

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА
МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ
ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

**ОЗИҚ-ОВҚАТ МАХСУЛОТЛАРИ ТЕХНОЛОГИЯСИ
ФАКУЛТЕТИ**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ КАФЕДРАСИ
“БИОТЕХНОЛОГИЯ АСОСЛАРИ”
ФАНИДАН**

РЕФЕРАТ

МАВЗУ: Ферментация

**Бажарди: Тургунов А.
Текширди: Н.А.Хўjamшукуров**

Тошкент-2013

Режа:

1. Ферментлар продуцентларини ўстириш жараёнига таъсир этувчи омиллар
2. Ферментатив продуцентларни ўстириш усуллари
3. Фермент ва ҳужайралар иммобилизацияси

ФЕРМЕНТАТИВ ПРОДУЦЕНТЛАРНИ ЎСТИРИШ УСУЛЛАРИ

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.

Культураларнинг қаттиқ озиқа муҳити сиртида ўстириш жараёнини ҳар хил усуллар билан бажариш мумкин. Кюветаларга экиб ўстириш ананавий усул ҳисобланиб, кўп қўл меҳнاتини ва кўп ишлаб чиқариш майдонини талаб қилади. Продуцентларни механизациялашган қурилмаларда ўстириш бирмунча янги усул бўлиб ҳисобланади.

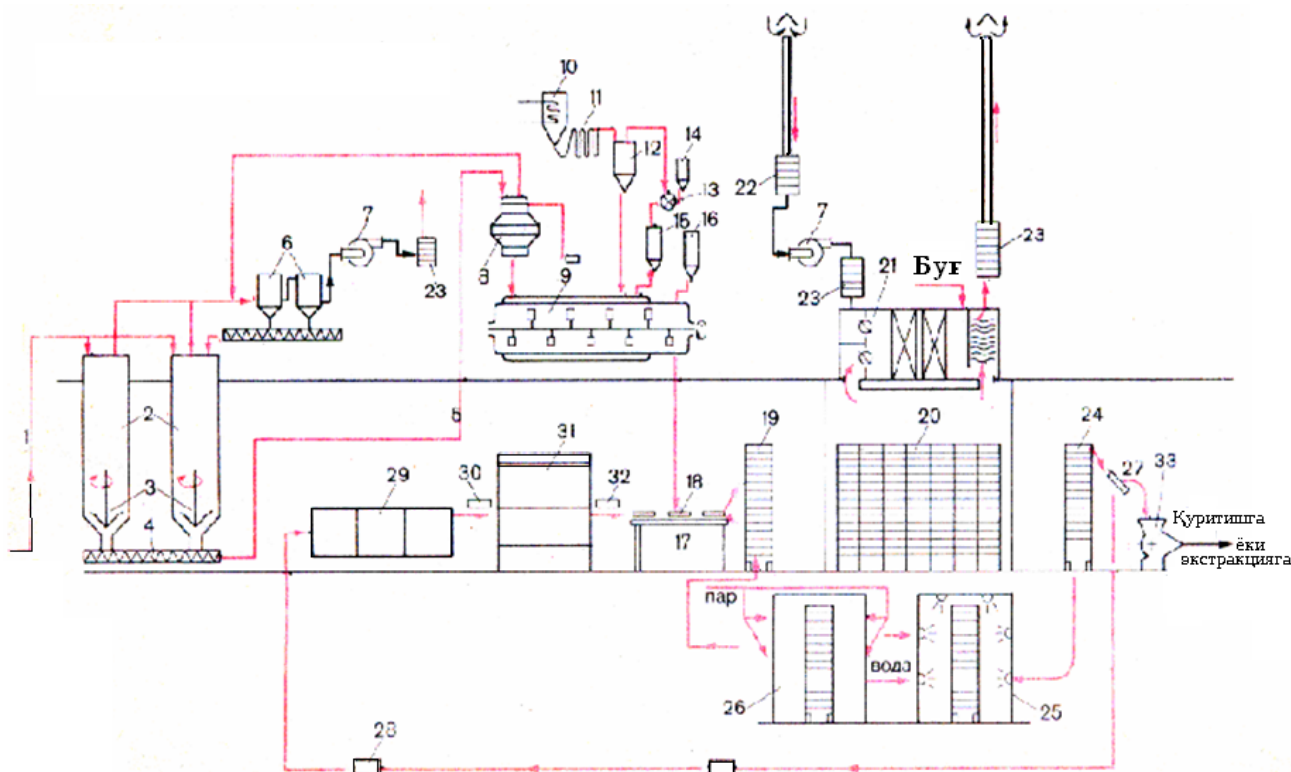
Кюветали ўстириш усулининг элементар ячейкаси бўлиб оддий рухланган темир туникадан ясалган усти очик ёки ёпиқ ва баландлиги 20-50 мм ли 0,25-0,50 м² майдонга эга бўлган идиш ташкил қилади. Бу идишнинг таг қисми тешикли ёки тешиксиз бўлади.

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 ўстириладиган 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, «ехословакия 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 ходисаси руй берса бутун бошли тизимни тўхтатиш ва ҳамма қисмларини стерилизация қилиш керак бўлади.

Микроорганизмларни механизациялашган ўстиришнинг Андеркофлер, Валерштейн ва «ехословакия 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- чикувчи газларни тозалаш учун циклонлар; 7- вентелятор; 8-кепакни автоматик меъёрловчи ускуна; 9- донадор компонентлар стерилизатори; 10-сув стерилизатори; 11-иссиқлик алмаштирувчи; 12- стерил сув ўлчагич; 13-меъёрловчи (дозатор); 14-хлорид кислота тўпланувчи идиш; 15-суялтирилган 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 суяқ озика муҳида 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.

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

Микроорганизмларни суяқ 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 суяқлик-қаттиқ, жисм-газ тизими билан ишлашга тўғри келади. Бу тизимда масса алмашинув жараёнлари жуда қийин кечади ва усқунани ўстиришнинг ҳамма босқичларига мослаб яратиш анча мушкулдир.

Саноатда ишлатилаётган ферментёрларни ҳаво алмашинуви учун энергия узатиши ва

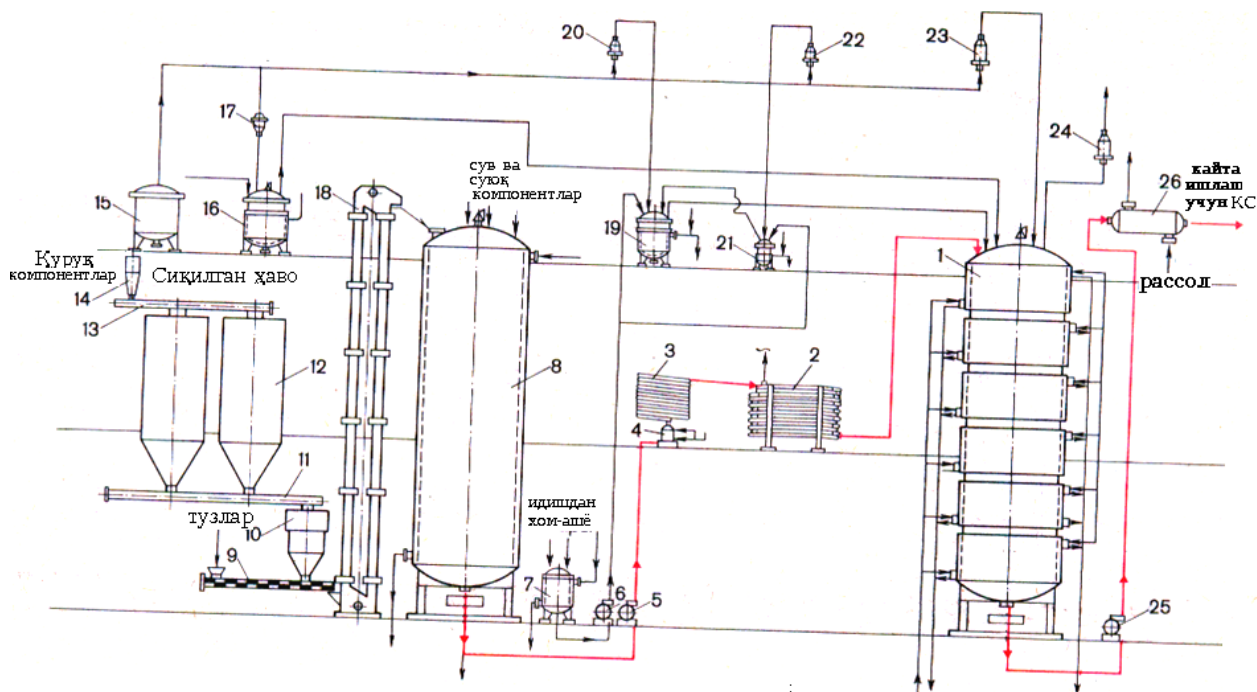
аралаштириш усулларига қараб уч гуруҳга бўлиш мумкин:

- *Механик аралаштиргичли ва пуркама ускуналар (бирлаштирилган);*
- *Сиқилган ҳавони пуркаш тизимига (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 миқёсда фойдаланилади. Бундан ташқари Германия маҳсулоти бўлган 63 м³ ли ферментёрлар жуда кўплаб фермент корхоналарида ишлатилади.



3-расм. Микроорганизмларни суюқликда 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 қуруқ элементлари пневмотранспорти циклони; 15-бош фильтр; 16-кўпиксизлантирувчиларни сақлаш стериллаш идиши; 17, 20, 22, 23-алоҳида фильтрлар; 18-сўриб-кўтаргич; 19-экиш ускунаси; 21-инокулятор; 24-чиқувчи ҳавони тозалаш фильтри; 26-совутилган культурал суюқликнинг иссиқлик алмаштирувчиси.

Ферментёрлар кўпи билан 0,25 МПа босим ва стерилизация вақтида 130-140⁰С ҳароратда ишлашга мўлжалланган. Продуцентни ферментёрда ўстириш жараёнида асептика 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 филтрлар намланиб қолиши ва натижада ускунанинг герметиклиги ҳамда стериллиги бузилиши мумкин.

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

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

МИКРООРГАНИЗМЛАРДАН ФЕРМЕНТ ПРЕПАРАТЛАРИНИ АЖРАТИБ ОЛИШ УСУЛЛАРИ

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 кишлоқ 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 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.

+аттиқ 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 куритгичлар ишлатилади. Бунда ҳўл культура иссиқлик берувчи қурилма билан биргаликда 80-85⁰С да куритгичга 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 куритгичларнинг ички томонида парраксимон куракчалар мавжуд бўлиб, барабан 3-8 мин⁻¹ тезликда айланиши ҳисобига қуритилаётган материалнинг бир текисда тарқалишини ва қуритилишини таъминлайди.

Шунинг учун бундай типдаги куритгичда қуритилган маҳсулот бутун массаси бўйлаб бир хил намликка эга бўлади. Ушбу куритгичда микроорганизм бўлақчалари 3-7 минут давомида қурилади, 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 куритгичларнинг яна бир тури - герметик берк бўлган лентали буғ конвейрли куритгичдир. Бундай қурилмаларда ферментнинг фаоллиги кўп йўқотилади, лекин улар ихчам ва юқори самарадорликка эга.

қаттиқ озиқа муҳитида ўстирилган микроорганизмларни қуритиш учун ҳар хил конструкцияли куритгичлардан фойдаланиш мумкин, қайсики маҳсулотнинг фаоллиги пасайишини минимумгача туширишни, унинг куритгичда 5-8 минут давомида бўлишини ва чиқишида 40-42⁰С дан пастда бўлишини таъминлайди.

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

Кўпчилик продуцентлар синтез қилган ферментларнинг асосий қисмини суюқ озиқа муҳитига 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 суюқликка чўктирилган бўлади. Филтрловчи сиртда тўпланган ҳар хил эримаган компонент ва биомасса маҳсус пичоқ ёрдамида тозаланаяди.

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

Фермент саноатида кўпинча рамали зич-филтр ҳам ишлатилади. Маҳсулот қўл ишига асосланган ҳолда олинаяди. 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 тиниқ 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 автоматлаштирилган 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 истиқболли ва бактериялар культурал суюқлигини филтрлашда жуда қўл 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 чўкади. 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 муҳити таркибига, ажратилаётган бўлакчалар катта-кичиклигига, эримаган фракциялар микдорига, филтрловчи материалнинг физик-кимёвий хусусиятларига, ҳарорат режимига ва бошқа омилларга узвий боғлиқдир. Филтрлаш жараёнини яхшилаш мақсадида культурал суюқлик кимёвий қайта ишланади, яъни ишқорийлиги рН 8,85 га келтирилиб, 0,1% ли CaCl_2 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 қуририлиб чорва молларига ем сифатида ишлатилади. Культурал суюқлик филтрати эса тоза фермент препарати олиш учун қайта ишлашга юборилади.

Қаттиқ озиқа муҳитида 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, ҳужайра деворлари механик ёки автоматик ҳолда бузилиб, экстракция жараёнига жалб қилинади. 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 хил микрофлора ўсмаслиги учун антисептиклардан (формалин, бензол, толуол, хлороформ ва ҳ.к) фойдаланилади. Кўпчилик ҳолларда ферментларни рН 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 йўкотади 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 типдаги “Роунс-Даунс” фирмаси экстракторларидир.

Лекин ҳозирги вақтда пресс-диффузия жараёнига асосланган ускуналарга қайтиш анъанаси қузатилмоқда. 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 озиқа муҳитларида ўстирилган микроорганизмларнинг экстрактлари сақлаш учун чидамсиздир. Тайёр техник препарат формаларини (П2х ва Г2х) олиш учун уларни қуюқлаштириш керак. қуруқ техник ёки тоза фермент препаратларини олишда вакуум-буғлантириш усули ҳам бир босқич бўлиб ҳисобланади.

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

Агарда қуюқлаштирилаётган эритма қанчалик тоза бўлса, шунчалик кам миқдорда ҳар хил моддаларни кам тутади ва ундаги ферментлар юқори ҳароратга жуда ҳам таъсирчан бўлади. қаттиқ озиқа муҳотида ўстирилган организм экстрактида жуда кўп миқдорда химояловчи бирикмалар бўлади ва улар қуюқлаштириш жараёнида фермент инактивациясининг олдини олади, лекин культурал суюқлигини қуюқлаштиришда бунинг аксини кузатиш мумкин, яъни фермент кўп миқдорда ўз фаоллигини йўқотади.

+уюқлаштириш жараёнида фермент эритмаларидаги моддаларнинг миқдори ва минерал таркиби бир мунча ўзгаради, қуюқ модда ҳисобига эса 11-20% гача камаяди ва қуюқлашган экстрактнинг рН 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 борилиш режимига, балки ускуна ёки қурилманинг конструкциясига ҳам боғлиқдир. Кейинги йилларда вакуум-буғлантиргич 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 қайтарилувчан осмос, ультрафилтрация, микрофилтрация ва нозик филтрация қабилар 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 коэффиценти; 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 тиркишларининг 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 суяқлик филтратлари, 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 ажратиб олиш мушкул вазифадир.

Ферментни кўпроқ ва фаол ҳолда ажратиб 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, рН, ион кучи, нейтрал тузлар, органик эритувчилар ёки инерт бирикмаларни қўшиш йўли билан) ўзгартириш ҳисобига, оксил молекуласининг гидрат ёки сольват қатламига таъсир қилиб агергацияга 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 миқдориди 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:

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

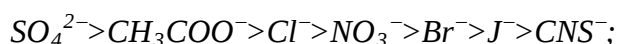
бунда, S , S_0 - оксилнинг тузли эритма ва тоза сувдаги эрувчанлиги; k_s - тузлаш константаси; μ - эритманинг ион кучи.

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 миқдорига боғлиқ эмас.

Ушбу жараён гидрофоб ўзаро таъсирга асосланган бўлсада унинг боришига таъсир қилувчи бошқа омиллар ҳам мавжуддир. Улар: муҳит рН кўрсаткичи, ҳарорат, фермент эритмаси тозаллиги 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 жараённинг 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. Шуни эсда 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. ×ўктириш 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 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 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, курук 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 тушадилар. 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 микдорда 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 куруқ модда микдори бўлиши керак. Кўп тадқиқотлардан маълумки, ферментларни чўктиришда, айниқса протеолитик ферментларни, куруқ модданинг энг мўтадил микдори 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 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 озиқа муҳити таркибига ва фермент препаратини қуюклаштирилганлик 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 микдорда 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 маълум бўлган эритувчида (буферда) эритилади ва шу эритувчи билан мувозанатланган колонкага юборилади. Кейин шу колонкадан маълум таркибга эга бўлган буферни ёки микдори 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 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 гурухларнинг 0,5 М миқдорига 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 уртасидаги 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 типидagi 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 миқдорининг 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 ходиса 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 миқдорига 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 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.

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 очиқ 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 қирмайди. 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 қира олиш қобилиятига боғлиқдир. Шунингдек, гелфилтрация жараёнида колонкадан аввал юқори молекулали моддалар ва кейин эса кичик молекулалилари 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 рН 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 услуби қисқа вақт ичида юқори даражали ажратиш имконини беради ва у ферментларни тозалашнинг охириги босқичларида жуда ҳам унумлидир.

ФЕРМЕНТ ВА ҲУЖАЙРАЛАР ИММОБИЛИЗАЦИЯСИ

Охириги 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 тақазо 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 ҳўжалигини 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 окламай 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.Грифин 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 беқиёсдир.

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 кенгрок 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 катор устунликка эга бўладилар.

Биринчидан, уларни реакцион муҳитидан ажратиб олиш жуда ҳам осон, бу эса:

- а) реакцияни ҳоҳлаган вақтда тўхтатиш;
- б) биокатализаторни (ферментни) қайта ишлатиш;
- в) керакли махсулотни 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 махсулотни 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.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ҚИЛИШ УСУЛЛАРИ

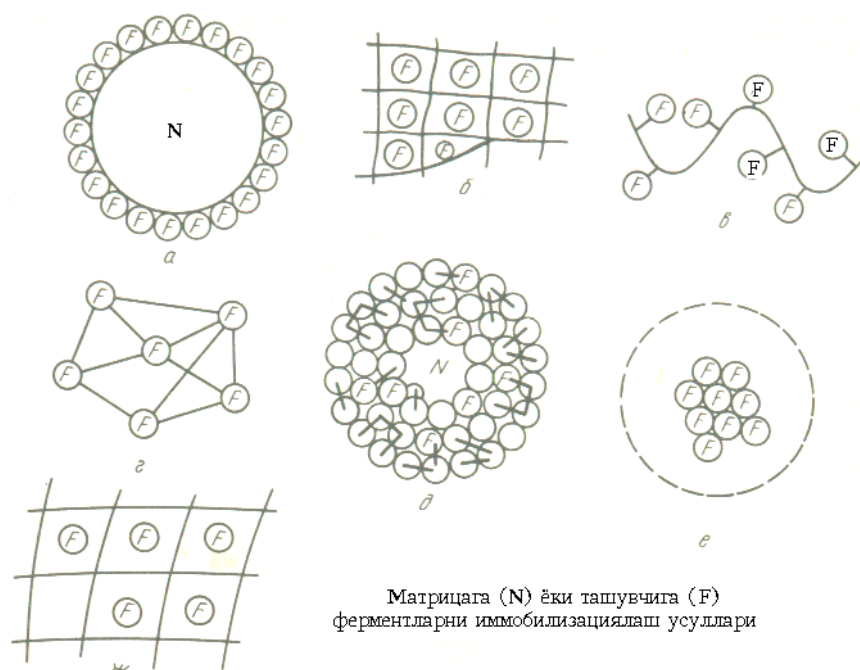
Иммобилизация қилиш усуллари иккига бўлинади:

- 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 мустаҳкамлик;
- фермент ва уни субстрати учун ўтказувчанлик;
- технологик жароёнлар учун зарур бўлган шаклда олиниши
- осонлиги (гранула, мембрана, варақ ва хоказо ҳолатда).
- реакцион шаклда тез кириши;
- юқори гидрофиллиги (иммобилизация жараёнини сувли муҳитга ўтказиш учун);
- арзонлиги.



5-расм. Матрицага (N) ёки ташувчига (F) ферментларни иммобилизациялаш усуллари

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

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 мустахкам 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 типдаги "ташувчи" лар бошқаларга нисбатан кенгроқ ишлатилади.

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, бундайшароитда фермент сувда эрувчан бўлади ва иккинчи фазага кира олмайди.

Келтирилган классификация шартлидир, чунки бу усуллар орасида аниқ ажримларни ўрнатиш мумкин эмас. Масалан, гель тешикчиларига 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.

Адсорбцион иммобилизация қилиш учун "ташувчи" лар

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

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

Органик ташувчилар орасида кенг тарқалганлари ҳар хил полисахаридлар полимерли ионалмашув смолалари, коллаген, товуқ 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 ўлчамли, механик ва кимёвий барқарорлигидир.

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 сатхида бир қатлам "ташувчи" суртилган бўлади. Электродлар токка уланганда фермент сатхидаги фаол гуруҳлар ($-NH_2$; $-COOH$ ва х.к.) ҳисобидан "ташувчи" сақланаётган электрод томонидан ҳаракат қилади ва уни сатхида чўқади.

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, икинчисидан 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.

Фермент ва "ташувчи" орасидаги адсорбцион ўзаро таъсирнинг табиати

"Ташувчи" сатхида 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 ҳужайраларини цитодекс гранулаларига адсорбция қилинганда ҳужайра девори деформацияга учрагани кузатилган.

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 сатхининг маълум бир қисмигина фойдали бўлади холос.

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.

pH кўрсаткичлари

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

Бунга асосий сабаб рН 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 рН да ўрганиб чиқилганда бу жараёни рН га алоқадорлиги W симон бўлганлиги, кўмирда адсорбция қилинганда эса мўтадил рН 3 дан 6 гача ўзгариши, бу ўзгариш кўмирни табиатига боғлиқлиги исботланган.

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.

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 миқдорига нисбатан таққослаб ўрганганда шу нарса маълум бўлдики, ферментни эритмадаги миқдорини ошиб бориши билан маълум нуқтагача 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.

Ҳарорат

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

Ферментни ташувчи билан боғланиш кучини оширувчи усуллар. 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 сатхи нордон муҳитга эга ($\text{pH}_{\text{к4,0}}$).

Бундай шароитда, иммобилизациядан олдин силикагельни маълум рН га эга бўлган буферда ферментни мўтадил рН га тўғри келган рН 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 қоғоз каби ташувчилардан фойдаланганда яхши натижалар бериши исботланган.

Олдиндан модификация қилинган ферментларни иммобилизация қилиш

Ионалмашувчи ташувчиларга адсорбция йўли билан иммобилизация қилишда изоэлектрик нуқтаси ва рН –мўтадиллиги бир-бирига яқин бўлган ферментлар билан ишланганда қатор муаммолар пайдо бўлади. Фермент билан ташувчи орасидаги мустаҳкам боғланиш фақатгина, изоэлектрик нуқтадан узоқроқ бўлган рН 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-химоотрипсин хлоротриазинли 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-химоотрипсинни КМ-целлюлоза билан модификация қилинганда, фермент нейтрал рН муҳитида ДЭАЭ-целлюлозада ёки ДЭАЭ-сефадексга фаоллиги сақланган ҳолда иммобилизация бўлади.

Фермент ташувчи боғини мустаҳкамлигига 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 юпка пленка ҳосил бўлади. Бифункционал агент сифатида глутаральдегид, госсипол ва бошқаларни ишлатиш мумкин.

Иммобилизация қилишни оригинал йўли профессор К.Мартинек томонидан намоиш этилган. Бунинг учун қисман кимёвий деструкцияга учраган нейлон ипларидан фойдаланилади. Ташувчи, фермент эритмасига солинади ва механик тортилади, натижада нейлонни ғовақлари йириклашиб, унга ферментнинг жойлашиши осонлашади.

Маълум вақтдан кейин тортиб турган куч олинади ва нейлон яна ўз ҳолатига келади, фермент эса ғовақларда 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.

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	

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 миқдорига 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 олинадиган 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 маротаба 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.

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 коптокчалар 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) сақловчи 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 pH га чидамли бўлган (диамин эритмаси) ферментлар учун ишлатилиши мумкин. Микрокапсула ҳосил қилиш учун ишлатиладиган фермент эритмаси 10% атрофида инерт оксил моддаси (гемоглобин) сақлаши 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 сақлаган органик моддани (полимерни) эмульсияси ҳосил бўлади. Вақт ўтиши билан органик эритма қотади, ва иммобилашган фермент сақловчи полимер заррачалари ҳосил бўлади.

1972 йилда С.Мэй ва Н.Ли лар бу усулни модификация қилдилар ва мембрана ҳосил қилувчи материаллар 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.

Ферментларни иммобилизация қилишнинг 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 pH, ҳарорати ва бошқа кўрсаткичларини ўзгартириш, ферментни десорбциясига, шу туфайли олинadиган маҳсулотни ифлосланишига олиб келмайди.

Бу эса айниқса медицина, озиқ-овқат махсулотлари, 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 нуқталиқ боғланишлар натижасида ферментни мўтадиллигини ошириш мумкин. Бу усулни камчилиги, баъзи-бир ферментлар кимёвий модификация жараёнида ўз фаоллигини йўқотиб қўядилар.

ФОЙДАЛАНИЛГАН АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ

1. Бакай С.М. Биотехнология обогащения кормов мицелиальным белком. Киев. Урожай 1987.
2. Биотехнология кормопроизводства и переработки отходов. Рига: Зинатие, 1987.
3. Быков В.А. и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. – М. Высшая школа, 1987.
4. Гаврилова Н.Н. Липиды микроорганизмов для кормовых целей. М., ВНИИСЭНТИ, 1985.
5. Глележа А.А. и др. Микробные ферменты в народном хозяйства – Вильнюс: Мокслас, 1985.
6. Давронов К. Микроблар дунёси. Тошкент: ТошДАУ, 2001.
7. Давронов Қ.Д., Хўжамшукуров Н.А. Умумий ва техник микробиология. Тошкент, Ўзбекистон энциклопедияси, 2004. – 279 б.
8. Удалова Э.В. и др. Энзиматическая конверсия растительно сырья и отходов сельскохозяйственного производства. М. ВНИИ систем управления, экологических исследований и научно-технической информации, 1990.
9. Хазин Д.А. Производство кормового белка и его использование в кормлении сельскохозяйственных животных. М. ВНИИТЭИ, 1987.
10. Алексеев В.В, Синюгин О.А. Техничко-экономическая оценка традиционной, атомной и альтернативной энергетики. - Российский химический журнал Т.41.№6.-М.:1997.
11. Баадер В., Донэ Е., Брендерфельд М. Биогаз-теория и практика.-М.:1982.
12. Гриднев П.И. Энергетические аспекты процесса переработки навоза в анаэробных условиях //Механизация и автоматизация производственных процессов ферм крупного рогатого скота. Сб. научных трудов ВНИИМЖ.- Подольск:1987, С.97-104.
13. Заварзин Г.А. Биогаз и малая энергетика. Природа,1987,№1.
14. Ковалев А.А. Ножевникова А.Н. Технологические линии утилизации отходов животноводства в биогаз и удобрения.-М.: Знания, 1990.