

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

**МИРЗО УЛУГБЕК НОМИДАГИ ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕСИТЕТИ**

КИМЁ ФАКУЛЬТЕТИ

Табиий бирикмалар кимёси кафедраси

Маманова Бахтинисо

Реферат

Мавзу: Ферментлар

Ферментлар инженерлиги

Режа:

1. Ферментлар инженерлигининг асосий вазифаси.
2. Микроорганизмлардан фермент препаратларини ажратиб олиш усуллари
3. Тозаланмаган, комплекс фермент препаратларининг олиниши.
4. Чўктириш усуллари ва унинг назарияси.
5. Ферментларни тозалаш усуллари.

Ферментлар инженерлигининг асосий вазифаси – биологик система ёки тирик ҳужайралардан ажратиб олинган ферментларнинг каталитик хусусиятларидан фойдаланган ҳолда биотехнологик жараёнларни яратишдир. У янги маҳсулотларни олиш, уларнинг сифатини яхшилаш ва иқтисодий кўрсаткичларини кўтариш билан боғлиқ бўлган масалаларни ечади. Ҳозирги кунда амалиётда ферментлар кенг қўлланади.

Маълумки, ферментлардан органик синтезларни катализатори сифатида фойдаланилади. Шунга қарамай, ферментларнинг “нозик” томони ҳам бордир, яъни уларнинг бузилишидир. Улар кам чидамли моддалар бўлиб, нозик макромолекуляр структурали оқсиллардир. Улар ташқи таъсир остида осонгина ўз хоссасини йўқотади.

Ферментлар катализаторлигида кечадиган реакциялар мураккаб механизмга эга. Уларнинг активлигини ташқи муҳитнинг ўзгариши, унинг кислоталилиги, уларни активлаштирувчи ёки сусайтирувчи қўшимча моддалар қўшиш билан бошқариш мумкиндир.

Ферментлар манбаи турли ҳайвон, ўсимликларнинг тўқималари, микроорганизмлар бўлиши мумкин. Ферментлар қайси бири кераклиги ва қайси бирини олиш қулайлигига қараб танланади.

Яқин давларгача амалий мақсадларда ҳайвон ва ўсимлик ферментларидан фойдаланиб келинган. Ҳайвонлардан олинадиган ферментлар гўшт саноатининг йўлдош маҳсулотлари ҳисобланади. Барча тўқима ва ҳужайралар ичида ферментларга бой орган ошқозон ости безидир. Ундан таркибида бир қатор гидролитик ферментлар (амилаза, протеаза, липаза ва б.) тутган комплекс препаратлар олинади. Масалан, ошқозон ости безидан панкреатин - қуритилган экстракт олинади.

Ҳайвон хомашёларидан айрим ферментларнинг тозаланган препаратлари - пепсин, трипсин, химотрипсин, реннин (химозин), рибонуклеаза, ДНКаза, липаза, гиалуронидаза, каталаза ҳам ажратиб олинади.

Ўсимликлардан саноат миқёсида протеолитик ферментларнинг айрим препаратлари - папаин (қовун дарахти мевасининг шарбатидан), фицин (анжир барги ва *Ficus* оиласига мансуб ўсимликлардан) ажратиб олинади.

Шу билан бирга ўсимликлардан фермент ажратиб олиш иқтисодий жиҳатдан самарали эмас, чунки сарфланадиган ўсимликка нисбатан олинадиган маҳсулот кам миқдорда бўлади. Ундан ташқари ҳар доим ҳам исталган минтақада керакли ўсимликни ўстириш имкони йўқ.

Ҳайвонлардан ферментларни ажратиб олишда ҳам айрим қийинчиликлар туғилади. Шунинг учун ҳозирда ферментлар манбаи сифатида микроорганизмлардан кенг фойдаланилмоқда.

Микроорганизмлар — фермент олиш учун жуда қулай манба ҳисобланади, чунки уларнинг ҳужайрадаги концентрациясини микроорганизм ўсишини тезлатиш ёки генетик манипуляция ҳисобига ошириш мумкин. Микроорганизмлар тез ўсади, арзон муҳитларда ўсади ва турли ферментларга бойдир.

Микроб ферментлари ҳозирда ўсимлик ва ҳайвон ферментлари ўрнини босмоқда. Қатор ферментлар медицина диагностикасида ҳам ўзига хос ўрин эгаллаб келмоқда. Масалан, холестериноксидаза қон зардобдаги холестерин, уреаза эса сийдик кислотаси миқдорини миқдорини ўлчашда ишлатилади. Ген инженерлиги тадқиқотларида эса рестриктацион эндонуклеазалар ва лигазалар ишлатилади.

Микробиологик усулда олинган ферментлар пластмасса ишлаб чиқаришда ҳам ўрин эгаллайди.

Қаттиқ ёки суяқ озук муҳитларида ўстирилган микроорганизмларнинг култураси ва уларнинг културал суяқликлари таркибида жуда кўп миқдорда балласт моддалар бордир. Ферментларни ажратиш ва тозалаш - кўп меҳнат ва харажат талаб қилувчи жараёндир, агарда фермент препарати микроорганизм култураси кўринишида ишлатилса, у тозаланмайди. Спирт ва терини ошлаш тармоқларида тозаланмаган микроорганизмлар културасини 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, пишлоқ, крахмал ва шарбат экстракция қилувчи), ҳамда текстил, 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 културал суяқлик, продуцентнинг биомассаси ёки қаттиқ озук муҳитда ўстирилган културанинг сувли экстракти хизмат қилади. Фермент препаратлари кукун ёки суяқ концентрат кўринишида олиниши мумкин. Ажратиш жараёнида препаратнинг умумий массасида фаол оксилнинг нисбий улуши, яъни унинг улуший фаоллиги ортади.

Тозаланмаган, комплекс фермент препаратларининг олиниши.
Тозаланмаган фермент препарати - микроорганизм културасини мўътадил шароитда намлиги 8-12% га олиб келинган ва бутун озук муҳити қолдиқлари билан биргаликдаги массасидир.

Тозаланмаган фермент препарати културани қаттиқ ёки суяқ озук муҳитида ўстириш йўли билан олиниши мумкин. Суяқ муҳитда ўсган култура қуритишдан олдин биомассаси ва озук муҳити қолдиқларидан қисман тозаланган ёки шундайлигича қуритилган бўлади.

Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизм культураси одатда 35 дан 58 % гача намликка эга бўлади. Бундай маҳсулот 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 хўл культура иссиқлик берувчи қурилма билан биргаликда 80-85°C да қуритгичга тушади. Бундай юқори ҳароратда қуритилувчи хўл микроорганизмларнинг майда бўлақларидаги намни буғланиши ҳисобига қаттиқ қизиб кетиш ҳолати кузатилмайди ва ундаги ферментларнинг фаоллиги тўлиқ сақланади. Кўпчилик барабанли қуритгичларнинг ички томонида парраксимон куракчалар мавжуд бўлиб, барабан 6-8 мин⁻¹ тезликда айланиши ҳисобига қуритилаётган материални бир текисда тарқалишини ва қуритилишини таъминлайди. Шунинг учун бундай типдаги қуритгичда қуритилган маҳсулот бутун массаси бўйлаб бир хил намликка эга бўлади. Ушбу қуритгичда микроорганизм бўлақчалари 3-7 мин. давомида қуритилади, берилаётган иссиқлик тезлиги 2-3 м/с, 80-85°C ҳароратда ҳамда чиқишда эса 60-65°C бўлади ва қуритилаётган материал ҳарорати 40°C дир. Қуритиш жараёнида атиги 3-10% гача фермент фаоллиги йўқотилиши мумкин.

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

Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмларни қуритиш учун ҳар хил конструкцияли қуритгичлардан фойдаланиш мумкин, қайсики

маҳсулотнинг фаоллиги пасайишини минимумгача туширишни, унинг курутгичда 5-8 мин. давомида бўлиши ва чиқишида 40-42°C дан пастда бўлишини таъминлайди.

Тайёр қуруқ микроорганизмлар махсус қоплаш машиналарида 25-40 кг қилиб қопланади ва тайёр маҳсулотлар омборига юборилади.

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

Микробиология 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 тўрсимон бўлиб, бўз ёки филтрловчи сунъий газлама билан ўралган ва у филтрланувчи суюқликка 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 асептика шароитларини таъминлай олмаслиги билан ажралиб туради.

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

Филтр-пресснинг камчиликлари горизонтал камерали типдаги ФПАКМ да бирмунча бартараф этилган. У устма-уст жойлашган филтрловчи

плиталар ва фильтрловчи газламадан иборат. Ушбу ускунанинг иши автоматлаштирилган ва иш юзаси 2,5 дан 50 м² хажмга зга. Нисбий самарадорлиги бошқаларига нисбатан 6-8 марта юқори ва фермент фаоллиги 4-5% атрофида йўқотилади. Уларни ишлаб чиқаришга жорий қилиш жуда истиқболли ва бактериялар культурал суюқлигини филтрлашда жуда қўл келади.

Фермент саноатида 8СМ типигаги 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 типигаги сепараторлар ҳамда "Альфа-Лаваль" (Швеция) фирмасининг сополи сепараторлари ишлатилади.

Биомассани филтрлаш самараси ишлатилаётган ускуна типига, озуқа муҳит таркибига, ажратилаётган бўлакчалар катта-кичиклигига, эрмаган фракциялар миқдори, филтрловчи материалнинг физик-кимёвий хусусиятларига, ҳарорат режимига ва бошқа омилларга узвий боғлиқдир. Филтрлаш жараёнини яхшилаш мақсадида культурал муҳит кимёвий қайта ишланади, яъни ишқорийлиги рН 8-8,5 га келтириб 0,1%ли СаСl эритмаси ва ҳар хил кизелгурлар (диатомит, радиолит, микрозил, кларгель ва х.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 суюқлик филтрлати эса тоза фермент препарати олиш учун қайта ишлашга юборилади.

Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлардан ферментларни экстракция қилиш. Барча ферментлар асосан сувда эрувчандир. Шунинг учун энг яхши экстрагент бўлиб сув ҳисобланади. Микроорганизмлардан ферментларни олиш учун улар майда қилиниб

хужайра деворлари механик ёки автоматик ҳолда бузилиб, экстракция жараёнига жалб этилади. Бу усулда ҳам ҳўл ҳолдаги, ҳам қуруқ ҳолдаги микроорганизмдан фермент эритмасини олиш мумкин. Биомассадан фермент экстракциясини тўлиқ амалга ошириш учун ҳарорат, рН, жараён давомийлиги, экстракция ускунасининг конструктив хусусиятлари, ажратилаётган 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 35-40°C да инактивацияга учрайди. Шунинг учун завод шароитида иложи борица сувнинг ҳарорати 22-25°C да ушлаб турилади ва ҳар бир микрофлора ўсмаслиги учун антисептиклардан (формалин, бензол, толуол, хлороформ ва х.к.дан) фойдаланилади. Кўпчилик ҳолатларда ферментларни рН 5-7 кўрсаткичида тўлиқ ажратиб олиш мумкин.

Биошрот билан ферментларни кам исрофгарчилиги асосида қуюқлаштирилган экстрактлар олиш учун махсус экстракция ускуналарини ишлатиш керак. Бу қурилмада экстракция қилинаётган микроорганизм ферменти нисбатан кўп фаолликни йўқотади ва қўл ишига асосланади.

Вакуум-буғлантириш усулида фермент эритмаларини қуюқлаштириш. Қаттиқ ва суюқ озук муҳитларида ўстирилган микроорганизмларнинг экстрактлари сақлаш учун чидамсиздир. Тайёр техник препарат формаларини (П2х ва Г2х) олиш ва уларни қуюқлаштириш керак. Қуруқ техник ёки тоза фермент препаратларини вакуум-буғлантириш усули ҳам бир босқич бўлиб ҳисобланади.

Одатда ферментлар буғлантириш ҳароратига жуда таъсирчан бўлади. Шунинг учун қуюқлаштиришнинг асосий шарты паст ҳароратда қайнатиш ва жараёни қисқа муддатда олиб бориш билан бирга, буғлантирилаётган суюқликни қизиб кетиши ва ферментлар инактивацияга учрашини олдини олишдир. Агарда қуюқлаштирилаётган эритма қанчалик тоза бўлса,

шунчалик кам миқдорда ҳар хил моддаларни кам тутати ва ундаги фермент юқори ҳароратга жуда ҳам таъсирчан бўлади. Қаттиқ озук муҳиtida ўстирилган организм экстрактида жуда кўп миқдорда ҳимояловчи бирикмалар бўлади ва улар қуюқлаштириш жараёнида фермент инактивациясини олдини олади, лекин культурал суюқликни қуюқлаштиришда бунинг аксини кузатиш мумкин, яъни фермент кўп миқдорда фаоллигини йўқотати. Қуюқлаштириш жараёнида фермент эритмаларидаги моддаларнинг миқдори ва минерал таркиби бирмунча ўзгаради, қуруқ модда ҳисобига эса 11-20 %га камаяди ва қуюқлашган экстрактнинг рН кўрсаткичи ҳам ўзгаради. Продуцентнинг 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 борилиш режимига, балки ускуна ёки қурилманинг конструкциясига ҳам боғлиқдир. Кейинги йилларда вакуум-буғлантириш ускуналари анча такомиллаштирилмоқда. Ушбу ускуналар трубка шаклида (горизонтал, вертикал ва қия) бўлиб, жараёни ўтиш муддатини 10 маротабага яқин қисқартирди ва ферментни фаоллигини йўқолишини бир мунча камайтирди. Булар жумласига «Альфа-Лаваль» (Швеция), «Единство» (Югославия), «Люва» (Швейцария), «APV» (Франция) ва б. бир қанча фирмалар ускуналарини киритиш мумкин ва уларнинг самарадорлиги 200 дан 20000 л/с ни ташкил қилади ҳамда ферментни фаоллиги 10% атрофида йўқотилади.

Фермент эритмаларини мембраналар ёрдамида тозалаш Мембранали тозалаш усулига диализ ва электродиализ, баромембранали усулга эса қайтариловчи осмос, ультрафилтрация, микрофилтрация ва нозик филтрация кабилар қиради.

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

$$Q = DdS\Delta C$$

Бунда, Q – маълум вақт ичида мембранадан ўтган модда миқдори, Dd – диализ коэффиценти, S – мембрана сиртининг юзаси, ΔC – мембрананинг ҳар икки томонидаги моддаларнинг концентрацияси 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 концентрацияли тузлар билан чўктирилганда диализдан ва элетродиализдан унумли фойдаланиш керак. Лекин тўртламчи структурага эга бўлган ферментларни ва металлоферментларни ажратишда элетродиализдан 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 яримўтказгич мембраналар ишлатилади, пергамент, целлофаннинг ҳар хил турлари, ультрафилтрацияда ишлатиладиган мембраналар ва бошқалардир. Диализ усули бир қанча камчиликларга эга бўлганлиги сабабли ҳозирги кунда ишлаб чиқаришда ишлатилмайди. Баъзан илмий лабораторияларда ферментларни юқори тозаликда олиш учун ишлатилиши мумкин.

Баромембрана усули ишлатиладиган мембраналар тирқишларининг катта-кичиклигига қараб синфланади. Масалан, қайтарилувчан осмос

($\approx 3 \times 10^{-4}$ мкм); гельфилтрация ($15 \times 10,5$ мкм); микрофилтрация (0,2 мкм) ва нозик филтрация (10 мкм) дир.

Қуюқлаштириш ва тозалашнинг қайтарилувчан осмос ва ультрафилтрация усуллари кимё, нефтни қайта ишлаш, озиқ-овқат, фармацевтика ва фермент саноатларида жуда кенг тарқалган. Энг асосийси, жараёни жуда ҳам кам ҳаражатлар ва энергия эвазига 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 целлофандан, каучукдан, полиэтилендан, полистеролдан, целлюлозадан ва б. бир неча хил материаллардан тайёрланган мембраналар ишлатилмоқда.

Мембраналар хусусиятига қараб 0,05-0,2 мкм ли бир қаватли – изотроп ва икки қаватли – анизотроп турларига бўлинади.

Чўктириш усуллари ва унинг назарияси. Саноат учун зарур бўлган кўпчилик ферментлар сувда эрувчан оксиллардир. Фермент эритмалари олиниш манбаларига қараб микроорганизмлар лизатлари, экстрактлари, культурал суяқлик филтратлари, ўсимлик ёки ҳайвон тўқималари гомогенатлари булиши мумкин. Бу фермент эритмалари таркиби жуда мураккаб системага эга. Унда ферментлардн ташқари коллоид табиатига эга бўлган ҳар хил бирикма ва моддалар ҳам учрайди. Бундай мураккаб системалардан ферментларни ажратиб олиш мушкул вазифадир.

Маълумки, оксилнинг гидрофоб гуруҳлари оксил молекуласи ичида тўпланиб ҳаракат жойлашади. Оксилнинг ҳар хил эритувчиларда эриш даражаси молекула сиртида гидрофоб ва гидрофил қолдиқларнинг тарқалиши билан белгиланади. Оксилларни асосий эритувчиси бўлган

сувнинг баъзи хусусиятларини (ҳарорат, pH, ион кучи, нейтрал тузлар, органик эритувчиларни ёки инерт бирикмаларни қўшиш йўли билан) ўзгартириш ҳисобига оқсил 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 фарқланади.

Нейтрал тузлар ёрдамида чўктириш. Бу жараён асосан оқсил молекуласининг гидрофоблиги даражасига боғлиқ. Типик оқсил молекуласи сиртида бир қатор аминокислоталар (тирозин, триптофан, лейцин, изолейцин, метионин, валин ва фенилаланин) занжири шаклида ёпишган гидрофоб қисмларга эга. Оқсил молекуласининг гидрофоб қисми сув билан тўқнашганда сув молекулалари билан ориентирланган қават ҳосил бўлади ва шу жойлар «музлатилган» ҳолатда бўлади. Бундай тартибли структуралар термодинамик жиҳатдан чидамли эмасдир. Агар сув молекулаларини оқсил табиатига ўхшамаган моддалар билан иммобилизация қилинса, оқсил молекулалари ўзаро таъсирлашиб агрегатлар ҳосил қила бошлайди. Маълумки, тузларнинг ионлари гидратланади. Агар оқсил эритмасига маълум миқдорда сув қўшилса у сув билан боғланади ва сувдан бўшаган оқсил молекулалари агрегат ҳосил қилади. Туз ионлари қанча кўп бўлса, оқсилларнинг агрегатланиши ҳам шунча кучаяди ва чўкмага тушиши ортади.

Тузлар билан чўктириш жараёни таъсирига кўра ҳар хил оқсилларга ҳар хил бўлади. Бу биринчидан, оқсил молекуласи сиртидаги гидрофоб қисмларнинг миқдори ва размерига боғлиқ. Қанча шундай қисмлар кўп бўлса, оқсил шунча тез чўкмага тушади. Баъзи оқсиллар борки, тузларнинг энг юқори концентрацияларида чўкмага тушмайди. Чўктириш жараёнида оқсиллар ёнида турган бошқа оқсиллар 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.

Оқсилларни тузли эритмаларда эрувчанлиги Коннинг эмпирик тенгламасига бўйсунади:

$$\lg S = \lg S_0 - k_s \mu$$

бунда S , S_0 - оқсилнинг 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 концентрациясига боғлиқ эмас.

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

Туз билан чўктиришда асосан ишқорий металлларнинг нейтрал тузлари ишлатилади. Ҳар хил ионларнинг чўктириш эффекти уларнинг ион кучига боғлиқ. Натрий тузлари анионларини тузлаш таъсири кучига қараб қуйидагича жойлаштириш мумкин: $\text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{J}^- > \text{CNS}^-$, ҳамда катионларни эса қуйидагича $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > (\text{NH}_4)^+$.

Фермент препаратларини туз ёрдамида чўктирилганда уларнинг таркибида 60-85% гача ҳар хил балласт қўшимча моддалар учраши мумкин. Ушбу жараённинг энг қийин босқичи, бу - тузни қўшиш ва уни эритишдир. Эритмада тузнинг локал концентрациясини ошириб юбормаслик учун у аввал майдаланиб, секин асталик билан маълум бир қисмдан қўшиб борилади ва тинмай аралаштириб турилади. Аралаштириш давомида кўпик ҳосил бўлишига йўл қўймаслик керак. Жараён эриган на агрегатланган оқсилларнинг 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 эса тутиш керакки, туз ҳеч қачон ферментни

бутунлай чўктирмайди, балки унинг эрувчанлигини пасайтиради, холос. Агар 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 чўктириши. 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 концентрацияси ортиши билан ферментнинг зарядланган гидрофил молекулаларини сув таъсирида солватланиш қобиляти 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 размеридир. Чўктириш жараёнида оксил молекуласининг размери қанчалик катта бўлса, эритувчининг салбий таъсир қилувчи концентрацияси шунчалик паст бўлади. Бу боғлиқликка молекуланинг гидрофоблик даражаси, солват қаватига чидамлилиги на бошқа омиллар таъсир қилиши мумкин.

Чўктириш учун ишлатиладиган органик эритувчи сув билан тўлиқ аралашиши 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 холислигига ва регенерация бўлиш қобилиятига эътибор бериш керак. Ишлаб чиқариш учун энг яроқлилари бўлиб этил спирти ва изопропанол 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 концентрацияси, балки электролитларнинг иштироки, чўктириш ҳарорати, муҳит рН кўрсаткичи, қуруқ моддаларнинг таркиби на 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 металл ионлари ҳимоя вазифасини бажаради. Шулар билан биргаликда баъзи металлларнинг (Fe^{2+} , Pb^{2+} , Si^{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 камайтиришга 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 чиқиши 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 килувчи препаратлар олиш мумкин. Маълумки, ферментлар ўзларининг изоэлектрик нуқталарида оксил агрегатлари ҳосил қилиб тўлиқ чўкмага тушадилар. Оксилларни изоэлектрик нуқталарида чўктирувчи реагентлар ишлатмай чўктириш жараёни изоэлектрик чўктириш дейилади. Органик чўктирувчиларни изоэлектрик нуқта рНга яқини 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 мўътадил 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 оптимал 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 молекулалари ажратиб олинади. Бундай қурилмада фермент билан эритувчининг алоқа муддати ўн маротабагача қисқартирилади. Бунда ферментнинг чўкмага тушиш унуми 15-20% гача ортади. Сепараторда

ажратилган чўкма ҳар хил усуллар билан мўътадил шароитда куришиб 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 озуқа муҳити таркибига ва фермент препаратини қуюқлаштирилганлик даражасига ҳам боғлиқдир.

Ферментларни тозалаш усуллари.

Ферментлар ва бошқа оксил моддалари ҳар хил эрмайдиган адсорбция (сурилиш) қобилиятига эга. Бу хусусият оксил аралашмаларини бирикмаларга 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 усулда бўлишига қарамай қуйидагиларга асосланади. Фермент маҳсулотини 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 концентрацияси ўсиб боровчи 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 ферментни 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 диэтиламиноэтил (ДЭАЭ-) ёки карбоксиметил (КМ) целлюлозани кўрсатиш мумкин. Улар бўктирилган ҳолатда зарядли гуруҳларнинг 0,5 М концентрациясига зга бўлади. Бу зарядлар колонкада қарама-қарши бўлган ионларни (металл ионлари, хлор ионлари, буфер ва ҳ.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 адсорбцияланган 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 аралашмаларига ва бошқа бирикмаларнинг ёмон ажралишига сабаб бўлади. Кейинги йилларда бу усул Л.Л.Слюйтерман ва бошқалар (1981) томонидан хроматофокус усулига ўтказиш йўли билан такомиллаштирилмоқда. Бунда ювиш жараёнида амфолит типигаги 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 на адсорбентлар ўртасидаги ўзаро тортиш кучи камайтирилади. Туз ионлари концентрациясини ошириш билан адсорбентга боғланган оксиллар ўз ўринларини уларга бўшатадилар ва ўзлари колонкадан ювилиб чиқа бошлайдилар. Шу билан бирга туз ионлари таъсирида адсорбентлар ўзаро

яқинлашиб оқсил ҳаракати учун тор йўлкалар ҳосил қилади ва бу ҳодиса ферментларни колонкадан чиқишида фракцияларга ажратиш олиш имконини беради.

Ион алмашувчига боғланган ферментни аффинли ювиш ёрдамида ажратиш мумкин. Бунинг учун колонкага оқсил билан боғланадиган махсус лиганд юборилади. Бунда оқсил лиганд билан биргаликда тезда колонкадан ювилиб чиқади. Лекин керакли оқсилни танийдиган ва уни сорбентдан ажратиш оладиган лигандни топиш жуда мушкул вазифадир. Шу билан бирга лигандни қандай зарядланганлиги ва концентрациясига алоҳида эътибор бериш керак. Бўлмаса қарама-қарши ҳолатда лиганд ўзи ионалмашувчига боғланиб қолиши мумкин.

Аффинли хроматография усули. Бу усул оқсил ва ферментларни тозалаш ва ажратишнинг адсорбция ҳодисасига асосланган усуллари ичида алоҳида ўринни эгаллайди. Кўпинча уни аффинли хроматография ёки биоаффинли ёки бўлмаса 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 боғласа фақат керакли ферментни ушловчи ва қолган оқсил ва моддаларни ўтказиб юборувчи махсус адсорбентни олиш мумкин.

Махсус ювувчилардан ёки жараён шароитлари фарқи асосида лигандни ферментга бўлган хусусиятини ўзгартириш йўли билан оқсилни десорбцияга учратиш, тозалаш натижасида битта юқори тозаликка 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. Аффинли хроматография учун ҳар хил турдаги эримайдиган сорбентлардан фойдаланади, лекин энг кўп тарқалгани кўндаланг қилиб уланган агароза

доначаларидир. Улар юқори босимда ўз шаклини сақлайди ва буферларни ҳамда эритувчиларни алмаштиришга бардошлидир.

Лигандлар эса 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.

Гельхроматография усули. Гельфилтрация жараёнини амалга ошириш учун декстран асосида олинган геллардан фойдаланилади ва улар ёрдамида размерига қараб ҳар хил макромолекулаларни тез ажратиш мумкин. Гель 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 киради ва йирик молекулалар эса кирмайди. Бу усул гелларнинг айнан шу хусусиятига асослангандир.

Бу усул ферментларни тозалаш ва ажратишда нафақат лаборатория, балки саноат миқёсида ҳам кенг қўлланилади. Гельфилтрация учун кўндаланг тикилган декстран (сефадекслар ва сефакриллар) гелларидан, кўндаланг тикилган полиакриламид гелларидан (биогеллар), акриламид полимер занжири ёпиштирилган агароза геллардан (ультрагеллар) ва б. агароза гелларидан фойдаланилади.

Колонкада фермент эритмасининг бир қисми гел доначалар орасида ва бир қисми эса доначаларнинг тешикчалари ичида жойлашади. Гельфилтрация – 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 кира олиш қобилиятига боғлиқдир. Шунинг учун

гельфилътрация жараёнида колонкадан аввал юқори молекулали моддалар ва кейин эса кичик молекулалилари бирин-кетин чиқа бошлайди. Бунда гелъ молекуляр тўр вазифасини бажаради. Бу жараён идеал 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 рН кўрсаткичида улар суриш қобилиятини намоён қилиши мумкин, масалан, шундай гелларга сефакрилларни киритиш мумкин. Гельфилътрация 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 услуби қисқа вақт ичида юқори даражали ажратиш имконини беради ва у ферментларни тозалашнинг охирги босқичларида жуда ҳам унумлидир.

Фойдаланилган адабиётлар:

1. Альбер Сассон. Биотехнология: свершения и надежды. Издательство «Мир», 1987.
2. А.Н.Евтушенков, Ю.К.Фомичев. Введение в биотехнологию. Курс лекций. Минск, БГУ, 2002
3. Кузьмина Н.А. Основы биотехнологии.
4. Рахимов М.М., Реут Е.Н., Садыкова К.А. Методические указания по проведению практических занятий по курсу «Инженерная энзимология». НУУ им.М.Улугбека, Ташкент, 2003
5. <http://www.study.online.ks.ua/>
6. <http://journal.issep.rssi.ru>
7. Лецинская И.Б. Генетическая инженерия // СОЖ, 1996, № 1
8. Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений // СОЖ, 1998, № 6
9. Лтова Л.А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды // СОЖ, 2000, № 10
10. Семенова М.Л. Зачем нужны трансгенные животные // СОЖ, 2001, №
11. Корочкин Л.И. Клонирование животных // СОЖ, 1999, №4
12. Абелев Г.И. Моноклональные антитела // СОЖ, 1998, № 1
13. Лецинская. Современная промышленная микробиология // СОЖ, 2000, № 4