилади.

Учинчи босқич (идиофаза) культурани морфологик ва биокимёвий ихтисослашиши кузатилади, яъни бунда микроорганизмлар конидияларни ва иккиламчи метаболитларни ҳосил қиладилар. Ушбу босқичда микроорганизмлар ҳужайра ташқарисига чиқарилувчи ферментларни ҳосил қиладилар. Бунда ўстириш хоналарида ҳароратни $3-4^{\circ}\text{C}$ га тушириш ва ҳаво алмаштиришни 3-5 мартага камайтириш зарур.

Микроорганизмларни суяқ озика муҳитларида ўстириш давомида ҳам ҳаво билан таъминлашга ва ис ва газ билан ифлосланган ҳавони ферментёрдан чиқиб кетиш режимига эътибор бериш керак. Масалан, бир культура ҳар хил аэрация шароитларида бир хил ферментни ҳар хил хусусияти билан ҳосил қилиши мумкин. Умуман олганда ҳаво билан таъминлаш микроорганизмни ўстириш жараёнини ва фермент ҳосил қилишини тезлаштиради.

Ўстириш давомийлиги ҳам муҳим кўрсаткичлардан бири бўлиб, у максимум фермент ишлаб чиқариш самарадорлигини белгилайди. У жуда кўп омилларга боғлиқ: озика муҳити таркиби ва уни продуцентга узатиш усули, муҳитни ҳаво билан таъминланганлик даражаси, продуцент тури, фермент хусусияти ва бошқалардир. ўстириш давомийлиги кўпинча продуцентнинг физиологик хусусиятларига боғлиқ бўлади. Масалан, *B.mesentericus* ПБ учун - 36 соат бўлса, *Asp.awamori* учун эса 144 соатни ташкил этади.

рН кўрсаткичининг таъсири

Микроорганизмларни қаттиқ озика муҳити сиртида ўстиришда муҳитнинг рН кўрсаткичи унинг намлиги кам ва кучли буферли бўлганлиги сабабли ферментларнинг ҳосил бўлиш жараёнларига кам таъсир қилади. Лекин рН кўрсаткичи суяқ озика муҳитида асосий ҳал қилувчи аҳамиятга эга бўлиб, озикани стерилизация қилишда ва культурани ўстириш давомида тез ўзгаради.

қаттиқ озика муҳитлари сиртида продуцентларни ўстириш жараёнида улар сув билан намланади ва намланган муҳитнинг рН кўрсаткичи 5,0-5,6 ташкил қилади. Кўпинча озика муҳити сифатида ишлатилган ўсимлик бўлакчалари хлорид, сульфат ёки сут кислоталарининг кучсиз эритмаси билан намланади ва уларнинг рН кўрсаткичи 4,5-5,0 атрофида бўлади. Кислоталарни қўшиш натижасида озика муҳити микроскопик замбуруғларнинг ўсиши учун селектив шароитга айланади. Бунда ҳаво ва озикани стерилизация қилиш харажатлари бир мунча камаяди.

Суяқ озика муҳитлари рН кўрсаткичи микроорганизмларни ўстиришда жуда катта аҳамиятга эгадир. Энг кўп эътиборни албатта, озиканинг бошланғич ва стерилизация ҳамда микроорганизм ўсиши пайтида катион ва анионларни истеъмол қилиши натижасида ўзгарадиган рН кўрсаткичига бериш керак. Шундай истеъмол натижасида культурал суяқлик ё кислотали ёки ишқорли муҳитга ўтиб кетади.

Муҳитнинг мўътадил рН кўрсаткичи продуцентнинг хусусиятига боғлиқ шунга қарамай баъзи умумий қонуниятларни кўриш мумкин.

Замбуруғ ва ачитки микробларига ўхшаш организмлар рН кўрсаткичи 3,8-5,6 бўлган шароитда яхши ўсади ва фермент ҳосил қилади. Бактериялар эса рН кўрсаткичи нейтрал (6,2-7,4) қийматларда фаол ривожланади. яна шундай маълумотлар борки, агарда рН кўрсаткичи фақат маълум бир

қийматда ушлаб турилса бундай шароитда ўстирилган продуцент битта керакли ферментни ҳосил қилиши мумкин. Кўпчилик микроорганизмлар рН омили таъсирига жуда таъсирчан бўладилар ва бу кўрсаткичнинг сезиларли даражада салбий ёки ижобий томонга ўзгариши, уларнинг фермент ҳосил қилиш қобилиятларига бирданига таъсир қилади.

Ҳароратнинг таъсири

Кўпгина ферментларнинг продуцентлари, хусусан микроскопик замбуруғлар, мезофил микроорганизмлар ҳисобланади ва уларнинг ривожланиши учун мўътадил ҳарорат 22-32⁰С атрофида бўлади.

Ферментларни бактериал продуцентлари орасида кўпгина термофиллари ҳам учрайди ва уларни мўътадил ўстириш ҳарорати 35-55⁰С дир. Масалан, *B.mesentericus* ПБ бактерияси 37⁰С ни талаб қилса, *Bac.diastaticus* 60-65⁰С ни, *Asp.oryzae* эса атиги 28-30⁰С ни талаб қилади. ҳамда липаза ферментининг продуценти *Rhizopus microsporus* замбуруғининг фаол ривожланиши ва фермент ҳосил қилиши учун 40⁰С ҳарорат мўътадил ҳисобланади.

Саноатда термофил микроорганизмлардан фойдаланишнинг бир қанча ижобий томонлари бор. чунки уларни юқори ҳароратда ўстирилганда жараённинг стериллигига бўлган талабни ўз-ўзидан камайтиради. Бундан ташқари термофил микроорганизмлар юқори ҳароратга бардошли бўлган ферментларни ҳосил қилади. ҳарорат ҳосил бўлаётган фермент миқдорининг ўзгаришида катта аҳамиятга эгаллиги билан ҳам ажралиб турувчи омилдир.

Микро- ва макроэлементлар таъсири

Микроорганизмларни ўстириш учун озиқа муҳитларини тайёрлашда фермент саноати ёки қишлоқ хўжалиги ўсимликлари қолдиқларидан кенг кўламда фойдаланилади. қаттиқ озиқа муҳитлари асосан қишлоқ хўжалиги ўсимликларининг қолдиқларини майдалаб, намлигини маълум даражага келтириб ва унга бошқа макро ва макроэлементларнинг эритмаларини аралаштириб тайёрланади.

Суюқ озиқа муҳитлари тайёрлашда эса кам эрувчан компонентлардан миқдори чекланган ҳолда фойдаланиш мумкин. Акс ҳолда унинг эримаган қолдиқлари озиқа муҳити ва культурал суюқликни қайта ишлашда ҳалақит беради. Озиқа муҳити таркибига ҳар хил ўсимлик ва фермент саноати қайнатмалари ва гидролизатлари дағал филтратларини ҳамда спирт бардаси, микроблар биомассаси плазмоллизатлари, аминокислоталар ва бошқаларни қўшиб тайёрлаш мумкин. Буларда йирик қолдиқларнинг бўлмаслиги тўхтовсиз ўстириш жараёнида жуда катта аҳамиятга эга. Суюқ озиқа муҳитлари таркибида, одатда 2,5% дан 20% гача қуруқ моддалар эритма ҳолида бўлади. Муҳитнинг рН кўрсаткичи уни тайёрлаш вақтида ва стерилизациясидан кейин назорат қилинади.

Углерод манбалари

Гидролитик ферментлар асосан индуцибел табиатга эга бўлганлиги учун озиқа муҳити таркибига керакли бўлган ферментни фаол тўплаш мақсадида унинг индукторини қўшиш даркор.

Углерод манбаси микроорганизмлар учун энг керакли бўлган компонентдир, чунки барча организмларда энг асосий метаболик жараёнлар айнан шу элемент иштирокида амалга оширилади. Углерод манбаси вазифасини ҳар хил органик бирикмалар бажариши мумкин ва улар хужайра моддаларини бошланғич материаллари ҳамда энергия манбаси сифатида ишлатилади.

Микроорганизмлардан гидролитик ферментларни олишда углерод манбасига алоҳида эътибор бериш керак, чунки улар шу комплекс ферментларнинг стимуляторлари бўлиб ҳисобланади. Агарда углерод манбаси (крахмал, пектин ва ҳ.к.) озиқа муҳитига кўп миқдорда қўшилса, улар ҳаракатсиз бўлиб қоладилар ва шунинг учун микроорганизм талабига қараб уларни қисм-қисм қилиб қўшиш керак.

Углерод манбасини танлаш албатта, микроорганизмнинг физиологик хусусиятларига ва у ҳосил қиладиган ферментнинг турига боғлиқдир ҳамда ҳар бир микроорганизм учун тадқиқотлар йўли билан аниқланади.

Азот манбалари

Мухитда азот манбаси вазифасини минерал тузлар ёки азотнинг органик бирикмалари бажариши мумкин. Масалан, протеиназалар ҳосил бўлишида азот манбалари нафақат озиқа муҳитининг муҳим компонент сифатида, балки, биосинтез жараёнини фаоллаштирувчи вазифасини ҳам бажаради. Энг яхши натижалар муҳитга оксиллар ва уларнинг парчаланиш маҳсулотларини қўшиш йўли билан олинади.

Азотнинг органик манбаларига ҳайвонларнинг ҳар хил оксиллари (пептон, казеин, гемоглобин, желатин, тухум оксили), ўсимлик хом ашёлари оксиллари (ёғсизлантирилган соя, маккажўхори экстракти), микроорганизмларнинг биомассаси ҳамда оксилларнинг кислотали, ишқорли ва ферментатив гидролизатлари, аминокислоталар ва бошқа бирикмалар киради.

Азотнинг ноорганик манбалари сифатида асосан ҳар хил азот кислотаси ва аммонийнинг тузларидан фойдаланилади. Ноорганик азот манбаларини танлашда катион ва анионларнинг физиологик таъсирига эътибор бериш керак. Мухит рН кўрсаткичини ишқорий ёки кислотали томонга ўзгариши продуцентнинг биосинтетик хусусиятига қаттиқ таъсир қилади.

Кўп тадқиқотчиларнинг маълумотларига қараганда, азотнинг органик манбаларидан фойдаланиш ноорганикларга нисбатан кўпроқ ижобий ҳисобланади. Лекин уларни биргаликда маълум ўрганилган микдорда ишлатилса, уларнинг таъсири кўп ҳолларда ижобий томонга бурилади.

Озиқа муҳитида азот ва углероднинг нисбати шундай бўлиши керакки, микроорганизм иккала элементга ҳам муҳтожлик сезмаслиги керак. Бир элемент танқислигини иккинчи элемент ҳисобига тўғирлаш мумкин эмас. Масалан, глюкозаоксидаза ва каталаза ферментларини *Penicillium vitale* замбуруғи азот ва углероднинг ўзаро нисбатига қараб ҳосил қилади ва ушбу нисбатни ўзгартириш йўли билан ёки глюкозаоксидаза, ё бўлмаса каталаза олиш мумкин.

Фосфор манбалари

Фосфор элементи озиқа муҳитига фосфор кислотаси тузи ёки органик бирикма - фитин шаклида қўшилади. Фосфор муҳит учун энг зарур бўлган элементдир, чунки у ҳужайрада энергия алмашинуви жараёнида АТФ, АДФ ва АМФ таркибига киради.

Микроорганизмлар логарифмик ўсиш фазасида фосфор элементини жуда кўп микдорда талаб қилади. Чунки бу босқич ҳужайра моддаларини ва биокимёвий жараёнларнинг интенсив ўтишига тўғри келади. Одатда бу даврда 83-91% гача бўлган фосфор озиқа муҳитидан микроорганизм биомассасига ўтади.

Фосфор протеаза, амилаза, пектолитик каби ферментларнинг биосинтезини тезлаштиради. Агар фосфорни фосфор кислоталарининг тузи кўринишида табиий қайнатмалари бор муҳит таркибига қўшилса энг яхши натижаларга эришиш мумкин.

Витаминлар ва ўстириш моддалари

Микроэлементларсиз, витаминларсиз ва ўстириш моддаларисиз микроорганизм ҳужайрасидаги моддалар алмашинуви жараёнини тўлиқ ўтиши эҳтимолдан узоқдир. Лекин ҳамма микроорганизмлар ҳам ўсиш ва ривожланишлари учун бу бирикмаларни қўшилишини талаб қилавермайди. Шу нуқтаи назардан назардан келиб чиқиб микроорганизмлар икки турга бўлинади:

➤ *Ауксоавтотрофлар* - витаминларни ташқаридан қўшилишини талаб қилмайдиган микроблар бўлиб, улар ўзлари ушбу моддаларни синтез қилиш қобилиятларига эга;

➤ *Ауксогетеротрофлар* - витаминларни синтез қила олмайдиган микроорганизмлар гуруҳи бўлиб, улар учун албатта, озиқа муҳити таркибига витаминларни қўйиш керак.

Агарда ауксоавтотроф микроорганизм ўстирилувчи муҳитга витаминлар ва ўстирувчи бирикмалар қўшилса, улар бу продуцентнинг ўсиши ва ривожланишига ҳеч қандай таъсир кўрсатмайди.

Агарда ауксогетеротроф продуцент озиқасига жуда ҳам кам миқдорда юқорида зикр этилган моддалар қўшилса, уларнинг ўсиш ва ривожланиши сезиларли даражада тезлашади. Афсуски жуда кўп продуцентлар ауксогетеротроф организмлар бўлиб, улар ферментлар биосинтезида қатнашувчи В витаминлар гуруҳи комплекси (V_1 , V_3 , V_5 , V_6 , V_8) , яъни биотин, инозит, пантотен кислотаси, тиамин, пиридоксин ва бошқаларнинг озиқада бўлишига муҳтождирлар.

Биотин аминокислоталарнинг ҳосил бўлиш реакцияларида қатнашади, бир неча ферментларнинг фаол марказига киради ва ёт кислоталарининг карбоксилланиш ва декарбоксилланиш жараёнларини катализлайди. Инозит эса фосфор кислотасининг олти молекуласи билан бирикиб ачитқич микробларни ўсишини тезлаштирувчи инозитфосфор кислотасини ҳосил қилади. Пантотен кислотаси КоА таркибига кириб, ҳужайрадаги энг муҳим модда алмашинув жараёнларида иштирок этади.

Макро ва микроэлементлар озиқа муҳитларининг ажралмас қисми ҳисобланади. Кўп металл ионлари ферментларнинг фаол маркази таркибига киради ёки ферментларнинг структурасини тутиб туришда ва организмдаги ферментатив фаолиятни таъминлашда иштирок этади. Ҳозиргача маълум бўлган ферментларнинг 1/4 қисми металлоферментлар ҳисобланади. Улар нафас олиш жараёнини, оксидланиш-қайтарилиш реакциясини, аминокислоталар, шакарлар, нуклеотидлар, пиримидин асослари синтезларини фаоллаштиради, биокутбли оксил молекулалари, гликогенлар, нуклеин кислоталари ҳосил бўлишини ҳамда уларнинг трансформацияси ва парчаланишини бошқарадилар.

Ҳамма металлоферментлар икки гуруҳга бўлинади:

➤ **Биринчи гуруҳ** ҳақиқий металлоферментлардир, яъни улар метал ионлари ва оксил молекулалари ўртасида бузилмас бог ҳосил қилиб, ионитлардан ўтказилганда ҳам парчаланмайди.

➤ **Иккинчи гуруҳ** металлоферментлари эса диализ жараёнида металл ионлари билан бўлган богни узадилар ёки ферментга бошқача ишлов бериш жараёнида каталитик фаоллигини йўқотадилар. Бу гуруҳ ферментларига яна ташиқаридан металл қўшилса улар фаоллигини тиклайдилар.

Оксидланиш-қайтарилиш жараёнларида темир, мис, марганец, рух, бор ва молибден талаб қилувчи ферментлар иштирок этади. Умуман олганда микроорганизмларда борадиган барча жараёнлар макроэлементлардан ташқари микроэлементларнинг иштирокига муҳтождир. Шунинг учун, айниқса синтетик озиқа муҳитлари тайёрлашда микроэлементларнинг улуший миқдорини эътиборга олиш лозим.

3-мавзу. ФЕРМЕНТАТИВ ПРОДУЦЕНТЛАРНИ ЎСТИРИШ УСУЛЛАРИ

Режа:

1. қаттиқ озиқа муҳитида ўстириш;
2. Микроорганизмларни юза қисмга экиш усулининг технологик чизмаси;
3. Продуцентларни суюқ озиқа муҳитида ўстириш;
3. Микроорганизмларни суюқликда ўстиришнинг технологик чизмаси;

Қаттиқ озиқа муҳитида ўстириш

Продуцентларни ўстириш жараёни совитилган стерил озиқа муҳитига экиш материални сепишдан бошланади. Даврий стерилизация шароитида экишни одатда стерилизаторнинг ўзида узлуксиз аралаштириш йўли билан ўтказилади. Узлуксиз стерилизация қилиш шароитида эса озиқага экиш стерилизаторнинг совитиш бўлимида амалга оширилади ва экилган озиқа муҳити культура билан биргаликда ўстириш цехига юборилади.

Култураларнинг қаттиқ озиқа муҳити сиртида ўстириш жараёнини ҳар хил усуллар билан бажариш мумкин. Кюветаларга экиб ўстириш ананавий усул ҳисобланиб, кўп қўл меҳнатини ва кўп

ишлаб чиқариш майдонини талаб қилади. Продуцентларни механизациялашган қурилмаларда ўстириш бирмунча янги усул бўлиб ҳисобланади.

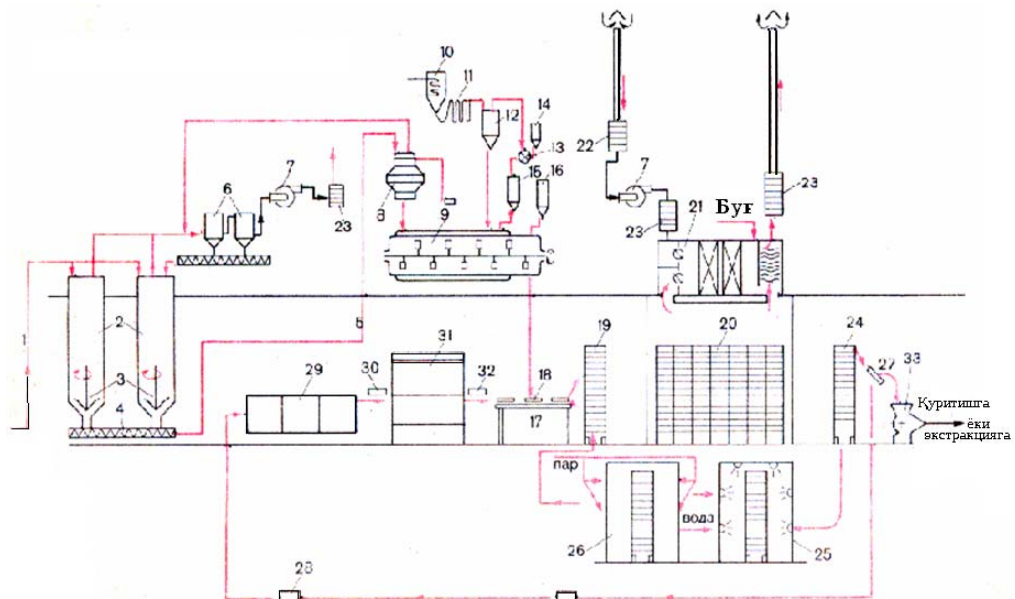
Кюветали ўстириш усулининг элементар ячейкаси бўлиб оддий рухланган темир туникадан ясалган усти очик ёки ёпиқ ва баландлиги 20-50 мм ли 0,25-0,50 м² майдонга эга бўлган идиш ташкил қилади. Бу идишнинг таг қисми тешикли ёки тешиксиз бўлади.

Кюветаларга 2-2,5 см қалинликда намланган, экилган озиқа муҳити солинади ва у ўстириш хонасига юборилади. Бу ерда кюветалар ҳаракатланувчан ёки стационар ускуналарда бир неча қаватли қилиб терилади. ҳар бир қават ораси 10-11 см бўлади. Одатда бу қаватлар сони 18 та атрофида бўлиб, умумий бўйи 2 м дан ошмаслиги керак. Биринчи кювета 20-25 см баланликда ўрнатилади. ҳамма темир ускуналар каррозияга қарши материал билан қопланган бўлиши лозим. Кюветаларни ўстириш хонасига бўшатишда улар формалин билан дезинфекция қилинади. ўстириш хоналари ҳар хил шакл ва кўринишда бўлиши мумкин. Кўпинча улар узун энсиз икки томонига эшик ўрнатилган йўлак шаклида бўлади. ўстириш хонаси тепасида ҳаво ҳайдаш ва ҳавони тозалаш мосламалари ўрнатилади. ўстириш хоналарида олиб бориладиган бутун технологик жараёнлар 36-90 соат давом этади.

Механизациялашган ўстириш қурилмаларини яратишнинг имкониятлари озиқа муҳити қаватларининг орасида ҳавонинг яхши айланиши, зичлашиб қолмаслиги ёки тезда қуриб қолмаслиги каби талаблар билан чекланган. Шу билан бирга уларни шундай қуриш керакки, агарда ўстирилаётган микроорганизмлар ифлосланиб қолса, ўстириш тизимини тўхтатмасдан шу ердаги ифлосланган озиқа муҳитларини бемалол алмаштириш ва стерилизация қилиш имкониятлари бўлиши керак. Бундай нисбатан яхши қурилмаларга Джеффрис, Христенсен, Андеркофлер, Валерштейн, чехословакия ва ВНИИФС, ВНИИ биотехника ва бошқалар ишлаб чиқарган ускуналарни киритиш мумкин (2 – расм).

Джеффрис ва Христенсен қурилмалари тузилиши жиҳатидан бир-бирларидан сал фарқ қилсада, ишлаш механизми ҳаракатланувчан тасма ёки транспортерга асосланган ва ҳар бир ўстириш жараёни тўлиқ бажарилади. Лекин бу қурилмаларда ифлосланиш ҳодисаси руй берса бутун бошли тизимни тўхтатиш ва ҳамма қисмларини стерилизация қилиш керак бўлади.

Микроорганизмларни механизациялашган ўстиришнинг Андеркофлер, Валерштейн ва чехословакия қурилмаларида ўстиришни узлуксиз олиб бориш, ҳар бир қисм ва жиҳозларни алоҳида стерилизация қилиш мумкин ва ифлосланиш жараёнида бутун тизимни тўхтатиш шарт эмас. Уларнинг самарадорлиги суткасига 0,4 тоннадан 10 тоннагача бўлиши кузатилган.



2-расм. Микроорганизмларни юза қисмга экиш усулининг технологик чизмаси.

1-донадор компонентларнинг пневмотранспорти; 2- бункер; 3- ворошитель; 4-шнек; 5-кепак пневмотранспорти; 6- чиқувчи газларни тозалаш учун циклонлар; 7- вентелятор; 8-

кепакни автоматик меъёрловчи ускуна; 9- донатор компонентлар стериллизатори; 10-сув стериллизатори; 11-иссиқлик алмаштирувчи; 12- стерил сув ўлчагич; 13-меъёрловчи (дозатор); 14-хлорид кислота тўпланувчи идиш; 15-суьултирилган хлорид кислотани ўлчов ускунаси; 16-экиш суспензияси учун идиш; 17-стол; 18- кюветаларга жойлаш; 19-кюветаларни кетма-кет жойлаштириш учун жавонлар; 20-ўстириш камераси; 21-совутгич; 22-дастлабки тозалаш учун фильтр; 23-микробиологик ифлонишларни тозалаш учун фильтр. 24-тайёр культуралар учун жавонлар; 25-жавонларни ювиш жойи; 26-жавонларни стериллаш; 27-кюветалардан қуйиб олиш; 28-ифлосланган кювета; 29-кюветаларни ювиш; 30-тоза кювета; 31-кюветаларни стериллаш камераси; 32-стерил кюветалар; 33-майдалагич ускуна.

Продуцентларни суюқ озика муҳитида ўстириш

Бу усул қаттиқ озика муҳити сиртида ўстириш усулига қарганда бир қатор, яъни ишлаб чиқариш майдонини бир неча маротаба қисқартишга, оғир қўл муҳнатини бартараф қилишга, меҳнат гигиенасини яхшилашга, ишлаб чиқаришни автоматик тизимини яратишга ва бошқа устунликларга эгадир.

Суюқ озика муҳити ичида ўстиришда озикани бир мунча иқтисод билан ишлатишга ва фермент препаратларини тозароқ ҳамда юқори фаоллик билан олишга эришиш мумкин.

Микроорганизмларни суюқ озика муҳити ичида ўстириш вертикал ҳолатда жойлашган ферментёрларда олиб борилади. Ферментёрга қўйилган энг асосий талаб - продуцентни ўстириш жараёнида интенсив ҳаво алмашинуви билан бирга асептика шароитларини вужудга келтириш имкониятларидир. ўстириш жараёнида мураккаб бўлган уч фазали суюқлик-қаттиқ, жисм-газ тизими билан ишлашга тўғри келади. Бу тизимда масса алмашинув жараёнлари жуда қийин кечади ва ускунани ўстиришнинг ҳамма босқичларига мослаб яратиш анча мушкулдир.

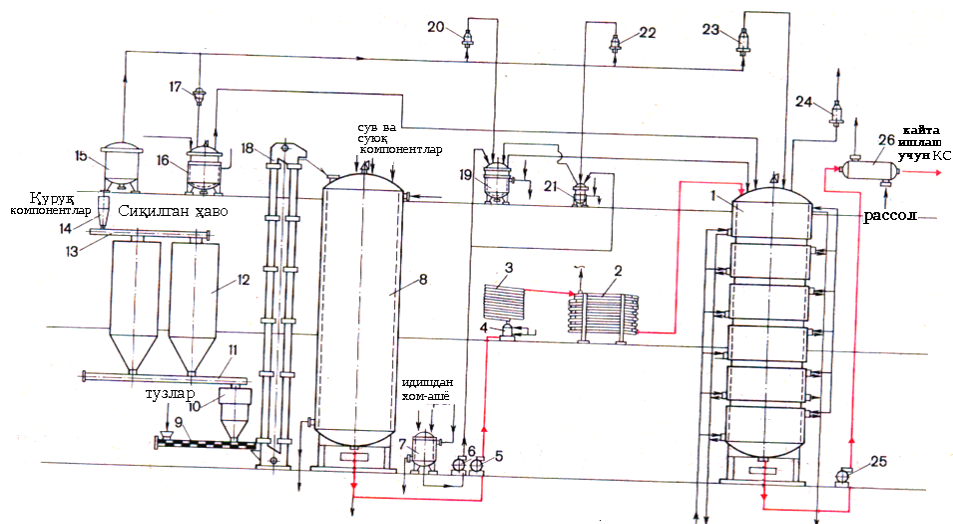
Саноатда ишлатилаётган ферментёрларни ҳаво алмашинуви учун энергия узатиши ва аралаштириш усулларига қараб уч гуруҳга бўлиш мумкин:

- *Механик аралаштиргичли ва пуркама ускуналар (бирлаштирилган);*
- *Сиқилган ҳавони пуркаш тизимида (энергияни суюқлик ичига пурковчи) асосланган ускуналар;*
- *Пуркашга асосланган (энергияни газ фазасига узатувчи) ускуналар.*

Фермент саноати учун биринчи гуруҳ ферментёрлари асептика талабларига жавоб беришлари билан жуда катта аҳамиятга эга. Бу ускуналар асосан цилиндр шаклиги эга бўлиб, бир-бирларидан ҳажми, ички тизим конуструкцияси, айлантириш тезлиги ва қурилмалари ҳамда иссиқлик алмаштириш мосламалари билан фарқ қилади.

Ферментёрларнинг энг йириги механик айлантиргичлари ва кўпик сўндиргичлари билан биргаликда 2000 м³ ҳажмга эга. “Хеман” фирмаси 360-400 м³ ли ферментёрларни ишлаб чиқаришни жорий қилиш билан шуғилланади.

Бизда асосан Россияда ишлаб чиқарилган 50 м³ ли ва 100 м³ ли герметик берк бўлган ва механик аралаштиргичли ҳамд аҳавони пурковчи ферментёрлардан кенг микёсда фойдаланилади. Бундан ташқари Германия махсулоти бўлган 63 м³ ли ферментёрлар жуда кўплаб фермент корхоналарида ишлатилади.



3-расм. Микроорганизмларни суёқликда ўстиришнинг технологик чизмаси

1-ишлаб чиқариш ферментёри; 2-музлатгич; 3-сақлагич; 4- қизитувчи колонка; 5-6, 25-насослар; 7-инокулянтларни учун озук муҳити пайёрлаш идиши; 8-аралаштиргич; 9-шнек; 10-автоматик торозилар; 11-, 13-трубоконвейр; 12-бункер; 14-озуканинг курук элементлари пневмотранспорти циклоны; 15-бош фильтр; 16-кўпиксизлантирувчиларни сақлаш стериллаш идиши; 17, 20, 22, 23-алоҳида филтлар; 18-сўриб-кўтаргич; 19-экиш ускунаси; 21-инокулятор; 24-чиқувчи ҳавони тозалаш филтри; 26-совутилган культурал суёқликнинг иссиқлик алмаштирувчиси.

Ферментёрлар кўпи билан 0,25 МПа босим ва стерилизация вақтида 130-140⁰С ҳароратда ишлашга мўлжалланган. Продуцентни ферментёрда ўстириш жараёнида асепитика нуқтаи назаридан энг муҳим бўлган омил - ферментёр қисмларини тўғри ва ўз қоидасига биноан ечиб улашдир. Агарда ҳар бир қисм ферментёрни ишлатиб бўлгандан кейин алоҳида ювиб, тозалаб, яхши стеризизация қилинмаса ифлосланишнинг манбаси бўлиб қолиши мумкин.

ўстириш жараёнида ферментёрда ҳосил бўладиган кўпикка ва уни бартараф қилувчи мосламаларга ҳам катта эътибор бериш керак. Фермент саноатида ишлатиладиган барча ферментлар кўпикни бартараф қилувчи моддаларни киритувчи ва кўпик миқдорини назорат қилиб турувчи алоҳида мосламалар билан жиҳозланган. Кўпикни чиқариб ташлаш мақсадга мувофиқ эмас, чунки бунда ҳаво тозаловчи филтлар намланиб қолиши ва натижада ускунанинг герметиклиги ҳамда стериллиги бузилиши мумкин.

Микроорганизмларни ферментёрларда ўстириш жараёнида ҳосил бўлаётган ферментларнинг тўпланиши, продуцент биомассасининг ҳолати, муҳит рН кўрсаткичи, озикани ташкил қилувчи баъзи компонентларнинг камайиши ва бошқа бир қанча омиллар доим назорат қилиб борилиши лозим.

ўстириш жараёнининг тугалланиши билан культурал суёқлик ишлаб чиқаришга узатилади ёки суёқлик фазасини биомасса ва қаттиқ фазадан ажратиш бўлимига узатилади. Баъзи ҳолларда продуцент биомассаси ҳар хил тозаликдаги фермент препаратларини олиш учун манба бўлиб хизмат қилади.

4-мавзу. МИКРООРГАНИЗМЛАРДАН ФЕРМЕНТ ПРЕПАРАТЛАРИНИ АЖРАТИБ ОЛИШ УСУЛЛАРИ

Режа:

1. Тозаланмаган, комплекс фермент препаратларининг олиниши;
2. қаттиқ озиқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлардан ферментларни экстракция қилиш;
3. Вакуум-буғлантириш усулида фермент эритмаларини қуюклаштириш;
4. Фермент эритмаларини мембраналар ёрдамида тозалаш;
5. чўктириш усуллари ва унинг назарияси.

қаттиқ ёки суюқ озиқа муҳитларида ўстирилган микроорганизмларнинг культураси ва уларнинг культурал суюқликлари таркибида жуда кўп миқдорда балласт моддалар бўлади. Ферментларни ажратиш ва тозалаш - кўп меҳнат ва харажат талаб қилувчи жараёндир. Агарда фермент препарати микроорганизм культураси кўринишида ишлатилса у тозаланмайди. Спирт ва терини ошлаш тармоқларида тозаланмаган микроорганизмлар культурасини ишлатиш мақсадга мувофиқдир ва худди шундай микроорганизмларни қишлоқ хўжалигида ем-хашак тайёрлашда ёки фермаларда емларни қайта ишлашда қўллаш мумкин.

Озиқ овқат саноатининг бир қанча тармоқларида (нон, пиво, вино, пишлок, крахмал ва шарбат экстракция қилувчи) ҳамда енгил саноат, мўйна ва микробиологик саноатларда, шу жумладан тиббиётда балласт моддалардан қисман ёки тўлиқ тозаланган, яъни фақат тоза фермент препаратлари ишлатилади.

Тоза фермент препаратларини олишнинг бошланғич материали бўлиб, филтрланган культурал суюқлик, продуцентнинг биомассаси ёки қаттиқ озиқа муҳитда ўстирилган культуранинг сувли экстракти хизмат қилади. Фермент препаратлари кукун ёки суюқ концентрат кўринишида олиниши мумкин. Ажратиш жараёнида препаратнинг умумий массасида фаол оксилнинг нисбий улуши ортади, яъни унинг улуший фаоллиги ортади.

Тозаланмаган, комплекс фермент препаратларининг олиниши

Тозаланмаган фермент препарати дегани, бу - микроорганизм культурасини мўътадил шароитда намлиги 8-12% га олиб келинган ва бутун озиқа муҳити қолдиқлари билан биргаликдаги массасидир.

Тозаланмаган фермент препарати культурани қаттиқ ёки суюқ озиқа муҳитида ўстириш йўли билан олиниши мумкин. Суюқ муҳитда ўсган культура қуритишдан олдин биомассаси ва озиқа муҳити қолдиқларидан қисман тозаланган ёки шундайлигича қуритилган бўлади.

қаттиқ озиқа муҳитида ўстирилган микроорганизм культураси одатда 35 дан 58% гача намликка эга бўлади. Бундай махсулот чидамсиз бўлганлиги сабабли уни тезда ишлаб чиқаришга жорий қилиш ёки намлигини 10-12% гача қуритиб олиш керак. қуритиш жараёнидан олдин, ўстириш хонасидан олинган микроорганизм майдаланади ва кейин қуритилади.

Микроорганизм культураларини қуритиш учун тасмали, тоннелли, шахтали, барабанли, жавонли (шкафли) ва тебранувчан қуритгичлардан фойдаланиш мумкин. Ишлаб чиқаришда, юқорида қайд қилинганларига нисбатан кўпроқ тўғри йўналтирилган барабан типдаги қуритгичлар ишлатилади. Бунда ҳўл культура иссиқлик берувчи қурилма билан биргаликда 80-85⁰С да қуритгичга тушади. Бундай юқори ҳароратда қуритилувчи ҳўл микроорганизмнинг майда бўлақларидаги намнинг буғланиши ҳисобига қаттиқ қизиб кетиш ҳолати кузатилмайди ва ундаги ферментларнинг фаоллиги тўлиқ сақланади. Кўпчилик барабанли қуритгичларнинг ички томонида парраксимон қуракчалар мавжуд бўлиб, барабан 3-8 мин⁻¹ тезликда айланиши ҳисобига қуритилаётган материалнинг бир текисда тарқалишини ва қуритилишини таъминлайди.

Шунинг учун бундай типдаги қуритгичда қуритилган махсулот бутун массаси бўйлаб бир хил намликка эга бўлади. Ушбу қуритгичда микроорганизм бўлақчалари 3-7 минут давомида қуритилади, берилаётган иссиқлик тезлиги 2-3 м/с, 80-85⁰С ҳароратда ҳамда чиқишда эса 60-65⁰С бўлади ва қуритилаётган материал ҳарорати 40⁰С дир. қуритиш жараёнида атиги 3-10% гача фермент йўқотилиши мумкин.

Микроорганизмларни қуритишда ишлатиладиган қуритгичларнинг яна бир тури - герметик берк бўлган лентали буғ конвейрли қуритгичдир. Бундай қурилмаларда ферментнинг фаоллиги кўп йўқотилади, лекин улар ихчам ва юқори самарадорликка эга.

Қаттиқ озиқа муҳотида ўстирилган микроорганизмларни қуритиш учун ҳар хил конструкцияли қуритгичлардан фойдаланиш мумкин, қайсики махсулотнинг фаоллиги пасайишини минимумгача туширишни, унинг қуритгичда 5-8 минут давомида бўлишини ва чиқишида 40-42⁰С дан пастда бўлишини таъминлайди.

Тайёр қуруқ микроорганизмлар махсус қадоклаш ускуналарида 25-40 кг қилиб қопланади ва тайёр махсулотлар омборига юборилади.

Кўпчилик продуцентлар синтез қилган ферментларнинг асосий қисмини суяқ озиқа муҳотида чиқарадилар ва тўплайдилар. Тоза фермент препаратларини продуцентнинг биомассаси билан биргаликда филтрларда, центрифугаларда ёки сепараторларда ажратилади.

Микроббиотехнология саноатида асосан ташқи томони билан филтрловчи ячейкали-барабанли тўхтовсиз ишловчи вакуум филтрлар ишлатилади. Бу филтрлар юқори даражада механизациялаштирилган бўлиб, ҳар хил суспензияларни бир хил тезликда филтрлаш имконини беради. Барабаннинг сирти тўмтоксимон бўлиб, бўз ёки филтрловчи сунъий газлама билан ўралган ва у филтрланувчи суяқликка чўктирилган бўлади. Филтрловчи сиртда тўпланган ҳар хил эрмаган компонент ва биомасса махсус пичоқ ёрдамида тозаланади.

Барабан филтрлар биомассани ажратиш учун жуда қулай, лекин улар паст самарадорлиги, кўполлиги ва асепитка шароитларини таъминлай олмаслиги билан ажралиб туради.

Фермент саноатида кўпинча рамали зич-филтр ҳам ишлатилади. Махсулот кўл ишига асосланган ҳолда олинади. Рамали зич-филтрларнинг филтрловчи ҳажми кичик бўлганлиги сабабли барабанли вакуум-филтрга нисбатан ҳам кам самарадордир. Рамали филтрда филтрлаш жараёни 0,4-0,6 МПа босим остида олиб борилади. Одатда филтратнинг биринчи қисми тиник бўлмайди ва у қайта филтрланади.

Зич-филтрнинг камчиликлари горизонтал камерали типдаги ФПАКМ да бир мунча бартараф этилган. У устма-уст жойлашган филтрловчи плиталар ва филтрловчи газламадан иборат. Ушбу ускунанинг иши аўтоматлаштирилган ва иш юзаси 2,5 дан 50 м² ҳажмга эга. Нисбий самарадорлиги бошқаларига нисбатан 6-8 марта юқори ва фермент фаоллиги 4-5% атрофида йўқотилади. Уларни ишлаб чиқаришга жорий қилиш жуда истикболли ва бактериялар культурал суяқлигини филтрлашда жуда кўл келади.

Фермент саноатида ВСМ типдаги сепараторлар ҳам кенг қўлланилади. Улар ичига барабан ўрнатилган идиш кўринишида бўлади. Барабанларнинг ичида цилиндрик тўсиқлар ўрнатилган бўлиб, юқори тезликдаги марказдан қочма куч ҳисобига унинг тагида чўкма ҳолида биомасса ва бошқа компонентлар чўқади. Сепараторнинг самарадорлиги юқори бўлиб 2000-5000 л/с гача етади. Бизда АСЭ-3, АСИ, АСЭ-Б типдаги сепараторлар ҳамда “Альфа-Леваль” (Швеция) фирмасининг сополи сепараторлари ишлатилади.

Биомассани филтрлаш самараси ишлатилаётган ускуна типига, озиқа муҳоти таркибига, ажратилаётган бўлакчалар катта-кичиклигига, эрмаган фракциялар микдорига, филтрловчи материалнинг физик-кимёвий хусусиятларига, ҳарорат режимига ва бошқа омилларга узвий боғлиқдир. Филтрлаш жараёнини яхшилаш мақсадида культурал суяқлик кимёвий қайта ишланади, яъни ишқорийлиги рН 8,85 га келтирилиб, 0,1% ли СаСl₂ эритмасига ва ҳар хил кизелгурлар (тиатомит, радиолит, микролиз, кларгель ва ҳ.к) қўшилади. Бу тўлдирувчилар филтрлаш самарасини оширади, лекин фермент фаоллигига салбий таъсир қилади. Олинган биомасса (биошрот) стерилизация қилинади ва қуритилиб чорва молларига ем сифатида ишлатилади. Культурал суяқлик филтрлати эса тоза фермент препарати олиш учун қайта ишлашга юборилади.

Қаттиқ озиқа муҳотида ўстирилган микроорганизмлардан ферментларни экстракция қилиш

Ҳамма ферментлар асосан сувда эрувчандир. Шунинг учун энг яхши экстрагент бўлиб сув

ҳисобланади. Микроорганизмлардан ферментларни олиш учун улар майдаланиб қилиниб, хужайра деворлари механик ёки автоматик ҳолда бузилиб, экстракция жараёнига жалб қилинади. Бу усулда ҳам ҳўл ҳолдаги, ҳам куруқ ҳолдаги микроорганизмдан фермент эритмасини олиш мумкин.

Биомассадан фермент экстракциясини тўлиқ амалга ошириш учун: ҳарорат, pH, жараён давомийлиги, экстракция ускунасининг конструктив хусусиятлари, ажратиладиган фермент табиати ва бошқа бир қанча омилларга боғлиқ. Бу омиллар ҳар бир продуцент мисолида алоҳида тадқиқотлар ёрдамида аниқланади ва тавсия этилади. Масалан, ҳарорат экстракция жараёнига катта таъсир кўрсатади, яъни жуда кўп ферментлар термолабил бўлиб, ҳаттоки, 35-40⁰С да инактивацияга учрайди.

Шунинг учун завод шароитида иложи борида сувнинг ҳарорати 22-25⁰С да ушлаб турилади ва ҳар хил микрофлора ўсмаслиги учун антисептиклардан (формалин, бензол, толуол, хлороформ ва ҳ.к) фойдаланилади. Кўпчилик ҳолларда ферментларни pH 5-7 кўрсаткичида тўлиқ ажратиш олиш мумкин.

Биошрот билан ферментларнинг кам исрофгарчилиги асосида қуюқлаштирилган экстрактлар олиш учун махсус экстракция ускуналарини ишлатиш даркор. Яқингача диффузияли батареялар кенг қўламда ишлатилар эди. Бу қурилмада экстракция қилинган микроорганизм ферменти нисбатан кўп фаолликни йўқотади ва қўл ишига асосланган ҳолда кўп харажат талаб қилади. Шу билан бирга кам самарадордир. Шунинг учун тўхтовсиз ишловчи экстракция ускуналари устида тадқиқотлар олиб борилмоқда. Булар жумласига фермент саноатида бир мунча қизиқиш уйғотган юқори босимда ишловчи “Ниро Атомайзер” (япония) фирмаси ва ротор типидagi “Роунс-Даунс” фирмаси экстракторларидир.

Лекин ҳозирги вақтда пресс-диффузия жараёнига асосланган ускуналарга қайтиш анъанаси қузелмоқда. Унинг моҳияти шундаки, сувда ушлаб турилган культура прессланади ва яна сувда тиндирилиб прессланади ва ҳ.к. ларга асосланади. Эҳтимол экстракциянинг бу усули келажакда ўз ривожини топиши мумкин.

Вакуум-буғлантириш усулида фермент эритмаларини қуюқлаштириш

Қаттиқ ва суюқ озика муҳитларида ўстирилган микроорганизмларнинг экстрактлари сақлаш учун чидамсиздир. Тайёр техник препарат формаларини (П2х ва Г2х) олиш учун уларни қуюқлаштириш керак. куруқ техник ёки тоза фермент препаратларини олишда вакуум-буғлантириш усули ҳам бир боскич бўлиб ҳисобланади.

Одатда ферментлар буғлантириш ҳароратига жуда таъсирчан бўлади. Шунинг учун қуюқлаштиришнинг асосий шarti паст ҳароратда қайнатиш ва жараёнини қисқа муддат ичида олиб бориш билан бирга, буғлантириладиган суюқликни қизиқ кетишни ва ферментларнинг инактивацияга учрашини олдини олишдир.

Агарда қуюқлаштириладиган эритма қанчалик тоза бўлса, шунчалик кам миқдорда ҳар хил моддаларни кам тутати ва ундаги ферментлар юқори ҳароратга жуда ҳам таъсирчан бўлади. қаттиқ озика муҳитида ўстирилган организм экстрактида жуда кўп миқдорда ҳимояловчи бирикмалар бўлади ва улар қуюқлаштириш жараёнида фермент инактивациясининг олдини олади, лекин культурал суюқлигини қуюқлаштиришда бунинг аксини қузелтиш мумкин, яъни фермент кўп миқдорда ўз фаоллигини йўқотади.

Қуюқлаштириш жараёнида фермент эритмаларидаги моддаларнинг миқдори ва минерал таркиби бир мунча ўзгаради, қуюқ модда ҳисобига эса 11-20% гача камаяди ва қуюқлашган экстрактнинг pH кўрсаткичи ҳам ўзгаради. Продуцентларнинг турига қараб уларнинг культурал суюқликлари ҳам ҳар хил кимёвий таркибга ва ферментлар комплексига эга бўлганлиги учун, вакуум-буғлантиришнинг ҳарорат режимлари тадқиқот йўли билан аниқланади.

Фермент фаоллигини қуюқлаштириш жараёнида йўқотилиши нафақат уни олиб бориш режимига, балки ускуна ёки қурилманинг конструкциясига ҳам боғлиқдир. Кейинги йилларда вакуум-буғлантиригич ускуналари анча такомиллаштирилмоқда. Ушбу ускуналар трубка шаклида (горизонтал, вертикал ва қия) бўлиб, жараённинг ўтиш муддатини 10 маротабага яқин қисқартирди ва ферментнинг фаоллиги йўқолишини бир мунча камайтирди. Булар жумласига “Альфа-Лаваль”

(Швеция), “Единство” (Югославия), “Люва” (Швейцария), “APV” (Франция) ва бошқа бир қанча фирмалар ускуналарини киритиш мумкин ва уларнинг самарадорлиги 200 дан 20000 л/с ни ташкил қилади ҳамда ферментнинг фаоллиги 10% атрофида йўқотилади.

Ушбу ускуналар юқори самарадорлигига қарамай вакуум-буғлантириш усули билан ферментларни қуюқлаштириш кўпгина камчиликлардан холи эмас. Шунинг учун бу усул ўз ўрнини аста-секин ультрафилтрлаш усулига бериши мумкинлиги яққол исботланмоқда.

Фермент эритмаларини мембраналар ёрдамида тозалаш

Мембранали тозалаш усулига диализ ва электродиализ, биромембранали усулга эга қайтариловчан осмос, ультрафилтрация, микрофилтрация ва нозик филтрация кабилар киради.

Эритмадаги моддаларни диализ усулида ажратиш мембранани модда массасига қараб танлаб ўтказувчанлик хусусиятига асосланган. Бу жараён учун ярим ўтказгич мембрананинг ҳар икки томонида эритмалар миқдорининг фарқи вужудга келиши керак. Диализ жараёни ушбу тенглик билан ифодалаш мумкин:

$$Q + D_d S \Delta C$$

бунда, Q - маълум вақт ичида мембранадан ўтган модда миқдори; D_d - диализ коэффициент; S - мембрана сиртининг юзаси; ΔC - мембрананинг ҳар икки томонидаги моддалар миқдорининг фарқи.

Диализдан фермент препаратларини кичик молекулали моддалардан тозалашда фойдаланилади. Масалан, фермент эритмаларини шакар, аминокислоталар, минерал тузлар ва бошқалардан 60-100% гача бўлган миқдорда тозалашга эришиш мумкин. Айниқса ферментлар юқори миқдорли тузлар билан чўктирилганда диализдан ва электролиздан унумли фойдаланиш керак. Лекин тўртламчи структурага эга бўлган ферментларни ва металлоферментларни ажратишда электродиализдан фойдаланиш мумкин эмас, яъни фермент ушбу жараёнда ўз фаоллигини йўқотади.

Диализ жараёни жуда секин ўтувчи жараёндир ҳамда эритманинг миқдори кўп бўлганда, жуда кўп миқдорда мембрана сарфланади. Диализда қуйидаги ҳар хил кўринишдаги ярим ўтказгич мембраналар ишлатилади: пергамент, целофаннинг ҳар хил турлари, ультрафилтрацияда ишлатиладиган мембраналар ва бошқаларидир.

Диализ усули бир қанча камчиликларга эга бўлганлиги сабабли ҳозирги кунда ишлаб чиқаришда ишлатилмайди. Баъзи илмий лабораторияларда ферментларни юқори тозаликда олиш учун ишлатилиши мумкин.

Баромембрана усули ишлатиладиган мембраналар тирқишларининг катта-кичиклигига қараб табақаланади. Масалан, қайтариловчан осмос ($F3 \times 10^{-4}$ мкм); ультрафилтрация (15×10^{-5} мкм); микрофилтрация (0,2 мкм) ва нозик филтрация (10 мкм) дир. қуюқлаштириш ва тозалашнинг осмос ва ультрафилтрация усуллари кимё, нефтни қайта ишлаш, озиқ-овқат, фармацевтика ва фермент саноатларида жуда кенг тарқалган. Энг асосий жараёни жуда ҳам кам харажатлар ва энергия ҳисобига олиб борилишидир.

Ультрафилтрация жараёнида ферментларни ҳарорат таъсиридаги инактивацияси умуман бартараф қилинган бўлиб, бирварақайига эритма бир қанча балласт бирикмалардан хона ҳароратида тозаланади. Ушбу жараён юқори босим остида ўтганлиги учун самарадорлиги ҳам юқоридир. Бу усулнинг ҳам асосий элементи бўлиб мембраналар ҳисобланади. ҳозирги кунда целофанлардан, каучик, полиэтилен, полистирол, целлюлоза ва бошқа бир неча хил материаллардан тайёрланган мембраналар ишлатилмоқда.

Мембраналар хусусиятига кўра 0,05-2 мкм ли бир қаватли - изотроп ва икки қаватли - анизотроп турларига бўлинади. “Амикон” фирмасининг (АҚШ) “Миллипор” ва “Диаффо” мембраналари жуда ҳам машҳурдир ва улар ҳар хил шароитларга мослаб ишлаб чиқарилади, яъни улардан фойдаланиш тармоқлари жуда кўпдир.

Ультрафилтрация жараёни кўп жиҳатдан ускунанинг тузилишига ва мембраналарнинг техник хусусиятларига боғлиқдир. ҳозирги кунда мембраналар бир қанча ривожланган давлатларда, яъни

АқШ (Акбор, Дюпон, Дорр-Оливер, Амикон, Хавенз), Франция (Рамикон, Дедремо) ва бошқаларда ишлаб чиқарилади.

ЧЎКТИРИШ УСУЛЛАРИ ВА УНИНГ НАЗАРИЯСИ

Саноат учун зарур бўлган кўпчилик ферментлар сувда эрувчан оксиллардир.

Фермент эритмалари олиниш манбаларига қараб микроорганизмлар лизатлари, экстрактлари, культурал суюқлик фильтратлари, ўсимлик ёки ҳайвон тўқималари гомогенатлари бўлиши мумкин. Бу фермент эритмалари таркиби жуда мураккаб тизимга эга. Унда ферментлардан ташқари коллоид табиатига эга бўлган ҳар хил бирикма ва моддалар ҳам учрайди. Бундай мураккаб тизимлардан ферментларни ажратиш олиш мушкул вазифадир.

Ферментни кўпроқ ва фаол ҳолда ажратиш олишни таъминлаш учун барча эҳтиёткорлик чораларини кўриш даркор.

Маълумки, оксилнинг гидрофоб гуруҳлари оксил молекуласи ичида тўпланишга ҳаракат қилади, лекин уларнинг етарлича миқдори молекула сиртида жойлашади. Оксилни ҳар хил эритувчиларда эриш даражаси молекула сиртида гидрофоб ва гидрофил қолдиқларнинг тарқалиши билан белгиланади.

Оксилларни асосий эритувчиси бўлиб ҳисобланмиш сувнинг баъзи хусусиятларини (ҳарорат, pH, ион кучи, нейтрал тузлар, органик эритувчилар ёки инерт бирикмаларни қўшиш йўли билан) ўзгартириш ҳисобига, оксил молекуласининг гидрат ёки сольват қатламига таъсир қилиб агрегацияга учратиш ва чўкмага тушириш мумкин. Саноатда асосан органик эритувчилар ёки тузлар билан чўктиришдан фойдаланилади. Бу усуллар бир-биридан чўктириш механизми билан фарқ қилади.

Нейтрал тузлар ёрдамида чўктириш

Ферментларни тузлар ёрдамида чўктириш жараёни асосан оксил молекуласини гидрофоблиги даражасига боғлиқ. Типик оксил молекуласи сиртида бир қанча аминокислоталар (тирозин, триптофан, лейцин, изолейцин, метионин, валин ва фенилаланин) занжири шаклида ёпишган гидрофоб қисмларга эга. Оксил молекуласининг гидрофоб қисми сув билан тўқнашганда сув молекулалари билан мўлжалланган қават ҳосил бўлади ва шу жойлар "музлатилган" ҳолатда бўлади. Бундай тартибли структуралар термодинамик жиҳатдан чидамли эмасдир. Агарда сув молекулаларини оксил табиатига ўхшамаган моддалар билан иммобилизация қилинса, оксил молекулалари ўзаро таъсирга кириб агрегатлар ҳосил қила бошлайди.

Маълумки тузларнинг ионлари гидратланади, агарда оксил эритмасига маълум миқдорда туз қўшилса у сув билан боғланади ва сувдан бўшаган оксил молекулалари агрегатлар ҳосил қилади. Туз ионлари қанча кўп бўлса, оксилларнинг агрегатланиши ҳам шунча кучаяди ва чўкмага тушиши ортади.

Тузлар билан чўктириш жараёни таъсирига кўра ҳар хил оксилларда ҳар хил бўлади. Бу биринчидан, оксил молекуласи сиртидаги гидрофоб қисмларнинг миқдори ва ўлчамига боғлиқ, қанча шундай қисмлар кўп бўлса шунча оксил тез чўкмага тушади. Баъзи оксиллар борки тузларнинг энг юқори миқдорида ҳам чўкмага тушмайди. чўктириш жараёнида оксиллар ёнида турган бошқа оксиллар билан ҳам агрегат ҳосил қилиб чўкмага тушиши мумкин. Бунда бир қанча ферментлар комплексини олиш мумкин. Лекин фракцияларга бўлиб чўктирилса, бир мунча юқори натижага эришиш мумкин.

Оксилларни тузли эритмаларда эрувчанлиги Коннинг эмпирик тенгламасига бўйсунди:

$$\lg S + \lg S_0 - k_s \mu,$$

бунда, S , S_0 - оксилнинг тузли эритма ва тоза сувдаги эрувчанлиги; k_s - тузлаш константаси; μ - эритманинг ион кучи.

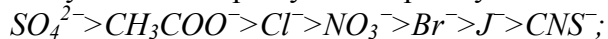
Тузлар билан чўктириш жараёнини унумли ўтказиш учун $k_s \mu$ кўрсаткичи иложи борица катта бўлиши керак. k_s кўрсаткичи тузнинг табиатига боғлиқ бўлиб, водород ионлари миқдorigа боғлиқ

эмас.

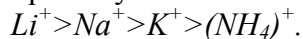
Ушбу жараён гидрофоб ўзаро таъсирга асосланган бўлсада унинг боришига таъсир қилувчи бошқа омиллар ҳам мавжуддир. Улар: муҳит рН кўрсаткичи, ҳарорат, фермент эритмаси тозалиги даражаси, жараёни ўтказиш муддати ва бошқалардир.

Туз билан чўктиришда асосан ишқорий металлларнинг нейтрал тузлари ишлатилади. ҳар хил ионларнинг чўктириш самарадорлиги уларнинг ион кучига боғлиқ.

Натрий тузлари анионларини тузлаш таъсири кучига қараб қуйидагича жойлаштириш мумкин:



катионларни эса қуйидагича жойлаштириш мумкин:



Фермент препаратларини туз ёрдамида чўктирилганда уларнинг таркибида 60-85% гача ҳар хил балласт қўшимча моддалар учраши мумкин. Ушбу жараёнинг энг қийин босқичи, бу - тузни қўшиш ва уни эритишдир. Эритмада тузнинг локал миқдорини ошириб юбормаслик учун у аввал майдаланиб, секин асталик билан маълум бир қисмдан қўшиб борилади ва тинимсиз аралаштириб турилади. Аралаштириш давомида кўпик ҳосил бўлишига йўл қўймаслик керак. Жараён эриган ва агрегатланган оксилларнинг мувозанати ҳосил бўлгунча 20-40 мин, баъзида бир неча соат давом этади.

Туз билан чўктириш жуда ҳам кўп омилларга боғлиқ бўлган мураккаб технологик жараёндир. Шунинг эсада тутиш керакки, туз ҳеч қачон ферментни бутунлай чўктирмайди, балки унинг эрувчанлигини пасайтиради холос. Агарда эритмада 1 мг/мл оксил бўлса, унинг 90% и чўкмага тушиши мумкин, лекин эритмада бор-йўғи 0,1 мг/мл оксил бўлса ҳеч қандай фермент препаратини олишнинг иложи бўлмайди.

Нейтрал тузлар билан оксилларни чўктириб фермент препаратларини олиш усуллари асосан чет элларда кенг тарқалган.

Органик эритувчилар ёрдамида чўктириш

Ферментларни сувда эрувчан органик эритувчилар билан чўктириш усуллари саноат миқёсида кенг қўламда қўлланилади. Оксилларни чўктириш самараси органик эритувчилар таъсирида сувнинг фаоллигини камайиши билан узвий боғлиқдир.

Эритувчининг миқдори ортиши билан ферментнинг зарядланган гидрофил молекулаларини сув таъсирида солватланиш қобилияти пасаяди. Оксилнинг гидрофоб қисмидаги сув молекулалари органик эритувчи томонига ўта бошлайди ва натижада ферментнинг эрувчанлиги пасаяди. Оқибатда оксил молекулалари агрегатланади ва чўкмага тушади.

Оксилларни агрегатланиши электростатик ва Ван-дер-Ваальс кучлари таъсирида, алоҳида жойлашган оксил молекулалари ўртасида юзага келади.

Оксилларни агрегатланиши жараёни ва чўкма ҳосил бўлиши чўктиришнинг бир қанча омилларига боғлиқдир. Шулардан бири оксил молекуласининг ўлчамидир. чўктириш жараёнида оксил молекуласининг ўлчами қанчалик катта бўлса, эритувчининг салбий таъсир қилувчи миқдори шунчалик паст бўлади. Бу боғлиқликка молекуланинг гидрофоблик даражаси, солват қаватига чидамлилиги ва бошқа омиллар таъсир қилиши мумкин.

Чўктириш учун ишлатиладиган органик эритувчи сув билан тўлиқ аралашishi ва фермент билан эса алоқада бўлмаслиги керак. Асосан бу жараён учун этил спирти, ацетон ва изопропил спирти кенг қўлланилса, метанол, н-пропанол, диоксан, 2-метоксиэтанол ва бошқа спиртлар, кетонлар, эфирлар ва уларнинг аралашмалари камроқ ишлатилади. Эритувчиларни танлашда уларнинг токсиклигига, портлаш хавфидан ҳолислигига ва регенерация бўлиш қобилиятига эътибор бериш керак. Ишлаб чиқариш учун этил спирти ва изопропанол энг яроқли бўлиб ҳисобланса, ацетоннинг кўрсаткичлари эса сал пастроқдир. Булар орасида энг истикболлиси изопропанолдир. Бу эритувчилар ёрдамида ферментларни комплексларга ажратиш ёки фракциялар ҳолида чўктириб олиш мумкин.

Фермент препаратларини чўктириш учун нафақат эритувчининг табиати ва миқдори, балки электролитларнинг иштироки, чўктириш ҳарорати, муҳит рН кўрсаткичи, қуруқ моддаларнинг

таркиби ва миқдори каби бир қанча омилларга эътибор бериш керак.

Чўктириш эритмасида баъзи ионларнинг учраши фермент мўътадиллигига таъсир қилиши мумкин. Масалан, Ca^{2+} ионлари α -амилаза, протеиназа, глюкоамилаза ферментлари фаоллигига ижобий таъсир қилса, магний, марганец, кобальт каби метал ионлари ҳимоя вазифасини бажаради.

Шулар билан биргаликда баъзи металлларнинг (Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Hg^{+} ва х.к.) ионлари салбий таъсир кўрсатади ва уларнинг эритмада бўлиши мақсадга мувофиқ эмасдир. Эритмада электролитларнинг бўлиши эритувчи сарфини камайитиришга ва чўкма структурасини яхшилашга хизмат қилади.

Фермент эритмаси ва эритувчининг ҳарорати фермент чўктириш жараёнида паст бўлишига ҳаракат қилиш керак. Спирт ва ферментнинг сувли эритмаси аралаштирилганда иссиқлик ажралиб чиқади ва аралашма ҳарорати $5-10^{\circ}\text{C}$ га кўтарилади. Агарда спирт олдиндан совутилган бўлмаса ферментларнинг инактивациясини кузатиш мумкин. Бу ҳодиса нафақат термоинактивацияга, ҳаттоки фермент молекуласини денатурациягача олиб келади.

Фермент препаратларини чўктиришда рН кўрсаткичи жуда катта аҳамиятга эга. Бир хил фермент эритмасидан ҳар хил рН кўрсаткичи таъсирида бир-биридан чўкмаси миқдори ва фермент фаоллиги билан фарқ қилувчи препаратлар олиш мумкин. Маълумки ферментлар ўзларининг изоэлектрик нуқталарида оксил агрегатлари ҳосил қилиб тўлиқ чўкмага тушади. Оксилларни изоэлектрик нуқталарида чўктирувчи реагентлар ишлатмай чўктириш жараёни изоэлектрик чўктириш дейилади.

Органик чўктирувчиларни изоэлектрик нуқта рН ига яқин рН да қўллаш ферментларни осон чўктириш ва эритувчини кам миқдорда сарфлаш учун хизмат қилади. рН кўрсаткичи изоэлектрик нуқтадан четга чиқса, чўкма унуми ва фермент фаоллиги 30-50% гача йўқотилади.

Фаол ферментни препарат ёки мўтадил структурали чўкма ҳолида олиш учун эритмада 10-12% атрофида қуруқ модда миқдори бўлиши керак. Кўп тадқиқотлардан маълумки, ферментларни чўктиришда, айниқса протеолитик ферментларни, қуруқ модданинг энг мўтадил миқдори 10% бўлиши керак.

Юқорида қайд қилинган омиллар қаторида фермент эритмаларини эритувчи билан алоқада бўлиш муддати ҳам катта аҳамиятга эга. Фермент саноатида тўхтовсиз ишлайдиган чўктирувчиларда ушбу вақтни жуда ҳам қисқартиришга эришилгандир, бу албатта фермент фаоллигини камайишини олдини олади.

Органик эритувчилар билан чўктириш самарадорлиги шу жараёнга мўлжалланган ускунага ҳам узвий боғлиқдир. Бундай ускуналар асосан фермент эритмаларини қабул қилгич, тўхтовсиз аралаштиргич, фермент эритмаси ва эритувчини тўхтовсиз равишда узатувчи контурлар, сепаратор ва автоматизация тизимларидан тузилган бўлади. Цилиндр шаклидаги аралаштиргичдан фермент эритмаси ва эритувчи мураккаб ҳаракат йўналиши бўйлаб қисқа вақт ичида аралашиб ўтади ва натижада ҳосил бўлган аралашма сепаратор қисмига узатилади.

Сепараторда чўкмага тушган оксил моддалари ажратиб олинади. Бундай қурилмада фермент билан эритувчининг алоқа муддати ўн маротабагача қисқартирилади ва ферментнинг чўкмага тушиш унуми 15-20% гача ортади. Сепараторда ажратилган чўкма ҳар хил усуллар билан мўтадил шароитда қуришиб олинади. Чўкма тепасида қолган суюқлик таркибида 50-75% гача эритувчи улуши бўлади ва ректификация бўлимида регенерация қилишга юборилади.

Органик эритувчилар билан чўктириш унуми продуцент ўстирилган озиқа муҳити таркибига ва фермент препаратини қуюқлаштирилганлик даражасига ҳам боғлиқдир.

ФЕРМЕНТЛАРНИ ТОЗАЛАШ УСУЛЛАРИ

Ферментлар ва бошқа оксил моддалари ҳар хил эримайдиган бирикмаларга адсорбцияланиш (сўрилиш) қобилиятига эга. Бу хусусият оксил аралашмаларини ажратишда ва айниқса ферментларни лаборатория шароитида тозалашда ҳамда гомоген бўлган фермент препаратларини олишда ишлатилади. Адсорбция усули, шу билан бирга колонкали хроматография усуллари ферментларни юқори даражада тоза ва кўп миқдорда олиш имконини беради.

Оксилларнинг муҳим адсорбентлари бўлиб ҳар хил ионалмашувчилар, яъни кальций фосфат,

алюминий гидроксид геллари ва маълум типдаги ферментлар учун махсус бўлган ҳар хил аффин адсорбентлар ҳисобланади. Ферментларни тозалаш ва оксилларни ажратиш технологияси қандай типдаги усулликка қарамай қуйидагиларга асосланади.

Фермент махсулотини ўз таркибига олган оксиллар аралашмаси маъқул бўлган эритувчида (буферда) эритилади ва шу эритувчи билан мувозанатланган колонкага юборилади. Кейин шу колонкадан маълум таркибга эга бўлган буферни ёки микдори ўсиб борувчи градиентли ювиш эритмаси, ёки бўлмаса ушбу фермент учун махсус бўлган боғловчи (лиганд) ёрдамида оксил босқичма-босқич ювиб олинади. Колонкадан ювиб олинган фермент препаратлари фракциялар тўпламида йиғилади ва ферментнинг тоза препаратини олиш учун бошланғич материал бўлиб хизмат қилади.

Ионалмашув хроматография усули

Бу усулда оксиллар электростатик куч ёрдамида боғланадилар, яъни бу ҳодиса зарядланган оксил сиртлари ва зарядланган ионалмашув бирикма гуруҳларининг зич қатлами ўртасида юзага келади.

Типик ионалмашувчи сифатида бўктирилган диэтиламиноэтилни (ДЭАЭ-) ёки карбоксиметил (КМ-) целлюлозани кўрсатиш мумкин. Улар бўктирилган ҳолатда зарядли гуруҳларнинг 0,5 М микдорига эга бўлади. Бу зарядлар колонкада қарама-қарши бўлган ионларни (метал ионлари, хлор ионлари, буфер ва х.к.) нейтраллайди. Одатда оксилнинг умумий заряд белгиси ион алмашувчига ўтирган ион белгиси билан бир хил бўлади ва колонкадан ўтиш жараёнида айнан уни сиқиб чиқаради. Шунинг учун ҳам бу жараён хусусиятига қараб "ион алмашув" жумласи қўлланилади.

Колонкада адсорбланган керакли оксилни ювиш учун аффин усулидан ташқари икки усулдан фойдаланилади.

Биринчи усул - буфернинг рН кўрсаткичини маълум даражага ўзгартириш билан ион кучини ошириб, адсорбент ва оксил ўртасидаги электростатик ўзаро таъсирни камайтиришдир. Бу усул умуман яхши натижа бермайди. Чунки буфер ҳажмини кичик бўлганлиги учун рН кўрсаткичини бирданига ўзгартириш оксил аралашмалари ва бошқа бирикмаларнинг ёмон ажралишига сабаб бўлади.

Кейинги йилларда бу усул хроматофокус усулига ўтказиш йўли билан такомиллаштирилмоқда. Бунда ювиш жараёнида амфолит типдаги буфер ҳажми юқори бўлган буферлардан фойдаланилади ва шу усул кейинчалик саноат миқёсида ўз ўрнини топиши мумкин.

Иккинчи усул - кенг миқёсда фойдаланилаётган калий ёки натрий хлорид тузлари ёрдамида градиент тузишга асосланган. Туз ионлари иштирокида мустақил оксил ва адсорбентлар ўртасидаги ўзаро тортиш кучи камаяди. Туз ионлари микдорининг ошиши билан адсорбентга боғланган оксиллар ўз ўринларини уларга бўшатадилар ва ўзлари колонкадан ювилиб чиқа бошлайдилар. Шу билан бирга туз ионлари таъсирида адсорбентлар ўзаро яқинлашиб оксил ҳаракати учун тор йўлқалар ҳосил қилади ва бу ҳодиса ферментларни колонкадан чиқишида фракцияларга ажратиб олиш имконини беради.

Ионалмашувчига боғланган ферментни аффинли ювиш ёрдамида ажратиш мумкин. Бунинг учун колонкага оксил билан боғланадиган махсус лиганд юборилади. Бунда оксил лиганд билан биргаликда тезда колонкадан ювилиб чиқади. Лекин керакли оксилни танийдиган ва уни сорбентдан ажратиб оладиган лигандни топиш жуда мушкул вазифадир. Шу билан бирга лиганднинг қандай зарядланганлиги ва микдорига алоҳида эътибор бериш керак. Акс ҳолда қарама-қарши ҳолатда лиганд ўзи ионалмашувчига боғланиб қолиши мумкин.

Аффинли (биоспецифик) хроматография усули

Бу усул оксил ва ферментларни тозалаш ва ажратишнинг адсорбция ҳодисасига асосланган усуллари ичида алоҳида ўринни эгаллайди. Кўпинча уни аффинли хроматография ёки биоаффинли, ёки биоспецифик хроматография дейилади.

Маълумки барча биологик фаол бирикмалар, хусусан ферментлар ҳам лигандлар ёки аффинли лигандлар деб номланадиган бирикмаларга махсус боғланиш хусусиятларига эгадир. Агарда шундай лигандларни инерт матрицага ковалент боғланса фақат керакли ферментни ушловчи ва қолган оксил ва

моддаларни ўтказиб юбуровчи махсус адсорбентни олиш мумкин.

Махсус ювувчилардан ёки жараён шароитлари фарқи асосида лигандни ферментга бўлган хусусиятини ўзгартириш йўли билан оксилни десорбцияга учратиб, тозалаш натижасида битта юқори тозалikka эга бўлган ферментни олиш мумкиндир. Лекин лиганд ва уни ушлаб турувчини танлаш жуда қийин вазифадир. Кўпчилик ҳолларда аффинли адсорбентларни синтез қилишда тозаланаётган ферментнинг хусусиятларини эътиборга олиш керак.

Бу жараён бошқа қийинчиликларга ҳам эга. Масалан, сорбент юқори спецификликка эга бўлмай керак бўлмаган бошқа ферментларни ҳам ушлаб қолиши ва натижада ферментни бу мураккаб комплексдан ажратиб олишни қийинлаштириши ҳам мумкин.

Аффинли хроматография учун ҳар хил турдаги эримайдиган сорбентлардан фойдаланилади, лекин энг кўп тарқалгани кўндаланг қилиб уланган агароза доначаларидир. Улар юқори босимда ўз шаклини сақлайди ва буферларни ҳамда эритувчиларни алмаштиришга бардошлидир.

Лигандларга бўлган талаблар эса жуда қаттиқлиги билан ажралиб туради, яъни улар матрицага шундай боғланган бўлиши керакки, оксиллар ҳеч қийинчиликсиз уларга келиб боғланиши ва бунинг учун матрица билан лиганд ўртасида кўприкча бўлиши керак. Булардан ташқари лиганд бошқа бирикмалар билан ўзаро боғланмаслиги, фақат матрицага боғланган ва ювиш, регенерация жараёнларига чидамли бўлиши шартдир.

Бу қўйилган шартларнинг оддий рўйхати ҳам ушбу жараённинг мураккаб ва кўп меҳнат сарф қилинишидан дарак беради. Шунга қарамай бу усул билан ўнлаб ферментлар тозаланган, лекин улар ҳали фермент саноатида кенг тарқалмаган.

Гел хроматография усули

Препаратив энзимологияда чидамли бўлмаган ферментларни «юмшоқ» (паст ҳароратли) шароитларда ажратишдан кўп фойдаланилади, яъни бунда фермент бутун тозалаш жараёни давомида эритма ҳолида бўлади. Бу усуллар орасида энг кенг тарқалгани гелфилтрация, электрофорез, изоэлектрик фокуслаш ва бошқалардир.

Фермент препаратлари технологиясида энг катта амалий аҳамиятга эга бўлгани - гелфилтрациядир. "Гелфилтрация" жумласи анча кўполроқ, лекин у илмий адабиётда жуда кенг тарқалган. Бу жараёни амалга ошириш учун дестран асосида олинган геллардан фойдаланилади ва улар ёрдамида ўлчамига қараб ҳар хил макромолекулаларни тез ажратиш мумкин.

Гел очик ҳолдаги кўндаланг тикилган уч ўлчамли молекула тури бўлиб, колонкаларни осон тўлдириш учун юмалоқ доначалар (гранула) кўринишида бўлади. Доначаларда кичик тешикчалари бўлиб уларга фақат жуда кичик молекулали бирикмалар кириб, йирик молекулалар эса кирмайди. Бу усул гелларнинг айнан ана шу хусусиятига асослангандир.

Бу усул ферментларни тозалаш ва ажратишда нафақат лаборатория, балки саноат миқёсида ҳам қўлланилади. Гелфилтрация учун кўндаланг тикилган декстран (сефадекслар ва сефакриллар) гелларидан, кўндаланг тикилган полиакриламид гелларидан (биогеллар), акриламид полимер занжири ёпиштирилган агароза геллардан (ультрагеллар) ва бошқа қаттиқ кўндаланг тикилган (*CL*-сефарозалар ва *S*-сефакриллар) агароза геллардан фойдаланилади. Колонкада фермент эритмасининг бир қисми гел доначалар орасида ва бир қисми эса доначаларнинг тешикчалари ичида жойлашади.

Гелфилтрация - бу тарқалувчан хроматографиянинг бир шакли бўлиб, эритилган моддалар эритманинг бир мунча юзада жойлашган ҳаракатчан ва ички томонида жойлашган кам ҳаракатли қисмларида тарқалган бўлади. Колонкада эритилган модданинг ушлаб қолиниш даражаси унинг гел тешикчаларига қара олиш қобилиятига боғлиқдир. Шунингдек, гелфилтрация жараёнида колонкадан аввал юқори молекулали моддалар ва кейин эса кичик молекулалари бирин-кетин чиқа бошлайди, бунда гел молекуляр тўр вазифасини бажаради. Бу жараён мукамал равишда олиб борилиши учун, гел тайёрланган материал эриган бирикмалар таъсирига жуда ҳам инерт бўлиши керак.

Афсуски бугунги кунда ишлатилаётган барча геллар инерт эмас ва баъзан маълум pH кўрсаткичида улар сўриш қобилиятини намоён қилиши мумкин. Масалан, шундай гелларга сефакрилларни киритиш мумкин. Гелфилтрация усули билан майда гел доначаларида юқори

босим остида жуда кўп ҳар хил моддаларнинг, шу жумладан оксилларнинг аралашмалари ажратилмоқда. Бу янги юқори босим остида суюқ хроматография услуги қисқа вақт ичида юқори даражали ажратиш имконини беради ва у ферментларни тозалашнинг охирги босқичларида жуда ҳам унумлидир.

5-мавзу. ФЕРМЕНТ ВА ҲУЖАЙРАЛАР ИММОБИЛИЗАЦИЯСИ

Режа:

1. Ферментлар иммобилизацияси ҳақида тушунча;
2. Иммобилизация қилиш усуллари;
3. Ферментни ташувчи билан боғланиш кучини оширувчи усуллар;
4. Адсорбция йўли билан иммобилизация қилишнинг афзаллиги ва камчиликлари;
5. Гель ичига киритиш йўли билан иммобилизация қилиш.

Охирги 25-30 йилда икки фан кимё ва биология орасида янги бир фан йўналиши бўлмиш кимёвий энзимология ташкил топди. Фаннинг бу йўналишини ташкил топишини асосий сабабчилари - бу ферментлар ва фермент ҳосил қилувчи микроорганизмларни ёки алоҳида ҳужайра ва тўқималарини иммобилизация ҳолатида олиш бўлди.

Иммобилизация қилинган ферментларни саноат миқёсида олиш ва уларни ишлатиш муаммоси жуда катта гуруҳ мутахассисларини ҳамкорликда ишлашларини тақозо этади. Бу муаммони ҳал қилишни долзарблиги эса, олий таълим олдида бундай мутахассисларни тайёрлашдек ўта муҳим муаммони қўяди. Бугунги кунга келиб бу муаммога бағишланган юзлаб монографиялар, илмий мақолалар тўпланмалари ҳамда минглаб илмий - экспериментал мақолалар чоп этилган.

Юқорида келтирилган манбалардан келтирилганидек, ферментлар тизими халқ хўжалигини ҳар хил тармоқларда: озиқ-овқат, фармацевтика, тўқимачилик, чорвачилик ва бошқа бир қатор соҳаларда кенг қўлланилиб келинмоқда.

Шундай бўлишига қарамасдан ферментларни қўллаш масаласи узоқ вақтлардан бери ривож топмасдан келган. Бунга асосий сабаб ферментлар ва ферментлар тизимининг иқтисодий қимматлиги эди. Ишлатилган ферментлар ташлаб юборилаверган, бунинг устига уларни ишлаб чиқаришни ўзи ҳам жуда қиммат бўлган.

Албатта, микробиология саноатини ривожлантириш ҳисобидан керакли ферментларни, керакли миқдорда ишлаб чиқаришни йўлга қўйиш мумкин. Аммо бу ҳам унчалик арзонга тушадиган маҳсулот эмас.

Бундан ташқари ферментларни ишлатишни тўхтатиб турадиган энг камида иккита сабаби бор:

- ферментлар сақлашда, айниқса ташқи муҳит таъсирига (ҳароратга) ўта чидамсиз;
- ферментларни қайта ишлатиш жуда мураккаб масала, чунки уларни реакция шароитидан ажратиш имконияти йўқ.

Мана шу сабабларга кўра ферментлардан фойдаланиш ўзини оқламай қўйган эди. Аммо, бугунги кунда бу муаммо бутунлай ҳал қилинган.

Иммобилизация қилинган ферментларни олиш технологиясининг яратилиши бу муаммога чек қўйди.

1916 йилда Д.Ж.Нильсон ва Е.Гриффин инвертаза ферментини кўмир майдасига адсорбция қилинганда (иммобилизация қилинганда), уни фаоллиги сақланиб қолганлигини кузатдилар. 20-30 йилларда оксил ва ферментларни адсорбция қилиш муаммоси бўйича қатор мақолалар эълон қилинган. Аммо бу мақолаларни моҳияти илмий муаммоларга бағишланган бўлиб, ишлаб-чиқариш билан боғлиқ бўлмаган.

1939 йилда Д.Ж.Пфанмюллер ва Г.Шлейхлар протеолитик ферментларни ёғоч қипиғига адсорбция қилиш бўйича биринчи патентни олишга мувофиқ бўлдилар ва олинган ферментни терига ишлов беришда ишлатиш мумкинлигини исботлаб бердилар.

Ферментлар ва сорбентлар орасида мустахкам конъюгатлар (боғлар) ҳосил қилиш мумкинлигини биринчилардан бўлиб 1953 йилда Н. Грубховер ва Д.Шлейглар кўрсатиб бердилар. Бу олимлар фермент билан сорбентни ковалент боғлар билан боғлаш мумкинлигини ва бу ҳолатда фермент фаолиятини сақлаб қолажагини исботлаб бердилар.

1950-60 йилларга келиб, бу соҳадаги илмий йўналишлар ишлаб чиқаришга узвий боғлаш асосида олиб борилди. Бу соҳани ривожланишда Г.Манеке ва Э.Качалскийларни хизматлари бекиёсдир.

Ферментларни адсорбентларга боғлаш натижасида гетероген катализаторлар ҳосил бўлиши ўз исботини топгач, 1971 йилда Хеникер (А+Ш) томонидан ферментлар муҳандислиги бўйича ўтказилган биринчи умумжаҳон конференциясида "Иммобилизация қилинган ферментлар" қонунга киритилди. Илмий адабиётларда баъзи вақтларда "эримайдиган ферментлар", "матрицага киритилган ферментлар" деган иборалар ҳам учраб туради. Уларнинг асосий моҳияти сувда эримайдиган сорбентларга ёпиштирилган (тармаштирилган, уланган ва х.к.) деган маъно билан боғлиқ.

Аммо "иммобилизация" сўзининг кенгроқ тушиниш лозим, хусусан оксил молекуласининг майдонда ҳаракатдан тўхтатиш билан боғлиқ бўлган ҳар қандай тадбир оксилни иммобилизация қилиш деб қаралмоғи лозим. Юқорида баён этилган усуллардан ташқари, молекулалар ичидаги ёки молекулалар аро "Боғлаш", оксилни кичик молекулали икки функциялик молекулалар орқали бошқа оксилга, юқори молекулали полимерларга, жумладан адсорбентларга ҳам "боғлаш" ёки "улаш" усуллари ҳам иммобилизация усулларига киради.

Иммобилизация қилинган ферментлар, оддий сувда эрувчи ферментлар олдида бир қатор устунликка эга бўладилар.

Биринчидан, уларни реакцияон муҳитидан ажратиш олиш жуда ҳам осон, бу эса:

- а) реакцияни ҳоҳлаган вақтда тўхтатиш;
- б) биокатализаторни (ферментни) қайта ишлатиш;
- в) керакли маҳсулотни тоза ҳолда олиш (фермент билан аралаштирилмаслик)

имкониятини беради.

Охирги бандда (в) кўрсатилган устунлик озиқ-овқат ва фармацевтика саноатида жуда катта рол ўйнайди.

Иккинчидан, иммобилизация қилинган ферментларни ишлатиш шароитида тўхтовсиз олиб боришга имкон беради, масалан, оқиб ўтадиган махсус устунларда (колонкаларда) ва ферментатив реакциянинг тозалигини бошқариш, демак, керакли маҳсулотни миқдорини ошириш (оқиш тезлигини ўзгартириш ҳисобидан) имкониятини беради.

Учинчидан, ферментни иммобилизация ёки модификация қилиш уни хосса ва хусусиятларини керакли томонга ўзгариш жараёнларини ташкил қилиш мумкин. Иммобилизация қилинган ферментларни олиниши, ферментларни ҳаётга тадбиқ қилишни янги, авваллари имконияти бўлмаган йўллари очиб берди.

1.Иммобилизация қилиш усуллари

Иммобилизация қилиш усуллари иккига бўлинади:

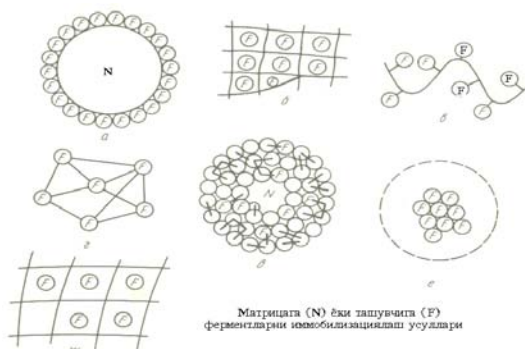
- физикавий йўллар билан иммобилизация қилиш;
- кимёвий йўллар билан иммобилизация қилиш;

Ҳар қайси усулда иммобилизация қилишда қуйидагиларга эътибор бериш керак; "ташувчилар" (сорбентлар) нинг табиати ва физик-кимёвий хусусияти органик ва ноорганик табиатга эга бўлишлари мумкин.

Иммобилизация қилишга мўлжалланган "ташувчи" ларга қуйидаги талаблар қўйилади:

- кимёвий ва биологик мўтадиллик;
- механик нуқтаи назардан мустахкамлик;
- фермент ва уни субстрати учун ўтказувчанлик;

- технологик жароёнлар учун зарур бўлган шаклда олинishi
- осонлиги (гранула, мембрана, варак ва хоказо ҳолатда).
- реакцион шаклда тез кириши;
- юқори гидрофиллиги (иммобилизация жараёнини сувли муҳитга ўтказиш учун);
- арзонлиги.



Табиийки, бу талабларни барчасига жавоб бераоладиган ташувчилар йўқ. Шу сабабли ҳам иммобилизация учун жуда ҳам кўп материаллардан фойдаланишга тўғри келади.

2. Органик полимерли ташувчилар

Бундай полимерларни икки синфга бўлиш мумкин: табиий полимерлар ва сунъий полимерлар. Ўз навбатида табиий полимерларни ҳам биокимёвий хоссаларига қараб гуруҳларга бўлиш мумкин; полисахаридлар; оксил, липид табиатли ташувчилар. Сунъий, яъни синтез йўли билан олинган полимерлар ҳам гуруҳларга бўлинади, масалан, макромолекуларни асосий занжирни кимёвий тузилишига қараб, полиметиленик, полиамидлик, полиэфирлик ташувчилар ва х.к.

Иммобилизация қилиш усулли, ферментни хусусиятини ва ишлатилишига қараб, "ташувчи"ларга бир қатор қўшимча талаблар қўйилади: ковалент иммобилизация қилинганда "ташувчи" ферментни фаоллигини белгиловчи қисми билан боғланмаслиги лозим; (ферменти фаоллик маркази ўз ҳолда бўлиши шарт), фермент фаоллигини пасайтириш хусусиятлари бўлмаслиги шарт.

Иммобилизация қилиш жараёнида қуйидагиларни билиш лозим; "Ташувчи" ва фермент ҳар хил зарядларга эга бўлсалар, иммобилизация жараёни тез ва мустаҳкам кечади, аксинча бир хил зарядга эга бўлсалар жараён кийин кечади; "ташувчини" заррачалари қанча кичик бўлса, сорбция қилиш хусусияти шунча баланд бўлади. Иммобилизация жараёнида кўпроқ полиметиленик типидagi "ташувчи" лар бошқаларга нисбатан кенгроқ ишлатилади.

3. Физик усулларда иммобилизация қилиш

Юқори кўрсатиб ўтилганидек, ферментни иммобилизацияси дейилганда, уни (ферментни) қандай бир алоҳида фазага киритилиши сув фазасидан ажралиб турадиган ва шундай вазиятда ўзини асосий хусусияти - субстрат ёки эффекторлар билан алоқада бўлиш имкониятидан жудо бўлмаслигини тушинилади.

Шу аниқликдан келиб чиққан ҳолда, физикавий иммобилизация қилиш усуллари тўрт гуруҳга бўлиш мумкин:

- сувда эримайдиган "ташувчи" ларга адсорбция қилиш;
- гель тешикчаларига киритиш;
- ярим ўтказгич мембраналар ёрдамида ферментни реакцион тизимини бошқа қисмидан ажратиш;
- ферментни икки фазалик реакцион муҳитга киритиш, бундай шароитда фермент сувда эрувчан бўлади ва иккинчи фазага кира олмайди.

Келтирилган классификация шартлидир, чунки бу усуллар орасида аниқ ажримларни ўрнатиш мумкин эмас. Масалан, гель тешикчаларига киритиш усули билан иммобилизация қилишни, ярим ўтказгич мембраналар орқали ажратиш туриш деб ҳам қараш мумкин. Шунга қарамасдан бу

классификация физикавий усуллар билан иммобилизация қилишни бир тизимга солишда ёрдам бера олади.

Адсорбция қилиш орқали иммобилизация қилиш, энг кўхна усулларида ҳисобланади. Юқорида айтиб ўтилганидек, 1916 йилда Дж.Нильсон ва Э.Грифин инвертаза ферментини фоаллаштирилган кўмирда ва алюминий гидроксиди гелида иммобилизация қилганлар. Худди шу усулдан кейинроқ, 1969 йилда И.Шибата L-аминоацилаза ферментини иммобилизация қилишда фойдаланган. L-аминоацилаза ферменти N-ацетил-DL-аминокислоталарни бир бирларидан ажратишда саноат миқёсида ҳозиргача ишлатилиб келинмоқда. Умуман адсорбция усулида иммобилизация қилиш бошқа усуллардан осонлиги, вазифани тез бажариш мумкинлиги, ташувчиларни арзонлиги ва бошқа бир қатор устунликларга эга бўлганлиги учун ферментлар муҳандислигида кенг қўлланилиб келинмоқда.

4. Адсорбцион иммобилизация қилиш учун "ташувчи" лар

Адсорбцион иммобилизация учун ишлатиладиган "ташувчи" ларни икки синфга - органик ва ноорганик ташувчиларга бўлиб ўрганиш мумкин.

Ноорганик ташувчилар сифатида кремнезем, алюмин, титан ва бошқа элементлар оксидлари, альюмосиликатлар (лойлар), шиша, сопол, фоаллаштирилган кўмир ва бошқалар кенг ишлатилади.

Органик ташувчилар орасида кенг тарқалганлари ҳар хил полисахаридлар полимерли ионалмашув смолалари, коллаген, товук суяклари ва бошқалардир. Ташувчилар кукун, кичик шарчалар, гранулалар сифатида ишлатилади. Баъзи бир ҳолатларда, гидродинамик қаршиликни пасайтириш мақсадида, тор параллел каналлар сақловчи монолитлар сифатида ҳам чиқарилади.

Ташувчиларни энг асосий хусусияти сорбция қилиш қобилияти, тешикчаларини ўлчами, механик ва кимёвий барқарорлигидир.

5. Адсорбцион иммобилизация қилиш усуллари

Адсорбция қилиш йўли билан иммобилизация қилиш энг содда усуллардан бўлиб, фермент эритмасини "ташувчи" билан аралаштириш йўли билан амалга оширилади. Ёпишмасдан ферментни ювиб ташлагач, иммобилизация қилинган фермент ишлатилишга тайёр бўлади. Адсорбцион иммобилизация қилинган ферментларни олиш учун қуйидаги услубий кўрсатмалардан фойдаланади.

Статистик усул энг осон йўл бўлиб "ташувчи" фермент эритмасига ташланиб (солиниб) ҳосил бўлган аралашма, маълум вақтга ташлаб қўйилади. Иммобилизация ферментни ўз ўзидан диффузияси туфайли бошланиб, адсорбция билан тугалланади. Бу усулни камчилиги, фермент эритмаси билан "ташувчи" аралашмаси узок вақт (бир неча кунга) ташлаб қўйилиши лозим. Лаборатория шароитида кўпроқ аралаштириш усули ишлатилади. Бу усулда статистик усулдан фарқли ўлароқ фермент эритмаси билан "ташувчи" доимий равишда аралаштириб турилади.

Аралаштириш учун магнит аралаштиргич, механик аралаштиргич ёки микробиологик тебратгичдан фойдаланиш мумкин. Бу усул олдингисидан анча устун туриб "ташувчи" сатҳида ферментни бир текис жойланишини белгилаб беради. Баъзида адсорбцион иммобилизация қилиш учун электрочўктириш усулидан фойдаланилади. Бунинг учун фермент эритмасига иккита электрод туширилади, улардан биттасини сатҳида бир қатлам "ташувчи" суртилган бўлади. Электродлар токка уланганда фермент сатҳидаги фаол гуруҳлар ($-NH_2$; $-COOH$ ва х.к.) ҳисобидан "ташувчи" сақланаётган электрод томонидан ҳаракат қилади ва уни сатҳида чўкади.

Технологияда фойдаланиш учун энг қулай усул - колонкалардан ўтказиш усулидир.

Бу усулни икки модификацияси бор, улардан биридан "ташувчи" тўлдирилган колонкадан тепадан пастга қараб, микронасослар ёрдамида фермент эритмаси ҳайдалади, икинчисида эса тескариси, фермент пастдан тепага қараб йўналтиради. Бу усулни афзаллик томони, ферментни ҳайдаш, ювиш, ва кейинги ферментатив жараёнлар, ҳеч қандай манипуляциясиз бир колонкани ўзида олиб борилади.

6. Фермент ва "ташувчи" орасидаги адсорбцион ўзаро таъсирнинг табиати

"Ташувчи" сатҳида адсорбция бўлган фермент молекулалари ҳар хил кучлар ҳисобига, хусусан нонспецифик Ван-дер-Ваальс, электростатик, ўзаро таъсирлар, водород боғлари ва гидрофоб боғлар ҳисобига амалга оширилади. Санаб ўтилган боғларни нисбий иштироки фермент молекуласидаги

фаоллик гуруҳлари ёки "ташувчи"нинг кимёвий табиатига боғлиқ бўлади. Кўпчилик ҳолларда асосий вазифани электростатик ўзаро таъсирлар ва водород боғлари ташкил этади.

Баъзи вақтларда ўзаро таъсир кучи оқибатида "ташувчи"нинг тузилиши бузилишигача бориш мумкин. Масалан, баъзи ўсимлик хужайраларини цитодекс гранулаларига адсорбция қилинганда хужайра девори деформацияга учрагани кузатишган.

7. Ферментлар адсорбциясига таъсир этувчи омиллар

Адсорбция ўтиш жараёни ва фермент билан "ташувчи" орасидаги боғни мустахкамлиги, кўпчилик ҳолларда иммобилизация қилиш шароитига боғлиқ бўлади.

Фермент адсорбциясига таъсир этувчи омилларга қуйидагилар киради: ташувчини ғоваклиги ва сиртини фаоллигидир.

Ташувчини сорбция қилиш ҳажми унинг сиртини фаоллигига тўғри пропорционал оксил ёки ферментга келганда бу қонуният фақатгина ташувчини ғоваклиги оксил молекуласидан анчагина катта бўлгандагина ўз кучини саклайди. Ташувчини ғоваклиги жуда кичик бўлганда, ферментлар ғовакларга сиғмасалар, ферментлар учун ташувчилар сатҳининг маълум бир қисмигина фойдали бўлади ҳолос.

Бундай пайтларда ташувчининг сорбция қилиш имкониятлари жуда кам бўлади, бошқача қилиб айтганда, ғоваклар қанча кичик бўлса, ташувчининг адсорбция қилиш имкониятлари шунча кам бўлади. Ғовакларни мўтадил ҳажмини ҳисоблашни биринчилардан бўлиб буни 1976 йилда Р.Мессинг таклиф этган.

У шиша ва сопол материаллардан ташувчи сифатида фойдалана туриб, уларни ғовакларини катталигини (ҳажмини) ўлчаб чиқди ва ғовакларни катталиги фермент бўйидан тахминан 2 маротаба катта бўлган ҳолларда ташувчини адсорбцион имкониятлари максимум бўлишини тажрибалардан исботлаб берди.

Бундай ҳолда субстратни молекуляр ўлчами ферментдан анча кичик бўлмоғи ва сорбция қилинган фермент ғовакларига бемалол кириб туришлари лозим, албатта.

Субстрат молекуласининг ҳажми ферментникидан катта бўлган ҳолларда ташувчининг ғоваклиги субстрат молекуласи билан белгиланади. Баъзи бир ҳолларда субстратни ўзи ташувчи вазифасини бажариши ҳам мумкин. Масалан, целлюлаза ферментини иммобилизация қилиш учун унинг субстрати бўлган целлюлозадан кенг фойдаланилади.

8. pH белгилари

Реакция муҳити иммобилизация қилиш жараёнида жуда катта аҳамиятга эга, айниқса сорбция, электростатик ўзаро таъсир ёрдамида амалга оширилган ҳолатларда.

Бунга асосий сабаб pH ўзгариши билан оксил ёки ташувчининг сорбция учун жавобгар бўлган ионоген гуруҳларни ионизацияси ўзгаради. Ионалмашув хоссаларига эга бўлмаган ташувчилардан фойдаланганда, сорбция оксил ёки ферментни изоэлектрик нуқтасида амалга оширилса яхши натижа беради.

Аммо бу қонуниятни четлаб ўтиш ҳоллари ҳам учраб туради. Масалан, альбуминни латексга сорбция бўлишини ҳар хил pH да ўрганиб чиқилганда бу жараёни pH га алоқадорлиги W симон бўлганлиги, кўмирда адсорбция қилинганда эса мўтадил pH 3 дан 6 гача ўзгариши, бу ўзгариш кўмирни табиатига боғлиқлиги исботланган.

9. Ион кучи

Фермент билан ташувчи орасидаги боғланишни кучига таъсир кўрсатувчи омилдир. Тузларни юқори миқдорда ташувчи сиртидан электростатик йўл билан боғланган ферментни сиқиб чиқаради.

Бошқача қилиб айтганда, ион кучини ошириши билан ферментни десорбцияси ошиб боради. Баъзи ҳолларда бунга аксинча таъсир ҳам учраб туради, буни оксилни "тузланиши" деб аталади.

10. Ферментнинг миқдори

Эритмада ферментни миқдори ошиб борган сари, уни сорбция бўлиши ва иммобилизация бўлган ферментни каталитик фаоллиги ошиб боради.

Иммобилизация бўлган фермент фаоллигини, эритмадаги фермент миқдorigа нисбатан таққослаб ўрганганда шу нарса маълум бўлдики, ферментни эритмадаги миқдорини ошиб бориши

билан маълум нуктагача ферментни каталитик фаоллиги ошиб боради ва ундан кейин ўзгармасдан қолади ва ҳатто камайиши ҳам мумкин.

Текширишлар шуни кўрсатдики, ферментни фаоллиги ташувчи сатҳини бутунлай қоплаб олгунга қадар фаоллик ошиб боради, кейин эса фермент 2-чи, 3-чи қават ҳосил қилади ва х.к. Охирида, ташувчининг энг тепа қисмида ёпишган ферментлар фаоллик кўрсатади, тагида қолганлари эса субстрат билан алоқа қилаолмайдилар ва ўз-ўзидан "ишсиз" қоладилар. Шунинг учун ҳам иммобилизация бўлган ферментни фаоллиги камаяди.

11. Ҳарорат

Ҳароратни ошиши адсорбция жараёнига икки хил таъсир қилади. Биринчидан, ҳароратни ошиши ферментни инактивациясига (денатурация) олиб келади, иккинчи томондан эса ҳароратни ошиши ферментни ташувчи ғовақларига диффузиясини кучайтириш ҳисобидан, фермент фаоллигини ошишига олиб келади.

Демак, адсорбция йўли билан иммобилизация қилишни мўтадил шароити бўлиш керак. Бундай ҳарорат адсорбция қилинадиган ферментни табиати ва ташувчи сатҳига боғлиқ бўлиб, ҳар бир фермент ёки ташувчи учун қатор тажрибалар орқали топилади.

Шундай қилиб, ферментларни адсорбция йўли билан иммобилизация қилиш бир қатор омилларга боғлиқ бўлиб, фақат тажрибалар асосида аниқ топилади. қуйида фермент билан ташувчи орасидаги боғни кучайтиришга хизмат қилувчи омиллар ҳақида фикр юритамиз.

12. Ферментни ташувчи билан боғланиш кучини оширувчи усуллар

12.1. Олдиндан модификация қилинган ташувчиларга иммобилизация қилиш

Ташувчининг олдиндан модификация қилиш адсорбция кучини кескин оширишга олиб келади. Бундан ташқари, фермент молекуласи атрофида махсус шароитлар яшаш ҳисобидан, олдиндан модификация қилинган ташувчида иммобилизация қилинган ферментни каталитик хусусияти ҳам ортиб боради.

Бунинг устига, олдиндан модификация қилмаслик адсорбция қилинган ферментни фаоллигини бутунлай йўқолишигача олиб келиш мумкин. Масалан, агар ферментни мўтадиллиги нордон шароитда паст бўлса, силикагельга сорбция қилинган ферментни фаоллиги бутунлай йўқолади, чунки, силикагельни сатҳи нордон муҳитга эга ($pH \approx 4,0$).

Бундай шароитда, иммобилизациядан олдин силикагельни маълум pH га эга бўлган буферда ферментни мўтадил pH га тўғри келган pH да сақлаб туриш лозим бўлади.

Худди шундай муаммо, фаол марказида металл сақлайдиган ферментлар билан ишлаганда келиб чиқади. Бунга сабаб, баъзи бир ташувчилар ўзларига металл ионларини тортиб олиш қобилиятига эгалар. Бундай ташувчиларда адсорбция қилинган ферментлар, ўз фаол марказидаги метални чиқиб кетиши ҳисобидан фаолиятларини йўқотишлари мумкин. Бу ҳолни бартараф этиш учун, ташувчини махсус металл ионлари сақлаган эритмаларда узоқ вақт ушлаб туриш ва шу туфайли уни металл ионига нисбатан бўлган эҳтиёжини қондириш мумкин бўлади.

Ташувчиларни металл ионлари билан тўйинтириш адсорбция йўли билан иммобилизация қилишни мўтадиллаштиришда ҳам ишлатилади. Ташувчи сирти металл ионлари билан тўйинтирилганда (бунинг учун Ti , Sn , Zr , V ва Fe ишлатилади), ферментни сорбция қилиш хусусияти ортади, бунга сабаб металл иони фермент билан ташувчи орасида кўприк бўлиб хизмат қилишидир. Иммобилизациянинг бу усули, целлюлоза, нейлон шиша филтър коғоз каби ташувчилардан фойдаланганда яхши натижалар бериши исботланган.

12.2. Олдиндан модификация қилинган ферментларни иммобилизация қилиш

Ионалмашувчи ташувчиларга адсорбция йўли билан иммобилизация қилишда изоэлектрик нуктаси ва pH –мўтадиллиги бир-бирига яқин бўлган ферментлар билан ишланганда қатор муаммолар пайдо бўлади. Фермент билан ташувчи орасидаги мустаҳкам боғланиш фақатгина, изоэлектрик нуктадан узоқроқ бўлган pH да, яъни ферментни каталитик хусусияти паст бўлган шароитда амалга оширилади. Шунинг учун, ҳам ферментни олдиндан модификация қилиш, яъни

фермент молекуласига янги ионоген гуруҳлар (поликислоталар, карбоксиметил, целлюлоза, янтарь кислотаси ва х.к.) киритиш мақсадга мувофиқ бўлади. Масалан, L-химотрипсин хлортриазинли ранг билан аралаштирилганда, уни изоэлектрик нуқтаси ишқорий томонга силжиши, ва шу туфайли фермент кўпгина ташувчиларга адсорбция бўлиши, оқибат натижада эса каталитик фаоллиги сақланиб қолиши исботланган. Бошқа бир мисол, L-химотрипсинни КМ-целлюлоза билан модификация қилинганда, фермент нейтрал рН муҳитида ДЭАЭ-целлюлозада ёки ДЭАЭ-сефадексга фаоллиги сақланган ҳолда иммобилизация бўлади.

12.3. Фермент ташувчи боғини мустахкамлигига таъсир этувчи бошқа омиллар

Иммобилизация бўлган ферментни ташувчи сатхидан осон ювилиб кетмаслиги учун адсорбция қилинган фермент қатлами бифункционал агентлар билан ишлов берилади. Натижада, ташувчи сатхида ферментларни бир-бирларига боғланган ҳолатидан иборат юпқа пленка ҳосил бўлади. Бифункционал агент сифатида глутаральдегид, госсипол ва бошқаларни ишлатиш мумкин.

Иммобилизация қилишни оригинал йўли профессор К.Мартинек томонидан намойиш этилган. Бунинг учун қисман кимёвий деструкцияга учраган нейлон ипларидан фойдаланилади. Ташувчи, фермент эритмасига солинади ва механик тортилади, натижада нейлонни ғоваклари йириклашиб, унга ферментнинг жойлашиши осонлашади. Маълум вақтдан кейин тортиб турган куч олинади ва нейлон яна ўз ҳолатига келади, фермент эса ғовакларда сиқилиб қолади. Электр токи ёрдамида ушлаш усули, иммобилизациянинг янги усулларида бўлиб, мембраналар ёрдамида ажратилган электродлар билан коллекторларда электр майдони ҳосил қилинади. Коллектор қилиб силикагел, ион алмашув смолалари, минераллар ишлатилиши мумкин. Фермент коллекторларда электростатик ва диполь-диполлик ўзаро таъсир кучлари орқали ушланиб қолади. Бу усулни ёмон томони шундан иборатки, иммобилизация тизими ҳамиша электр токи таъсирида бўлиши шарт. Ток узилса ёки ўчса фермент ташувчидан ювилиб кетади.

13. Адсорбция йўли билан иммобилизация қилишнинг афзаллиги ва камчиликлари

Афзаллиги	Камчилиги
Сорбентнинг арзонлиги	Фермент ва ташувчи орасидаги боғни мустахкам эмаслиги
Экспериментларни осонлиги	Умумий ягона йўриқномани йўқлиги
Бир вақтни ўзида ферментни тозалаш мумкинлиги	

14. Гель ичига киритиш йўли билан иммобилизация қилиш

Бу усулни моҳияти шундан иборатки, фермент молекуласи, қаттиқ тўқилган полимер занжирларидан иборат бўлган гель ҳосил қилувчи учламчи элақларга ўрнатилади. Занжир боғлари орасидаги масофа фермент молекуласидан кичик бўлгани учун, у маҳкам сиқилиб туради ва полимердан чиқиб кета олмайди. Фермент билан ташувчи орасидаги боғни мустахкамлигини оширувчи омил ролини фермент ва ташувчи гель орасида пайдо бўлган водород боғлари ҳам ўйнаши мумкин.

Полимер занжирлари орасидаги бўшлиқ сув билан тўлдирилган бўлади. Масалан, акрил кислотаси ҳосилалари асосида пайдо бўлган гелда, унинг миқдориغا қараб, 50 дан 90% гача сув бўлиши мумкин.

Ферментларни гелда иммобилизация қилишнинг икки усули бор. Биринчиси, фермент мономер эритмасида эритилади сўнгра полимеризация қилинади. Бундай эритмага кўпчилик ҳолларда бифункционал агентлар ҳам қўшилади.

Иккинчиси, П.Бертфельд ва Дж.Уэнлар ишлатган N-N' метилен-бисакриламидни полимеризация қилиш асосида олинган иммобилизацияланган ферментлар.

Гельга киритиш йўли билан иммобилизация қилиш усули ўзининг соддалиги билан ажралиб туради. Бу усул билан ферментни хоҳлаган геометрик конформацияда (сферик заррачалар ва х.к.) олиш ва ферментни ташувчи ичида бир текис тарқалишига эришиш мумкин.

Кўпчилик полимер геллар ўзларининг механик ва кимёвий иссиққа чидамлилиги билан ажралиб туради. Бу хусусиятлар эса ферментларни бир неча мартабалаб ишлатиш имконини беради. Бу усул универсал усул бўлиб нафақат барча хилдаги ферментлар, балки полифермент тизимлар, хужайра ва хужайра фрагментларини иммобилизация қилиш учун ҳам тўғри келади. Бу усулни ижобий томонларидан яна бири - уни ферментга мўтадиллик бериш имкониятидир. Ва ниҳоят бу усулда иммобилизация қилинган фермент, бактериологик зарарланишдан қўрқмайди чунки, фермент молекуласидан катта бўлган бактериялар гелни ичига кира олмайдилар.

Усулнинг энг катта камчилиги баъзи бир ҳолатда полимер матрикслари субстратни диффузияси халақит беради ва шу туфайли ферментни фаоллиги паст бўлиши мумкин. Шундай экан, субстрат сифатида юқори молекулали моддалар ишлатилганда бу усулдан бутунлай фойдаланиш мумкин эмас.

15. Ярим ўтказгич мембраналар ёрдамида иммобилизация қилиш

Бу усул кичик молекулали субстратни сувдаги эритмаси, катта молекулага эга бўлган фермент эритмасидан ярим ўтказгич мембрана ёрдамида ажралиб туришига асосланган. Ярим ўтказгич мембрана субстратни осон ўтказди, фермент эса мембранадан ўта олмайди. Бу усулни ҳар хил модификацияси, ярим ўтказгич мембраналарни олиш ва уларни табиати асосида яратилгандир.

Микрокапсулалаш - усули биринчи бўлиб, 1964 йилда Т.Чанг томонидан яратилган. Бу усул - ферментни сувдаги эритмасини микрокапсулалар ичига жойлаштиришдан иборат. Майда тешикли полимер плёнкалардан ташкил топган кичик копточалар ичидаги ферментларни ташқарига чиқиши белгилаб қўйилган. Капсулаларни олиш усулига қараб, уларни ўлчами ҳал хил бўлади (10 дан 100 микрометр гача).

Микрокапсулалар олишнинг икки усули мавжуд бўлиб, биринчисида ферментни сувдаги эритмаси ПАВ (сирт фаол моддалар) сакловчи диэтилэфири билан кучли аралаштириш натижасида дисперс ҳолатга ўтказилади. ПАВ - бу ерда эмульгатор вазифасини бажаради. Ҳосил бўлган эмульсияга, тўхтатмасдан полимернинг эфирдаги эритмаси қўшиб борилади.

Полимер (нитрат целлюлоза), сувда эримаслиги сабабли эмульсияга теккан жойда юпқа мембрана микрокапсула ҳосил қилади. Тайёр бўлган микрокапсула центрифуга ёрдамида ёки филтрлаш йўли билан ажратиб олинади.

Микрокапсула ҳосил қилишнинг иккинчи йўли - икки модданинг фазалараро поликонденсация қилишига асосланган. Моддалардан бири сувнинг майда эмульсияларида иккинчиси эса органик фазада эриган бўлади. Кўп тарқалганлардан бири полиамид микрокапсуласи.

Бу микрокапсула 1,6-гексаметилендиамин (сув фазаси) ва себацин кислотасининг хлор гидриди (органик фаза) асосида олинади. Бу усул фақатгина юқори рН га чидамли бўлган (диамин эритмаси) ферментлар учун ишлатилиши мумкин. Микрокапсула ҳосил қилиш учун ишлатиладиган фермент эритмаси 10% атрофида инерт оксил моддаси (гемоглобин) саклаши лозим. Бу оксил капсула ичида керакли босим бўлишини ҳамда ферментни мўтадиллигини таъминлайди. Ферментни мўтадиллигини ошириши учун глутаральдегид билан ишлов беради, баъзида эса адсорбция ёки гелга киритиш йўли билан иммобилизация қилинади.

Баъзи ҳолатларда иммобилизация қилиш учун молекулалари ковалент боғланган оксиллардан ташкил топган мембраналардан ҳам фойдаланилади.

Иккиламчи эмульгирлаш. Бу йўл билан иммобилизация қилганда, аввало ферментни сувдаги эритмасини органик полимердаги эмульсияси тайёрланади. Тайёр эмульсияни яна бир бор сувда дисперсия қилинади. Натижада, ферментни сувдаги эритмасини саклаган органик моддани (полимерни) эмульсияси ҳосил бўлади. Вақт ўтиши билан органик эритма қотади, ва иммобиллашган фермент сакловчи полимер заррачалари ҳосил бўлади.

1972 йилда С.Мэй ва Н.Ли лар бу усулни модификация қилдилар ва мембрана ҳосил қилувчи материалар сифатида сувда эримайдиган полимер ўрнига катта молекуляр массага эга бўлган суюқ углеводородлардан фойдаланишни тавсия қилдилар. Бу усул суюқ мембраналарда иммобилизация қилиш деб аталди. Бундан ташқари толага киритиш, липосомага киритиш, микроэмульсия ҳосил қилиш каби бир қатор усуллар мавжуд.

16. Ферментларни иммобилизация қилишининг кимёвий усуллари

Кимёвий усулларни бошқа усуллардан асосий фарқи кимёвий таъсир натижасида фермент билан ташувчи орасида қўшимча ковалент боғи пайдо бўлади. Бу усулда иммобилизация қилинган ферментларни камида иккита устунлиги бор. Биринчидан, фермент ва ташувчи орасидаги ковалент боғ, ҳосил бўлган конъюгатни юқори мустаҳкам қилади. Бошқача қилиб айтганда фермент иштирокида ўтадиган реакцияларни рН, ҳарорати ва бошқа кўрсаткичларини ўзгартириш, ферментни десорбциясига, шу туфайли олинадиган маҳсулотни ифлосланишига олиб келмайди.

Бу эса айниқса медицина, озиқ-овқат маҳсулотлари, аналитик ишлар учун реактивлар олишда ўта муҳим аҳамият касб этади. Иккинчидан, кимёвий модификация ферментни фаоллигини ва мўтадиллигини оширишига олиб келади. Фақатгина кимёвий йўл билан, кўп нуқталик боғланишлар натижасида ферментни мўтадиллигини ошириш мумкин. Бу усулни камчилиги, баъзи-бир ферментлар кимёвий модификация жараёнида ўз фаоллигини йўқотиб қўядилар.

2-қисм. ХУЖАЙРА ИНЖЕНЕРИЯСИ

(ўсимликшунослик асосида)

6-мавзу. ХУЖАЙРА ВА ТЎҚИМА ИНЖЕНЕРИЯСИ

Режа:

1. Хужайра биотехнологияси ҳақида тушунча;
2. Хужайралар ва тўқималарни биотехнологик ажратишнинг йўналишлари;
3. Хужайра ва тўқималарни ажратишнинг усуллари.

Хужайра биотехнологияси

Хужайра биотехнологияси – хужайра, тўқима ва протопластларни ишлатишга асосланади. Хужайраларни манипуляция (фаолиятига қандайдир ўзгаришлар киритиш) қилиш учун, уларни ўсимликдан ажратиб олиш ўсимлик организмидан ташқарида яшаши ва кўпайиши учун шароит туғдириб бериш лозим. Ажратиб олинган хужайра ва тўқималарни сунъий озуқа муҳитида, стерил шароитда (*in vitro*) ўстириш, усули ажратилган тўқималар культураси деб ном олди ва уларни биотехнологияда ишлатиш мумкинлиги сабабли, катта аҳамият касб этди.

Биотехнология узок - узоклардан маълум бўлсада, алоҳида амалий фан сифатида ўтган асрни иккинчи ярмидан бошлаб, инсоният энг аввало ўзи учун ўта зарур бўлган яъни озиқ-овқат, энергетика, заҳира (ресурс), атроф – муҳитни муҳофазаси ва х.к. муаммоларни тубдан янги асосда ечиши зарурлигини сезганидан кейин мужассамлана бошланди. Биотехнологик жараёнлар сунъий озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлар, ўсимлик ва хайвон тўқималари, хужайралари ва органларидан фойдаланишга асосланади. Ҳозирги вақтда дунёни кўплаб мамлакатларида биотехнологияни ривожланишига алоҳида эътибор берилмоқда. Бунга асосий сабаб, биотехнологияни бошқа технологияларга нисбатан бир қатор устунликка эгалигидир. Масалан, биотехнологик жараёнлар жуда кам энергия талаб қиладилар, деярли чиқиндисиз, экологик тоза ва х.к. Шунинг билан бир қаторда, биотехнология стандарт жиҳозлардан ва препаратлардан фойдаланади ва иқлим шароитига қарамасдан ҳамда кўп майдон эгалламаган ҳолда жараёнларни йил бўйи ўтказишга асосланади. Айтиб ўтилган устунликлар, ўсимликларни ва хайвонларни хужайралари, тўқималари ва органларига ҳам тегишлидир.

Ажратиб олинган хужайралар ва тўқималарни биотехнологиядаги ролини уч йўналишда кўриш мумкин:

Биринчи йўналиш ажратиб олинган ўсимлик хужайрасини тиббёт, ветеринария, косметика ва бошқа соҳалар учун зарур бўлган иккиламчи метаболитлар : алколоидлар, стероидлар, глюкозидлар, гормонлар, эфир мойлари ва бошқа биологик фаол моддалар синтез қилиш имконияти билан боғлиқ. Маълумки, иккиламчи метаболитлар қаттиқ (агарли) ёки суюқ озуқа муҳитида

ўстирилган каллус тўқималардан олинади. Хужайра технологияси асосида диосгенин – диоскоре хужайрасидан; аймолин – илон рацвольфи хужайрасидан; умумий куч берувчи моддалар – женьшен хужайрасидан; ва х.к. ажратиб олинади ва тиббиёт ҳамда парфюмерияда ишлатилади. Шунинг эътиборга олиш керакки, ўстириладиган хужайраларни ҳосилдорлиги, бутун ўсимликни ҳосилдорлигидан анча баланд. Бундай усул билан иккиламчи метаболитлар ажратиб олишни яна бир устунлик томони шундаки, муайян шароитда ўсимликни ўзини ўстириш имконияти бўлмаган шароитда (совуқ ёки иссиқ иқлимли минтақаларда), уларни хужайраларини бутун йил мабойинида ўстириш мумкин.

Иккинчи йўналиш – ажратиб олинган хужайраларни, ўсимликлар селекциясида ишлатиш ва шу орқали тез ривожланувчи, ҳар хил ташиқи муҳит таъсирига чидамли (иссиққа, совуққа, шўрланишга, оғир металлларга, қўрғоқчиликка, касалликка ва х.к.) ўсимликлар яратиш. Шунинг билан бирга бу йўналиш, ажратилган протопластларни қўйишиш орқали янги ўсимликлар яратиш ҳамда ножинсий (сомотик) гибридлар олишни ҳам ўз ичига олади. Ажратиб олинган протопластларга ген муҳандислиги методлари ёрдамида бегона генларни киритиши, кейинчалик янги, мерос қоладиган хоссаларга эга бўлган ўсимлик яратишга ҳам олиб келади. Ажратиб олинган чангдон ва уруғ куртакни сунъий озуқа муҳитида ўстириш, гаплоидлар, олиш имконини берса, муртакларни ўстириш – ўсаолмайдиган (эндоспермаси ёмон ривожланган) ўсимликлардан гибрид уруғларетиштириш имконини беради.

Учинчи йўналиш – ажратиб олинган тўқималарни кўпайтириш ва экув материалларини вируслар ва бошқа патогенлардан соғломлаштириш мақсадида ишлатиш. Бу усул, ўсимликларни клонал микрокўпайтириш дейилади ва битта медистемадан йилига юз минглаб ўсимлик олиш имконини беради.

Хужайра ва тўқималар культураларини ишлатишдаги натижалар биринчи навбатда хужайраларни бўлиниши, уларни табақаланиши ва улардан ўсимлик ўсиб чиқишини белгиловчи, физиологик жараёнларни оптимизациясига боғлиқ. Энг мураккаб томон бу алоҳида хужайрадан ўсимлик регенерация қилиш. Биринчи навбатда бу бошоқли ўсимликларга тегишли. Шунинг учун ҳам *in vitro* шароитда морфогенез регенерация ва уларни асосида ётган жараёнларни механизмларини аниқлаш, энг муҳим аҳамиятга эгадир.

Ўсимликлардан ажратиб олинган тўқималарни ўстиришга ҳаракат анча узоқлардан маълум. Бу методни ривожланиш тарихини бир неча босқичларга бўлиб ўрганиш мумкин:

➤ **I-босқич (1892 – 1902 йиллар)** – Хаберландт, Фехтинг, Рехтигер каби немис олимларини номлари билан боғлиқ. Улар сахароза эритмасида ҳар хил ўсимликлар тўқималарини ўстиришга уриниб кўришган, аммо ўсимликларни ўсиш кузатилмаган. Фақатгина қоқи ўтини ва тол дарахтини пояларини сегментлари учун бирламчи каллус олинган ва каллусгенезга айланиши мумкин бўлган сегментин энг кичик размери аниқланган. Экспериментал муваффақиятларга етаолмасдан бу олимлар қатор гоя ва гипотезалар яратганлар. Бу гоя ва гипотезалар анча кечироқ ўз тасдиқини топган. Масалан, Харерландт ҳар қандай тирик ўсимлик хужайрасини тотипотентлиги яъни хужайраларни маълум шароитда ўстирилганда ўзини ривожланиш потенциалини намоён қилиши ва бутун ўсимлик ҳосил бўлишига бошлаши ҳақида гипотеза эълон қилган эди.

➤ **II-босқич (1902-1922 йиллар)** – хайвон тўқималарини ўстириш учун биринчи озуқа муҳити яратилганлиги билан нишонланади. Бу озуқа муҳитлари табиий бўлиб, таркибида қон плазмаси (қонни суюқ қисми) ва куртак суюқлиги сақлаган. Ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини ўсимлик экстрактлари сақлаган сунъий озуқа муҳитида ўстириб кўриш муваффақиятсиз чиққан, чунки экспериментларда юксак ўсимликларни ўсиш фаоллигини намоён қилишга тўғри келмайдиган хужайра ва тўқималаридан фойдаланилган.

➤ **III-босқич (1922 – 1932 йиллар).** Бу даврда бир-бирлари билан боғлиқ бўлмаган ҳолда Америкалик олим В.Робинс ва немис олими Котте қаттиқ озуқа муҳитида помидори ва маккажўхори илдири учидаги меристемаларни ўстириш мумкин эканлигини намоён қилганлар. Аммо, маълум вақт ўтгач, ўсимлик тўқималари қўнғир ранга кириб, ҳалок бўлганлар. Ўсимликларни тўқималарини ўстириш методи ривожланиши – 1932 йилдан бошланган.

➤ **IV-босқич (1932 – 1940 йиллар), француз олими Р.Готре номи билан боғлиқ.** *У, in vitro* шароитида ўсимлик тўқималарини вақти- вақти билан тоза озуқа муҳитига кўчириб туриш орқали узоқ вақт ўстириш мумкинлигини намоёни қилган. Бу янгилик, тўқималар технологиясини ривожланишига катта хисса қўшди ва ўстиришга қўйиладиган ўсимликлар сони жуда ҳам кпайди.

➤ **V-босқич (1940 – 1960 йиллар).** 1955 йилда янги синфга мансуб фитогормон – цитокининларни ихтиро қилиниши, (хусусан кинетинни) ҳужайраларни бўлинишини кучайтириш имконини яратади. Ўсишни кучайтирувчи моддаларни миқдори ва уларни нисбатига қараб, эксплант ҳужайрасини бўлинишини кучайтириш, каллус тўқималарни ўсишини муҳофаза қилиш, морфогенезни мндуцироват қилиш мумкин эканлиги намоёни этилди. Шу даврда какос ёнғоғини, каштан, маккажўхори ва бошқа ўсимликлар эндоспермаларини ҳужайрани ўсиши, моргенез жараёнлари (каллус тўқима ва ҳужайра суспензиясида)га ижобий таъсир кўрсатиши аниқлашган.

➤ **VI-босқич (1960 – 1975 йиллар).** Бу даврни энг муҳим воқеаси Ноттинген университети профессори Э.К.Коккинг томонидан ферментатив йўл билан помидорини илдизи ва мевасидан протопластлар олиниши ва уларни назорат қилиниб турилган шароитда ўстирилганлиги бўлган. Кейинроқ шу лабораторияда Пауэр ўзини шогирдлари билан протопластларни сунъий қўшилиш шароитларини яратишган. Бу эса, соматик гибридлар яратишида янги йўл бўлиб хизмат қилган. Ўша даврда яратилган яна бир усул – бу ўсимликларни *in vitro* шароитида меристин культуралар ишлатиб микро кўпайтиришидир. Дастлаб бу усул француз олими Ж.Морел томонидан орхидей ўсимлигини соғлом кўчатини олиш мақсадида яратилган.

➤ **VII-босқич – (1975 йилдан ҳозирги вақтгача).** *In vitro* техникасини жадаллик билан ривожланиши ўстириладиган манбаларни биологиясини ўрганиш давом этмоқда ажратилган протопластларни электро қовуштириш усуллари ишлаб чиқилмоқда, мутагенез ва ҳужайра селекцияси усуллари, гаплоидли ўсимликлар яратиш усуллари, ҳужайраларни ажратилган протопластлар ва *Ti* ва *Ri Agrobacterium tumefaciens* ва *Agrobacterium rhizogenes* асосида тайёрланган *Ti* ва *Ri* плазмид векторларни ишлатиб суяқликда ўстириш усуллари мукаммаллаштирилмоқда. Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида икки паллали ўсимликларни генларини кўчириб ўтказишни самарали усуллари ишлаб чиқилди.

Шундай қилиб, охириги йилларда ажратиб олинган ўсимлик ҳужайралари ва тўқималари билан ишлаш техникаси такомиллаштирилди. Аммо, бу ишларда асосий манба бўлиб, бир паллали ва икки паллали ўтлик ўсимликлар хизмат қилган. Дарахтларни ўрганиш бўйича олиб борилган ишлар унчалик кўп эмас.

7-мавзу. АЖРАТИБ ОЛИНГАН ҲУЖАЙРА ВА ТЎҚИМАЛАРИНИ ЎСТИРИШ ТЕХНИКАСИ

Режа:

1. Тўқималар билан ишлашнинг асосий шартлари ва шароитлари;
2. Озуқа муҳитлари ва уларни тайёрлаш;
3. Ўстириш шароитлари.

Ажратиб олинган тўқималар билан ишлашнинг асосий шarti – стерилликга қатъий риоя қилишидир. Таркиби бой бўлган озуқа муҳити микроорганизмларни ривожланиши учун ҳам жуда яхши субстрат ҳисобланади, ўсимликлардан ажратиб олинган фрагментлар (эксплантлар) озуқа муҳити билан аралаштирилганда микроорганизмлар таъсирига тез учрайдилар. Шунинг учун ҳам эксплантни ҳам, озуқа муҳитини ҳам стерилизация қилиш керак. Ажратилган ҳужайралар ва тўқималар билан қилинадиган барча нозик ишлар (манипуляция) асептик шароитда (ламинар-боксларда) стерилланган ускуналар ёрдамида бажарилади. Ажратилган тўқималарни ўстириш даврида ҳам стерилликни сақлаш керак, айниқса харорат ва намлик ўзгарганда, чунки пробиркаларни пахта-бинтдан тайёрланган тикинчалари намланади ва ундан микроорганизмлар осон ўтишади.

Эксплантни стерилизацияси, шунингдек уруғлар ҳам 5-20 минут давомида стерилизация қилувчи эритмада ушлаб туриш, кейин эса стерил сув билан ювиб ташлаш орқали амалга оширилади. Стерилизация даври эксплантни характериға ҳамда эритмани стерилизация қилиш хусусиятиға боғлиқ. Одатда уруғ 10-20 мин, вегетатив қисмлар эса 5-10 мин. давомида стерилизация қилинади. Стерилизация қилувчи эритмаларға мисоллар 3.1- жадвалда кўрсатилган.

Эксплант олинмоқчи бўлган ўсимлик органи, дастлаб совунли сув билан шеткалар ёрдамида яхшилаб ювилади ва дистилланган сув билан чайиб ташланади, кейин эса бир неча секунд давомида 70 % ли этанолға ботириб олинади. Уруғлар спиртда 1-2 мин. ушлаб турилади. Тўқималарға спирт билан ишлов бериш, уни стерилизация қилиш хоссасидан ташқари, асосий стерилизация қилувчи эритмани таъсирини кучайтириши билан ҳам боғлиқ.

3.1-жадвал.

**Дастлабки ўсимлик материалларини стерилизация қилиш
(Р.Г.Бутенка, 1990 йил)**

Манба	Стерилизация вақти, мин			
	0,1% ли диацид	0,1% ли кумуш хлорид (AgCl ₂)	5-9 % ли гипохлоритлар (Na, Ca)	10-12% ли водород пероксида (H ₂ O ₂)
Уруғлар				
суруқ	15-2	10-15	15-20	12-15
тамланган	6-10	6-8	10-15	6-8
Тўқималар				
рутли илдиз, измева	20-3	15-25	15-20	-
парахтланган поя	20-4	20-25	20-25	-
барглар	1-3	1-3	3-6	3-5
пекслар	1-10	1-7	3-15	2-7

Стерилизация кейин ўсимлик объектлари стерилланган сув билан тозалаб ювиб ташланиши керак. Сиртки стерилизация эксплантни фақат ташқи инфекциядан озод қилади. Агар эксплант тўқималари ички инфекцияға эга бўлсалар, уларға антибиотиклар билан ишлов беришға тўғри келади. Айниқса ички инфекцияға йирик томирли тропик ва субтропик ўсимликлар бой бўлишади. Культураларни замбуруғлар ёки бактериялар билан ифлосланиши экилгандан 1-14 кун ўтганда кўзга ташланади. Ёруғлик хонасидаги ҳавони ифлосланишдан сақлаш учун, ифлосланган культурани дарҳол йўқотиш керак.

Озуқа муҳитларини автоклавда, 120⁰С да 0.75 – 1,0 атм. босимда 20 минут давомида стерилизация қилинади. Агар озуқа муҳити таркибига юқори хароратда парчаланадиган моддалар кирса, уларни алоҳида совуқ стерилизация қилинди. Уларни тешиқлар диаметри 0,22–0,45 мкм, бўлган бактериал филтрлардан ўтказилади ва автоклавдан чиққан озуқа муҳитини 40⁰С гача совутиб, кейин уларни аралаштирилади. Олдиндан фольгача ёки ўрайдиган қоғозға ўралган идишларни қуруқ иссиқ билан, қуритгич шкафларида 160⁰С да икки соат давомида стерилизация қилинади.

Озуқа муҳити

Ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарни ўстириш учун мўлжалланган озуқа муҳитлари, ўсимликларни яхши ўсиши учун керак бўлган барча макроэлементлар (азот, фосфор, калий, кальций, магний, олтингурут ва бошқалар) ва микроэлементлар (бор, марганец, рух, мис, молибден ва бошқалар) ҳамда витаминлар, углеводлар, фитогормонлар ёки уларни синтетик аналогларини сақлаши керак. Баъзи озуқа муҳитлари аминокислоталар, казсин гидролизоти, ЭДТА (этилендиаминтетрасирка кислота) ёки уни натрийли тузи (бу туз темирни ҳужайра киришиға ёрдам беради) ва бошқа керакли моддалар сақлайди.

Каллус тўқима олиш учун, алоҳида ҳолларда озика муҳитига кокос ёнғоғини (какос сути), каштан дарахтини эндоспермасини қўшилади. Карбон сувлар озика учун энг керакли компонентлар ҳисобланади. Бунга сабаб, кўп ҳолларда ажратиб олинган хужайра ва тўқималарни автотроф озикланишга қурблари етмайди. Карбон сув сифатида кўпроқ 2-3 % ли сахароза ёки глюкоза эритмасидан фойдаланилади.

Фитогормонлар хужайраларни табақаланиши (дедифференцировки) ва хужайра бўлинишини кучайтириш (индукция) учун керак. Шунинг учун ҳам каллусли тўқималар олиш учун мўлжалланган озика муҳити таркибида албатта ауксинлар (хужайра бўлинишини кучайтирувчи) бўлиши шарт. Поя морфогенезини индукция қилганда муҳит таркибидаги ауксинлар микдорини камайтириш ёки бутунлай олиб ташлаш мумкин.

Гормон сақламайдиган озика муҳитида шиш ва «ўрганган» тўқималар ўсади. Ҳар икки гуруҳ гормонларига ёки улардан бирортасига автономлик, бу хужайраларни ўзларини гормон синтезқилиш хусусияти билан боғлиқ.

Ауксин манбаи сифатида озика муҳитига 2,4-дихлорфенокси сирка кислота (2,4-Д), индолил-3-сирка кислота (ИУК), L-нафтил сирка кислота (НУК) қўшилади. Яхши ўсувчи каллус олиш учун кўпроқ 2,4-Д дан фойдаланилади, чунки ИУК, 2,4-Д га нисбатан 30 маротаба кучсиздир.

Сунъий озика муҳитига қўшиш учун, цитокинин манбаи сифатида, кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП) ва зеатин ишлатилади. 6-БАП ва зеатин ажртилган тўқималарни ўсишига оргоногенезни индукциясига кинетинга нисбатан фаолроқ таъсир кўрсатади. Баъзи бир озика муҳитлар таркибига аденин ҳам қўшилади.

Ҳозирги пайтда жуда кўп сонли озика муҳитларни таркиби аниқ бўлсада, ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини *in vitro* шароитида ўстириш учун Т.Мурасига ва Ф.Скуга муҳитлари ишлатилади. Бу муҳитни таркиби биринчи марорта 1962 йилда эълон қилинган ва у жуда яхши балансланган озика моддалари таркибига эга ва бошқалардан аммонийли ва нитратли азотни нисбати билан фарқ қилади (3.2-жадвал).

+аттиқ озика муҳит тайёрлаш учун агар-аграр ишлатилади. Агар-агар денгиз сув ўтларидан олинадиган полисахариддир. Вақтдан унумли фойдаланиш мақсадида, макро- ва микроэлементлар эритмалари ҳамда витаминлар ва фитогормонлар қуюқроқ қилиб тайёрланади ва совуқ шароитда сақланади ҳамда керак бўлганда суюлтирилиб ишлатилади.

3.2-жадвал.

Ўсимликларни ажратиб олинган тўқималарини ўстириш учун ишлатиладиган озика муҳитларини таркиби

Озика муҳити компонентлари	микдори, мг/л			
	Мурасига-Скуга	Гамборга	Шенка - Хильдебрандта	Грессхофф-Доу
NH_4NO_3	1650	2500	2500	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	300	-
KNO_3	1900	-	-	1000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	200	150
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	400	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	130	-	-
KH_2PO_4	170	-	-	-
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3	37,3	20,0	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	27,85	15,0	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	150	-	90,0
H_3BO_3	6,2	3,0	5,0	3,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	10,0	10,0	10,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	1,0	3,0

Cl	0,83	0,75	1,0	0,75
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25	0,25	0,1	0,25
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025	0,025	0,2	0,25
CoU ₂ ×6H ₂ O	0,025	0,025	0,1	0,25
Лицин	2,0	-	-	2,0
Мезоинозит	100	100	1000	10
Никотин кислотаси	0,5	1,0	5,0	1,0
Пиридоксин-HCl	0,5	1,0	0,5	0,1
Пиамин HCl	1,0	10,0	5,0	-
4-	-	0,1-1,0	-	-
Кинетин	-	0,1	0,1	-
Глутамин	-	-	-	2,0
Сахароза	30000	30000	30000	20000

Ўстириш шароити

Ўсимликлардан ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарни яхши ўстириш учун, ўстиришни маълум шартларига роия қилиш керак. Кўпчилик каллус тўқималари ёруғликга эҳтиёжи йўқ, чунки уларни хлоропластлари бўлмасдан, гетеротроф озикланадилар. Баъзи – бир яшил рангдаги каллус тўқималар бундан мустасно. Баъзи бир ҳолатларда каллус тўқималар автотроф озикланишига қобилиятли эмас, буларни доимий ёруғлик шароитида ўстирилади, бу эса мувоффақиятли морфогенез учун мажбурий шароитдир кўпроқ каллус тўқималар коронғиликка олинади.

Морфогенезга аниқланган (детерминирован) тўқималар ёруғликга ўтказилиб, кейин 1000-4000 лк ёруғликда ўстирилади. Ажратиб олинган меристемлар ва уларни микрокўпайтириш ҳам ёруғликда ўтади. Ёруғ уйчани ёруғлиги 1000–10000 лк бўлиши керак ва ёруғликни кучи ўсимликни хусусиятларига боғлиқ. Ўстриладиган объектни фото даврини ҳам ҳисобга олиш керак.

Ўстриладиган хонада намлик 60-70 % бўлиши керак. Ундан куруқроқ ҳаво озика муҳитини куришиб юборади, агар пробирка пахтали тикин билан бектилган бўлса, озуқа моддаларни концентрацияси ўзгариб, ўстириш шароити бузилади.

Кўпчилик тўқималарни ўстириш учун оптимал ҳарорат 25-26⁰С. Агар тропик ўсимликларни тўқималари бўлса 29-30⁰С да ўстирилади. Морфогенез индукция қилинганда ҳарорат 18-20⁰С гача туширилади. Одатда климатик камералардан фойдаланилади.

8-мавзу. КАЛЛУС ТЎҚИМАЛАР КУЛЬТУРАСИ

Режа:

1. Умумий ҳолати;
2. Каллусли ҳужайраларни ўзига хослиги;
3. Каллус ҳужайралари генетикаси;
4. Гормонларга боғлиқ бўлмаган ўсимлик тўқималари;
5. Ҳужайра суспензиялари культуранга;
6. Ягона ҳужайралар культуранга;
7. Каллусли тўқималарда морфогенез.

Умумий ҳолати

Ажратилган тўқималар культуранга одатда ёки каллусли, ёки шиш (жуда кам ҳолатда) тўқима бўлиши мумкин. Каллусли культура табақалашмаган (дедифференцированн) ҳужайралардан ташкил топган, тартибсиз тўқималардир. Кейинроқ улар каллуслига ихтисослашади, яъни ўзига хос равишда табақалашади. Каллус дегани қадоқ (қотиб қолган) деган маънони англатиб, in vitro

шароитида алоҳида олинган тўқималарни (эксплантлар) бир қисмида ва бутун ўсимликни бир қисмида (шикастланганда) пайдо бўлиши мумкин.

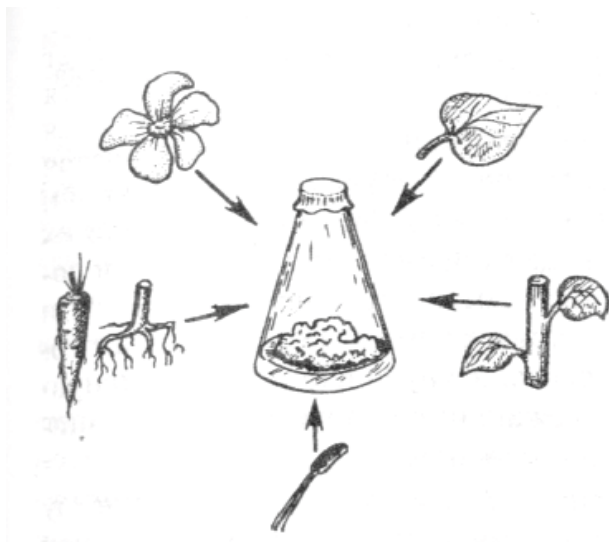
In vitro шароитида каллус тўқима, асосан оқ ёки сарикроғ жуда ҳам кам ҳолатларда оч-яшил рангда бўлади. Каллус ҳужайралар қариганда, тўқ қўнғир рангга кирадилар, бунга сабаб уларда фенол бирикмаларини тўпланиши билан боғлиқ. Вақт ўтиши билан феноллар оксидланиб, линонга айланадилар. Улардан қутулиш мақсидида озуқа муҳитига антиоксидантлар қўшилади.

Каллус тўқималар аморф бўлиб, маълум бир анатомик тузилишга эга эамслар, аммо келиб – чиқиши ва ўстириш шароитига қараб, ҳар хил консистенцияга (суяқ - қуюқ ва х.) эга бўлади:

- **Биринчи** – уваланиб кетадиган пўк ҳолатда кичик агрегатларга енгил майдаланиб кетадиган, кучли сувланган ҳужайралар;
- **Иккинчи** – ўрта зичли яхши намоён бўлиб турадиган меристемали ўчоқлар;
- **Учинчи** – зич ҳолатда, унда камбий (ўсимлик пўтлоғи тагидаги бўлинувчан ҳужайралар) элементлари ва ўтказувчи тизим табақалашган (дифференциация) ҳолатда учрайди.

Ўсимлик ҳужайрасини табасизланиши ва уни каллусга айланиши учун шарт бўлган шароит-бу озуқа муҳити таркибида икки фитогормонларни яъни ауксинлар ва цитокининларни бўлишидир. Ауксинлар ҳужайраларни табақасизланишини (дифференцировка) чақирса уларни бўлинишига тайёрлайди, цитокининлар табақасизланган ҳужайраларни бўлинишига (тролифорция) олиб келади. Агар таркибида гормон сақламаган озуқа муҳитига поя, барг ёки илдизни бир қисмини тикиб қўйилса, ҳужайраларни бўлиниши амалга ошмайди ва каллус тўқима ҳосил бўлмайди. Бу табақалашган ҳужайраларни бўлинаолмаслиги билан боғлиқдир (3.1-расм).

Охирги босқични (фазани) характерли томони ҳужайрани иккиламчи қобиғини қалинлашуви ва ҳужайрани бўлинишга бўлган қобилятини йўқотишидир. Дифференциацияга учраган ҳужайралар яна қайтадан бўлиниш қобилятига эга бўлиши учун, уларни дидифференцировка бўлиши шарт, яъни ҳужайра худди меристема ҳолатига қайтиши керак. Табақаланган ҳужайраларни кўпайтириш тартибсиз, анархия шаклида ўсишга олиб келади ва оқибатда каллус тўқима ҳосил бўлади. Шундай қилиб, ихтисослашган ҳужайраларни каллус тўқималарга айланиши ҳужайра бўлинишини кучайтириш билан боғлиқ бўлиб, табақалаш жараёнида, ҳужайра бўлиниш қобилятини йўқотади.



3.1-расм.
Турли хил эксплантлардан
каллус тўқимаси культура-
ларини олиш:

Ҳар бир ҳужайра ўсишни уч боскичда ўтади:

- **бўлиниш;**
- **чўзилиш;**
- **табақаланиши (дифференцировка).**

Озуқа муҳити таркибида цитокининларни бўлмаслиги тамаки ўсимлигини ўзак қатлами паренхимасида ҳужайра циклини тўсиб қўяди. Шунинг учун ҳам агар озуқа муҳити таркибида фақатгина ауксин бўлса, ҳужайра бўлинмайди ва тўрт кунлик даврдан кейин чўзилиб, ўсишга ўтади.

Ауксинларсиз, фақат цитокининларни ўзлари ҳам гормон сақламаган озуқа муҳитига ўхшаб, ўсимликни қаришига олиб келади. Тамаки ўсимлиги мисолида келтирилган далиллар бирта гормон сақлаган озуқа муҳитида каллусли тўқима ҳосил бўлишини барчасини тушунтира олмайди. Бунга зид бўлган мисоллар ҳам бор.

Масалан, буғдойни етилмаган куртакларида цитокининсиз 2,4-Д сақлаган озуқада каллус ҳосил бўлиши ёки кунгабоқарни уруғ палласида цитокинин сақлаган ауксин сақламаган озуқада каллус ҳосил бўлиши ва х.к. Кузатиладиган натижалар кўпроқ эндоген гормонларга, аниқроғи у ёки бу эксплантни ҳужайрасида сақланадиган гормонлар билан яъни ҳужайрани гормонал статуси билан боғлиқ эканлиги исботланган.

Баъзи бир олимларни фикрларича, ҳужайрани бўлинишини ауксин ёки цитокинин эмас, балки полисахаридлар ва бошқа қандайдир индукторлар чақиритиши ва каллус ҳосил бўлишига олиб келиши мумкин.

Апексни асосий қисмида каллусли ўсишга ўтиш жараёни ҳужайра бўлинишини тўхташи билан бошланади. Лаг – фаза 24-28 соат давом этади. Бу давр мобайнида ҳужайра катталашиб, тўқималар шишади. Лаг фаза тугагандан кейин ҳужайра тез бўлиниб, каллус тўқима ҳосил қилади. Шундай қилиб, агар ихтисослашган ҳужайраларни дедифференциацияси фитогармонлар таъсирида бўлинишни кучайитиши (индукцияси) билан боғлиқ бўлса, бўлинадиган меристемали ҳужайраларни дедифференциацияси бўлинишини тўхташ билан ҳужайрани ихтисосланиши ва фақатгина ундан кейин каллус ҳосил бўлишига олиб келувчи бўлинишни кучайитиши билан боғлиқ.

Бир фитогормонни таъсир самараси, нишон тўқимани физиологик тавсифига қараб ҳар хил бўлиши мумкин.

Ҳужайрани *in vitro* шароитида дифференциалланган ҳолатдан дидефференциалланган ҳолатга ва ҳужайрани фаол бўлинишга ўтиши, генларни фаоллигини ўзгариши билан бошланади. (Эпигеномли ўзгарувчанлик). Бир генни фаоллашуви ва иккинчисини репрессияга учраши ҳужайрадаги оксил таркибини ўзгаришига олиб келади. Каллусли ҳужайраларда ўзига хос бўлган оксиллар пайдо бўлади ва бир вақтнинг ўзида баргнинг фотосинтез қилувчи ҳужайраларида оксиллар миқдори пасаяди. Икки паллали ўсимликларда дидефференциаллашган генларни репрессия ва депрессия жараёнлари нисбатан осон ўтади.

Дедифференциаллашган ҳужайраларни каллус тўқималар ҳосил бўлишига олиб келувчи тартибсиз кўпайишга ўтиши билан биокимёвий ва цитологик ўзгаришлар содир бўлади. Заҳирадаги моддаларни ишлатилиши ва ихтисослашган ҳужайра органеллаларини парчаланиши билан дедифференциалланиш бошланади. Дедифференцияни индукциясидан 6-12 соат ўтгандан кейин ҳужайра қобиғи ғоваклашиб шишади, мустақил рибосомалар сони кўпайиб, Гольджи аппарати элементлари сони ҳам ошади. Бу ўзгаришлар бўлинишдан олдин бошланади.

Ўстиришга қўйишдан олдин, эксплантлар ҳужайрасининг метаболизмида ўзгаришлар содир бўлишини, у эса дедифференция ёки травматик синтез билан боғлиқ бўлишини ҳисобга олиб қўйиш зарур. Бундай жараёнларни ажратиш мақсадида эксплантларни гормонлар сақламайдиган муҳитда 3-6 сутка давомида преинкубация қилиш тавсия этилади.

Каллусли ҳужайра ўзини ривожланиш циклига эга бўлиб, ҳар қандай ҳужайрани ривожланишини қайтаради: бўлиниш, чўзилиш ва дифференция ва ундан кейин қариш ва ҳужайрани ўлиш даври. Каллусли дифференцияни иккиламчи деб атаса бўлади, аммо уни морфогенез асосида ётувчи ҳужайраларни иккиламчи дифференцияси билан аралаштириб юбормаслик керак.

Каллус ҳужайралари нобуд бўлиб қолмаслиги учун уларнинг бўлинишга бўлган қобилиятларини йўқотмасликлари учун, эксплантларда пайдо бўлган бирламчи каллус, 4-6 ҳафтадан кейин янги тайёрланган озуқа муҳитига ўтказиб турилади. Бу операцияни – пассирлаш деб аталади. Ўз вақтида бу жараён ўтказиб турилса, каллус ҳужайралари ўн йиллаб ўз бўлини хусусиятини йўқотмаслиги мумкин.

Каллус ҳужайраларни ўсиш чизиги 3.2-расмдан кўриниб турибдики, S- симон шаклга эга, ўсиши беш фаздан иборат:

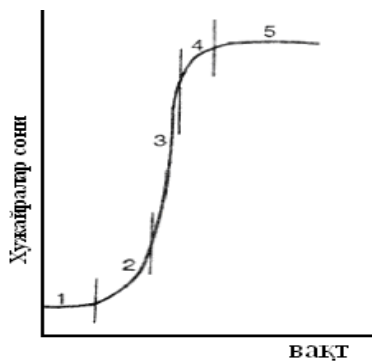
➤ **1-латент ёки лаг-фаза** даврида ҳужайра сони ёки оғирлиги ўзгармайди. Ҳужайралар бу даврда бўлинишга тайёргарлик кўрадилар.

➤ **2-фаза логарифмик ёки экспоненциал ўсиш фазаси** энг кўп митодик фаоллик билан ва каллус культуранинг массасини ошиши билан ҳамда тезлик билан ўсиш кузатилиши билан характерланади.

➤ **3-фаза тўғри чизиqli (линейка),** бунда ҳужайраларни ўсиш тезлиги доимийдир.

➤ **4-фаза ўсишни секинлашув фазаси бошланади,** бу босқичда ҳужайранинг митотик фаоллиги кескин пасаяди.

➤ **5-фаза ўсиш чизиги (стационар) бир текис ҳолатга келади.** Бу даврда ҳужайралар парчаланади, аммо ҳужайра сонини ошиши билан баробарланишади; умуман олганда бу босқичда, ҳужайра массасини кўтарилиши нолга тенг бўлади. Стационар фазадан кейин ҳужайраларни дегрэдацияси бошланади ва бу даврда тирик ҳужайраларни сони ва массаси тобора камайиб бораверади.



3.2-расм. Каллус тўқималарининг даврий ыстирганда ысиш бос=ичининг эгри чизиги. Ўсиш бос=ичлари:

1-латент; 2-логарифмик; 3-линей; 4-секинлашув; 5-стационар

Каллусли ҳужайраларни ўзига хослиги

In vitro шароитида каллусли ҳужайралар ўсимликлар организмидаги оддий ҳужайраларга хос бўлган кўплаб физиологик ва биокимёвий хусусиятларни сақлаб қолади. Улар, иккиламчи метаболитлар синтез қилиш қобилиятини йўқотмайдилар. Совуққа чидамлик хусусияти каллусли ҳужайраларда, ўсимликлардагидек қайтарилади. Бундай хусусият, тропик ёки субтропик ўсимликлардан олинган каллус тўқималарда бўлмайди. Каллусли тўқималарга фотодаврилик реакцияси ҳам хос, бу фитохрон фаоллигини сақлаб қолинганлиги билан боғлиқдир.

Ўсимликларни нормал ва каллусли тўқимлари учун умумийлик яна қатор белгиларда намоён бўлади, хусусан, юқори хароратга чидамлик, осмотик фаол моддаларга, шўрланишга чидамлик ва ҳ.к. Шунинг билан бирга, каллусли тўқималарни нормал тўқималардан фарқли томонлари ҳам бор. Уларда специфик оксиллар пайдо бўлади ва умумий оксил миқдори, хусусан баргда фотосинтез жараёнида қатнашадиган оксиллар камаяди ёки бутунлай йўқолади. Каллусли ҳужайралар улкан генетик гетерогенлиги ва физиологик синхронликни бузулганлиги билан фарқ қилади.

Организм назоратидан чиққанлиги сабабли. Каллусли ҳужайраларни ўсиши тартибсиз, синхронсиз равишда ўтади ва чегараланмайди. Бундан 65 йил аввал Р.Готте томонидан олинган сабзининг каллусли ҳужайраси, янги озуқа муҳитига ўтказиб туриш ҳисобидан ҳозиргача яшаб келмоқда.

Очиқ тупроқда ўсувчи ўсимликга нисбатан, каллусли ҳужайраларни ҳужайра цикли узунроқдир.

Каллусли хужайра ўзига хос томонларидан яна бири-уларни ёшени хар хиллиги (гетерогенлиги). Каллус тўқима бир вақтни ўзида ёш хужайралар (G- фазадаги), қари (G₂) ва S – фазалар иштирок этадилар.

Каллусли хужайраларни энергия алмашинувида ҳам анча фарқ кузатилади. Улар, нормал хужайраларга нисбатан кислородни кам истеъмол қиладилар. 1938 йилда Ромсторн бундай хусусият меристематик хужайраларда ҳам борлигини кузатган эди, демак бу хусусият фаол бўлинадиган хужайралар учун хосдир. Каллус хужайраларни нафас олиш коэффиценти бирдан катта. Масалан нўхат каллус хужайрасида бу сон 3,5 дан катта (А.В. Романова, 1988).

Бу нафас олиш билан бижғиш орпасидаги нисбат бижғишни кучайиш томонига, сурилганлигини яъни Пастер эффектини пасайишини кўрсатади.

➤ ***Пастер эффекти деганда, бижғишни кислород иштирокида нафас олиш билан босишни тушунилади.***

Нафас олиш субстратлари ўзгармаган шароитда, нафас олиш коэффицентини кўпайиши, нафас олиш бижғишни тўхтатаолмаётганлигини ва ҳатто кислородли шароитда ҳам каллусли хужайраларда нафас олиш билан бир қаторда, углеводларни кислородсиз парчаланиши бижғиш жараёни содир бўлаётганлигидан хабар беради. Тартибсиз ўсишда углеводларни кислородсиз парчаланишига мисол қилиб, бўлинадиган хужайраларда этил спиритини тўпланишини кўрсатиш мумкин. Илмий адабиётларда бундай мисолларни кўплаб топса бўлади.

Каллус хужайраларни митохондриялари, меристем хужайраларга ўхшаб, жуда паст ривожланган уларда кристаллар кам, бу эса аэроб нафас олишга таъсир кўрсатмасдан қолмайди. Пастер эффектини бузилиши кўпроқ хайвонларни шиш хужайраларида кузатилади. Бу ходиса Варбург томонидан аниқланган бўлсада ҳозиргача аниқ тушунтира олинганча эмас. Пастер эффектини бузилиши оқибатида келиб чиқадиган анаэроб гликолиз (углеводларни кислородсиз парчаланиши), кислород иштирокида шишли хужайраларни углеводлар истеъмол қилишини кескин (19 маротабага) ошириб юборади.

Каллусли хужайраларни нафас олиш характерини ўзгариши билан бир қаторда углеводларни кислородсиз парчаланишини кучайиши йўналишида, бўлинадиган хужайралар учун зарур бўлган пентозофосфат йўли томон силжиш намоён бўлади.

Каллус хужайралари генетикаси

Узоқ вақт каллусли хужайралар генетик бир хил деб ҳисоблаб келинар эди. Ўтган асрнинг 60-йилларида каллусли хужайралар генетик гетероген (кўпсонли) эканлиги аниқланди. Уларни бир хил эмаслиги энг аввало ҳар хил сонли хромосомалар сақлаши билан намоён бўлади. *In vitro* шароитида меристематик тўқималар генетик мўътадил бўлдаилар

Плоид хужайралар қисқа лаг фазага эга бўлганлиги сабабли, диплоид хужайраларга нисбатан бўлиниши тезроқ ўтади. Бунинг оқибатида, улар кейинги кўчириб ўтказиш жараёнларда устунликка эга бўлиб қоладилар. Ҳар ҳолда икки сабаб ҳам ўринли деб ҳисоблаш мумкин.

Плоидликни ўзгаришидан ташқари ўсимлик хужайра ва тўқималарини *in vitro* ўстирилиши, хужайрада хромосомали абберациялар ҳосил бўлишини чакиради. Бу эса ўстирилаётган тўқималарни биологик хусусиятларига таъсир кўрсатади, уларни (тўқималарни) ташқи кўриниши, модда алмашинуви, ўсиш тезлиги ўзгаради.

Ўстирилаётган хужайраларда микроскоп остида кўринадиган хромосомали мутациялардан ташқари кўринмайдиган ўзгаришлар ҳам содир бўлиши мумкин. Бундай ўзгаришлар хромосомаларни бир қисмида ҳамда генларни тузилишида ҳам бўлиши мумкин. Генли мутациялар хужайраларни морфологияси ва физиологик-биокимёвий хоссаларини ўзгаришида намоён бўлади.

Ўстирилаётган хужайраларни генетик мўътадил эмаслиги сабаблари нималардан иборат? Бундай сабаблар бир нечта. Энг аввало – дастлабки материални генетик бир хил бўлмаганлиги (эксплантларни гетерогенлиги). Кўпчилик ўсимликларда табақалашган тўқималар, ҳар хил плоидли хужайраларга эга бўладилар ва фақатгина тўқимани онтогенези даврида фаол кўпаядилар, юқори меристемалар, камбийлар ва бошқалар эса доимодиплоид ҳолатда қолади. Бошқа бир сабаб – бу

тўқима ва хужайраларни узоқ муддат экилиши, ўз навбатида бундай шароитда улардаги генетик ўзгаришлар, жумладан плоидликни бир хил бўлмаган ўзгариши содир бўлади.

Ўсимлик тўқималарини бир қисмини ажратиб олиб, уларни озуқа муҳитига ўтказишда бир бирига мос алоқаларни бузилиши ҳам хужайраларни генетик мўътадилликдан чиқишига олиб келади. Шунга ўхшаш натижалар озуқа муҳити таркибидаги фитогормонларни хужайранинг генетик аппарати таъсири оқибатида намоён бўлиши мумкин. Каллус ҳосил бўлиши учун гормон сифатида албатта озуқа муҳити таркибида ауксинлар ва цитокининлар киритилади.

Бу моддаларни мутагенлик хусусияти эса кўпчилик олимлар томонидан исботланган. Энг кучли мутагенлик хусусияти эса кўпчилик озуқа муҳитлари таркибига кирувчи 2,4-Д препаратида кузатилган.

Цитокининлар хусусан кинетик хужайраларда полиплоидия содир бўлишига ёрдам берадилар.

Каллус хужайраларни генетик хилма-хиллиги, уларни ташқи муҳит таъсирига фитопатогенларга чидамли ҳамда серҳосил мутантлар олиш учун амалга ошириладиган селекцион ишларда фойдаланиш имкониятини яратади.

3.4. ГОРМОНЛАРГА БОҒЛИҚ БЎЛМАГАН ЎСИМЛИК ТЎҚИМАЛАРИ

Каллусли хужайралар фақат озуқа муҳити таркибида гормонлар бўлгандагина бўлинадилар. Аммо узоқ муддатда ўстирилганда, баъзан улар гормонсиз муҳитда ҳам ўсиш хусусиятига эга бўладилар, яъни ауксин ва цитокининларга нисбатан автоном бўлиб қоладилар. Баъзан «мослашган» хужайралар томонидан яратилган тўқималарни кимёвий шишлар ҳам деб юритилади. «Мослашган» тўқималар, шиш тўқималарига ўхшаб, кўп ҳолатларда нормал регенерация бўла олмайдилар ва фақат тератомлар ҳосил қиладилар. Илмий адабиётларда жуда кам бўлсада, улардан нормал регенерантлар ҳосил бўлганлиги ҳақида ахборотлар бор.

Шуни ҳам эслаб қолиш зарурки, барча каллусли тўқималарда, ўстириш жараёнида, баъзи бир культураларда 4-экишдан кейинроқ регенерация бўлган хусусият пасайиб боради, баъзи вақтларда эса умуман йўқолади. +ари кўчатларда регенерант –ўсимлик яратиш мумкин эмас.

Ҳозрча «мослашув» сабабларини аниқ жавоби йўқ. Балки, у хужайраларни табақасизланмайдиган ёки фаол пролиферация (хужайра ва тўқималарни кўпайиши йўли билан янгидан ҳосил бўлиши) ҳолатида ушлаб турувчи гормонларни хужайрага узоқ муддатда таъсир этиши билан боғлиқ бўлса керак, деген тахминлар бор.

Ўсимликларни «мослашган» ва шиш тўқималарини умумий хусусияти уларни гормонга эҳтиёжсизлигидир, бошқача айтганда ҳар иккала тўқима ҳам гормон сақламаган муҳитда ўса оладилар. Бу хусусият уларнинг каллули тўқималардан фаркли томонидир. Маълумки, каллусли тўқималарни табақалашмаганлиги ва пролиферацияси учун озуқа муҳити таркибида гормон сақлаши шарт.

«Мослашган» тўқималарда худди шиш тўқималарга ўхшаб, ўз гормонлари синтез бўлади, шунинг учун ҳам улар гормонга муҳтожлик сезмайдилар. Гормонга тобе бўлмаган тўқималар ташқи кўринишидан каллусли тўқималардан фарқ қилмайдилар, уларни ягона фарқи гормон синтез қилиши билан намоён бўлади. Бу хусусияти «мослашган» шиш хусусияти учун умумий бўлсада, уларда бу вазифани ечиш йўли ҳар хилдир. «Мослашган» тўқималарда гормонга тобе бўлмаслик, гормонларни синтез қилишда иштирок этувчи ферментлар молекуласи синтезига жавобгар бўлган генларни фаоллигини ўзгариши натижасида содир бўлади. Шундай қилиб, ушбу ҳолатда ўзгариш эпигеномли характерга эга бўлсада, мутация имкониятларини ҳам эътибордан ташқарида қолдирмаслик керак.

«Мослашган» хужайраларда ўзгариш эпигеномли ёки генотипик асосга эга эканлигини аниқлаш учун хужайра-ўсимлик-хужайра қаторида гормонга муҳтож бўлмаслик хусусияти сақланиб қолиши ёки қолмаслигини нозат қилиш керак бунинг учун «мослашган» тўқимада регенерант олиниб, кейин регенерация қилинган ўсимликдан олинган эксплант бутунлай гормонсиз ёки гормонларни бирортаси бўлмаган муҳитда хужайра бўлинса, яъни гормондан автоном бўлса, гормонга муҳтожсизлик хусусияти авлоддан-авлодга ўтади, демак у генетик асосга эга деб айтиш мумкин.

Шиш тўқималарда гормонларни синтези – ўсимлик ўтказилиши билан боғлиқ. Ўтган асрни 40-йилларида Ф.Уайтнинг ўқувчиси, Браун корончатогалли шиш тўқима культураси агробактерия йўқлигида (уларни юқори хароратда ўлдирилгандан кейин ҳам) ҳам ишишлик хусусиятини сақлаб қолишини кузатган эди.

Гормон сақламаган сунъий озуқа муҳитида, бактерия сақламаган корнчатли галл тўқимаси фаол пролиферацияни давом эттираолган. Бу тўқималар, оддий тўқимага қараганда юқори микдорда ауксинлар ва бирнеча цитокининлар сақлайдилар. Ўзи ўтказган тажрибалар асосида Баун, ўсимлик хужайралари *Agrobacterium tumefaciens* таъсиридан кейин қандайдир йўл билан шиш хужайраларга айланадилар деган фикрга келган эди.

Агробактериялар ўсимлик хужайрасига Тір (Tumor inducing principle) киритади, у эса 36соатда оддий хужайрани шиш хужайрага айлантиради деб тахмин қилинган эди. Кейинчалик Тір ДНК эканлиги ва агробактерияларни катта плазмидасида сақланиши аниқланди ва Ті плазмиди деб аталди. Онкоген фаоллик бактерия хужайрасидан Ті плазмидани бутунлай ёки уни маълум бир қисмини ажратиб олинганда йўқолиши исботланган.

1977 йилда Чилтон ўзини шогирдлари билан корончатўй галлни шишлари агробактерияларни Ті плазмидасини маълум қисмини ўсимликни ядро ДНК сига киритиш натижасида пайдо бўлишини исботладилар.

Шундай қилиб, Ті плазмидани сигменти (Т-ДНК) хромосомага интеграция қилинади ва ўсимликни трансформацияланган (шиш) хужайрасини ирсий аппаратини бир қисми бўлиб хизмат қилади. Агробактерияларни Ті плазмидани Т-ДНК сини ўсимликлар хромосомасига интерграцияси шиш пайдо бўлишига ва шиш хужайрасини сунъий озика муҳитида гормонга муҳтожиз равишда ўсишга олиб келади. Бу ҳар икки ҳодиса бир бири билан ўзаро узвий боғлиқ, чунки ауксин ва цитокининларни синтезини назорат қилиб турувчи генларни экспрессияси оқибатида гормонга муҳтожсизлик келиб чиқади ва у хужайраларни табақасизланишига ва пролиферациясига олиб келади.

Т-ДНК ауксин ва цитокининлардан ташқари табиатда учрамайдиган янги синф аминокислоталар галли (опинлар) синтезини детерминация қилиши аниқланди. Бу моддалар шиш пайдо бўлишига сабаб бўлаолмайдилар; балки улар ҳосил бўлган шиш тўқималарида синтез бўладилар. Шиш тўқималар бир неча кунлик бўлганларидан кейингина опинлар синтезини бошлайдилар, масалан, коланхоэда опинлар синтези, шиш индукцияси бошланган кундан 7-кунда бошланади.

Опинлар аминокислоталар, ҳар хил кетокислоталар ва шакарларни ҳосилаларидир. Улар янги типдаги биологик фаол моддалар ҳисобланадилар ва фақатгина ўсимликларни корончатўй галли тўқималарида учрайдилар, шунинг учун ҳам уларни корончатўй галларни биокимёвий мархори сифатида қараш мумкин. Опинлар агробактериялар учун озуқа модда ҳисобланадилар, аммо шиш тўқималар опинлар стерил шароитда агробактериялар бўлмаган шароитда ҳам синтез қилаверадилар. Опинларни уч типи маълум: нопалин, актопин ва агропин. Агробактерияларни бир штамми октопинсинтез қилувчи шишларни индукция қилса, бошқа штамми нопалинсинтез қилувчисини индукция қилади.

Шундай қилиб, агробактериялар ёрдамида индукция бўлувчи «мослашган» ва шиш тўқималарни биринчи умумий хусусияти, гормон синтез қилиш билан боғлиқ бўлган гормонга муҳтожсизликдир. Галли шишларда бундай қобилят ўсимликларга бактерияларни бегона генларини киритилиши оқибатида келиб чиқади. Кимёвий (мослашган) шишлар хужайраларида бу хусусият гормонлар синтези учун жавобгар генларни депрессияси билан боғлиқ бўлса керак деб тахмин қилинади, аммо у мутация билан алоқадор бўлиши ҳам мумкин.

Иккинчи умумий хусусият, биринчисидан келиб чиқиб, агробактериялар билан индукция қилинган «мослашган» ва шиш хужайраларни фертил ўсимлик регенерация қилиш қобилятини юқотишидир. Галли шишлар кўпчилик ҳолатларда соғлом ўсимлик ҳосил қилаолмайдилар. Баъзида улар тератомлар (хунук, органларга ўхшаган тузилмалар) ҳосил қиладилар ва улар нормал ривожлана олмайдилар.

«Мослашган» тўқималар ҳам одатда нормал ўсимликга айланаолмайдилар, уларни хужайралари иккиламчи дифференцировкага ва морфогенезга бўлган қобилятларини йўқотадилар. Аммо, баъзида, озуқа муҳити таркибини ўзгартириш орқали, «мослашув» чегарсини орқага суриш мумкин.

Демак, узоқроқ пассаж қилинган культуралар тўқималаридан ҳам регенерция қилаоладилар ўсимлик олиш имкониятлари ҳам йўқ эмас.

3.5. ХУЖАЙРА СУСПЕНЗИЯЛАРИ КУЛЬТУРАСИ

Каллусни суяқ озуқа муҳитига ўтказиб, автоматик равишда аралаштириш орқали хужайра суспензияси олиш мумкин. Ферментлар ёрдамида. Масалан пектиназа ферменти ёрдамида тўғридан-тўғри эксплант тўқималардан (барг, поя, илдиз ва х.к) ҳам хужайра суспензияси тайёрлаш мумкин. Дастлаб, эксплант юзасида каллусли тўқима пайдо бўлади, кейин ундан хужайра ва хужайра агрегатлари ажралади ва оқибатда хужайра суспензияси олинади. 100 мл хужайра суспензияси олиш учун 2-3 г каллусли тўқима керак бўлади.

Хужайра суспензиясини тайёрлаш учун энг зарур шароит – бу домий равишда аралаштириб ёки чайқатиб туришдир. Агар хужайра суспензияси қимирламай турса, ундан бўлиниш натижасида каллусли тўқималар ҳосил бўлади.

Суспензион хужайраларни бўлиниши ауксинлар ва цитокининлар, яъни каллус хужайраларни ўсиши ва индукцияси учун зарур бўлган гормонлар ёрдамида химоя қилиб турилади. Шундай қилиб, суспензияли хужайралар каллус хужайраларни ўзгинаси бўлиб, уларда бундай хужайраларга хос бўлган барча хусусиятлар намоён бўлади.

Суспензия 2,4-Д сақлаган муҳитда ҳосил бўладиган пўкак хужайрадан яхшироқ ҳосил бўлади. Муҳит таркибидан кальций олиб ташланса, суспензия ҳосил бўлиши енгиллашади. Озуқага пектиназа ферменти аралаштирилса (бу фермент озуқа таркибидаги алоҳида хужайраларни бири-бирига боғлаб тувчи пекрат кальцийни парчалайди) суспензия янада енгилроқ ҳосил бўлади.

Суспензион культуралардан иккиламчи метаболитлар продуценти сифатида фойдаланилганда, даврий ёки оқава усулида очик ёки ёпиқ тизимда хужайраларни кўпайтириш усуллари ишлатилади. Ёпиқ тизимда хужайра суспензиясига тоза озуқа муҳити киритилмайди, тизимда домий режимда ўстирилганда эса озуқа муҳити тозасига алмаштириб турилади.

Даврий режимда ҳам, оқава режимда ҳам очик тизимда, ўстирилганда хужайралар озуқа муҳитида, уни (озуқа муҳитини) алмаштирганда ҳам қолади. Аммо, очик тизимда ўстирилганда, озуқа муҳити алмаштирилганда (домий ёки даврий режимда) суспензион хужайрани бир қисми муҳит билан бирга ўтади.

Суспензион хужайралар билан ишлаганда уларни характеристикасини билиш шарт: тириклиги, хужайраларни суспензион культурда кўп ёки камлиги, агрегация даражаси, ўсиш тезлиги ва х.к.

Хужайраларни тирик ёки тирик эмаслиги уларни бўяш (кўк метилен ёки Эванс кўки) орқали аниқланади. Тирик хужайралар, хужайра мембранаси бўёкни ўтказмаслиги сабабли бўялмайди. Ўлик хужайра қобиғидан бўёқ тез ўтади ва шунинг учун ҳам кўк рангга бўялади. Хужайра суспензиясини асосий кўрсаткичларидан бири, хужайра популяциясини қалинлигидир. Хужайра сони Фукс–Розентал ҳисоб камерасида микроскоп остида мацерациядан кейин (хужайраларни ажратилгандан кейин) аниқланади. Мацерация қилувчи модда сифатида хром кислотасини 10-20% ли эритмасидан фойдаланилади. Бу кислота, хужайраларни бириктириб турувчи ўртадаги пластинкани эритиб (гидролиз қилиб) юборади.

Яхши ривожланувчи суспензия, каллусли культурга ўхшаб, S- симон ўсиш чизигига эга. Одатда, пассажни давомийлиги 14-16 кундан иборат. Бунда суспензиянинг қалинлиги 5×10^4 дан 5×10^6 хужайра 1 мл гача ошади. Хужайра сонини кўпайиши, уларни қуруқ ва хўл массаси-суспензион культурани асосий ўсиш критериясини ташкил этади.

Суспензияни сифати, хужайраларни агрегация даражасига боғлиқ. Агрегатлар 10-12 хужайрадан кўп бўлмаслиги керак. Шунинг учун ҳам йирикроқ агрегатлардан қутулиш мақсадида суспензияни марля, найлон ёки метал филтрдан ўтказилади. Бу операция бир вақтни ўзида эксплантлар қолдиғидан ёки каллус тўқималарни бўлакчаларидан қутулиш имконии беради.

Иккиламчи синтез маҳсулотларини саноат шароитида олиш учун катта ҳажмдаги (20 м³ ва ундан ҳам каттароқ) ферментерлардан фойдаланилади ва хужайралар доимий режимда ўстирилади. Суяқликда ўстиришни энг кўп тарқалган режими хужайра суспензиясини ёпиқ даврий тизимда ўстиришдир. Суспензияни аэрацияси ва аралаштирилиши учун (качалка) тебраткичлардан

фойдаланилади. Шунингдек бу мақсадда механик ёки магнит аралаштиргич ўрнатилган ферментлардан, ёки барбатация (ҳаво ёрдамида аралаштириб туриш) дан ҳам фойдаланса бўлади.

Хужайра суспензиясида қимматбаҳо иккиламчи метаболитлардан ташқари янги ажойиб бирикмалар: компототедин, хиррингтонин каби антиканцерогенлар, ҳар хил пептидлар (протеаза ферменти ингибитори, фитовируслар ингибиторлари) ва бошқа бирикмалар синтез бўлиши ҳам кузатилган.

Шуни алоҳида таъкидлаш лозимки, хужайраларни бўлиниши оқибатида хужайра биомассасини кўпайиши ва иккиламчи метаболитларни синтез бўлиши ҳар хил вақтга тўғри келади. Иккиламчи метаболитлар синтез бўлишини максимуми, ўсишни стационар фазасига тўғри келади.

3.6. ЯККА ХУЖАЙРАЛАР КУЛЬТУРАСИ

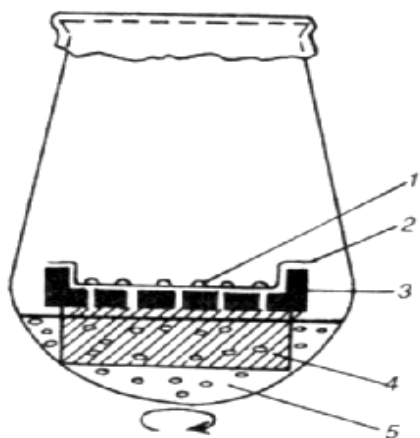
Генетик ва физиологик изланишлар ҳамда хужайроа селекцияси амалиётида ишлатиш учун алоҳида хужайралар жуда катта аҳамият касб этади. Клонни олиниши ягона хужайра авлодини олиниши каллусли хужайраларни генетик бир хил эмаслигини сабабларини аниқлашга ёрдам беради, чунки бу ҳолатда кузатишлар гетероген эксплат олинган тўқималарда эмас, балки алоҳида олинган хужайраларда олиб борилади.

Бир хужайрали фракция олиш учун баъзида суспензион культуранинг колбада 15-30 мин тиндириб қўйиш кифоя бўлади. Бунда йирик агрегатлар чўкмага тушади. қолдиқ устки суюқликда эса фақат бир хужайрали культура ёки кичик агрегатлар бўлади. Агар бу йўл билан бир хужайрали фракция олиш имконияти бўлмаса, ёрдамида мацерация қилиш, сахароза градиентида центрифуга қилиш ёки ҳар хил элактродлардан ўтказиш усулларида фойдаланилади.

Ягона хужайраларни ўстиришда бироз қийинчиликлар сезилади, чунки алоҳида хужайра каллусли тўқима ўсган шароитда яхши бўлинмайди. Ягона хужайраларни бўлинишига мажбур қиладиган махсус усуллар яратилган. 1960 йилда Джонсон «энага» усулини тадбиқ қилган эди. Бу усулда «энага» функциясини бир қисм каллусли тўқима бажаради ва улоҳида хужайрани бўлинишига мажбур қилади ва уни алоҳида хужайрадан филтр қоғози ёрдамида ажратиб олинади. Бундай шароитда («энага» ҳузурида) алоҳида хужайра бўлиниб, хужайрани индивидуал колонияси – клон ҳосил қилади.

Бошқа бир усул жуда кам миқдорда бой озуқа муҳитида алоҳида хужайраларни Купрак ликобчасида (уни ҳажми 20 мкл) микротомчида ўстиришга асосланган. Бу метод академик Ю.Ю.Глейба томонидан таклиф қилинган. Микротомчида соматик гибридизация жараёнида ягона хужайрани олиниши ва уни бўлинишини кузатиш жуда ҳам қулай.

Ягона хужайраларни бўлинишини кучайтириш учун «озиклайдиган қават»дан фойдаланиш мумкин. («Озикланадиган қават»- ягона хужайра олинган ўсимлик турини фаол бўлинувчи хужайра суспензияси) (3.3-расм.).



3.3-расм.

Маккажыхорининг якка хужайралари ва ажратилган протопластларини ўстиришда «энага» сифатида суспензион хужайралар культурасини ишлатилиши:

- 1–хужайра колониялари;
 - 2–филтр қоғоз;
 - 3–алюмин элак;
 - 4–пенополиуретан;
 - 5–хужайра суспензияси
- (Бу Дык Куанг, З.Б. Шамина, 1985).

Хужайрани бўлиниши муҳитни кондицирлаш ҳам тезлатади, бунинг учун унга (муҳитга) тез бўлинадиган хужайра культурасини озуқа муҳити қўшилади. Кондиция қилувчи фактор хужайра суспензиясини ўсишни экспоненциал фазасида бактериал филтрдан ўтказиш даврида пайдо бўлади (олинади). Моҳияти бўйича юқорида зикр этилган барча усуллар ҳам бўлинадиган хужайралардан чиқадиган кондиция қилувчи фактордан фойдаланишга асосланган.

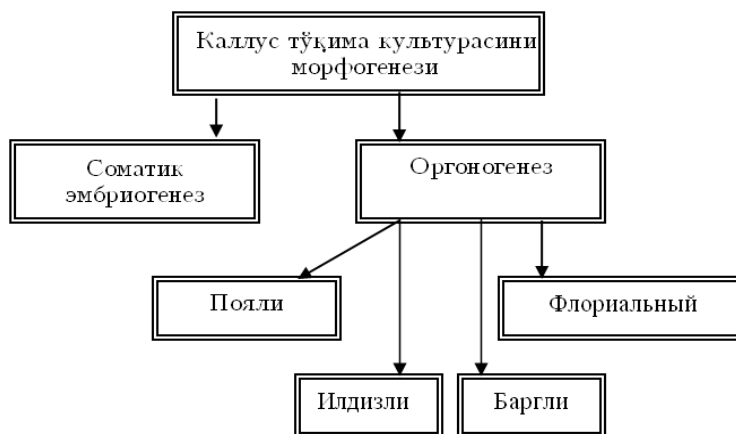
Ҳозирча бу факторни таъсир механизми ва уни кимёвий табиати аниқ эмас. Аммо, бу фактор иссиққа чидамли, сувда эрувчан, паст молекулали модда ҳамда фитогормонлар билан алмашиб бўлмаслигини айтиш мумкин. Шунингдек, бу модда тахминан 700 Дальтон молекуляр оғирлигига эга бўлган рН 4-11 да мўтадил модда эканлиги ҳам аниқланган. Шундай қилиб, бу модда тоза кимёвий модда бўлмасдан, хужайрадан ажраладиган факторлар йиғиндиси бўлса ҳам ажаб эмас.

3.7. КАЛЛУСЛИ ТЎҒИМАЛАРДА МОРФОГЕНЕЗ

Хужайра ривожланишини табақасизлангандан кейин ўтадиган бир неча йўли маълум. Биринчи йўл – бу бутун ўсимликни қайта регенерацияси, балким, хужайра, тўқима, органлар даражасида табақаланиш. Иккинчи йўл хужайрани қайта табақаланиш хусусиятини йўқолиши ва ўсимликни регенерацияси, мустақкам табақасизланиш, гормонсиз муҳитда ўсиш хусусияти, яъни шишга айланиш. Бундай хоссалар эски (қари) кўчат культураларга хос. Учинчи йўл – каллусли хужайрани нормал ривожланиш цикли, уни қариб, нобуд бўлиши билан тугайди. Бу ҳолатда хужайра иккиламчи табақаланишга учрайди ва бўлинишдан тўхтади (ўсишни стационар фазаси). Аммо бундай табақаланиш морфогенезга олиб келмайди ва унда қариган каллус хужайралари хоссаларини мустақкамлайди.

Каллусли тўқималар культурасида морфогенез деб хужайраларни ташкил бўлмаган массасидан тўлақонли структуралар ҳосил бўлишига айтилади. Морфогенезни икки асосий йўли маълум (3.4 - расм).

Тўқималар культурасини у органогенез сифатида (монополяр тузилишини ҳосил бўлиши, яъни алоҳида органларни) кўриниш мумкин: илдиз, поя, камроқ феорал (гулли) ёки баргли ҳамда соматик эмбриогенез, кўринишида (соматик хужайралардан бифтоляр зародиш куртаксимон тузилмалар ҳолатида) кўриниши мумкин. Органогенезда дастлаб алоҳида органлар регенерация бўлади, кейин эса улардан бутун ўсимлик пайдо бўлади. Илдиз органогенези бундан мустасно. Соматик эмбриогенез натижасида органогенездан фарқли ўлароқ, илдиз меристемси ҳамда тепа қават меристемаларига эга бўлган куртак ҳосил бўлади ва ундан кейинроқ бутун ўсимлик ўсиб чиқади.



3.4 –расм. Каллус тўқима культурасини морфогенез типлари

Алоҳида олинган соматик хужайраларни ўз ривожланиш дастурини тўлиқ бажара олиши ва бутун ўсимлик организми ўсиб чиқиши учун асос яратиб бериш хусусияти, ўсимлик хужайрасини тотипотентлиги деб аталади. Ўсимликни ҳар қандай хужайраси бир хил потенциал имкониятларга эга, чунки барча керакли генлар тўпламига эга, демак, хужайра зиготага хос бўлган ривожланиш дастурига эга. Шунинг учун ҳам агар гул барги хужайрасидан ёки пояни ўзаксимон паренхима ёки ҳар қандай хужайра тўқималардан каллус олинганда умуман хужайрани ҳар қандай тўқимасидан

бутун ўсимлик олиш мумкин. Аммо, тотипотентлик хоссалари ҳамма вақт ҳам намоён бўлавермайди, чунки ҳар хил типдаги хужайларни потенциал имкониятлари бир хил намоён бўлавермайди. Улардан баъзи бирларида генлар кучли репрессия ҳолатида бўладилар ва шу сабабли ҳам тотипотентликни намоён бўлиши чегараланган бўлади.

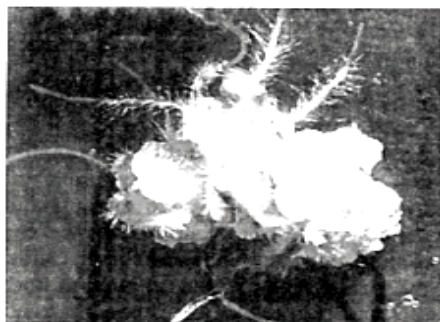
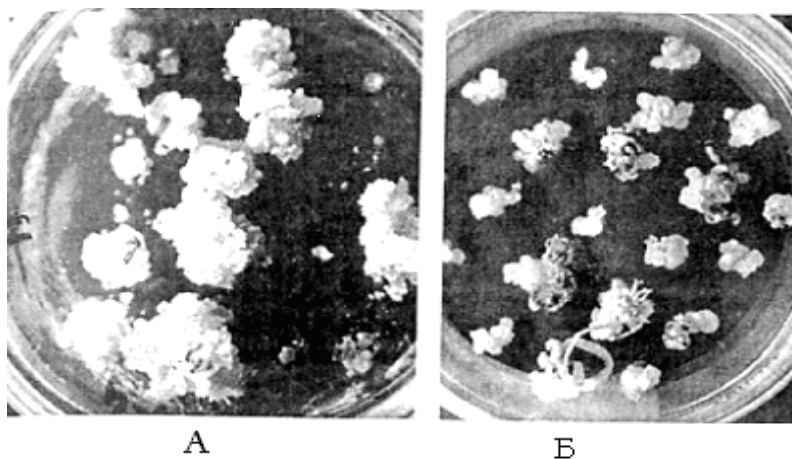
Ўсимлик хужайраларида тотипотентлик ғояси биринчилардан бўлиб, 1902 йилда Г.Хаберлант томонидан илгари сурилган бўлсада, тажрибалар билан исботланган эмас эди.

«Ўсимликни ҳар қандай хужайраси янги организм пайдо бўлишига асос бўла олади, фақатгина ўсимлик организми хужайрани ривожланиш потенциясини босиб қўйган ҳолатдагина бундай бўлмаслиги мумкин» -деган эди Хаберлант. Ўсимликдан хужайрани алоҳида ажратиб олиш мана шу потенцияларни намоён бўлишига ёрдам беради.

Морфогенезни хужайра асосини цитодифференцировка ташкил қилади. Ўсимликни регенерацияси хужайрани иккиламчи табақаланишидан бошланади. Бунда, табақасизланган хужайра бошқатдан ихтисослашган хужайрани структураси ва функциясини эгаллайди.

Барча кўринишдаги иккиламчи табақаланишдан энг катта қизиқиш уйғотадигани, бу морфогенездир, чунки у каллусли хужайрадан бутун ўсимлик яратиш имконини беради.

Табақаланиш ва морфогенезни асосида ҳар хил генларни бирин-кетин қўшилиши ётади, яъни хужайрани табақаланиши генларни табақалашган фаоллиги билан аниқланади. Структура генларини фаоллигини ўзгариши уларни дерепрессияси (уйғониши), репрессияси ёки амплификацияси (кўпайиши) билан боғлиқ. Бу жараёнда фитогормонлар катта роль ўйнайдилар. Каллусли тўқималарни морфогенезини бошқариш мумкин. Ўсимликларни алоҳида ажратиб олинган хужайраларини морфогенезга бўлган қобиляятларига ҳа ички, ҳам ташқи факторлар таъсир кўрсатадилар. Ички факторларларга: дастлабки ўсимликни қайси турга мансублиги, эксплант олинган орган, эксплантнинг ёши киради. Ташқи факторларга эса, энг аввало озук муҳити таркиби, ҳарорат, ёруғлик (уни интенсивлиги ва фотодаврнинг узунлиги) киради. Морфогенезни энг кучли индуктори – озук муҳити таркибига кирувчи цитокинин ва ауксинларнинг ўзгариши ҳисобланади. Буни стимул ёки морфогензни сигнали деб ҳам юритилади. Ауксинга нисбатан цитокинилар миқдори кўпроқ бўлганда, поя органогенези бошланади, тескари бўлганда эса (ауксин цитокинингга нисбатан кўпроқ бўлганда) илдиз яхшироқ ривожланади (3.5-расм).



3.5 расм.

**Каллус ты=имаси морфогенетик
реакцияси:**

- А** - пролиферирующий каллус;
- Б** - адвентивный почек;
- В** - илдиз (ризогенез) щосил
былиши.

Шуни ҳам алоҳида таъкидлаш лозимки, каллусли тўқималар культурасидан ҳосил бўлган илдиздан ҳеч қачон бутун ўсимлик ҳосил бўлмайди, пояли органогенезда эса дастлаб новда ҳосил бўлади ва уни кўпроқ ауксин сақлаган озуқа муҳитларига кўчириб ўтказилгандан кейин, ўзидан илдиз чиқаради ва бутун ўсимлик ҳосил қилади.

Ф.Скуг ва Е.Миллер, 1957 йилда ауксин ва цитокинин типдаги фитогармонларни балансидаги фарқ, бир томондан хужайрани табақасизланган ва ташкил бўлмаган проиферацияга, иккинчи томондан эса, у ёки бу типдаги морфогенезни иккиламчи табақаланишини кучайишига олиб келишини таъкидлаб ўтган эдилар. Демак, ауксинлар ва цитокининлар, уларни бир-бирларига нисбатига қараб, ёки табақасизланиши ва каллусли ривожланишга ўтиш ёки табақаланиш ва каллусли тўқималар морфогенезини чақириши нафақат ўсишни бошқариш балки дифференцировкани бошқаришга олиб келади. Шундай қилиб, озиқа муҳити таркибида:

Ауксин > цитокинин = илдиз → каллусли тўқима

Цитокинин > ауксин = поя → новда → илдиз → ўсимлик

Агар органогенезни ауксин ёки цитокининлар ёрдамида кучайтириш мумкин бўлса, соматик эмбриогенез- экзоген фитогармонларга умуман боғлиқ эмас. Одатда эмбриоген зоналар каллусли тўқималарда, каллус ҳосил қилиш учун ишлатилган озуқа муҳитида пайдо бўлади. Каллусли тўқималарда соматик куртакларни ривожланиши, озуқа муҳитидан табақасизлантирувчи фактор (2,4-Д ёки бошқа ауксинлар) олиб ташлангандагина бошланади. Ўсаётган куртак экзоген гормонларга муҳтожлик сезмайди, чунки уни ўзи гормон синтез қилиш имкониятига эга ва ўзини-ўзи гормон билан таъминлай олади.

Шундай қилиб, морфогенез учун асосий стимул бўлиб, озиқа муҳит таркибидаги гормонларни бир-бирига нисбати ва ўсимлик хужайрасини организмдан ажратиб олиш хизмат қилади. Каллусли тўқималар культурасида морфогенезида қўшимча стимул бўлиб, озуқа муҳити таркибига қўшилган кумуш нитрат, аммоний нитрат, баъзи-бир аминокислоталар (проин, тирозин, баъзида серин), полиаминлар (путресцин ва спермидин) хизмат қиладилар.

Баъзи бир ҳолатларда морфогенез жараёнини манний ва сорбий ҳам кучайтиради. NO₃ ионлари каллус тўқималарда ҳосил бўлган тартибли структураларни ривожланиши ва таъсир кўрсатади, уларни индукциясини эса NH₄ иони кучайтиради. Гибберел кислотаси пояни ўсишини кучайтирса, абсциз кислотаси соматик куртакларни дифференциясини кучайтиради.

Шуниси қизиқарлики, юқорида келтирилган моддалардан баъзилари, масалан кумуш нитрати эски кўчатларни регенерация хусусиятини узайтиради.

Морфогенезни кучайтирувчи у ёки бу таъсир оқибатида каллусли хужайра детеринация ҳолатига ўтиши керак бўлсада, уларни 400-1000 дан биттаси регенерация йўлига ўтадилар холос. Демак, морфогенезга ўтиш учун индукторни бўлиши етарли эмас, балки хужайра унга жавоб беришга тайёр бўлиши керак. Морфогенезни стимулини қабул қилиш қобиляти хужайрани компентлиги деб аталади. Олимларни фикрига хужайрани компетентлиги тасаддуф воқеилик, шунинг учун ҳам жуда кам учрайди. Шу муносабати билан ўзини компетентсизлиги туфайли морфогенез стимулини қабул қолаолмайдиган каллусли хужайралар ҳаёти тўғрисида савол туғилиши муқаррар.

Кўчатларда бу хужайралар бўлинишда давом этади ва кўпроқ гормонга муҳтожсизлик йўлига ўтиб олади. Аммо, каллус тўқималарни ҳаммаси ҳам ўзини ривожланишини гормонга муҳтожсизлик билан тугатмайди.

Каллусли культуралар тўқималарини морфогенезга ўтиши, нафас олиш метаболизмни ўзгариши билан олиб борилади. Умуман нафас олиш (CO₂ бўйича) кучаяди, аммо уни характери пентозофосфат йўлини кучайиши томон ўзгаради. Нафас олиш ферментларини фаоллиги ошади.

Биокимёвий ўзгаришдан кейин, хужайрани структурасида реорганизация (қайта бузулиш) бошланади. Хужайрани биокимёвий ўзгариши уни тузилишини ўзгаришидан олдин туради. Морфогенез йўлига кирган хужайраларда рибосомалар, митохондриялар сони кўпаяди, уларни ички тузилиши ўзгаради. Каллусли хужайраларда морфогенез жараёни синхронсиз ўтади ва узоқ давом

этади. Бир вақтда каллусли тўқималарда тўлиқ тузилган структуралар ҳамда эндигина бу йўлга кирмоқчи бўлган хужайраларни ҳам кузатиш мумкин.

Меристематик учокни хужайраларини ваглобуляр проэмбриони синтетик фаоллигини ошиши, уларни озуқа муҳитидаги моддалар интиладиган аттрагир (озуқа муҳитини фитогормонлар миқдори кўпроқ бўлган органга йўллантирувчи) марказга айлантириб қўяди. Бундай ҳолатда атрофдаги каллусли хужайралар емирилиб, ҳосил бўлган эмбрионидлар каллусли хужайралар массасидан осон тушиб кетади.

Каллусли хужайралар бир-бири билан плпзмодесмалар орқали боғланмайди. Муртаксимон тузилмалар ёки меристематик ўчоқ пайдо бўлганда, хужайралар оралиғида қайтадан плазмодесмалар ёрдамида боғлар пайдо бўлади.

Морфогенезда ўтадиган ва каллусли хужайралардан ўсимлик пайдо бўлиши билан тугайдиган барча ўзгаришлар махсус генлар орқали бошқариб (назорат қилиб) турилади. Ҳозирги вақтда бир гуруҳ олимлар – морфогенезни белгиси полигенли бўлиб, бир неча хромосомалар билан назорат қилиб турилади, деб ҳисобласалар, бошқалари- бу белги иккита ядро гени билан аниқланади, деган фикрга келишган. Каллусли хужайраларни морфо-генетик фаоллиги генетик табиатга эга эканлигини ўзи, нима учун баъзи-бир ҳолларда каллусли тўқималардан у ёки бу генотипларни регенерациясини олиш мумкин эмаслигини тушунтириб беради. *In vitro* шароитида морфогенетик фаол генотипларни чатиштириш – регенерацион имкониятларни (қобилиятларни) ошишига олиб келиши мумкин.

9-мавзу. ЎСИМЛИКЛАРНИ КЛОНЛИ МИКРОКЎПАЙТИРИШ

Режа:

1. Ўсимликларни клонал микрокўпайтириш ҳақида тушунча;
2. Ўсимликларни клонал микрокўпайтиришни усуллари ва босқичлари;
3. Меристемаларни фаоллаштириш усулини;
4. Тўқима културасида эмбрионидларни пайдо бўлиши босқичлари.

Ўсимликларни клонал микрокўпайтириш

Уруғли ўсимликлар икки хил йўл билан: уруғдан ва вегетатив йўл билан кўпаяди. Бу иккала йўлни устиворлиги ҳам камчилиги ҳам бор. Уруғдан кўпайишнинг камчилигига энг аввало, олинган кўчатларни генетик хилма-хиллиги ва ювенил (уруғдан чиққан майсадан ёки вегетатив куртақдан репродуктив органлар ҳосил қилиш) даврининг узунлигини кўрсатиш мумкин.

Вегетатив кўпайишда она ўсимликни генотипи сақланиб қолади ва ювенил давр қисқарок бўлади. Аммо кўпчилик турлар (энг аввало ёғоч ҳосил қиладиганлар) учун вегетатив кўпайиш муаммоси охиригача ўз ечимини топгани йўқ. Бунга асосий сабаблар қуйидагилар:

- *Биринчидан, кўпчилик турлар (навлар) ҳаттоки, ювенил босқичда ҳам вегетатив усулда керакли самара билан кўпаявермайди (эман, тилоғоч, ёнғоқдошлар ва бошқалар);*
- *иккинчидан, ўсимликларни кўпчилик дарахт навларини 10-15 ёшдан кейин, қаламча ёрдамида кўпайтириш мумкин эмас;*
- *учинчидан, ҳар доим ҳам стандарт экиш материали олиш мумкин эмас (юқумли касалликлар тўпланиши ва ўтиши мумкин);*
- *тўртинчидан, пайванд қилиш орқали катта ёшли (ёғочли) ўсимликларни кўпайтириш жуда ҳам қийин ва мураккаб; бешинчидан, йил давомида бир хил генетик материални олиш учун ишлаб чиқилган технологиялар самарадорлигининг ўта пастлигидир.*
- *Хужайра ва тўқималар културалари бўйича эришилган ютуқлар вегетатив кўпайишни тубдан янги бўлган усулни клонал микрокўпайтириш in vitro шароитида (пробиркада), жинсий бўлмаган йўл билан, ўсимликларни дастлабки нусхаси билан генетик бир хил бўлган навини яратиши).*

Бу усул асосида ўсимлик ҳужайраларига хо бўлган ноёб хусусият, тотипотентлик, яъни ташқи таъсирини бутун ўсимлик организми ҳосил бўлишига туртки бўлиши ётади. Албатта, бу усулни бошқа анъанавий усуллардан устунлик томонлари жуда ҳам кўп:

- генетик бир хил экиш материалнинг олиниши;
- меристема тўқималари культуралари ишлатилиши ҳисобига ўсимликларни вирусли ва бошқа юқумли касалликлардан ҳоли бўлиши;
- кўпайиш коэффициентининг юқорилиги (ўтчил ва гулли ўсимликлар учун 10^4 - 10^5 ; нинабаргли ўсимликлар учун -10^4);
- селекция даврининг қизариши;
- ўсимлик ривожланиши ювенил даврдан репродуктив фазага ўтишини тезлаштириши;
- анъанавий йўллар билан қийин кўпаядиган ўсимликларни кўпайтириши;
- ишни йил давомида ташиқил этиш имкониятларининг мавжудлиги ва кўчат материаллари ўстириши учун керак бўлган майдонни тежаши;
- ўстириш жараёнини автоматлаштириш имкониятлари ва ҳ.к.

Клонал микрокўпайтиришни дастлабки муваффақиятлари ўтган асрнинг 50-йиллари охирида француз олими Жорж Морел орхидея ўсимлигининг регенерантини яратганда эришилган эди. Бу муваффақиятга ўшў вақтларда яратилган, *In vitro* шароитида ўсимликларни апикал меристемаларини кўпайтириш техникаси ўз ҳиссасини қўшган. Одатда олимлар бирламчи эксплант сифатида ўтчил ўсимликларни устки меристемаларидан фойдаланадилар, ва озуқа муҳити таркибини ўсимликни регенерация ва пайдо бўлиш жараёнларига таъсирини ўрганадилар. Худди шу мақсадда чиннигул, хризантема, кунгабоқар, нўхат, маккажўхориқоқиўт ва бошқа ўсимликлар ўрганиб чиқилган эди.

Ж.Морель ўз тажрибаларида худди шундай қилиб, цимбидиум (орхидеялар оиласига мансуб ўсимлик)ни учки қисмини ишлатган. У ўсиб келаётган конуссимон кўринишдаги ва икки-уч барг олди элементларидан иборат бўлган ва ундан маълум шароитда куббали, юмалоқ-прокариотлар пайдо бўлишини кузатган эди.

Ҳосил бўлган (етилган) протокормларни бўлиш ва кейин алоҳида мустақил равишда янги тайёрланган озуқа муҳитида барг ва илдиз пайдо бўлгунча ўстириш мумкин бўлган эди. Натижада у, бу жараён чегарасиз эканлигини ва юқори сифатли генетик бир хил, вируссиз экиш материални жуда ҳам кўп миқдорда тайёрлаш мумкинлигини кузатган эди.

Мамлакатимизда бу усул илмий лабораторияларда синаб кўрилмоқда. Хусусан, Тошкент Давлат аграр университети биотехнология кафедраси илмий лабораториясида картошкани клонал микрокўпайтириш усуллари орқали касалликларга, иссиққа, шўрланишга чидамли навларини яратиш бўйича илмий изланишлар олиб борилмоқда.

Шуни ҳам эслатиб ўтиш ўринлики, микрокўпайтиришдан фойдаланиш доираси жуда кенг бўлиб, кундан кунга янада ошиб бормоқда. Энг аввало бу *in vitro* шароитида ўсимликларни ёғочли турларини, айниқса, ингибиторлар ва бу усулни йўқолиб кетаётган ўсимликлар ҳамда доривор ўсимликларни кўпайтириш учун ишлатилганда катта самара беради.

Маълумки, ёғоч ҳосил қилувчи дарахтлар, айниқса игна баргли ўсимликлар жуда ҳам секин ўсадилар, қийин томир оладилар, жуда кўп миқдорда иккиламчи бирикмалар (феноллар, терпенлар ва бошқа моддалар) сақлайдилар, бу моддалар эса алоҳида ажратиб олинган тўқималарда фенолаза ферментлари таъсирида оксидланадилар. Ўз навбатида фенолларни оксидланган маҳсулотлари одатда ҳужайрани ўсишини ва бўлинишини ингибирлайдилар, бу эса бирламчи эксплантларни нобуд бўлишига ёки ёғочли ўсимликлар тўқимасини регенерация имкониятларини пасайишига ва ёши улғайган сари секин бутунлай йўқолишига олиб келади. Аммо, қанчалик қийин бўлишига қарамасдан олимлар изланиш манбаи сифатида тез-тез ёғочли ўсимликларни тўқима ва органларидан фойдаланиб келмоқдалар. Ҳозирги вақтга келиб, *in vitro* шароитида кўпайтирилган ёғочли ўсимликлар сони 40 оилага мансуб бўлган 250 турдан ошиб кетган (каштан, дуб, қайин, заранг, тоғ тераги, толни тоғ тераги билан гибриди, сосна, арча ва ҳ.к.).

Ўсимликларни клонал микрокўпайтиришни усуллари ва босқичлари

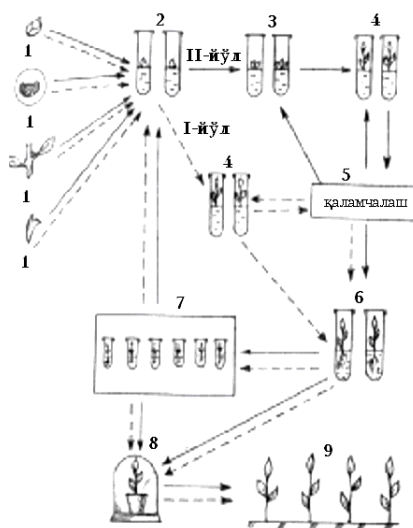
Клонал микрокўпайтириш жараёнини 4 га босқичга бўлиш мумкин:

- *биринчи – донор ўсимликни танлаш, эксплантларни ажратиш ва яхши ўсадиган стерил культура олиш;*
- *иккинчи – микрокўпайтиришни ўзи, бунда мериклонларни энг кўп (максимал) миқдорини олишга эришилади;*
- *учинчи – кўпайтирилган наведани илдиз олиши ва уларни тупроқ шароитига мослаштириш, керак бўлганда регенерант – ўсимликларни совуқ хароратда ($+2^0$, $+10^0$) сақлаш;*
- *тўртинчи – ўсимликни иссиқхона шароитида ўстириш ва уларни майдонга чиқариб экиш ёки сотишга тайёрлаш (3.8-расм).*

Клонал микрокўпайтириш кўп усуллари маълум. Кўплаб муаллифлар эксплантларни ўстиришга шароитни морфогенез жараёнига таъсирини ўргана бориб, ўстириш шароитини ўзгаришига ҳар хил мофогенетик реакция бўлишини кузатганлар, бу эса клонал микрокўпайтириш методларини янги классификациясини яратишига олиб келди.

Илмий адабиётлардан маълум бўлган, ўсимликларни микрокўпайтириш услублари асосида, бу жараённи қуйидаги йўллар билан амалга ошириш мумкин:

- *ўсимликда бор бўлган меристемаларни ривожланишини жадаллаштириш (поя апекси, пояни куртаклари);*
- *эксплантлар тўқималарида тўғридан - тўғри адвентив куртаклар ҳосил бўлишини индукция қилиш;*
- *соматик эмбриогенезни индукция қилиш;*
- *бирламчи ва кўчат олувчи калусли тўқималарда адвентив куртакларни табақалаштириш.*



3.8-расм. Ўсимликларни клонал микрокўпайтириш

1-йўл – бор меристемаларни ривожланишини фаоллаштириш усули;

2-йўл- эксплантда адвентив куртаклар ҳосил бўлишини индукция қилиш.

1-дастлабки эксплант танлаш; 2–стерил культура олиш; 3–бирламчи эксплантда, тўғридан – тўғри адвентив куртаклар ҳосил бўлиши; 4- куртакларни ўсиши ва микро навдаларни ҳосил бўлиши; 5–микронавдаларни кўпайтириш (қаламча); 6–микро навдаларни илдиз олиши; 7–регенерант ўсимликни паст хароратда сақлаш (депонаровака қилиш); 8–ўсимликларни иссиқхона шароитига ўтказиш; 9 – регенерант ўсимликларни далага экиш.

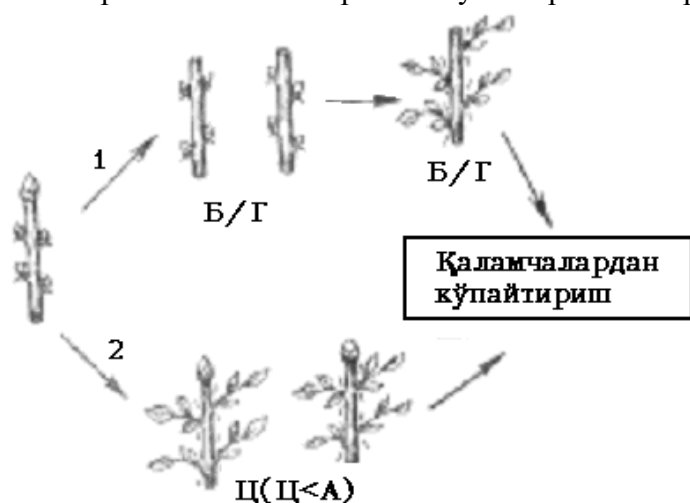
Ўсимликларни клонал микроқўпайтиришда ишлатиладиган асосий усул – бу ўсимликларда бор бўлган меристемаларни ривожланишини фаоллаштириш бўлиб, у апикал устиворликни (доминирования) олиб ташлашга асосланган (3.9-расм).

Бунга икки йўл билан эришиш мумкин:

- *пояни тепа меристемасини олиб ташлаш ва кейин наводани in vitro шароитида гормон сақламаган муҳитда микроқаламчалаш;*
- *озуқа муҳитига цитокинин таъсирига эга бўлган моддалар қўшиши (наводани ўсишини кучайтириши).*

Одатда, цитокинин сифатида – 6–бензиламинопурин (БАП), 6–фурфуриламинопурин (кинетин), ҳамда 2-изопентениладенин (2ip) ва зеатин ишлатилади.

Шундай йўл билан олинган наваларни бирламчи она эксплантдан ажратилади ва қайтадан янги тайёрланган озуқа муҳитида ўстирилади. Ҳозирги вақтда бу усул қишлоқ хўжалик ўсимликларини вируссиз экув материалларини тайёрлашда кенг қўлланилади. Шу йўл билан қанд лавлаги, тамаки, хмель, топинамбур, помидори, картошка, бодринг, қалампир, ошқовоқ ва бошқа ўсимликларни соғломлаштирилган кўчатларини тайёрлаш йўлга қўйилган.



9-расм.
Ўсимликларни бор меристемаларини фаоллаштириш усули билан кўпайтириш чизмаси:

- 1 - тепа меристемасини юлиб ташлаш йўли;
- 2 - озуқа муҳитига цитокининлар қўшиш йўли

Б/Г – гормонсиз муҳит; Ц- цитокининлар, А-ауксинлар.

Баъзи бир қишлоқ хўжалик ўсимликлари учун (масалан, картошка ўсимлиги) клонал микроқўпайтириш технологияси саноат даражасига кўтарилган. Ўсимликларда бор бўлган меристемаларни фаоллаштириш усулини ишлатилиши бир йилда бир дона картошка меристемасидан 10^5 дона ўсимлик етиштириш имконини беради, бундай технология пробиркада микро туганаклар - қимматбаҳо вируссиз уруғлик яратишни ўз олдига қўйган (3.10-расм.).

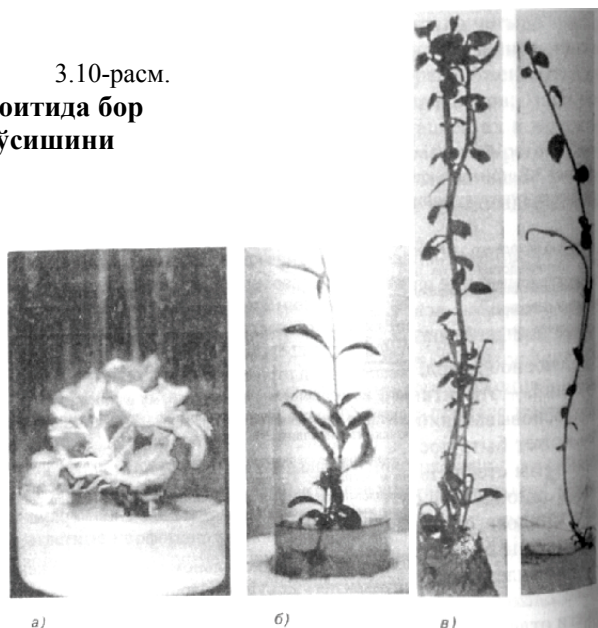
Иккинчи усул – Бу эксплант тўқималарида тўғридан-тўғри адвентив куртаклар пайдо бўлишини кучайтириш (индукция қилиш). Бу усул ўсимликни ажратиб олинган қисмини қулай озуқа муҳитида етишмаган қисмини (органларини) ҳосил қилишига асосланган, шундай қилиб, бутун ўсимлик ренерация (ҳосил) қилиш.

Адвентив куртак ҳосил қилишни ўсимликни ҳоҳлаган органи ва тўқимаси (ажратиб олинган куртак, барг, поя, уруғпалла, илдизни бир қисми ва х.к) асосида ташкил этиш мумкин.

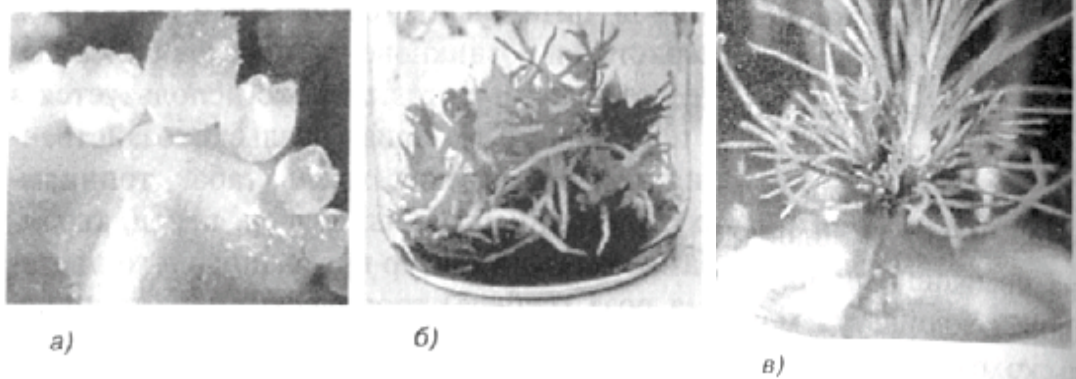
Аммо, материал заҳарланмаган (юкумли касалликлардан ҳоли) бўлиши шарт. Бу жараён, одатда алоҳида цитокинин ёки уни ауксин билан аралашмаси (10:1 ёки 100:1) сақлаган озуқа муҳитида амалга ошади. Ауксин сифатида кўпроқ β-индолил–3-сирка кислота (ИУК) ёки α-нафтилсирка кислота (НУК) ишлатилади.

Бу микроқўпайтиришни энг кенг тарқалган усули бўлиб, шу усул билан илдиз мевали гуллар (нарцисса, лилия, гиацинт, гладиолус, лолақизғалдоқ); Brassica авлодига мансуб ўсимликлар (рангли карам) шунингдек пиёз, саримсоқпиёз, помидор ва бошқа бир қатор ўсимликлар кўпайтирилган (3.11- расм).

3.10-расм.
Ўсимликларни *in vitro* шароитида бор
бўлган меристемаларни ўсишини



3.11-расм.
Ўсимликларни адвентив куртакни индукция
қилиш орқали кўпайтириш:
а- бугдой; б- орхидея; в- сосна.



Ер тути (земляника) ўсимлигини апикалли меристемаларини ўстиришга асосланган клонал микрокўпайтириш технологияси ҳам яхши йўлга қўйилган (3.12-расм.).



3.12-расм.
Ер тутини клонал кўпайиши

а- микрокўпайишни ызи;
б- адаптация былган ўсимлик.

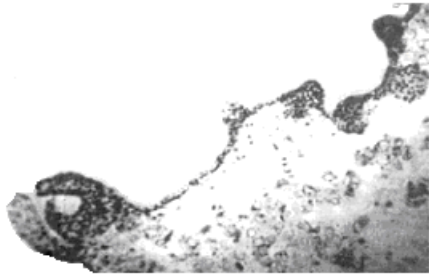
Ёш ва вирус билан касалланмаган, соғлом ўсимликни юқори меристемасини ажратиб олиб, уни Мурасига ва Скугани модификация қилинган озиқа муҳитида ўстирилади. Озуқа муҳити 0,1-0,5 мг/л 6- бензиламинопурин (БАП) сақлаши керак. 3-4 ҳафта ўтгандан кейин меристема майсага айланади ва уни асосида адвентив куртаклар ҳосил бўла бошлайди, ҳамда тез ривожланиб. Янги куртак солдилар. 6-8 ҳафта мобайнида куртакларни тартибсиз йиғиндиси (конгломерати) ҳосил

бўлади. Бу куртаклар ривожланишни ҳар хил босқичида бўлиб, бир-бирлари билан боғловчи тўқимлар орқали боғланган бўлади. Калта қаламчалардан барглар пайдо бўлади, уларни тагида эса янги адвентив куртаклар чиқа бошлайди.

Табиийки, изланувчиларни адвентив куртакларни келиб чиқиши, хусусан меристемани табақаланишида қайси бир хужайра қавати иштироқ этиши қизиқтиради. Ҳозирча бу масалада бир хил фикр йўқ. Масалан, Тран Тан Ван ўзини тамаки тўқималари билан олиб борган ишларида энг фаол тўқима эпидерма эканлигини, ундан озика муҳити таркибидаги гормон балансига қараб, куртак, каллус ёки илдиз чиқишлигини кўрсатиб берган.

Шунингдек, адвентив куртаклар меристематик хужайраларни юқори қатлампидан пайдо бўлиши ҳам кўрсатиб ўтилган. Сосна дарахти мисолида адвентив куртакни куртакни уруғпалласини ва субэпидермал қаватларида пайдо бўлиши кузатишган ва бу жараён сосна учун ишлатиладиган цитокининларга боғлиқ эмаслиги кўрсатиб ўтилган (3.13-расм).

Клонал микрокўпайтиришда қўлланиладиган учинчи усул. Соматик хужайралардан, ташқи кўриниши зиготали куртакчага ўхшаган куртаксимон структурани табақаланишига (дифференциация) асосланади. Бу усул соматик эмбриогенез деб ном олган. *In vitro* шароитида куртак ҳосил бўлишини *in vivo* (табиий) ҳолатидан фарқи шундан иборатки, соматик куртаклар, куртак қопчасидан ташқарида асексуал ривожланадилар ва ўзларини ташқи кўринишлари бўйича бир вақтни ўзида поя ва илдизни апикал меристемаларини ривожланиши кузатиладиган икки полярли тузумани эслатадилар.



3.13-расм.
Эксплантти эпидермал ва субэпидермал
хужайра қаватида адвентив
куртакларни ҳосил бўлиши

Стевардни тушунтирилишича, соматик куртаклар ривожланишни уч босқичини ўтадилар: глобуляр, юраксимон, торпедосимон ва оқибатда майса бўлиб униб чиқади. 1950 йилларда сабзи хужайраларида биринчилардан бўлиб кузатишган бу кўриниш ҳозирги даврда *Orchidaceae* ва *Rutaceae* оилаларига мансуб бўлган шунингдек бошоқчиларни баъзи бирларини (буғдой арпа) беда, редис, ток ва баъзи дарахтлар каби кўплаб ўсимликларни кўпайтириш учун ишлатилиб келинмоқда.

Тўқима культурасида эмбрионидларни пайдо бўлиши икки босқичда амалга ошади:

➤ *Биринчи босқичда хужайра эксплантлари озуқа муҳити таркибига солинган акусинлар, энг аввало 2,4 – дихлорфеноксирка кислотаси (2,4 -Д) ҳисобидан эмбрионалга айланади.*

➤ *Иккинчи босқичда ҳосил бўлган хужайраларни эмбрионидларгача ривожланишига мажбур қилиш керак бу эса, озуқа муҳит таркибидаги ауксинларни миқдорини камайтириш ёки уларни бутунлай чиқариб ташлаш орқали амалга оширилади.*

Соматик эмбриогенезни тўғридан – тўғри бирламчи эксплантлар тўқималарида, ҳамда каллусли культураларда кузтиш мумкин. Шунинг ҳам таъкидлаб ўтиш лозимки, каллусли культуралардан клонал микрокўпайтиришда фойдаланиш камроқ самара беради, чунки шу йўл билан тайёрланган экув материаллари (кўчатлар) донор – ўсимликга нисбатан генетик турғун (мустаҳкам) бўлмайди. Кўпинча, каллусли хужайраларни суяқ озуқа муҳитида ўстирилганда, соматик эмбриогенез келиб чиқади ва энг қийин операцидлардан ҳисобланади. Бунга сабаб, ҳар доим ҳам хужайраларга хос бўлган тотипотентлик амалга ошавермайди.

10-мавзу. Соғломлаштирилган, вирусдан холи экиш материаллари олиш.

Режа:

1. Ўсимлик меристемаларидан фойдаланиш.
2. Термотерапея усули
3. хемотерапея усули

Клонли микроўпайтиришнинг афзаллиги генетик бир хил вируссиз экиш материаллари олиш мумкинлигидир. Бунга апекс тўқималари ва пояга хос куртаклар меристемасидан фойдаланиб эришиш мумкин. Меристема ўсиш конуси ва бир ёки икки барг асосидан (примордий) иборат бўлиб, вирусдан ҳоли бўлади.

Вирус билан зарарланган ўсимликларнинг меристема тўқималари вирусдан ҳоли эканлиги биринчи бўлиб Чунг (1938) ва П.Р.Уайт (1943) томонидан аниқланган, XX асрнинг 50 йилларда георгина ўсимлигини ўсиш нуқтасидан вируссиз ўсимлик олиш бўйича биринчи муваффақиятли тажриба амалга оширилди. Бу усул муаллифлари Ж.Морель ва С.Мартинларнинг тахминича, касалланган ўсимликларда вируслар тарқалиши бўйича тез ўсаётган ёш органлардан орқада қолади, айниқса дифференцияланмаган ёш тўқималарда вируснинг миқдори йўқ даражада бўлади. Бу усул асосига қўйилган назарий концепция сабаби кейинги вақтларда аниқлана бошлади

Амалиётда қўлланиладиган ҳолатида структуравий асос бўлиб, ўсимлик ўсиш нуқтаси тузилишининг спецификаси хизмат қилади; унинг апикал меристема деб аталувчи дисталь қисми турли ўсимликларда турлича ўлчамга эга бўлиб, ўртача 200 мкм диаметрга ва 20-150 мкм узунликка эга бўлади. (4.13-расм) Дифференцияланаётган меристемани ҳужайраларни пастроқ қатламида ўтказувчи система боғламларини пайдо қилувчи прокамбий ҳосил қилади. Маълумки, клонли микроўпайтиришдаги муваффақият меристема эксплантини ўлчамига боғлиқ, барг асослари ва поя тўқималари қанча катта бўлса, морфогенез жараёни шунча енгил кечади ва нормал пробирка ўсимлиги ҳосил бўлиши билан тугайди. Шу билан биргаликда, вирус зарраларидан ҳоли зона турли вируслар учун турличадир. Бу ўсимликнинг турлари ва навларига билан боғлиқ. Донли экинлар колеоптилида, масалан, ўтказувчи найлардан ҳоли учки қисмининг ўлчами 250 мкм га етиши, мумкин. Апикал меристемани бундай ўзига хос тузилиши ўтказувчи тизимлар орқали вирусларни тез ташилишини истисно қилади, лекин плазмодезма орқали бириктирувчи меристема ҳужайраларига секин тарқалиш имкониятига йўл қўяди. Картошкани 200 мкм ўлчамдаги апикал меристемасини озиқа муҳитда културалаш ва кейинчалик регенерант ўсимлик олишда аниқланишича, олинган ўсимликлардан фақат 10 % гина Х- вирусдан, аммо 70 % У- вирусидан ҳоли экан.

Электрон микроскоп орқали, баъзи вируслар билан ўсимликлар меристемаларининг ҳам зарарланганлиги аниқланган бўлиб, бу зарарланган ўсимликнинг меристемаларига ҳам вируснинг етиб борганлигидан далолат беради.

Шундай қилиб, апикал меристемаларни вирус билан зарарланган ўсимликларни соғломлаштириш усулида қўллаш ҳам кам самара берар экан. CarMV ва CarVMV вируслари билан зарарланган чиннигул, цимбидиум ўсимликлар апикал меристемаларидан *in vitro* шароитида зарарланган (инфекцияга учраган) мериклонлар олингани тажрибаларда кўрсатилган.

Термотерапея усули *in vivo* шароитида, шунингдек *in vitro* шароитида ҳам қўлланилиб, қуруқ, иссиқ хаводан фойдаланишга асосланган. Термотерапея жараёни орқали ўсимликларни вирусдан ҳоли қилиш механизми ҳақида турли назариялар мавжуд. Улардан бири юқори ҳарорат вирус заррачаларига тўғридан-тўғри уларнинг рибонуклеин кислоталари ва оқсил қобиғи орқали таъсир этиб, уларнинг физик парчаланишига ва вирус заррачаларининг зарарлаш қобилятини йўқолишига олиб келади деган фикр берса, иккинчи назария эса, юқори ҳарорат вирусларга ўсимликларни метаболизми орқали таъсир этади, деган тахминни илгари суради. Юқори ҳарорат таъсирида вирус заррачаларини синтези ва деграцияси орасидаги мувозанат бузилади. Агар синтез амалга ошса, унда зарарланган тўқималарда вируслар концентрацияси ошади.

Термотерапея қилинаётган ўсимликлар махсус термокамераларга жойлаштирилади ва биринчи ҳафтада ҳарорат 25⁰ дан 37⁰С гача ҳар куни 2⁰С дан ошириб борилади. Термотерапеяда бутун жараён давомида опимал режимни яратиш ва уни ушлаб туриш ҳам

муҳим бўлиб, ҳарорат 37⁰С, кундузги лампа ёруғлиги 5 минг лк, културага қараб, фотодавр бир суткада 14-16 соат, термокамеранинг ҳаво намлиги 90 % ни ташкил этиши лозим.

Термотерапеяни давомийлиги вирус таркибига ва уларнинг юқори ҳароратга чидамлилики даражасига боғлиқ. Масалан, агар чиннигулга 10-12 ҳафталик иссиқлик таъсири етарли бўлса, хризантемани Б-вирусидан холи қилиш учун эса бу муддат 12 ҳафта ва ундан кўпроқни ташкил этади. Аммо, пиёзли ўсимликлар, цимбидиум, атиргуллар ва бошқа шу каби ўсимликларга узоқ вақт *in vivo* термотерапея қилиш салбий таъсир кўрсатади. Бундай ўсимликлар учун термотерапеяни *in vitro* регенерант ўсимликларда ўтказиш мақсадга мувофиқдир.

Термотерапеяни ўсимликларни вирусдан тозалашдаги ижобий таъсири билан бирга юқори ҳароратнинг *in vitro* шароитида баъзи ўсимликларни ўсиш нуктасига ва морфогенез жараёнига ҳам яхши таъсир кўрсатиши аниқланган. Термотерапеяни қўллаш орқали кўпайтириш коэффицентини 50-60% га ошириш, пробирка регенерант ўсимликларини тупроқ шароитига мослашишини яхшилаш ва шунингдек, бошланғич вируссиз ўсимликлар сонини кўпайтириш имконини беради.

Термотерапеяни меристема култураси билан биргаликда қўллаш орқали нина барглиларни регенерант ўсимликларини 70%ини хлороз вирусидан, кулупнай ўсимлигини 90 %и, қизил ва қора қарағат (смородина) 20%и, маймунжоннинг 50%и, картошка ўсимликларининг 80% соғломлаштирилган, вирусдан холи ўсимликларини олиш мумкин.

Ўсимликларда вируснинг мавжудлигини иммунофермент ташхиси, электрон микроскоп ва ўтчил индикатор – ўсимликлар ёрдамида аниқлаш мумкин.

Вируссиз, ўсимликлар олишнинг бошқа усули – **хемотерапея** усули бўлиб, бу усул апикал меристемалар култраланаётган озиқа муҳитга гуанозинни аналогҳои–1β–Д–рибофуранозил–1,2,4–триазол–3 – карбоксимид (вирозол деб ҳам аталади) 20-50 мг/л концентрацияда қўшишдан иборат. Бу вирусга қарши препарат бўлиб кенг таъсир спектрига эга. Вирозолни културал муҳитда қўлланилганда вируссиз меристема ўсимликларини олиш фоизи вирус одатий бўлиб қолган ўсимликлар учун 80-100 % назоратда эса 0-41 % га ошди. Хемотерапея усули олхўри, гилос, маймунжон, турли гуллар ва бошқа ўсимликларга қўлланилганда яхши натижалар олинган. Вируссиз экиш материаллари олишнинг хемо ва термотерапея усуллари иқтисодий кам фойда беради. Шунинг учун Ҳозирги вақтда трансгенотизм усуллари ёрдамида ўсимликларни вирусга генетик чидамли шакллари яратилмоқда.

Ўсимликларни клонли микрокўпайтиришга таъсир этувчи омиллар.

Режа:

1. Генетик ва физиологик омиллар.
2. Гормонал омиллар.
3. Физик омиллар.

Микрокўпайтиришга генотип, бошланғич ўсимликни ёши, ажратилган мавсуми, шунингдек бирламчи эксплантни ўлчами таъсир кўрсатади. Гормонал таъсирлардан цитокинин ва ауксинларни нисбати, озиқа муҳитни минерал моддалар, витаминлар, сахароза бўйича таркиби, физик омиллардан эса муҳит консистенсияси (суюқ ёки агарланганлиги), кислоталилиги, ёритиш шароити, шунингдек, ҳарорат режими ва ҳавонинг намлиги таъсир кўрсатади.

Генетик ва физиологик омиллар. Клонли микрокўпайтиришни муваффақиятини белгиловчи омиллардан бири, бошланғич ўсимликнинг генотиби катта аҳамиятга эга. Икки паллали ўтчил ўсимликлар бир паллали ўсимликлар, дарахтларга нисбатан катта морфогенетик потенцияга эга, яъни уларнинг адвентив куртаклар пайдо қилишга, ниҳолларни ўсиши, илдиз отиши ва кўпайтиришни юқори коэффицентига эга бўлиши тажрибаларда аниқланган. Масалан, қанд лавлаги, тетроплоид шаклдаги дурагайлардан энг

кўп регенерант ўсимликлар олинган, энг ками диплоидлардан, триплоид дурагайлардан олинган ўсимликлар сони оралиқ ҳолатни эгаллайди.

Бошланғич эксплантнинг ёши ҳам морфогенезни намоён қилиш қобиляти жиҳатидан аҳамият касб этади. Етилган муртаклар, 20-30 кунлик ўсимталар ёки уларнинг турли қисмлари (ювенил материал) етук ўсимлик тўқималарига нисбатан юқори морфогенетик потенциалга эга ва катта микдорда адвентив куртакларни ҳосил қилади, келгусида яхши ўсадиган ва илдиз ҳосил қиладиган ниҳоллар пайдо қилувчи ички меристемаларни ривожланишини стимуллайди. Бундай ҳолларда битта муртакдан бир йилда 10-100 минг ўсимлик олинса, етилган ўсимликнинг ички ёки апикал меристемасидан кўпайиш коэффиценти 1-2 баробарга камаяди.

Бирламчи эксплантнинг ёши *in vitro* кўпайтирилган микрониҳолларнинг илдиз отишига ҳам муҳим таъсир кўрсатади. Бошланғич материалнинг ёши катталаша борган сари ниҳоллар ва қаламчаларнинг илдиз отиши қобиляти пасаяди.

Амалий жиҳатдан ўсимликларни, айниқса, дарахтларни 20 йилдан сўнг яъни ҳўжалик аҳамияти муҳим белгилари баҳоланганидан сўнг кўпайтириш мақсадга мувофикдир. Лекин улардан бундай қари ўсимликларни *in vitro* кўпайтириш катта қийинчиликлар туғдиради. Биринчидан, катта ёшдаги ўсимликларни барча тўқима ва органлари замбуруғ, бактериялар билан эндоген зарарланган бўлиб, бу асептик култура олишда қийинчиликлар туғдиради. Иккинчидан, етук дарахтларнинг куртаклари ёки бошқа органлари ўтчил ўсимликларга нисбатан *in vitro* шароитини турлича қабул қилади. Бу културага қайта ўтказилган эксплантларнинг яхши ўсиши ва ривожланишини таъминловчи оптимал шароитни танлаш бўйича махсус тажрибалар ўтказишни тақазо қилади.

Физиологик омилларга эксплантни ажратиш даври ҳам киради. Ўсимликларни вегетация даврида ажратилган тўқима ва органлар, мажбурий ва чуқур тиним даврида ажратилганларига нисбатан, озиқа муҳитнинг таркибига таъсирчанлиги ва адвентив куртаклар пайдо қилиш, ниҳолларининг шаклланиш ва илдиз отиш қобиляти юқори бўлади.

Эксплантлар ўлчами ҳам муваффақиятли микрокўпайтиришни белгиловчи омиллардан биридир. Эксплант қанчалик кичик бўлса, регенерацияланиш хусусияти шунчалик кам бўлади ёки аксинча, паренхима, ўтказувчи тўқималар ва камбийдан ташкил топган йирик ўлчамдаги эксплантлар озиқа муҳит таркибидаги фитогормонлар нисбатидан қатъий назар, куртаклар ҳосил қилади. Лекин бошқа томони ҳам борки, катта ўлчамдаги эксплант ҳужайраларида вирус ва бошқа патогенлар пайдо бўлиш эҳтимоли юқори бўлиб, бу *in vitro* ўсимликлар тўқимасини соғломлаштирилишига тўсиқ бўлади.

Эксплантларни оптимал ўлчами бирламчи эксплант манбаи бўлиб хизмат қилувчи донор ўсимликнинг турига хос хусусиятларига ва органлари хусусиятларига боғлиқ. Малина учун бирламчи эксплант ўлчами 2 мм деб қабул қилинган, бунда ўсимликнинг апикал учларининг 60%и Морел муҳитида регенерацияланган. Хмел учун бу кўрсаткич 0,1 дан 0,2 мм, пиёз ва сарисоқ пиёз учун меристемаларнинг оптимал ўлчами 0,5-0,8 мм ни ташкил қилади.

Гормонал омиллар. Гормонларнинг нисбати (цитокинин ауксин) юқори бўлганда ички меристемалар ёки адвентив куртаклар ривожланади, паст бўлганда илдиз ҳосил бўлиши индуцирланади, ўртача бўлганда эса каллус тўқималари ҳосил бўлиши ва пролиферацияси кузатилади.

Клонли микрокўпайтиришда ауксин компонентлари сифатида ИСК, баъзи ҳолларда НСК, цитокинин сифатида эса кинетин ва БАП қўлланилади.

Ўсимликларни микрокўпайтиришда фойдаланиладиган цитокининларни унинг фаоллиги бўйича қуйидаги тартибда жойлаштириш мумкин: кинетин < 6 бензил аминопурин (БАП) < 2-изопентиладенин (2 ip) < зеатин.

Цитокинин ва ауксинлардан ташқари озиқа муҳитга баъзида гебберал кислотаси ҳам қўшилади, у шаклланган куртакларни ўсишини ва чўзилишини (элонгацияси) стимуллайди ва ер устки қисми яхши ривожланган ўсимлик олиш имконини беради.

Клонли микрокўпайтиришга гормонлар билан бир қаторда минерал тузлар, витаминлар ва углеводлар ҳам таъсир кўрсатади.

Клонли микрокўпайтиришнинг барча босқичларида Углерод манбаи сифатида сахароза билан бир қаторда глюкоза, фруктоза, галактоза ва бошқалардан ҳам фойдаланиш мумкин. Маълумки, *in vitro* ўсимликлар тўқимасини културалашда углеводли озиқа сифатида фойдаланиладиган манбалардан глюкоза сахарозадан кейинги ўринни эгаллайди.

Физик омиллар. Озиқа муҳитнинг қаттиқ, суюқ ҳолатда бўлиши ҳам эксплантларни ўсиши ва адвентив куртакларни пайдо қилиш жараёнларига таъсир этувчи муҳим омиллардан бири ҳисобланади. Маълумки, ниҳолларни учки қисмидан олинган эксплантлар суюқ озиқа муҳитларда роллер типдаги аппаратларда култураланганда уларнинг ўсиши сезиларли даражада стимулланади, ниҳолларни апикал доминантлиги аниқ намоён бўлмайди, ўсиш даври ва қайта экишлар сони қисқаради, бу ўсимликларга озиқа моддалар билан яхши таъминланиш имконини беради. Бошқа томонидан қараганда, бу шароитда аномал, эгри –бугри ниҳолларнинг пайдо бўлиш эҳтимоли ортади. Агарли озиқа муҳитлардан фойдаланиш орқали бу муаммоларни йўқотиш мумкин, лекин шу билан бирга бу усул эксплантларни озикланиши шароитини ёмонлаштиради ва метаболизм маҳсулотлари чиқиб кетишига тўсқинлик қилади.

Кўпчилик тадқиқотчиларнинг фикрича, ёритиш интенсивлиги органогенез индукциясида муҳим рол ўйнаётган экан. Ажратилган тўқималар ўсишининг интенсивлиги ва характери ёруғликнинг спектрал таркибига ҳам боғлиқ.

Ҳарорат метаболизм жараёнларини фаоллаштириш орқали ўсимликнинг ажратилган тўқималарини ўсиши ва регенерацияланишига, муҳим таъсир кўрсатади. Кўпчилик ўсимлик тўқималари учун оптимал ҳарорат 23 –25⁰С ни ташкил этади.

Ҳарорат режими биринчи навбатда, ўсимлик турига боғлиқ. Масалан, тропик ўсимликлар учун ўстиришнинг оптимал ҳарорати 27⁰С атрофида, бошқа кўпчилик ўсимликлар учун эса –25⁰С дир. Клонли микрокўпайтиришда пробирка ўсимликлари климатик камераларда 16 соатли фотодпериодда ва ҳавонинг намлиги 70 % бўлган шароитда ўстирилади.

Шундай қилиб, ўсимликларни кўпайтириш коэффицентини оширишда, ҳар бир тур учун, унинг табиий ўсиш шароитини ҳисобга олган ҳолда културалашнинг индивидуал шароитини яратиш зарур. Демак, клонли микрокўпайтириш усули ўсимликларни вегетатив кўпайтиришнинг янги истиқболли усули бўлиб, генетик бир хил соғломлаштирилган экиш материаллари олиш, кўпайтиришнинг юқори коэффицентига эришиш, селекцион жараёнларни қисқартириш, бутун йил давомида иш олиб бориш, ўсимликларни ўстириш учун зарур бўлган майдонларни қисқартириш имконини беради. Дунёнинг кўпгина мамлакатларида клонли микрокўпайтириш биоиндустрияси оқими саноат асосига қўйилган ва ўнлаб корхоналар фаолият юритмоқда. Масалан, Францияда гулли ўсимликлар маҳсулотларининг 94% ини ажратилган тўқималар култураси усули ёрдамида, АҚШда 100 га яқин тижорат корхоналари манзарали, мевали ва ўрмон ўсимликлари, сабзавотларнинг экиш материалларини клонли микрокўпайтириш усули ёрдамида олинади. Дунё бозорида соғломлаштирилган экиш материаллари етиштириш бўйича Голландия, олма, олхўри ва шафтоли кўчатларини (ҳар йили 250-500 мингтагагача) етиштириш бўйича Италия етакчилик қилади.

АДАБИЁТЛАР:

1. Р.М.Артикова, С.С.Муродова, Қишлоқ хўжалик биотехнологияси Тошкент 2010й
2. Быков В.А. и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. – М. Высшая школа, 1987.
3. Гаврилова Н.Н. Липиды микроорганизмов для кормовых целей. М., ВНИИСЭНТИ, 1985.
4. Глележа А.А. и др. Микробные ферменты в народном хозяйства – Вильнюс: Мокслас, 1985.
5. Давронов К. Микроблар дунёси. Тошкент: ТошДАУ, 2001.
6. Давронов К., Хўжамшукуров Н. Умумий ва техник микробиология. Тошкент, ТошДАУ, 2004.
7. Бабаев А.А. – Биотехнология. М., Наука, 1984.
8. Беккер М.Е. – Введение в биотехнологию. М., Пищевая промышленность, 1978
9. Бич Г., Бест Д., Брайерли К и др. Биотехнология, Принципы приложения. М., Мир, 1988.
10. Артамонов В.И. Биотехнология агропромышленному комплексу. Москва. Наука. 1989, 165с.
11. Безбородов А.М. Биотехнология продуктов микробного синтеза. М., «Агропромиздат» 1991. 240 с.
12. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн. /Под ред. Н.С.Егорова., В.Д.Самуилова. Кн. 6: Микробиологическое производства биологически активных веществ и препаратов/ Быков В.А., Крүлов И.А., Манаков М.Н. и др. - М.: Высш. шк., 1987. - 143 с.
13. Грачева И.М., Гаврилова Н.Н., Иванова Л.А. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров. - М.: Пищевая промышленность, 1980. 448 с.
14. Грачева И.М. Технология ферментных процессов. М., 1975.
15. Иванова Л.И.Войно Л.И., Иванова И.С. «Пищевая биотехнология» Книга 1. М., Колос. 2008 г. 467 с
16. Иванова Л.И.Войно Л.И., Иванова И.С. «Пищевая биотехнология» Кника 2М., Колос.2004 г. 460 с
17. Колунянц К.А., Голгер Л.И. Микробные ферментные препараты. М., 1979.
18. Колунянц К.А., Голгер Л.И. Ферменты медицинского назначения /Под ред. А.А. Терлишна./ Л. 1975.
19. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток/ Пер. с англ. М., 1978.
20. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы. М., 1977.
21. Варфагомев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология. Кинетическая основы микробиологических процесов М., Высшая школа, 1990.
22. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М., Изд-во МГУ, 1989.
23. Еликов П.П. Основы биотехнологии. С.п.б. Иф. «наука», 1995.
24. Контере В.М. Теоритические основы технологии микробиологических производств. М., «Агропромиздат», 1990.
25. Тутов И.К, Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных препаратов – Ставрополь, 1997.
26. Физические основы испособы микрофльтрации и ее применение в технологии производства ветеринарных иммунобиологических препаратов Ч. IV. «Микрофльтрация» (Воронин Е.С, Тихонов И.В и др) М., МГАВМи Б.им.К.И. Скрыбина, 2000.
27. Сайтлар: www.molbio.ru; www.biotech.com

