

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ СОҒЛИҚНИ САҚЛАШ ВАЗИРЛИГИ
ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ**

Қўлёзма ҳуқуқида

УДК.615.1:574(075)

РАҲИМОВА СЕВАРА ШУКРУЛЛАЕВНА

**“ Ферментация усулида фосфотид кислота ажратиш
технологияси ”**

**5А 510602- Иммунобиологик ва микробиологик препаратлар
технологияси**

Магистр

академик даражасини олиш учун ёзилган диссертация

Илмий раҳбар:

к.ф.н., доцент Ҳ.Т.Заирова

ТОШКЕНТ-2015

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ СОҒЛИҚНИ САҚЛАШ
ВАЗИРЛИГИ
ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ**

Факультет Саноат фармацияси
Кафедра Биотехнология
Ўқув йили 2013-2015

Магистратура талабаси: Раҳимова
Севара Шукруллаевна

Илмий раҳбар: доц. Ҳ.Т.Заирова
Мутахассислиги:
Иммунобиологик ва микробиологик
препаратлар технологияси

МАГИСТРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АННОТАЦИЯСИ

Мавзунинг долзарблиги. Бугунги кунда биотехнологик усуллар ёрдамида олинган ферментларни тажрибада қўллаш доирасини кенгайтиришга эришилди. Шунга асосланган ҳолда ферментларни катализатор сифатида саноат жараёнларида қўллаш муҳим аҳамиятга эга бўлиб келмоқда. Тадқиқотлар натижасида фосфотид кислотани фосфолипидлардан ферментация усулида олишни ишлаб чиқиш ҳамда олинган маҳсулотдан биофаол модда сифатида озиқ-овқат, фармацевтика саноатида фойдаланишга тавсия этиш долзарбдир.

Тадқиқот мақсади ва вазифалари. Тадқиқотимизнинг мақсади табиий хом ашёлардан олинган фосфолипидлар унумидан фосфотид кислотани ферментатив усул билан олиш технологиясини ишлаб чиқиш.

Тадқиқот объекти ва предмети. Тадқиқотнинг объекти Тошкент фармацевтика институти ва ЎзФА О.С.Содиқов номидаги Биоорганик кимё институти. Тадқиқотнинг предмети маҳаллий хом ашё бўлган Ўрта Осиё турпидан фосфолипаза Д ферментини ажратиб олиш ва фосфотид кислотани ажратиш.

Тадқиқот услубияти ва услублари. Диссертация ишини бажаришда физик-кимёвий таҳлил усулларида фойдаланилган.

Тадқиқот натижаларининг илмий жиҳатдан янгилик даражаси. Организмда ёғларни парчалаб берувчи биологик фаолликка эга бўлган фосфотид кислотани ажратиш.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти ва тадбиқи. Маҳаллий ўсимлик хом ашёси Ўрта Осиё турпидан олинган фосфолипаза Д ферменти ёрдамида фосфотид кислотани биотехнологик йўл билан олиш усули ишлаб чиқилди.

Иш тузилиши ва таркиби. Магистрлик диссертация иши 60 бетдан иборат бўлиб компьютер матнида баён этилган. Унда кириш, адабиётлар таҳлили, тажриба қисми, олинган натижалар ва уларнинг таҳлили, хулоса ва фойдаланилган адабиётлар рўйхатларидан иборат. Фойдаланилган адабиётлар рўйхати 50 та манбани ўз ичига олади.

Бажарилган ишнинг асосий натижалари. Диссертация ишининг асосий мазмуни ЎзФА Ўсимлик моддалари кимёси институтида ўтказилган анжуман материалларида ва “Ўзбекистон Фармацевтик хабарномаси” да муҳокама қилинган.

Хулоса ва таклифларнинг қисқача умулаштирилган ифодаси. Фосфотид кислотани биотехнологик йўл билан олиш усулини саноатга тадбиқ этиш тавсия этилади.

Илмий раҳбар _____ доц. Заирова Ҳ.Т.

Магистрант _____ Раҳимова С.Ш.

**THE MINISTRY OF HEALTHCARE OF THE REPUBLIC OF
UZBEKISTAN**

TASHKENT PHARMACEUTICAL INSTITUTE

Faculty of Industrial pharmacy
Department of Biotechnology
Academic year 2013-2015

Master resident S.Sh.Rakhimova
Scientific tutor docent Kh.T.Zairova
Speciality: immunobiology and
microbiological technology of drugs

ANNOTATION OF MASTER DISSERTATION

Theme actuality: Nowadays ferments which have been obtained with the help of biotechnological methods are widely used. Based on it using ferments as catalyst is the main significance at process of industry. The main goal of our research is to produce phosphotide acid from phospholipids by the method of fermentation and recommend bioactive substance to use as food, and to use substance at pharmaceutical industry.

The aim and the tasks of the research: The main goal of our research is to produce the technology of phosphotide acid from phospholipids, which have been obtained by domestic products, by the method of fermentation.

The object and the subject of the research: The Tashkent Pharmaceutical Institute, The Academy of Sciences of Uzbekistan The Institute of Bioorganic chemistry by O.S.Sodikov. The subject of the research is to obtain ferment phospholipase D and phosphotide acid from domestic product Central Asian horse redish.

The methodology and the methods of research: During dissertation work (working on dissertation) were used physicochemical comparative analyses.

The scientific novelty level of research results: Obtaining bioactive substance phosphotide acid which breaking up oil in organisms.

The practical value and implementation of the Research: Ferment phospholipase D which obtained from domestic product Central Asian horse redish have been produced for first time with the help of phosphotide acid by the bioactive route.

The structure and composition of the Research: Dissertation work consists of 60 pages and presented on computer version. It has introduction, analyses of Literatures, experiments unit and their analysis, general conclusion and the list of Literatures. In the dissertation there was used 50 literatures.

The main results of the work: The main goal of our research was discussed at the conference.

The precise general description of conclusion and suggestions:
Recommend the methods of obtaining phosphotide acid by the bioactive route.

Scientific tutor _____ Kh.T.Zairova

Master resident _____ S.Sh.Rakhimova

МУНДАРИЖА

КИРИШ	3
-------------	---

I боб. АДАБИЁТЛАР ШАРҲИ

1. Липолитик ферментлар ва уларнинг хусусиятлари	8
2. Ферментларнинг биологик катализаторлик хусусиятлари	12
3. Фосфолипидлар ва фосфолипаза Д	14

II боб. АСОСИЙ ҚИСМ

1. Материаллар ва таҳлил усуллари	21
2. Фосфолипаза Д ни ажратиш ва тозалаш	24
3. Ферментлар фаоллигини ўлчаш	26
4. Фосфолипаза Д ферментининг гидролитик фаоллигини аниқлаш	29
5. Ферментлар ингибиторлари	31
6. Фосфолипидлар йиғиндисини ажратиш	32
7. Реакция тезлигига температура таъсири	35
8. Фосфотид кислотани фермент ёрдамида гидролитик ва трансалкил реакциялари билан олиш	36
9. Фосфолипаза Д ферменти катализлайдиган трансалкиллаш ва гидролитик реакцияларни ўтказишнинг оптимал шароитлари	46
10. Фосфотид кислотани биотехнологик усулда олиш технологик схемаси	48

ХУЛОСА	49
--------------	----

АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ	50
--------------------------	----

Илова

КИРИШ

Мавзунинг асосланиши ва унинг долзарблиги. Бугунги кунда биотехнологик усуллар ёрдамида олинган ферментларни тажрибада қўллаш доирасини кенгайтиришга эришилди. Ўзбекистон Республикаси Президенти Ислам Каримовнинг 2011-йилнинг асосий йукунлари ва 2012-йилда Ўзбекистоннинг ижтимоий, иқтисодий ривожлантиришнинг устувор йўналишларига бағишланган Вазирлар маҳкамасидаги “2012 йил Ватанимиз тараққиётини янги босқичга кўтарадиган йил бўлади” маърузасида мамлакатимизда аҳолини иш билан таъминлаш, моддий техника базасини яратиш, табиий ресурслардан оқилона фойдаланиш ва улар асосида рақобатбардош маҳсулотлар яратиш, инновацион технология ишланмаларини саноат ишлаб чиқаришларида қўллаш хусусий тадбиркорликни ривожлантириш масалалари кўриб чиқилди. Шунга асосланган ҳолда ферментларни катализатор сифатида саноат жараёнларида қўллаш муҳим аҳамиятга эга бўлиб келмоқда. Тадқиқотлар натижасида фосфотид кислотани фосфолипидлардан ферментация усулида олишни ишлаб чиқиш ҳамда олинган маҳсулотдан биофаол модда сифатида фармацевтика, озиқ-овқат саноатида фойдаланишга тавсия этиш долзарбдир [1-5].

Тадқиқот объекти ва предмети. Тадқиқотнинг объекти Тошкент Фармацевтика институти ва ЎзФА О.С.Содиқов номидаги Биоорганик кимё институти тажриба синов лабораториялари ҳисобланади. Тадқиқотнинг предмети сифатида маҳаллий хом ашё бўлган Ўрта Осиё турпидан ажратиб олинган фосфолипаза Д ферменти ва тухум сариғидан ажратиб олинган фосфолипидлар унуми.

Тадқиқот мақсади ва вазифалари. Тадқиқотимизнинг мақсади табиий хом ашёлардан олинган фосфолипидлар унумидан фосфотид кислотани ферментатив усул билан олиш технологиясини ишлаб чиқиш.

Юқоридагилардан келиб чиққан ҳолда ишда қуйидаги вазифалар қўйилади:

- Фосфолипаза Д ферментини ажратиб олиб, гидролитик фаоллигини ўлчаш;
- Тухум сариғидан фосфолипидлар унумини ажратиб олиш;
- Лецитин – фосфолипаза Д фазалар чегараси модел системасини ўрганиш;
- Фосфолипаза Д нинг ҳар хил шароитдаги гидролитик ва трансалкиллаш реакцияларини ўрганиш;
- Фосфотид кислота ва холинни ферментатив олиш жараёнининг оптимал шароитини аниқлаш.

Илмий янгилиги. Шу кунларгача кимёвий йўл билан олинадиган фосфотид кислотани олиш кўп босқичли мураккаб жараён ҳисобланар эди. Шу сабабли реакциялар охирида жуда кўп қўшимча бирикмалар ҳосил бўлар эди. Фосфотид кислотани ушбу бирикмалардан ажратиб олиш кўп босқични талаб қилади. Бу мураккаб ва кўп босқичли жараёндан қутилиш учун биотехнологик усуллардан фойдаланиш зарур. Чунки биотехнологик жараёнларнинг кимёвий технологияга нисбатан кам босқичлилиги, иқтисодий самарадорлигининг юқорилиги, олинаётган маҳсулотнинг соф ҳолда бўлишлиги асосий афзаллик бўлса, экологик нуқтаи назардан ҳам қулайдир. Биотехнологик жараёнларни ферментлар ёрдамида олиб бориш кимёвий катализаторларни қўллашга қараганда анча самаралидир. Тадқиқотлар натижасида организмда ёғларни парчалаб берувчи биологик фаолликка эга бўлган фосфотид кислотани фосфолипидлардан ферментация усулида олишни ишлаб чиқиш.

Тадқиқотнинг асосий масалалари ва фаразлари. Табиатдаги барча тирик организмлар, шу жумладан, ўсимликлар ҳужайрасида,

тўқималарида кечадиган турли - туман кимёвий реакциялар нисбатан паст температурада ва ниҳоятда каттиқ тезликда боради. Масалан, оксил, углевод ёки ёғларни лаборатория шароитида парчалаш уларга кучли кислота ёки ишқор қўшиб, юқори ҳароратда узоқ вақт қайнатиш керак. Ваҳоланки тирик организмларда бу моддалар қисқа муддатда ҳамда паст ҳароратда осонлик билан парчаланadi. Организмларда фақат моддаларнинг парчаланиш реакцияси эмас, балки мураккаб моддалар ҳосил бўлиши ҳам осонлик билан амалга ошади. Чунки тирик организмлар таркибида кимёвий реакцияларни тезлатадиган махсус катализаторлар бўлади. Оксил табиатига эга бўлган бу катализаторлар ферментлар ёки энзимлар деб аталади.

Тадқиқот мавзуси бўйича адабиётлар шарҳи (таҳлили). Ферментлар баъзи хусусиятларига кўра бошқа катализаторлардан кескин фарқ қилади. Биринчидан, ферментлар ниҳоятда самарали таъсир этиш хусусиятига эга. Улар оптимал шароитда (яъни паст температурада, нормал босим ва маълум қийматга эга бўлган муҳитда) аноорганик катализаторларга нисбатан жуда катта тезлик билан таъсир этади. Масалан, водород пероксидни сув ва атом холидаги кислородгача парчаловчи каталаза ферментининг таъсири шу реакцияни катализловчи темир ионларига нисбатан 10^8 - 10^{11} марта юқори. Иккинчидан, ферментлар специфик таъсир қилиш хусусиятига эга. Бошқача айтганда, ҳар бир фермент одатда, фақат битта кимёвий реакцияни ёки бир хил турдаги бир гуруҳ реакцияларни катализлайди. Яъни, сахараза ферменти фақат сахарозани парчалайди. Шунга ўхшаш дисахаридларга эса таъсир қилмайди. Аноорганик катализаторлар бундай хусусиятга эга эмас. Учинчидан, ҳужайрадаги биокимёвий жараёнлар ферментлар ёрдамида катъий равишда бошқариб турилади. Ферментларнинг бундай хусусияти уларнинг ажралмас хусусияти ҳисобланади. Тўртинчидан, ферментлар иштирокида катализланадиган реакциялар доираси бир мунча кенг бўлиб,

улар тирик организмларда кечадиган оксидланиш – қайтарилиш, гидролиз, изомеризация, турли гуруҳларнинг кўчиши ва шунга ўхшаш бир қатор реакцияларни катализлайди. Масалан, соя уруғида мочевиани парчалайдиган уреаза ферменти, картошка тугунагида крахмал синтезланишида иштирок этадиган фосфолипаза ферменти кўп учрайди.

Тадқиқотда қўлланиладиган услубнинг тавсифи. Ферментлар ўта беқарор ва фаоллигини осон йўқотувчи бирикмалар ҳисобланади, шунинг учун уларни ажратиб олишда ва тозалашда махсус усуллар қўлланилади. Ҳар бир ферментни ажратиб олиш учун қайси усулни танлашда унинг ўзига хос хусусиятларини ҳисобга олиш керак. Ферментларни ажратиб олиш ва тозалаш усуллариининг барча босқичлари улар денатурацияга учрамайдиган шароитда олиб борилади. Паст температура, рН муҳит нинг доим бир хил бўлиши, оғир металл тузларининг бўлмаслиги ва ҳоказолар ана шундай шароит ҳисобланади.

Деярли барча ферментларни ажратиш учун аввало ўсимликлар тўқимаси ҳовончада ёки гомогенизатор деб аталадиган махсус асбобларда майдаланади. Бунда кўп ферментлар эритмага ўтиб кетади. Лекин бир қанча ферментлар тўқималар парчалангандан кейин эритмага ўтмаслиги мумкин, чунки улар ҳужайранинг структура тузилмалари ҳисобланган митохондрий, хлоропласт ва бошқа мембрана системалари билан боғланган бўлади. Боғланган бундай ферментларни ажратиш учун аввало структура тузилмаларини махсус усуллар билан парчалаш керак. Структура тузилмалари бир қанча механикавий усуллар (қум, майдаланган шиша, қаттиқ нейтрал тузлар), қайта-қайта музлатиш ва эритиш, органик эритувчилар (этанол, бутанол, ацетон, глицерин ва бошқалар) таъсирида парчаланади.

Тадқиқот натижаларининг назарий ва амлий аҳамияти.

Маҳаллий ўсимлик хом ашёси бўлган турп (*Rhaphanus sativis*) экстрактидан олинган фосфолипаза Д ферменти ва тухум сариғидан олинган фосфолипид субстратларидан фойдаланиб, фосфотид кислота олиш. Шу асосда уларни олишнинг биотехнологик чизмасини таклиф қилиш.

Иш тузилмасининг тавсифи. Фосфолипаза Д ферментини ажратиб, фермент таркибидаги оксил миқдорини Лоури усулда аниқлаш. Тухум сариғидан олинган фосфолипидлар унумини ажратиб олиш. Фосфолипаза Д ферментини гидролитик фаоллигини аниқлаш. Фосфолипаза Д ферменти катализлайдиган трансалкиллаш ва гидролитик реакцияларни ўтказишнинг оптимал шароитини аниқлаш.

I боб. АДАБИЁТЛАР ШАРҲИ

1. Липолитик ферментлар ва уларнинг хусусиятлари

Ферментлар – биологик катализаторлар бўлиб, асосида модда алмашинуви ётган кимёвий реакцияларни тезлаштириш қобилиятига эга. Улар ҳаёт фаолияти учун зарурий элементлар ҳисобланади. Тирик организмдаги барча кимёвий реакциялар каталитик жараёнлар бўлиб, улар ферментлар иштирокида боради.

Бунинг асосий сабабларидан бири шуки, организм ҳаёт фаолияти ташқи муҳитдан қувват манбаи сифатида ва турли аъзолар учун зарур моддаларни кимёвий нуқтаи назардан нисбатан турғун моддалар сифатида истеъмол қилади. Бу моддалар иштирокида борадиган кимёвий жараёнлар юмшоқ шароитда (паст харорат, нормал атмосфера босими, суюлтирилган эритмалар) юз беради. Организмдаги биокимёвий жараёнлар шу шароитларда етарли даражадаги тезликда бориши учун ферментлар иштироки зарур.

Хозирда 1000 дан ортиқ ферментлар маълум бўлиб, улар шунча индивидуал (алоҳида) биокимёвий реакцияларни бошқаради. Барча ферментлар оксил табиатли бўлиб, уларнинг молекуляр оғирликлари бир неча ўн мингдан тортиб, миллион ва ундан ортиқ қийматга эга. Шунинг учун фермент миқдорини г/моль ларда ифодалаш ўрнига унинг миқдорини каталитик фаоллигини ифодаловчи бирликларда ўлчанади, яъни ферментатив реакция тезлиги билан. Фермент миқдори бирлиги (Е) сифатида нормал шароитда 1 мин. да 1 мк моль субстратни катализлаш миқдори олинган. Ферментнинг ҳақиқий молекуляр фаоллиги деб, ферментнинг битта молекуласи 1 мин. да таъсир этган субстратнинг молекулалари сони олинади.

Ферментлар ичида гидролазалар алоҳида ўрин тутади. Бу гуруҳ ферментлар турли субстратларга нисбатан парчаловчи хоссага эга.

Ферментларнинг бу синфига липазалар кириб, улар ёғларни парчалаш хусусиятига эга. Липазаларнинг табиий функциялари, бу глицериннинг ёғ кислоталарининг мураккаб эфир боғини гидролизлаш бўлиб, баъзи ҳолларда ва маълум шароитларда улар қайта эфирлаш ва синтезлаш реакцияларини тезлаштириши мумкин.

Кейинги йилларда липазаларни амалиётда қўллашга йўналтирилган тадқиқотлар сони ортиб бормоқда. Буларга гидролиз ва липидларнинг синтези, уларни фермент композициялар таркибида озиқ - овқат саноатининг турли соҳаларида қўллаш ва бошқалар.

Бунга липазаларнинг ҳозирда етарлича ўрганилмагани сабаб бўлса, иккинчи томондан, сув – мой фазалари чегарасидаги ферментатив жараёнларни ўрганишнинг мураккаблигидир.

Шунинг учун липазалар ҳақидаги кўпчилик маълумотлар мунозарали ва қарама-қарши. Шунинг учун биз қуйида кўпроқ ферментларнинг хусусиятларини келтиришда уларнинг физик - кимёвий хоссалари билан бирга субстратга ва катализланадиган реакция хусусийлигига эътибор беришга ҳаракат қилдик.

Фазалар чегарасида липолитик ферментлар – таъсирини ўрганишга катор тадқиқотлар бағишланган [6-9].

Маълумки, липолитик ферментлар гетероген шароитда мураккаб эфир боғларини гидролизлайди. Шунинг учун липолизни тезлаштириш учун сувда эрийдиган ферментни субстрат фазаси юзасидаги адсорбциясини яхшилаш лозим.

Одатда бу мақсадлар учун майдалаш, эмульсиялаш, механик таъсир ва бошқа усуллар қўлланилади. Аммо баъзи тажрибалар натижалари шуни кўрсатдики, баъзи ҳолларда фазалар чегарасида липолиз тезлиги жуда юқори бўлиб, у гомоген тизимлардаги мураккаб эфир боғлари

гидролизидан тез бўлиши мумкин. Демак, бу реакцияларнинг қандайдир ўзига хос томонлари бўлиб, улар катализ самарадорлигини оширади. Баъзи тажриба натижаларига кўра, липазанинг сув билан субстратнинг чегара фазасида адсорбцияланиши реакция тезланишига сабаб бўлмаган.

Қатор тадқиқотлар фермент молекуласида алоҳида гуруҳлар бўлиб, улар ферментнинг субстрат сирт молекулалари билан боғланишига ва унинг фаоллашувига сабабчи бўлади.

Тахмин қилиш мумкинки, фермент - субстрат комплексининг ҳосил бўлиши ундан олдинги жараёнларга боғлиқ. Яъни, юзадаги липид қатламини гетероген каталитик хоссаларининг бошқарувчиси деб қараш мумкин.

Липолитик ферментларнинг турғунлиги энг муҳим муаммолардан биридир. Ферментларнинг турғунлиги уларнинг катализатор сифатида самарадорлигини ошириш билан бирга уларнинг технологиклигини ҳам оширади [10-11].

Турли хил манбалардан олинган липолитик ферментлар ўзларининг иссиқликка чидамлиликлари билан ҳам фарқланади. Аксарият ҳолларда уларнинг температура оптимумлари 37°C - 55°C ни ташкил этади.

Кенгроқ температура чегараларида максимал фаолликка эга бўлган липазалар ҳам учрайди. Кўп ҳолларда липазаларни тозалаш уларнинг фаолликларининг пасайишига олиб келади. Ферментлар турғунлиги ҳақида гапирилганда уларнинг термодеградацияси кўпроқ ташқи омиллар билан боғлиқлигини назарда тутмоқ керак. Ташқи омиллар уларнинг турғунлигига ижобий ва салбий таъсир кўрсатиши мумкин. Агарда субстратлар турғунликка ижобий таъсир этса, температура, рН муҳит ва бошқалар фермент турғунлигини пасайтириши мумкин. Агарда микроорганизмлардан олинган ферментлар ичида юқори температураларга мослашганлари ҳам учраса, ўсимлик ва ҳайвон

органларидан олинган ферментларнинг турғунлиги фақат маълум даражада бўлади.

Липолитик ферментлар фаоллиги кўп даражада муҳитнинг рН ига боғлиқ. рН нинг оптимал қиймати фермент турига боғлиқ. Микроб табиатга эга липазаларнинг мутлақо кўпчилиги нордон характерга эга бўлиб, рН 6 га тенг.

Ўсимликларнинг липолитик ферментлари ҳам нордон, ҳам ишқорий муҳитларда фаол бўлиши мумкин, у ўсимликларнинг липаз комплексларининг гетерогенлиги билан боғлиқ.

Липазаларнинг энг кўп ва яхши ўрганилган хусусияти, бу уларнинг гидролитик хусусиятидир. Уларнинг синтез хусусиятлари нисбатан камроқ ўрганилган.

Тажрибалар озод ёғ кислоталар миқдори камайганда липазалар иштирокида мураккаб эфирлар синтезланишини кўрсатади.

Умуман олганда, липазалар ўта хусусийликка эгаллигини тасдиқлаш мумкин. Улар боғларга хусусий, ундан ташқари субстратнинг кимёвий структурасига ҳам сезгир.

Кейинги йилларда хужайра структураларини парчалашда кўпинча детергент деб аталадиган махсус моддалар ишлатилади. Детергентлар жуда катта юза фаоллигига эга бўлган моддалардир. Улар оз миқдорда ишлатилганда ҳам хужайранинг структура тузилмалари бузилиб кетади. Детергент сифатида тритон - х – 100, На додесисульфат, дезоксихолат ва бошқа моддалардан фойдаланилади. Айрим ҳолларда, масалан, ҳаддан ташқари пишиқ бўлган хужайра структураларини парчалашда юқори частотали товуш ва ультратовуш тўлқинларидан ҳам фойдаланилади [12-22].

Хужайра, тўқималар ёки хужайранинг структура тузилмалари парчалангандан сўнг уларнинг таркибидаги ферментлар сув, буфер эритмалар, нейтрал тузларнинг эритмалари ёки органик эритувчилар ёрдамида экстракция қилиш йўли билан ажратиб олинади. Ажратиб олинган экстрактда ферментатив фаолиikka эга бўлган оксиллар билан бир каторда, фаол бўлмаган, яъни, структуравий оксиллар ва бошқа кичик молекулали бирикмалар ҳам бўлади [34,44].

2. Ферментларнинг биологик катализаторлик хусусиятлари

Ферментлар мухандислиги янги илмий йўналиш бўлиб, бир нечта фанларни ўзида мужассамлаштиради – энзимология, биохимия, кимёвий энзимология.

Ферментлар мухандислигининг асосий масаласи – биологик система ёхуд тирик хужайрадан олинган ферментларнинг каталитик таъсирини қўллаган ҳолда биотехнологик жараёнларни яратиш. Ферментлар мухандислиги – янги маҳсулот яратиш, унинг сифатини яхшилаш ва тежамкорлик (экономик) кўрсаткичларни кўтариш билан боғлиқ кўплаб муаммоларни ҳал қилади. Бугунги кунда ферментларни тажрибада қўллаш доирасини кенгайтиришга эришилди. Уларни катализатор сифатида саноат жараёнларида қўллаш кўзда тутилади [23-24].

Шуни айтиб ўтиш керакки, ферментларга шундай хусусият хоски, уларни саноатда органик синтезлар катализатори сифатида қўллаш мумкин. Шунга қарамай биокатализаторлик афзалликлари билаб бир каторда, ферментларнинг камчиликлари ҳам бор. Энг катта камчилик, бу унинг “шикастланиши”, яъни бузилиши. Маълумки, ферментлар табиатан кам чидамли модда, у юпка макромолекуляр структурага эга бўлган оксил бўлиб, ташқи муҳит таъсирида осон бузилади. Шунинг учун ҳам янги йўналишнинг юзага келиши (ферментлар мухандислиги) фермент соҳасида актуал ва талабга жавоб берувчи ҳисобланади.

Ферментлар катализаторлик қилаётган реакциялар қийин механизмга эга.

Хозирги вақтда ферментларнинг хусусиятини ўзгартиришда жуда юқори ютуқларга эришилди – уларнинг барқарорлиги кўтарилди. Ферментлар мухандислиги асосида иммобилизациялаштирилган ферментлар ва фермент системаларини қўллаш ётади.

Саноатда иммобилизацияланган ферментларни ташувчиларда жуда кенг қўлланилади, бу эса юқори сифатли маҳсулот олишга ёрдам беради. Бу уларнинг турғунлигини оширади, тоза реакция маҳсулотларини олишга ёрдам беради, биокатализаторларнинг қайта тикланишини ва қайта ишлатилишини енгиллаштиради.

Баъзи бир ферментлар ўзининг фаоллиги ва юқори спецификлиги туфайли озиқ - овқат саноатида ишлатилади. Ферментлар асосан комплекс ҳолатида табиий полимерларни – оқсилларни, крахмални, пектинни гидролитик парчалаш учун ишлатилади.

Ферментларни ташқи муҳит факторларидан сақлашни кучайтириш учун ҳозирги вақтда иммобилизацияланган ферментларни микроорганизм ҳужайраларига юбориш, кейинги ишлатиш учун масаласи ҳал қилинмоқда. Микроорганизм ҳужайраларини иммобилизациялаш жараёнида технологик жараёнлар анчагина енгиллаштиради, чунки ферментларни ажратиш, тозалаш ва иммобилизациялашга эҳтиёж қолмайди. Саноатда қўлланиладиган кўплаб ферментлар микроорганизмлардан олинади. Фақат кам миқдорда ўсимлик ва ҳайвонлардан олинадиган ферментлар (масалан, папаин – папай мевасидан олинади) саноатда қўлланилади. Ўсимлик ва ҳайвонлардан олинадиган ферментларни ўрнини борган сари микроорганизмлардан олинадиган ферментлар босмоқда [25,27].

3. Фосфолипидлар ва фосфолипаза Д

Фосфолипидлар – мураккаб липидлар бўлиб, улар фосфор кислотаси ва глицерин ёки сфинозиннинг мураккаб эфирлари ҳисобланади. Улар бир ёки бир неча юқори ёғ кислоталари қолдиқлари билан эфир ёки амид боғлари ташкил этади. Фосфолипидлар молекуласи таркибига этаноламин, холин, серин, инозит кириши мумкин. Фосфолипид таркибидаги спирт таркибига кўра фосфоглицеридлардан фарқланади. Уларнинг битта гидроксил гуруҳи ёғ кислота билан эмас, балки фосфат билан эфирли боғ ҳосил қилади. Фосфоглицеридлар фосфотид кислота ҳосилалари бўлиб, улар глицерин, ёғ кислоталар, фосфат кислота ва одатда биронта азот тутувчи бирикмалардан таркиб топган. Ҳамма фосфолипидлар қутбли липидлар ҳисобланади ва кўпроқ хужайра мембранасида оксил - липид комплекси сифатида учрайди [26,30-32].

Ҳар хил фосфатидлар авваламбор таркибидаги спиртлар ва азотли моддалар - серин, этаноламин ва холин билан фарқ қилади. Фосфолипидлар худди ёғлардай жамғарилмайди ва хужайра мембраналарининг муҳим компонентлари бўлиши туфайли хужайра метаболизмида муҳим бошқарувчи ролини бажаради. Фосфолипидлар табиатда кенг тарқалган. Асосий структура компонентлари сифатида ҳайвонлар, ўсимликлар ва микроорганизмлар хужайра мембраналари таркибига киради. Оксиллар билан липопротеин комплекслар ҳосил қилади.

Фосфоглицеридларнинг қуйидаги турлари мавжуд:

- 1) Фосфатидилхолин (лецитин);
- 2) Фосфатидил этаноламин;
- 3) Фосфатидилсерин;
- 4) Плазмалоген;

- 5) Фосфатидилинозит;
- 6) Кардиолипин.

Организмда фосфолипидлар хужайра мембранаси билан боғланиб, унинг функциясини ўзгартириши мумкин. Шунингдек, улар иммун реакциясига таъсир этади ва ацетилхолин медиаторнинг хужайрага таъсирини йўқотади.

Сфинголипидларнинг қуйидаги гуруҳлари мавжуд:

- а) сфингомиелинлар;
- б) гликолипидлар;

Сфинголипидларга таркибида икки атомли тўйинмаган аминоспирт сфингозин киради.

а) сфингомиелинлар хужайра мембраналарида, нерв тўқимаси, буйрак, жигар тўқималарида кўп миқдорда учрайди. Улар кўпроқ нерв тўқимасидаги нерв толаларининг қобиғида миелин таркибида бўлади.

б) гликолипидлар - таркибида углевод компоненти бўлган аралаш липидлар. Улар асосан нерв тўқималарида кўп бўлиб, нормал электр фаолликка эга бўлиши ва нерв импульсларини ўтказишда зарур бўлади. Бундай липидларга cerebroзидлар, gangлиозидлар ва сульфолипидлар киради.

Cerebroзидлар таркибида фосфор кислоталар ҳам, холин ҳам бўлмайди. Унинг таркибида гексоза сфингозиннинг гидроксил гуруҳи билан эфир боғи орқали бириккан, ёғ кислота қолдиғи эса сфингозиннинг аминогуруҳи орқали бириккан. Cerebroзидлар биринчи бўлиб бош миёда топилган ва унинг номи ҳам шундан келиб чиққан. Уларнинг углевод қисми асосан галактозадан, камдан кам ҳолларда глюкозадан иборат бўлади.

Сульфолипидлар – сереброзидларнинг сульфатли унумлари. Улар катионларнинг нерв тўқималари ва толаларнинг мембраналари орқали ташилишида иштирок этади. Шу сабабли сульфолипидлар нерв системасининг нормал электр фаолияти учун керак.

Ганглиозидларда бошқа гликофинголипидлардан фарқли равишда турли хил моносахаридлардан ташкил топган олигосахаридлар бўлади. Ганглиозидлар кўпроқ миянинг кулранг моддасида, нерв ҳужайраларининг плазматик мембраналарида кўп миқдорда бўлади.

Ҳар қандай фосфолипидлар молекуласи икки қисмдан ташкил топган: гидрофил ва гидрофоб қисмлардан. Фосфолипидлар барча тирик организмларнинг таркибига киради. Уларнинг миқдори асаб тўқималарида юқори бўлиб, куруқ модда ҳисобида 70 % дан кўпроғини ташкил этади.

Фосфолипидлар холестерин ва оксиллар билан ҳужайраларнинг мембраналарини тузилишида иштирок этади, митохондриялар, ядролар ва бошқалар структурасига киради. Улар мембраналардан ўтишида иштирок этади. Фосфолипидлар қоннинг липопротеидлари таркибига киради ва холестерин, ёғлар ва ёғ кислоталари транспортида муҳим роль ўйнайди. Фосфолипидларнинг организмдаги синтезининг бузилиши жигарни ёғ босишига олиб келади [36-40].

Фосфолипидлар асаб толалари қоплама қатлами структураси таркибида бўлиб, толалардан импульс ўтишига катта таъсир қилади.

Организмда барча фосфолипидларнинг биосинтезида иштирок этадиган асосий модда бўлиб, фосфолипид кислота ҳисобланади.

Ораганизмдаги цитизин коферментлари фосфотид кислота молекуласига этаноламин, холин ёки бошқа бирикмаларни бириктириши натижасида турли фосфолипидлар ҳосил бўлади.

Шундай қилиб, организм турли хил фосфолипидларга катта эҳтиёж сезади ва унинг етарли миқдорда бўлиши учун фосфотид кислотанинг аҳамияти каттадир.

Юқоридагиларни инобатга олган ҳолда биз ушбу магистрлик диссертациясида табиий хом ашёлардан олинган фосфолипидлар унумидан биотехнологик усулда фосфотид кислота олишни мақсад қилиб олдик. Бу жараённи амалга ошириш учун липолитик ферментлардан фойдаландик.

Фосфолипидларни гидролизлаб фосфотид кислота ва сувда эрийдиган асослар ҳосил қилишга қодир ферментлардан бири фосфолипаза Д дир.

Фосфолипаза Д фосфолипидларни гидролизлабгина қолмасдан, балки асослар алмашинув реакциясини ҳам тезлайди.

Фосфолипазалар липолитик ферментларнинг алоҳида гуруҳи бўлиб, фосфолипидларнинг сувда эримайдиган субстратларининг каталитик ўзгаришида иштирок этади. Улар физик - кимёвий хоссалари ва ўзига хослиги билан фарқланади [41-43].

Фосфолипаза Д фосфолипазаларнинг вакилларидан биридир. Бу фермент фосфолипидлар молекулаларидаги фосфодиэфир боғни парчалаш хусусиятига эга. У мембраналар фосфолипид таркибининг ва уларга боғлиқ бўлган липид - боғ функцияларининг тартибга солишида муҳим роль ўйнайди. Сабзи илдизи ва қарам барглари экстрактида Лецитиназа бўлиб, у тухум лецитинини гидролизлаганда холинни ажратиш хоссасига эга эканлиги аниқланган.

Кейинчалик, яна кўп тажрибалар ўтказиб, бу фермент ўсимликларда, айниқса, қарам баргларида, ер ёнғоқда, чигитда, қахвада, турпда, шолғомда ва хоказоларда кўп миқорда бўлиши аниқланган.

Фосфолипаза Д нинг икки тури: эрувчан ва мембрана билан боғланган тури фарқ қилинади. 1954 йилда Хейтс ўсимликлар экстрактидаги лецитинни гидролизловчи фермент пластида фракциялари билан чамбарчас боғлиқ бўлиб, цитоплазматик фракцияларда умуман бўлмаслиги аниқланган.

Маълум вақтдан сўнг, чигитнинг ёғсизлантирилган кукунидан фосфолипаза Д нинг сувда эрувчан шакли ажратиб олинган. Кейинчалик аниқланишича, ўсимликларда фосфолипазанинг сувда эрувчан шакли билан бирга ферментнинг бир қисми боғланган ҳолда ҳам учрар экан. Бундан ташқари, унинг бир шаклдан (митохондриялар билан боғланган) иккинчи шаклга (эрувчан фосфолипаза Д га) ўтиш имконияти мавжудлиги маълум бўлган. Буни қахва дони таркибидаги фосфолипаза Д ни ўрганишда аниқланган. Бу фосфолипазанинг айрим хоссалари ва молекуляр вазни кичиклиги билан фарқ қиладиган бошқа тур хили топилган, у микроорганизмларда бўлар экан [45-49].

Олинган маълумотлар шундан далолат берадики, фермент бу объектларда ҳам қисман мембрана билан боғланган ва сувда эрувчан ферментларда бўлар экан, масалан, қизил сув ўтлардан олинган фосфолипаза Д хужайра заррачалари билан чамбарчас боғланган бўлиб, хатто ультратовуш таъсир эттирилганда ҳам салюбилизацияланмайди. *Haemophilus parainfluenzae* *hachijonsis* дан олинган фосфолипаза Д эса эрувчан шаклда олинган. Бир қатор микроорганизмларнинг фосфолипаза Д си фақат мембраналарда тўпланган бўлиб, солюбилизирлана олмайди. Микробли бир қанча объектлардан фосфолипаза Д нинг молекуляр оғирлиги 16000 бўлган сувда эрувчан шакли ажратиб олинган. Ҳайвонлар тўқималарида ҳам фосфолипаза Д бўлиши анча кейинроқ аниқланган. Олимлар Токиб ва Конфер бу ферментни жигар микросалаларидан топган. Дастлабки олиб борилган ишларда бу фермент қайси шаклда бўлиши ноаниқ бўлган, чунки нишонланган фосфолипидлар билан олиб борилган

in vivo текширувларидагина бу ҳақида хулоса чиқарилган. Сентажрибаларида фосфолипаза фаоллиги мембрана фракцияларида тўпланганлиги ва фермент мембраналар фосфолипидлари билан мустаҳкам боғланиши аниқлаган. Фосфолипаза Д фосфолипидларни гидролизлашдан ташқари лизофосфолипидлар молекулаларидаги боғларни ҳам парчалаш хоссасига эга [50-59].

Ҳайвонларнинг ҳар хил тўқималарида ҳам фосфолипаза Д борлиги кейинроқ маълум бўлди. Каламушнинг тўқималари текширилганда мияси, жигари, юраги, ўпкаси, қораталоғида фермент борлиги аниқланган. Мембрана ва ўпкалар микросала мембраналари учун фосфолипаза Д нинг солиштирма фаоллиги энг юқори бўлганлиги аниқланган.

Адабиётлардан бу маълумотларга асосланиб, шундай хулосага келиш мумкин, яъни фосфолипаза Д узок вақтгача айтилганидек фақат ўсимликларга хос эмас, балки ҳайвон объектларида ва микроорганизмларда ҳам кенг тарқалган. Бу фермент мембрана билан боғланган фосфолипазадир.

Ферментнинг ўсимликлардаги эрувчан шакли мембрана фосфолипаза Д сининг солюбилизирлашган шаклидир. Микроорганизмларда ферментнинг ҳар иккала шаклини мембрана билан боғланган ва секретланувчи шакли бўлади. Шу билан бирга кейингисининг хоссалари ўсимлик ва ҳайвонлар фосфолипаза Д сининг хоссаларидан фарқ қилади.

Ўсимлик ва ҳайвон дунёсидаги турли шаклдаги липолитик ферментлар тадқиқотчилар диққатини тортиб келмоқда. Хозирда ўзларининг турли хоссалари билан фарқланувчи липолитик ферментларнинг анчаси маълум. Уларнинг аксарият кўпчилиги тоза ҳолда олинмаганлиги ва уларнинг кимёвий тузилиши ҳақидаги маълумотлар

камлиги сабабли баъзи ҳолларда битта ферментни турли гуруҳларга ажратиш ҳоллари ҳам учраб туради.

Ўсимлик дунёсида эса фақат бир ёки иккита липаза бор деб қаралиб келинган. Уларнинг рН – оптимумига қараб нордон ва ишқорий липазалар дейилган.

Аввал глицериннинг ёғ кислоталари билан ҳосил қилган эфирларини нордон муҳитда гидролизловчи ферментлар аниқланган. Уларнинг рН – оптимумлари 5,6; 4,2 ва 4,8 да бўлган ва ишқорий муҳитдаги рН – оптимумга эга бўлган икки тур фермент аниқланган рН 8,8 ва рН 9,5 [60-70].

II бoб. АСОСИЙ ҚИСМ

Олиб борилган тажрибаларда қуйидаги реагентлар ва жиҳозлар қўлланилди:

Натрий додецилсульфат (DS-Na) “Galabroock Bucks”, Англия, петролей эфири “Реахим” Россия, қайта ҳайдалган этил спирт, метил спирт (ha Chema Био), абсолют ацетон (қайта ҳайдалган).

Металларнинг икки валентли тузларининг “хг” русумлигидан фойдаланилган.

Жиҳозлар:

1. Гомогенизатор MPW – 303 (Польша).
2. Центрифуга PC – 6
3. Ротор – буғлаткич ИР – 1МГ
4. Совутгич
5. Иономер И – 130
6. Бюхнер воронкаси

1. Материаллар ва таҳлил усуллари

Тадқиқотларда асосан табиий хом ашёлардан олинган маҳсулотлар қўлланилди – ўсимлик хом ашёсидан олинган фермент препарати фосфолипаза Д ва тухум сариғидан ажратилган фосфолипидлар унумидан иборат.

Ацетон – CH_3COCH_3 , молекуляр оғирлиги 58,08, рангсиз суюқлик, буғланиш ҳарорати $56,24^\circ\text{C}$, 20°C ҳароратда буғларининг босими 181,72 мм сим.уст., сув ва органик эритувчилар билан яхши аралашади. Иссиқлик сиғими $C_p = 30, 87$ ккал/моль (суюқлик) ва 437,25 ккал/моль (газ). Ҳаво

билан портловчи масса ҳосил қилиш чегараси 2, 55 – 12, 80 %. Ацетон катор органик моддаларни эритувчиси сифатида кенг қўлланилади.

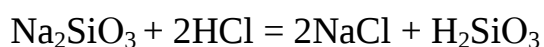
Ортобор (бор) кислотаси – H_3BO_4 – аорганик кислота, рангсиз кристалл, 109°C да эрийди. $\rho = 1,48$ – Қиздирилганда олдин метабор кислотага (70°C), сўнг бор ангидридига ва қисман тетрабор кислотага ($\text{H}_2\text{B}_4\text{O}_7$) айланади. Бор кислотанинг сувда эрувчанлиги (г/г) да 20°C да 4,9 г, $39,7^\circ\text{C}$ да 100 г. Органик эритувчиларда яхши эрийди. Лаборатория шароитида аксарият буфер эритмалар олишда қўлланилади.

Гексан – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ – рангсиз суюқлик, молекуляр оғирлиги 86, қайнаш ҳарорати – $68,95^\circ\text{C}$. СО билан H_2 дан олинадиган синтетик бензиннинг асосий қисмини ташкил этади.

Метил спирт (метанол) – CH_3OH , молекуляр оғирлиги – 32,18, бир атомли спирт – рангсиз, ўзига хос ҳидли суюқлик. Суюқланиш температураси – $97,88^\circ\text{C}$; қайнаш температураси – $64,5^\circ\text{C}$; қовушқоқлиги – 0,584 (20°C). Ёниш иссиқлиги 5420 ккал/г ёки 173,650 ккал/моль, алангаланиш ҳарорати $15,6^\circ\text{C}$; Ҳаво билан хавфли аралашма ҳосил қилиш концентрациялари чегараси 6,72 – 35,6 % ҳажм.

Петролей эфири – енгил углеводородлар аралашмаси (C_5 ; C_6) – рангсиз суюқлик; $d=0,633 - 0,670$. Қайнаш бошланиш температураси 40°C . Петролей эфири ёғлар, мум, целлюлозанинг баъзи эфирларини эритишда, эфир мойларини экстракциялашда қўлланилади. Кўпроқ лабораторияда эритувчи сифатида қўлланилади.

Силикагель – кремний кислота ангидриди гелининг қуритилган шакли. Силикагельни қуйидагича олиш мумкин:



Майдаланган гелъ майдаланиб, сувда яхшилаб ювилади, куритилади ва фракцияларга ажратилиб, герметик ҳолда сақланади.

Силикагелъ – сорбент бўлиб, унинг микроғовак структураси ва солиштирма юзаси катта. Шу сабабли олинмиш усулига қараб майда ғовакли ва катта (йирик) ғовакли турлари бор. Майда ғоваклилари – КСМ, ШСМ, МСМ ва АСМ. Йирик ғовакли силикагеллар – КСК, ШСК, МСК ва АСК лар. Силикагелъ гидрофил сорбент бўлгани учун асосан сув буғларини ютишда қўлланилади. Шу билан бирга силикагелъ спирт, ацетон, бензол ва бошқа органик эритувчилар буғларини ҳам ютади. Силикагелъ кўплаб органик суюқликларни тозалашда қўлланилади. У катализаторлар учун ташувчи сифатида ҳам қўлланилади.

Хлорид кислота – HCl , нормал шароитда рангсиз газ бўлиб, ўткир ўзига хос ҳидга эга, молекуляр оғирлиги 36,5. 1 л газнинг оғирлиги 1,6391 г, нисбий зичлиги 1,268. Солиштирма иссиқлик сифими – $C_p=0,1939$ ккал/г. Суюқ хлорид кислота – $84,8^{\circ}\text{C}$ да қайнайди ва $-114,2^{\circ}\text{C}$ да қотади. Эриш иссиқлиги 10,3 ккал/г. Суюқ ҳолда HCl ўткир хидли рангсиз суюқлик.

Fe Cl_2 ёки бошқа аралашмалар бўлганда сарғимтир – кўкиш рангли. HCl нинг суюқ эритмаларини қайнатилганда унинг буғларидаги HCl миқдори эритмаларидек паст бўлиб, концентрланган эритмалари қайнатилганда буғдаги HCl концентрацияси – юқори. Хлорид кислота амалиётда кенг миқёсда қўлланилади. Унинг иштирокида рух, темир, марганец ва бошқа металлларнинг хлоридлари олинади. Уни турли металлларнинг юзаларини тозалашда кенг қўлланилади. Кўпинча турли маҳсулотларни ишлаб чиқаришда хлорид кислота қўлланилади.

Натрий тетраборат (Бура) – $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, молекуляр массаси 381,37 – рангсиз, тиник, шаффоф кристалл ёки кристалл кукун. ГОСТ 4199-76, СТ СЕБ 1751-79. Унинг 0,05 мол/л эритмасини тайёрлаш учун сувда икки қайта кристалланади. Эриш ҳарорати 60°C дан ортмаслиги

керак. Қуритишни фильтр қоғоз орасида олиб борилади. Бунда фильтр қоғоз қайта – қайта алмаштирилиб турилади. 19,07 г қайта кристалланган бура сувда эритилиб, сувнинг хажми 1,0 л га етказилади.

Натрий ацетат – $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, молекуляр массаси 136,08, рангсиз, шаффоф холдаги кристал. ГОСТ 199-78.

Этил спирти (этанол), спирт 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, молекуляр массаси-46,07, рангсиз, учувчан, қўзғалувчан, ачиштирадиган мазали, ўзига хос хидли суюқлик. Зичлиги $\rho_0=0,8066-0,8054$ бўлиб,бу 96,2-96,5% этил спиртига тўғри келади. Сувсиз спиртнинг зичлиги $\rho_0=0,78927$ бўлиб, 100% этил спиртига тўғри келади. Этил спирти $+78,3^\circ\text{C}$ ҳароратда қайнайди ва -144°C ҳароратда музлайди.

Сирка кислота – CH_3COOH , молекуляр массаси 60,05, рангсиз, ўткир, ўзига хос хидли суюқлик. ГОСТ 61,75. Сирка кислота миқдори 98 % дан кам эмас.

2. Фосфолипаза Д ни ажратиш ва тозалаш

Ўрта Осиё турпидаги фосфолипаза Д ферментини экстракциялаш учун 0,05 М бура эритмаси ва 0,2 М бор кислота эритмасидан ташкил топган боратли буфер тайёрланди. 1 литр боратли буфер тайёрлаш учун 350 мл 0,05 М $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ эритмаси ва 650 мл 0,2 М H_3BO_3 эритмаси керак бўлади. Тайёр холдаги боратли буферни бор кислота ёрдамида рН и 8,2 гача етказилади.

Ферментни ажратиш қуйидагича олиб борилди. Ювиб тозаланган ва қирғичдан ўтказилган 1 кг турпга (0,05 М бура эритмаси ва 0,2 М бор кислота эритмасидан тайёрланган) рН 8,2 (1:1) га тенг бўлган 0,1 М борат буфери қўшилди. 10 дақиқа гомогенизацияланди ва ҳар 0,5 дақиқада рН назорат қилиб турилди. Экстракциялаш 4 соат давомида совуқ ҳолда олиб

борилди. Экстракт аралаштирилган ҳолда 24 соатга музхонада қолдирилди.

Экстракт Бюхнер воронкасида филътрлаб олинди. Оксиллар экстрактдан 1:2 нисбатда олинган ва 0°C да совитилган (10 дақиқа давомида айланишлар сони 5000 гача бўлган), ҳажми 3 маротабагача кўп бўлган ацетонда чўктириб олинди.

Чўкма центрифугада унинг айланишлар тезлиги дақиқасига 2000 бўлганда ажратиб олиниб, сувсиз ацетон билан яхшилаб ювилиб, ҳавода ацетондан қуритилди ва ацетон кукуни катта бўлмаган ҳажмдаги совитилган ва дистилланган сувда эритилди.

Олинган чўкма Трис – HCl буферида pH 7,4, эритилиб, препаратнинг буферида эрмаган қисми центрифугада ажратилди. Центрифугалаш 10 дақиқа давомида олиб борилиб, унинг айланиш тезлиги дақиқасига 18000 айл/дақ ни ташкил этди.

Фугат олиниб, унга 1:20 нисбатда совитилган ацетон қўшилиб препарат чўкмага туширилди. Чўкма ажратилиб, сувсиз ацетонда яхшилаб ювилиб, ҳавода қуритилди. Ферментнинг қуруқ кукуни - 4° С ҳароратда сақланди. Оксил миқдори Лоури усули билан аниқланди.

Тухум сариғидан фосфолипидлар унумини олиш. Ферментатив реакцияда субстрат сифатида тухум сариғидан Singleton усулида олинган фосфолипидлар йиғиндиси қўлланилди. Бунинг учун 12 дона тухим олиниб, унинг сариқ қисми оксилдан ажратилди. Ажратиб олинган тухум сариғи 450 мл абсолют ацетонда хона ҳароратида яхшилаб ажратилди. Аралаштириш миксер ёрдамида 10 дақиқа олиб борилди. Гомогенли ҳолга келтирилди.

Масса экстракциялаш учун 5°C ҳароратда 2 соатга қолдирилди. Экстракциялаш тугагандан сўнг чўкма центрифуга ёрдамида ажратилди (3000 айл/дақ). Чўкма 150 мл абсолют ацетонда иккинчи марта

экстракцияланди. Иккинчи экстракция ҳам 2 соат давомида олиб борилди. Центрифугаланган гомогенатдан олинган чўкма ацетонда ювилиб, ҳавода ацетон қолдиқларидан қуритилди.

Қуруқ қолдиқ 96% ли этил спирт билан экстракцияланди. Икки марта экстракциялангандан сўнг экстракт Бюхнер воронкасида филтрланди. Экстрактлар умумлаштирилиб, ундаги спирт роторли буғлаткичда ҳайдалди. Спиртни ҳайдаш вакумда 35⁰С ҳароратда олиб борилди. Ажратилган чўкма 75 мл петролей эфирида эритилди. Эритмадаги фосфолипидлар 1:10 нисбатда абсолют ацетонда чўктириб олинди. 1 соатга - 4⁰С ҳароратда қолдирилди.

1 соатдан кейин совитилган эритмани олдиндан совутилган филтрда сузиб олинди. Бу жараён икки марта қайтарилди ва ротор буғлаткичда 35⁰ С да қуритилди. Фосфолипидлар чиқиши 11,9 г ни ташкил этди. Фосфолипидлар 55 мл хлороформда эритилиб, - 10⁰ С ҳароратда сақлашга қолдирилди.

3. Ферментлар фаоллигини ўлчаш

Ферментлар фаоллиги улар катализлайдиган реакциялар тезлигини ўлчаш орқали олиб борилади. Бунинг учун реакция давомида реакцияга киришувчи моддалар концентрациялари ёки реакция маҳсулотлари концентрациялари ўлчаб борилади. Бунда спектрофотометрик усулни қўллаш ўлчашларнинг аниқлилик даражасини юқори бўлишини таъминлайди. Спектрофотометрда реакцион муҳит оптик зичлиги ўлчаб борилади.

Электрокимёвий ўлчаш усуллари ҳам етарли даражада аниқликка эришиш имконини беради. Электрокимёвий ўлчаш усулида эритманинг электрокимёвий хоссалари ўлчаб борилади (масалан, рН нинг ўзгариши, эритманинг электр ўтказувчанлиги ва ҳ.к.).

Субстрат ёки реакция маҳсулотлари газ фазада бўлганда манометрик ўлчаш усулларида ҳам фойдаланиш мумкин. Амалда юқорида келтирилган умумий усуллардан бошқа хусусий ўлчаш усуллари ҳам қўлланилади.

Ферментлар экстракти таркибидаги кичик молекулали бирикмаларни ажратиш учун диализ усули ҳам қўлланилади. Диализ ўрнига, кўпинча гель (сефадекс) орқали филтрлаш усули ҳам қўлланилади. Экстракт таркибидаги фермент бўлмаган оксилларни ажратишда эса танлаб денатурация қилиш усули яхши натижа беради. Агарда ажратиб олинаётган фермент юқори температурага чидамли бўлса (масалан, рибонуклеаза ферменти 90°C да ҳам фаоллигини йўқотмайди) эритмадаги бошқа оксиллар термик денатурация йўли билан, яъни 50°C – 70°C да маълум вақтгача қиздириб чўкмага туширилади. Баъзан экстракт таркибидаги инерт оксилларни кислотали муҳитда ҳам чўкмага тушириш мумкин.

Юқорида айtilган усуллар ёрдамида денатурацияга учратиб, чўкмага туширилган оксиллар филтрлаш ёки центрифугалаш усули билан ажратиб олинади. Кейин эритмадаги оксилларни бирин - кетин чўктириш билан (унда оксилларнинг турлича эрувчанлик хусусиятидан фойдаланилади) энг юқори ферментатив фаолликка эга бўлган фракция ажратиб олинади.

Кўп фермент препаратлари тузлар ёрдамида фракцияларга ажратиш усули билан гомоген ва кристалл ҳолида олинган. Бу усул оксилларнинг маълум температурада, нейтрал тузларнинг концентрланган эритмаларида чўкмага тушиш хусусиятига асосланган. Мазкур усулда кўпинча аммоний сульфат тузидан фойдаланилади, чунки у сувда жуда яхши эрийди, хатто паст температурада ҳам унинг эрувчанлик хусусияти кам ўзгаради.

Ферментларни тозалашда танлаб адсорбция қилиш усули ҳам қўлланилади. Мазкур усулда адсорбент (каолин, гидроксипатит, кўмир ва бошқалар) ферментли эритмага қўшилади ёки махсус шиша колонкаларни адсорбент билан тўлдириб, ундан фермент эритмаси ўтказилади. Ферментларни танлаб адсорбция қилиш икки хил йўл билан амалга оширилиши мумкин: бунда адсорбент инерт оксилларни бириктириб олиб, ферментларни эритмада қолдириши мумкин бўлган ферментлар адсорбцияланиб, эритмада инерт оксиллар қолади. Ферментларни адсорбентдан ажратиш учун улар турли буферли эритмалар ёрдамида элюация қилинади.

Юқорида айтиб ўтилган усуллар ферментларни ажратиш ва тозалашда кенг қўлланилади. Бироқ бу усулларни ферментларни тозалашнинг сўнгги босқичларида қўллаш яхши натижа бермайди. Чунки эритмада ажратиб олинаётган фермент билан бир қаторда эрувчанлиги ва бошқа физикавий ҳамда кимёвий хоссалари бир-бирига ўхшаш бўлган турли хил инерт оксиллар ҳам бўлади. Ажратиб олинаётган ферментларни бу оксиллардан тозалаш учун ион алмашинувчи хроматография ва электрофорез усуллари қўлланилади.

Ажратиб олинган ва тозаланган ферментнинг гомогенлиги ультрацентрифуга, хроматография, электрофорез, гел - фильтрация каби усуллар билан аниқланади. Ферментнинг гомогенлиги ҳар хил принципларга асосланган турли усуллар ёрдамида тасдиқланиши керак.

Чунки баъзи ҳолларда ультрацентрифуга усулида гомоген деб топилган фермент электрофорез усулида турли фракцияга ажралиши мумкин.

Ферментнинг тозалигига қараб унинг фаоллиги ортиб боради ва гомоген фермент учун хос бўлган маълум ўзгармас максимал қийматга эга бўлади. Қайта кристалланиш натижасида олинган фермент фаоллигининг

ўзгармаслиги ҳам унинг гомогенлигини ифодалайдиган белги бўлиб ҳисобланади.

Ферментларни соф ҳолда ажратиб олиш уларнинг кимёвий табиатини аниқлаш имкониятини беради. Ферментлар оксилларга мансуб бўлиб, юқори молекуляр коллоид бирикмалардир. Шунингдек, улар шу бирикмаларга хос бўлган барча хусусиятларга эга, яъни оксилларнинг ярим ўтказувчи мембраналардан ўта олмаслиги, денатурацуга учраши ва эрувчанлигидан ўзига хос хусусиятлари, коллоид эритмалар ҳосил қилиши ферментларга ҳам хосдир [28].

4. Фосфолипаза Д ферментининг гидролитик

фаоллигини аниқлаш

Фосфолипаза Д (фосфотидилхолин – фосфат дегидрогеназа) фосфоглицеридлардаги фосфат гуруҳлардаги ҳамда гидрофил спиртлар орасидаги эфир боғларини гидролизини катализлайди. Сўнгги йиллардаги тадқиқотлар фосфолипаза Д ферменти худди бошқа липолитик ферментлар каби барча тирик организмлардаги липидлар алмашинувида ионларни ва турли метаболитларни биомембрана орқали ташилишини бошқарилувчи жараёнларда жуда муҳим вазифани бажарилишини асослаб берди. Фосфолипаза Д ферментининг биологик вазифасини ўрганиш ишлари ривожланиш босқичидадир.

Усулнинг моҳияти. Фосфолипидларни аниқлаш (кефалин ёки лецитин) гидролитик парчаланиши натижасида ҳосил бўлган маҳсулотларнинг (этаноламин ёки холин) миқдорини ўлчашга асосланган. Ферментнинг юқори фаоллиги 1 мг оксил (мл.моль.холин/мг.б.дақ.) га нисбатан 1 дақиқа давомида реакцияда ажралган холин ёки этаноламин микромолекулаларида аниқланади.

Фойдаланилган реактивлар. 0,1 М Na ацетат буфери, рН 5,6; 1 М CaCl_2 ; 1% ли Na додецилсульфат эритмаси; хлороформ; 0,005 М натрий тиосульфат эритмаси; 40 мг/мл концентрацияли фосфолипидлар суспензияси; J ли реагент: 200 г KJ + 150 г J - 2000 мл.

Реакция қуйидагича олиб борилди. Умумий ҳажми 2,0 мл га тенг бўлган ацетатли буфердаги фермент аралашмасига таркибида маълум миқдорда CaCl_2 , 50 мг силикагель, дистилланган сувдаги фосфолипидлар йиғиндиси ва 1% ли 0,1 мл Na додецилсульфат эритмаси қўшилди.

Реакцион массани 5 дақиқа давомида 30^0 С ҳароратда ушлаб турилди. Бу вақт ўтгандан сўнг унга фаоллаштирувчи – гександан 0,27 мл миқдорда қўшилди.

Реакцияни массани узлуксиз аралаштириш билан 30^0 С ҳароратда 30 дақиқа давомида олиб борилди. Жараёни тўхтатиш учун унга 2,5 мл ҳажмда хлороформ қўшилди ва бир неча минут яхшилаб чайқатилди. Шундан кейин реакцион масса 5 дақиқа давомида центрифугаланди. Центрифугалаш 5000 айл/дақ тезликда олиб борилди. Бунда масса қатламларга ажралди. Массанинг сувли қатлами олиб ташланди ва хлороформни учуриб юбориш учун аралашма 50^0C да 10 дақиқа давомида қиздирилди.

Сувли қисмга 1 мл йодли реагент (KJ) қўшилиб, аралашма музда совутилди, центрифугалаш ёрдамида холин чўкмага туширилди. Чўкма 2 марта муздек сувда ювиб олиниб, 2 мл хлороформда эритилди. Титрлаш 0,005 М натрий тиосульфат эритмаси билан олиб борилди. Титрантнинг 1 мл миқдори 0,55 мл моль холинга тўғри келади [29,35].

Солиштира фаолликни қуйидагича формула ёрдамида ҳисобланди:

$$A_{c.f} = \frac{V_{\text{титр}} \cdot 0,55 \cdot 2,7}{n \cdot 2,0 \cdot t} \frac{\text{мнМоль}}{\text{мин} \cdot \text{мг}}$$

Бунда: $V_{\text{титр}}$ – титрлашга сарфланган натрий тиосульфат миқдори, мл;

n – намунадаги оксил миқдори, мг;

t – реакция вақти, мин;

Оксилларни аниқлашнинг Лоури усули. Ушбу усул ароматик аминокислоталар ва цистеиннинг Фолинг реактиви билан рангли маҳсулотлар ҳосил қилиши ва пептид боғларга биурет реакцияларига асосланган.

Препарат эритмасининг 1 мл ни олиб, (унинг таркибида 0,025 – 0,250 мг таҳлил қилинаётган оксил бор) қолбага солинди ва 2 мл 1 реактивдан солинди ва хона ҳароратида 10 минут қолдирилди. Сўнг унга 0,5 мл Фолинг реактиви қўшилади ва яхшилаб аралаштирилиб 30 – 40 мин дан сўнг спектрофотометрда 750 нм тўлқин узунликда 10 мм ли кюветада оптик зичлиги ўлчанди. Қиёслаш учун стандарт эритма сифатида ҳар иккала реактивнинг препарати аралашмаси қўлланилди. Калибровка чизиғи намуна оксилнинг 0,025 : 0,250 мг ли концентрациялар орасида чизилади. Бунинг учун аниқ концентрацияли эритмалар олинади ва 750 нм тўлқин узунликда оптик зичликлари ўлчанади.

5. Ферментлар ингибиторлари

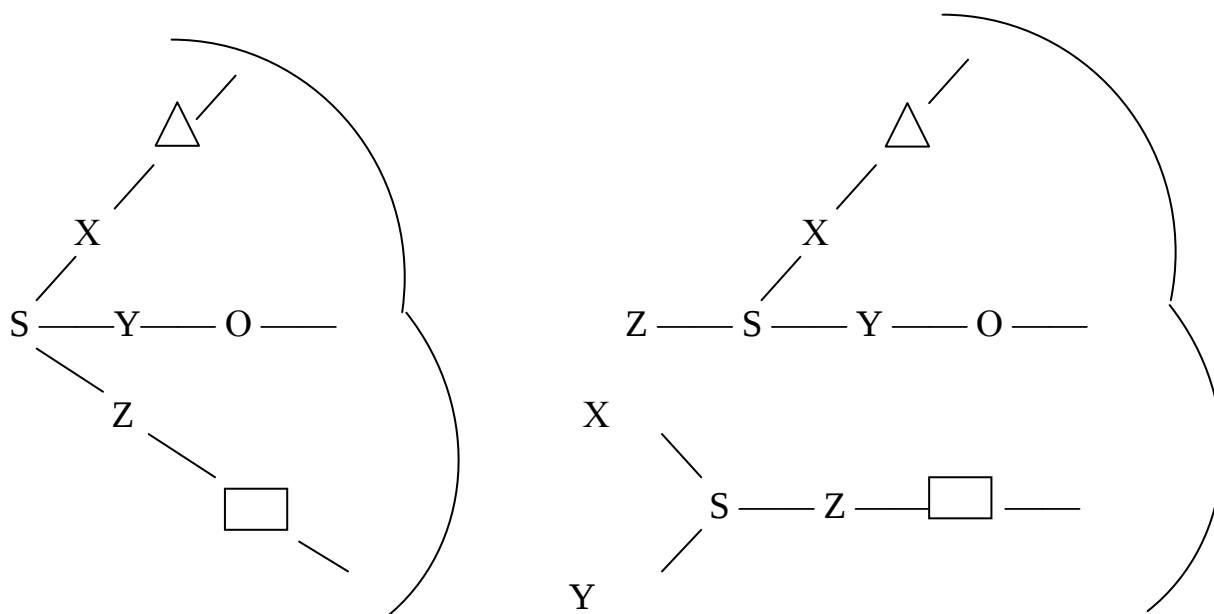
Ферментларнинг фаоллигини баъзи моддалар таъсирида пасайтириш мумкин. Бундай моддалар ингибиторлар деб аталиб, улар турлича бўлиши мумкин. Баъзи ҳолларда субстратнинг ўзи, ёки ферментатив реакция маҳсулоти ингибитор бўлиши мумкин. Фермент субстратнинг (S) бир неча фаол марказлари билан таъсирланса ва у марказларнинг бир қисми реакция маҳсулотлари билан эгалланса, фермент фаоллиги пасаяди:

Агарда ферментатив реакция давомиди ES комплекс фаол ва ES_1 комплекс фаол бўлмаса, у ҳолда реакция тезлиги билан субстрат концентрацияси орасидаги боғлиқлик қуйидагига тенг бўлади:

$$V = \frac{K + 2[E_0][S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_S^1}}$$

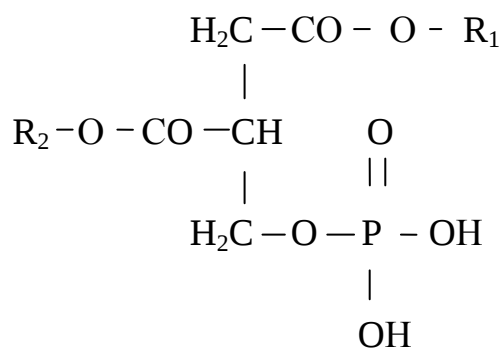
Бунда K^1 – фаол бўлмаган ES_2 комплекс диссоциация константаси.

Реакция кинетикасига ингибиторларнинг таъсири қайтар ва қайтмас бўлиши мумкин.



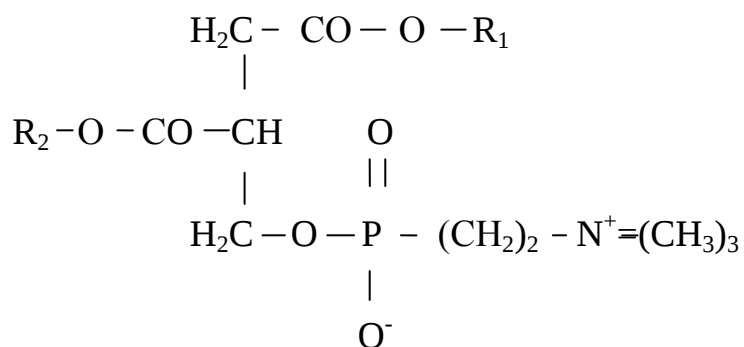
6. Фосфолипидлар йиғиндисини ажратиш

Фосфолипидларнинг катта гуруҳини ташкил этувчи глицерофосфатидлар структураси асосида фосфотид кислота ётади. Фосфотид кислота глицериннинг мураккаб эфиридир.

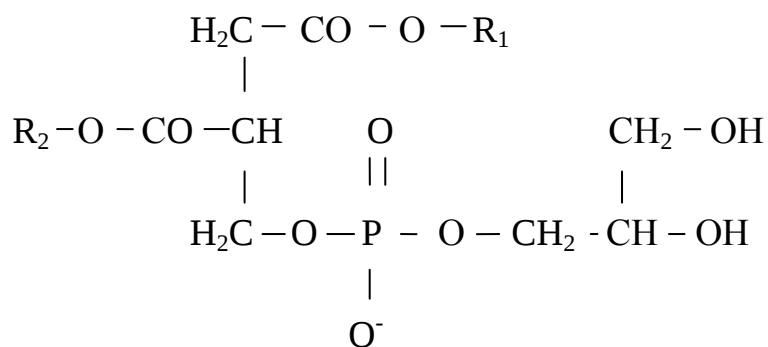


Фосфотид кислота

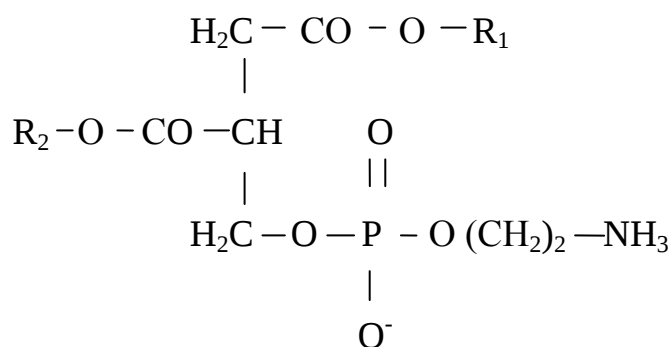
Фосфолипид кислотанинг хосилалари ҳисобланувчи
 глицерофосфотидлар гуруҳига фосфатидилэтаноламинлар,
 фосфатидилхолинлар, фосфатидилсеринлар, фосфатидилтреонинлар,
 фосфатидилглицерин ва фосфатидилинозитлар киради.



Фосфотидилхолин (лецитин)



Фосфотидилглицерин



Фосфотидилэтаноламин (кефалин)

Фосфолипидлар умумий липидлар гуруҳи ичида алоҳида физик - кимёвий хусусиятлари билан ажралиб туради.

Субстрат сифатида тажрибада фосфолипидлар йиғиндиси қўлланилди. Фосфолипидлар йиғиндиси тухум сариғидан Синглетон усулида олинди [56-57].

10 дона тухумнинг сариқ қисмини унинг оқсил қисмидан ажратиб олиб, 300 мл ацетонда хона ҳароратида яхшилаб бир хил масса ҳосил бўлгунча 10-15 минут давомида аралаштирилди. Аралашмани экстракциялаш учун 5⁰С ҳароратда 2 соатга қолдирилди. Бундан сўнг аралашмадаги эримаган қисмини ажратиш учун уни центрифугаланди. Центрифугалаш 3000 айл/мин тезликда олиб борилди. Шундан кейин масса яна 100 мл ацетон билан 2 соат давомида экстракцияланди. Масса иккинчи экстракциядан сўнг яна центрифугаланиб, чўкма ҳавода ацетон тўла учиб кетгунча қуритилди.

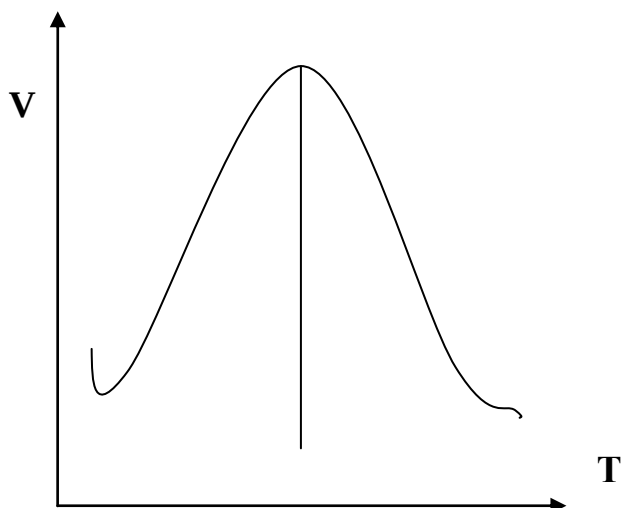
Қуруқ қолдиқ 96% ли спиртда экстракцияланди. Спиртда экстракциялаш 2 марта олиб борилиб, экстракт Бюхнер воронкасида филтрланди. Экстрактлар сузиб олингандан сўнг қўшилиб, ундаги спирт ротор – буғлаткичда ҳайдаб олинди. Спиртни ҳайдаш вакуумда 35⁰ С дан паст ҳароратда олиб борилди. Чўкма 40 мл петролей эфирида эритилди.

Эритмадаги фосфолипидлар 0°C ҳароратда 1:10 нисбатда ацетон билан чўктирилиб, -4°C ҳароратда 1 соатга қолдирилди.

Совитилган эритма шиша воронкада сузиб олинди. Бу жараён 2 марта қайтарилди ва ротор – буғлаткичда қуритилди. Ажратиб олинган фосфолипидлар (10 гр) 45 мл хлороформда эритилиб, -10°C - 15°C ҳароратда сақланди.

7. Реакция тезлигига ҳароратнинг таъсири

Одатда ферментатив реакциялар тезлигига температура таъсири расмда келтирилган эгри кўринишида бўлади.



Эгри чизикдаги температура ортиши билан реакция тезлиги ортиши кимёвий реакциялар каби бўлса, маълум температурадан сўнг, унинг пасайиши иссиқлик таъсирида фермент оқсил молекуласининг денатурацияси билан тушунтирилади. Кимёвий кинетикадаги каби ферментатив реакцияларда ҳам унинг тезлиги ва температура орасидаги боғлиқликни ўрганиш орқали жараённинг энергияси ҳақида маълумот олиш мумкин.

8. Фосфотид кислотани фермент ёрдамида гидролитик ва трансалкил реакциялари билан олиш

Шу кунгача кимёвий йўл билан олинадиган муҳим биологик фаол бирикмалар холин ва фосфотид кислотади. Холин ва фосфотид кислотани кимёвий йўл билан олиш кўп босқичли мураккаб жараён ҳисобланади. Холинни кимёвий йўл билан олишнинг иккита усули, яъни синтетик ва лецитинни гидролизлаш усули маълум. Бу реакциялар охирида жуда кўп қўшимча бирикмалар ҳосил бўлади. Холин ва фосфотид кислотани ушбу бирикмалардан ажратиб олиш кўп босқични талаб қилади. Бу мураккаб ва кўп босқичли жараёндан қутилиш учун биотехнологик усуллардан фойдаланиш зарур. Чунки биотехнологик жараёнларнинг кимёвий технологияга нисбатан кам босқичлилиги, иқтисодий самарадорлигининг юқорилиги, олинаётган маҳсулотнинг соф ҳолда бўлишлиги асосий афзаллик бўлса, экологик нуқтаи назардан ҳам қулайдир. Биотехнологик жараёнларни ферментлар ёрдамида олиб бориш кимёвий катализаторларни қўллашга қараганда анча самаралидир.

Шу сабабли холин ва фосфотид кислотани ферментатив усул билан олиш технологиясини ишлаб чиқишни олдимизга мақсад қилиб қўйдик.

Ушбу мақсадга эришиш учун қуйидаги масалаларни кўриб чиқамиз.

Лецитин – Фосфолипаза Д фазалар чегараси модел сиситемасини ўрганиш.

Фосфолипаза Д нинг ҳар хил шароитдаги гидролитик ва трансалкиллаш реакцияларини ўрганиш.

Холин ва фосфотид кислотани ферментатив олиш жараёнининг оптимал шароитини аниқлаш.

Ишда ферментли препарат сифатида Ўрта Осиё турпи (*Tharphanus sativis*) дан олинган фосфолипаза Д қўлланилди. Ферментли препаратда

оқсил миқдори Лоури усули бўйича аниқланди. Фосфолипаза Д нинг физикавий ва каталитик хоссаларини ўрганишда бу препарат фосфолипидларни фосфотид кислота ва асосларгача катализлаши аниқланган. Кейинчалик бу фермент реакциянинг бошқа турини, асослар алмашинуви реакциясини ҳам катализлаши аниқланди.

Субстрат сифатида фосфолипидлар йиғиндиси қўлланилди. Фосфолипидлар йиғиндиси Синглетон усули бўйича тоза тухум сариғидан олинди. Чунки холин миқдори ўсимлик ва ҳайвонларнинг бошқа маҳсулотларига қараганда тухум сариғида энг кўп бўлади. Мазкур босқичда фазалар чегарасида лецитин билан фосфолипаза Д орасида борадиган гидролитик ва трансалкиллаш реакцияларининг бориш хоссалари гетероген системаларидан холин ва фосфотид кислота ҳосил бўлишига турли омилларнинг таъсири ўрганилди. Бу реакцияларнинг ҳар иккаласи ҳам гетероген системаларда катта тезлик билан боради. Бунда албатта фаоллаштирувчи қўшимчалар бўлиши керак. Органик эритувчи сифатида гексан ишлатилди, трансалкиллаш реакциясида эса спиртли субстрат сифатида метанол ишлатилди. Қуйида тажриба натижалари келтирилган.

Биринчи ҳолатда реакция вақтини 20 минутдан 24 соатгача ўзгартириб туриб, фосфолипаза Д нинг солиштирма фаоллиги аниқланди. Бунда трансалкиллаш учун энг оптимал муддат 4 соат эканлиги аниқланди. Вақт узайтириб борилса, ҳар иккала реакцияда ҳам ферментнинг фаоллиги аста-секин пасайиб боради (1-расм).

Ҳар иккала реакциянинг тезлиги икки валентли металллар ионлари мавжудлигига ва муҳит рН ига боғлиқ бўлади. Бунда трансалкиллаш реакциясининг рН оптимуми гидролитик реакцияникидан фарқ қилади [33].

Олинган маълумотлар таҳлил қилинганда трансалкиллаш реакцияси учун рН 5,6 ва гидролитик реакция учун 7,0 бўлади (2-расм).

Фосфолипидлар билан фосфолипаза Д нинг ўзаро таъсирини ўрганишда системанинг каталитик фаоллиги намоён бўлишида Ca^{+2} ионлари функционал роль ўйнаши аниқланган. Реакцияда Ca^{+2} ионларининг концентрацияси 10 мМ дан 80 мМ гача ошириб борилганда, реакция системда Ca^{+2} ионларининг концентрацияси 40 мМ га етганда фермент фаоллиги энг юқори кўрсаткичга етди. Ферментнинг солиштира фаоллиги трансалкиллаш реакцияси учун 4,0, гидролитик реакция учун 3,2 га тенг бўлди. Кальций ионлари концентрацияси янада ошиб кетса, фосфолипаза Д нинг каталитик фаоллиги пасаяди (3-расм).

4-расмда фосфолипаза Д трансалкиллаш ва гидролитик фаоллигининг фермент концентрациясига боғлиқлиги кўрсатилган. Фермент концентрацияси 0,1 мг/мл дан 0,6 мг/мл гача ошириб борилганда, трансалкиллаш реакциясида 0,3 мг/мл да, гидролитик реакциясида 0,3-0,4 мг/мл да энг юқори кўрсаткичга етди. Фермент концентрацияси бундан ортиб кетса, ҳар иккала реакцияда фаоллигининг пасайиши кузатилади. Бунда лецитиннинг ўзгариш даражаси ҳам пасаяди.

Фосфолипаза Д фаоллигининг субстрат концентрацияга боғлиқлиги ўрганилганда, реакция муҳитда субстрат концентрациясининг ортиши билан трансфераз реакциясининг фаоллиги пасаяди, бу билан гидролитик реакциядан фарқ қилади (5-расм). Бироқ ҳар иккала реакция учун $A_{\text{сол}}$ қийматига қарб, муайян гетероген системада трансфераза реакцияси гидролаза реакциясидан устун бўлади.

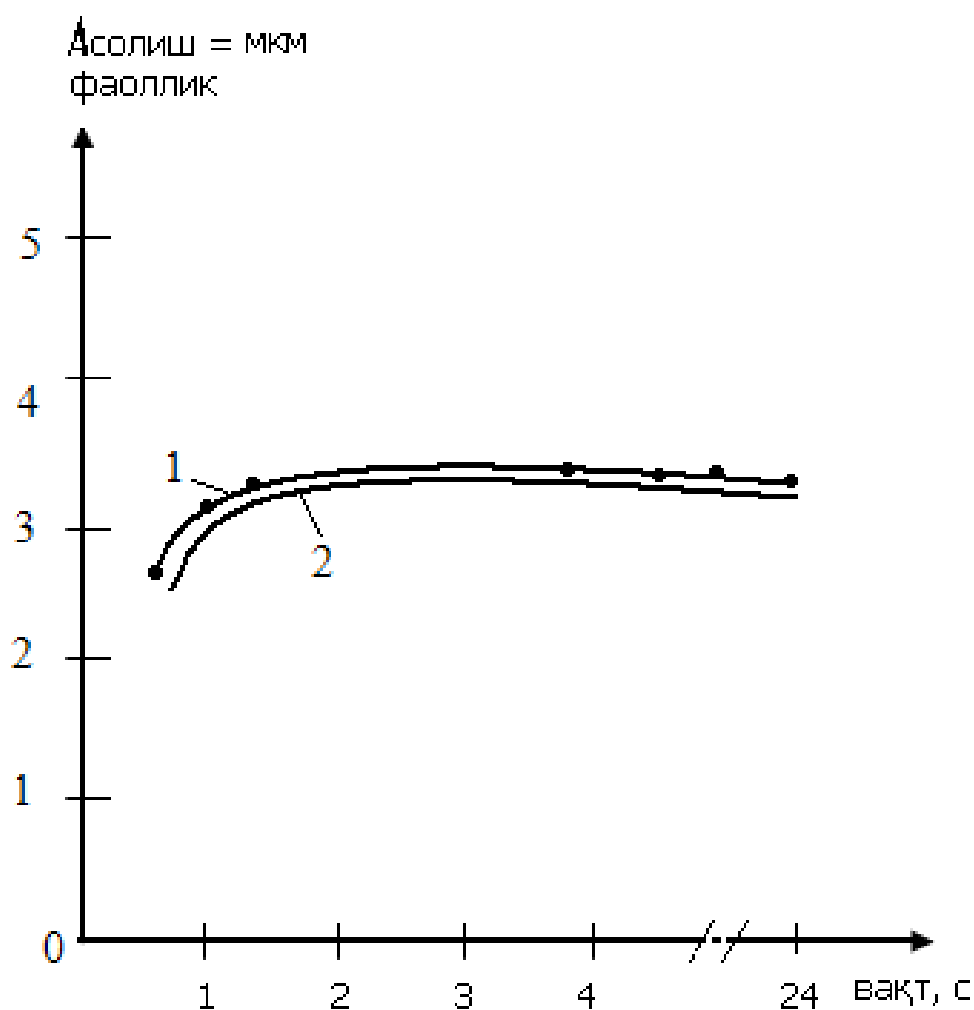
Ҳар иккала реакция учун ҳарорат 37°C да сақланди. Маълумки, фосфолипаза Д учун ҳарорат оптимуми жуда юқори, 26°C дан 40°C гача бўлади. У трансалкиллаш реакцияси учун $A_{\text{сол}}$ 4,4 мкМ/мин мг, гидролитик реакция учун 3,4 мкМ/мин мг ни ташкил этади. Ҳарорат янада ошириб

юборилганда, хар иккала реакцияда фосфолипаза Д нинг каталитик фаоллиги аста - секин пасайиб боради (6-расм).

Фосфолипаза Д нинг трансфераз фаоллиги спиртли субстратнинг табиатига ҳам боғлиқ. Реакция мувозанатли кечиши учун унда иштирок этувчи спирт сувда эрувчан бўлиши зарур. У қанча тез эриса, алмашинув тезлиги ҳам шунча юқори бўлади.

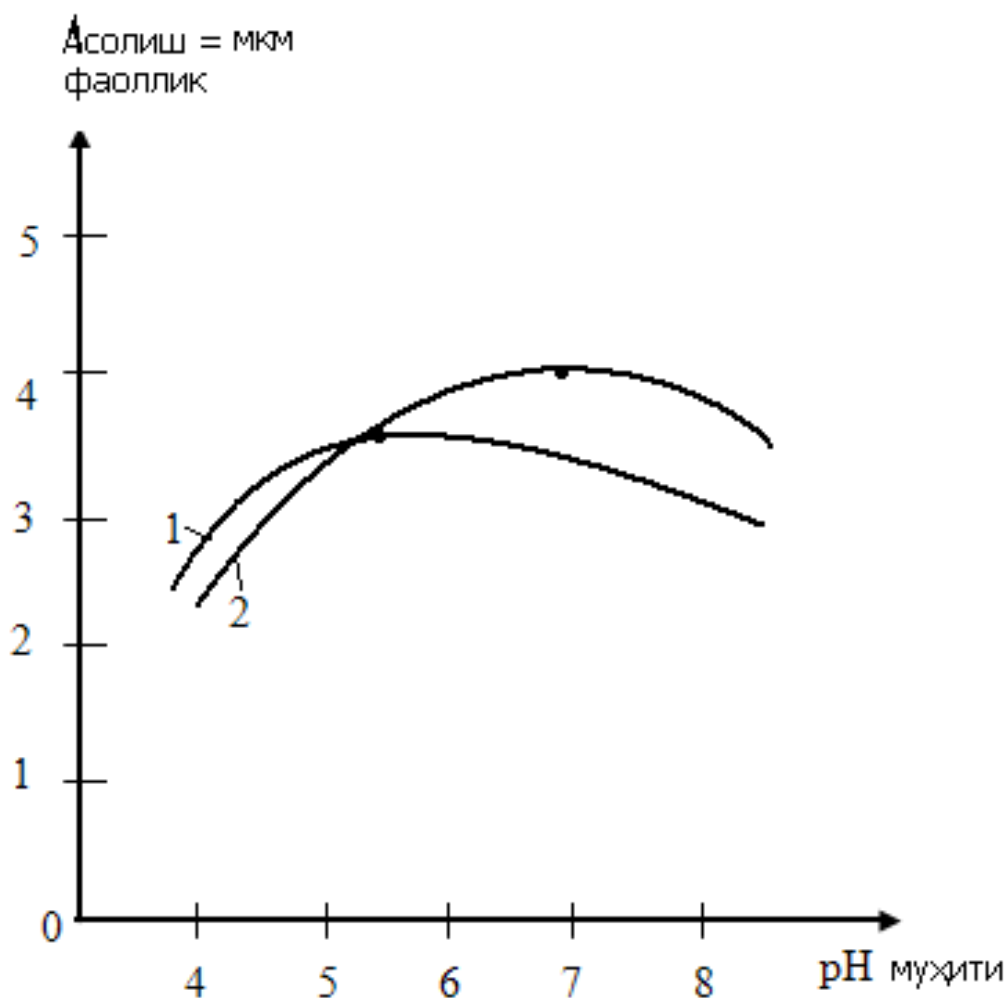
Трансфераза реакциясида энг яхши спиртли субстрат метанол бўлиб ҳисобланади.

Тажрибада олинган маълумотларга асосланиб, фосфолипаза Д ферменти катализлайдиган трансалкиллаш ва гидролитик реакцияларни ўтказишнинг оптимал шароити аниқланди. Оптимал шароит қийматлари 1-жадвалда кўрсатилган.



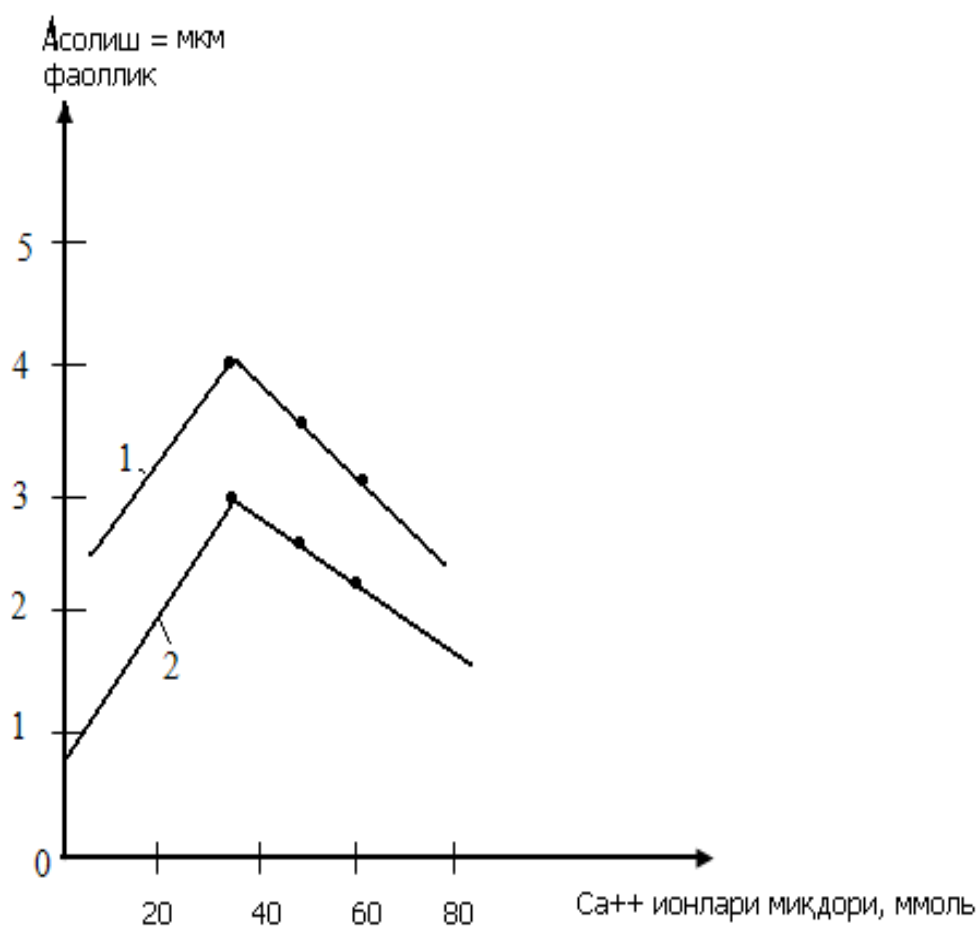
1-расм. Фосфолипаза Д трансалкил (1) ва гидролитик (2) фаоллигининг инкубация вақтига боғлиқлиги.

Реакция шароити: 22.1 мг фосфолипидлар йиғиндиси, 40 mM CaCl_2 , 0.2 мл гексан, 0.1 M Na ацетатли буфер pH 5.6, 0.05 M трис-HCl ли буфер pH 7.0, 0.1 мг/мл фермент препарати, инкубациялаш ҳарорати 30°C , реакцияни олиб бориш вақти 0.3 дан 24 соатгача.



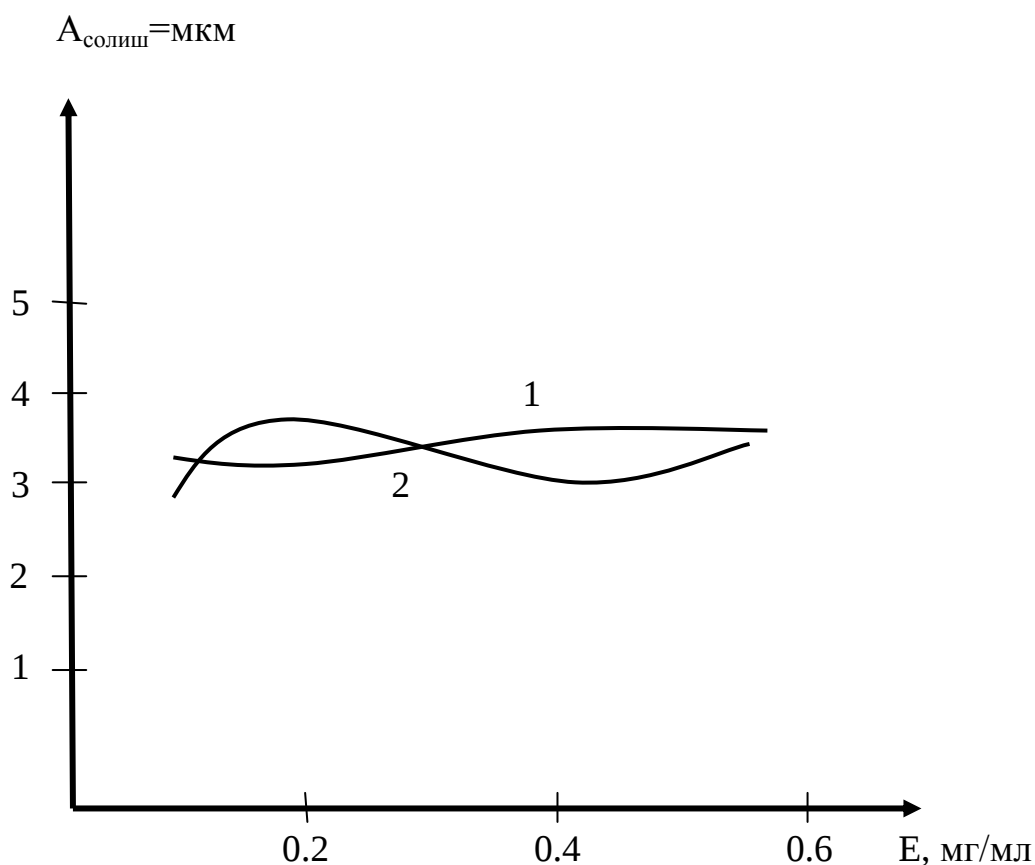
2-расм. Фосфолипаза Д трансалкил (1) ва гидролитик (2) фаоллигининг рН га боғлиқлиги.

Реакция шароити: 22.1 мг фосфолипидлар йиғиндиси, 40 mM CaCl_2 , 0.2 мл гексан, 0.1 M Na ацетатли буфер рН 5.6 – 7.0, 0.05 M трис- HCl ли буфер рН 7.0 – 8.0, 0.1 мг/мл фермент препарати, инкубациялаш ҳарорати 30°C , реакцияни олиб бориш вақти 0.5 соат.



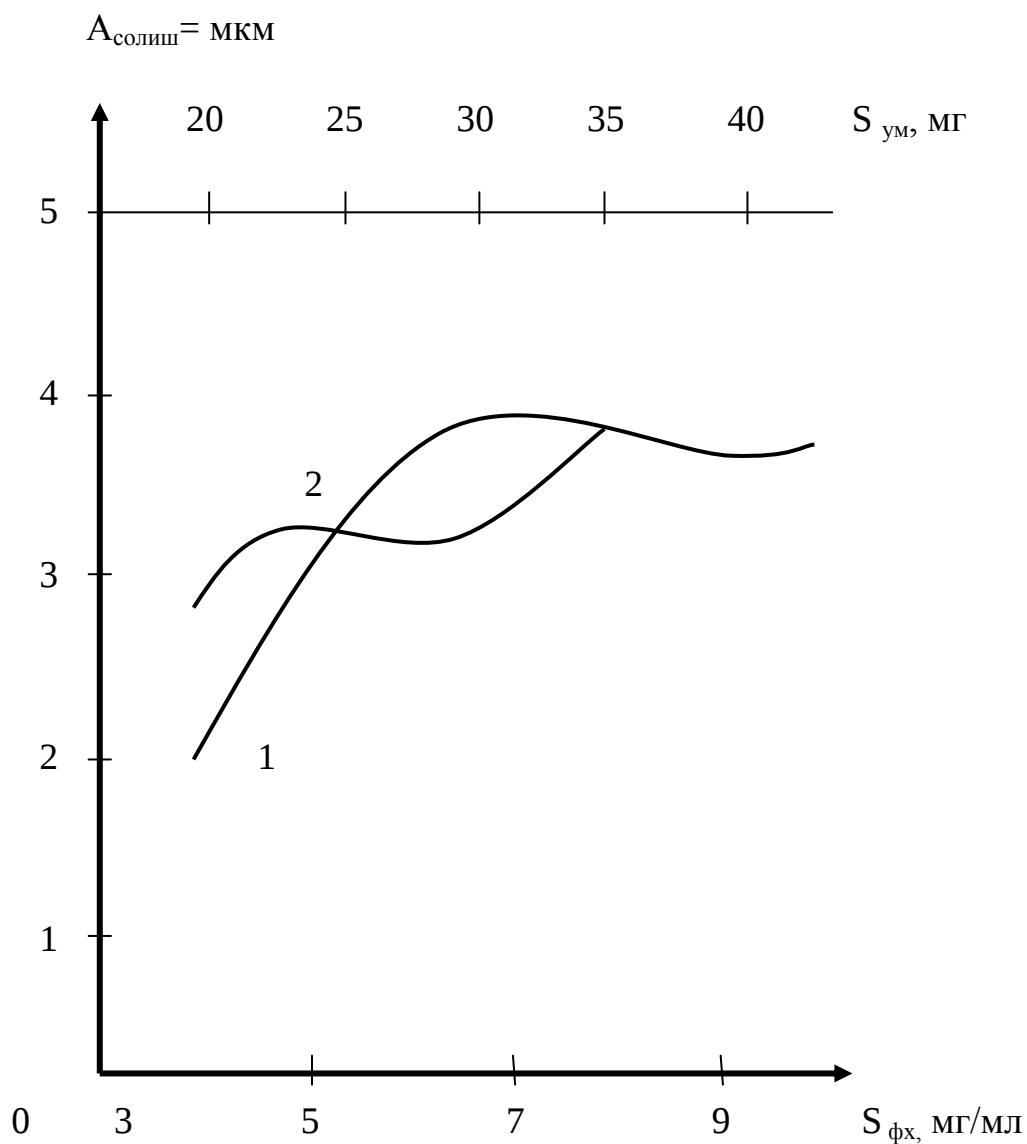
3-расм. Фосфолипаза Д трансалкил (1) ва гидролитик (2) фаоллигининг Ca^{+2} ионлари концентрациясига боғлиқлиги.

Реакция шароити: 22.1 мг фосфолипидлар йиғиндиси, CaCl_2 0 дан 84 мМ гача, 0.2 мл гексан, 0.1 м Na ацетатли буфер рН 5.6, 0.05 М трис-НСl ли буфер рН 7.0, 0.1 мг/мл фермент препарати, инкубациялаш ҳарорати 30°C , реакцияни олиб бориш вақти 0.5 соат.



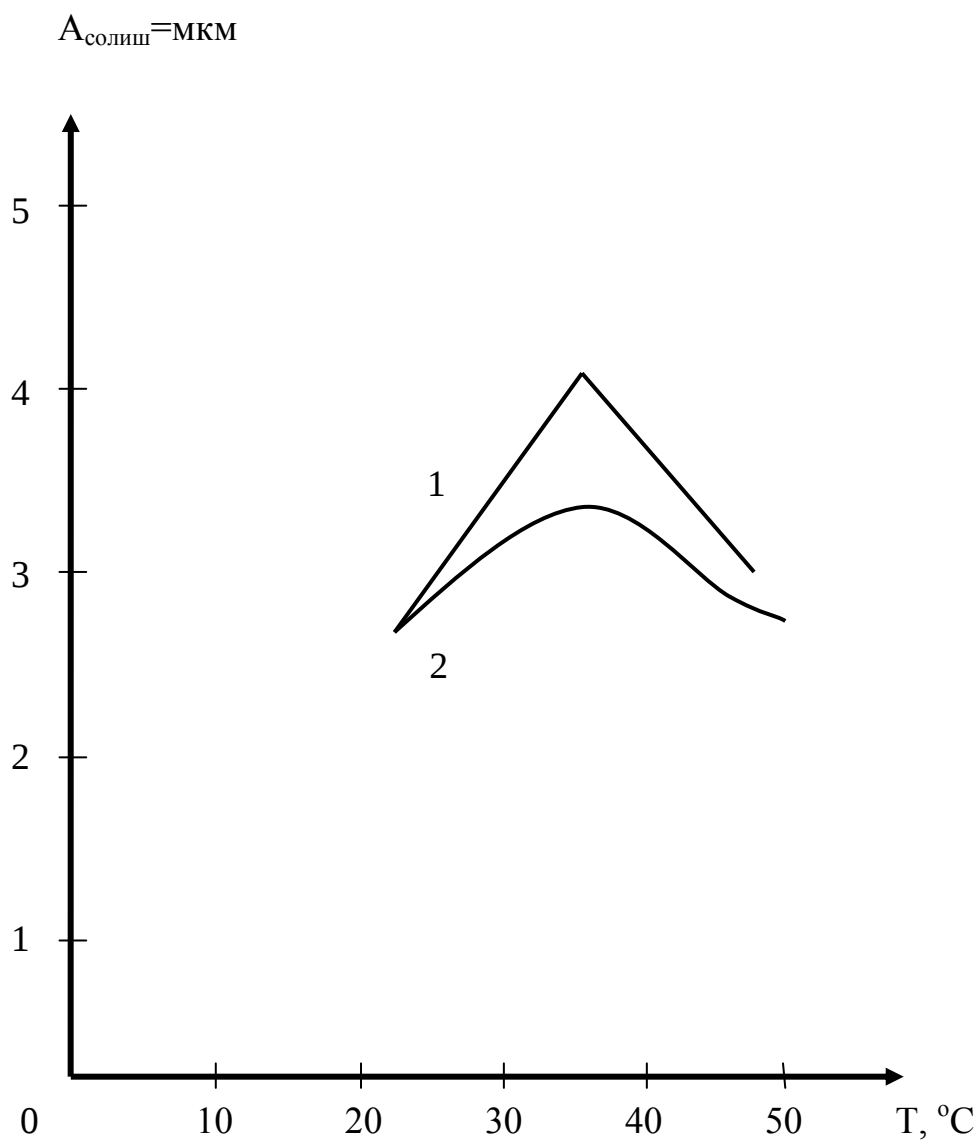
4-расм. Фосфолипаза Д трансalkил (1) ва гидролитик (2) фаоллигининг фермент концентрациясига боғлиқлиги.

Реакция шароити: 22.1 мг фосфолипидлар йиғиндиси, 40 mM CaCl_2 , 0.2 мл гексан, 0.1 M Na ацетатли буфер pH 5.6, 0.05 M трис-HCl ли буфер pH 7.0, фермент препарати 0.1 мг/мл дан 0.6 мг/мл гача, инкубациялаш ҳарорати 30°C , реакцияни олиб бориш вақти 0.5 соат.



5-расм. Фосфолипаза Д трансалкил (1) ва гидролитик (2) фаоллигининг субстрат концентрациясига боғлиқлиги.

Реакция шароити: фосфолипидлар йиғиндиси 17.9 мг (4.9 мМ фосфотидилхолин) дан 40 мг гача (9.1 мМ фосфотидилхолин), 40 мМ CaCl_2 , 0.2 мл гексан, 0.1 М Na ацетатли буфер pH 5.6, 0.05 М трис-HCl ли буфер pH 7.0, 0.1 мг / мл фермент препарати, инкубациялаш ҳарорати 30°C , реакцияни олиб бориш вақти 0.5 соат.



6-расм. Фосфолипаза Д трансалкил (1) ва гидролитик (2) фаоллигининг ҳароратга боғлиқлиги.

Реакция шароити: 22.1 мг фосфолипидлар йиғиндиси, 40 mM CaCl₂, 0.2 мл гексан, 0.1 M Na ацетатли буфер pH 5.6, 0.05 M трис-HCl ли буфер pH 7.0, 0.1 мг/мл фермент препарати, инкубациялаш ҳарорати 22⁰ C дан 50⁰ C гача, реакцияни олиб бориш вақти 0.5 соат.

9. Фосфолипаза Д ферменти катализлайдиган трансалкиллаш

ва гидролитик реакцияларни ўтказишнинг оптимал шароитлари

Фосфолипидларни ферментатив биотрансформациялаш биологик манбаадан олинган липид моддаларни ўсимликдан олинган фермент препарати ёрдамида гидролиз ва трансфосфотидиллашдан иборат.

1- жадвал

Реакция	pH муҳит	Ca ⁺² мМ	Субс- трат,мг	Фермент мг/мл	Вакт соат	Фаол- лашти- рувчи	Ха- ро- рат, С ⁰
Трансфераза	5.6	40	35	0.3	4	метанол	37
Гидролаза	7.0	40	35	0.4	4	гексан	37

Холин ва фосфотид кислотани олишда бундай бошланғич бирикмалар бўлиб, фосфотидилхолин ёки тухум фосфолипидлар йиғиндиси ҳисобланади. Холин ва фосфотид кислотани олишда фосфолипаза Д нинг трансалкиллаш ва гидролитик фаоллигидан фойдаланилди. Трансалкиллаш реакциясида сувда эрийдиган спирт метанолдан фойдаланилди, чунки у трансфераза реакцияси тезлигини ва маҳсулот чиқишини оширади, органик эритувчи сифатида гексан қўлланилди, чунки гексан - сув системасида сувли ва органик фазаларнинг ажралиши тез ва енгил кечади.

Муҳит pH трансфераза реакцияси учун 5.6, гидролитик реакция учун 7.0 га етказилди. Ca⁺² ионлари (40 мл) ва гексан (0,2 мл) қўшилди. Бунда аралашма 37⁰С да 4 соат давомида аралштирилди, кейин фазаларни ажратиш мақсадида аралаштириш тўхтатилди. Фазалар ажралгандан сўнг

органик фазани деконтациялаш орқали ажратиб олинди. Сувли фазадан эса J реагенти ёрдамида совукда чўктириши орқали холин ажратиб олинди.

Худди шу реакцион муҳитда фосфотид кислотани органик фазадан хлороформ билан чўктириш орқали ажратиб олинди.

Ўтказилган тажрибалар асосида қуйидаги натижалар олинди:

Трансalkиллаш реакцияси натижасида асосий маҳсулотнинг чиқиши 80% ни ташкил этди. 100 г тухум сариғига 1,09 г холин тўғри келди.

Гидролизлаш реакциясида маҳсулотнинг чиқиши 70% ни ташкил этди. 100 г тухум сариғига 0,91 г холин тўғри келди.

Фосфотид кислота эса 100 г тухум сариғига 0,63 г тўғри келди.

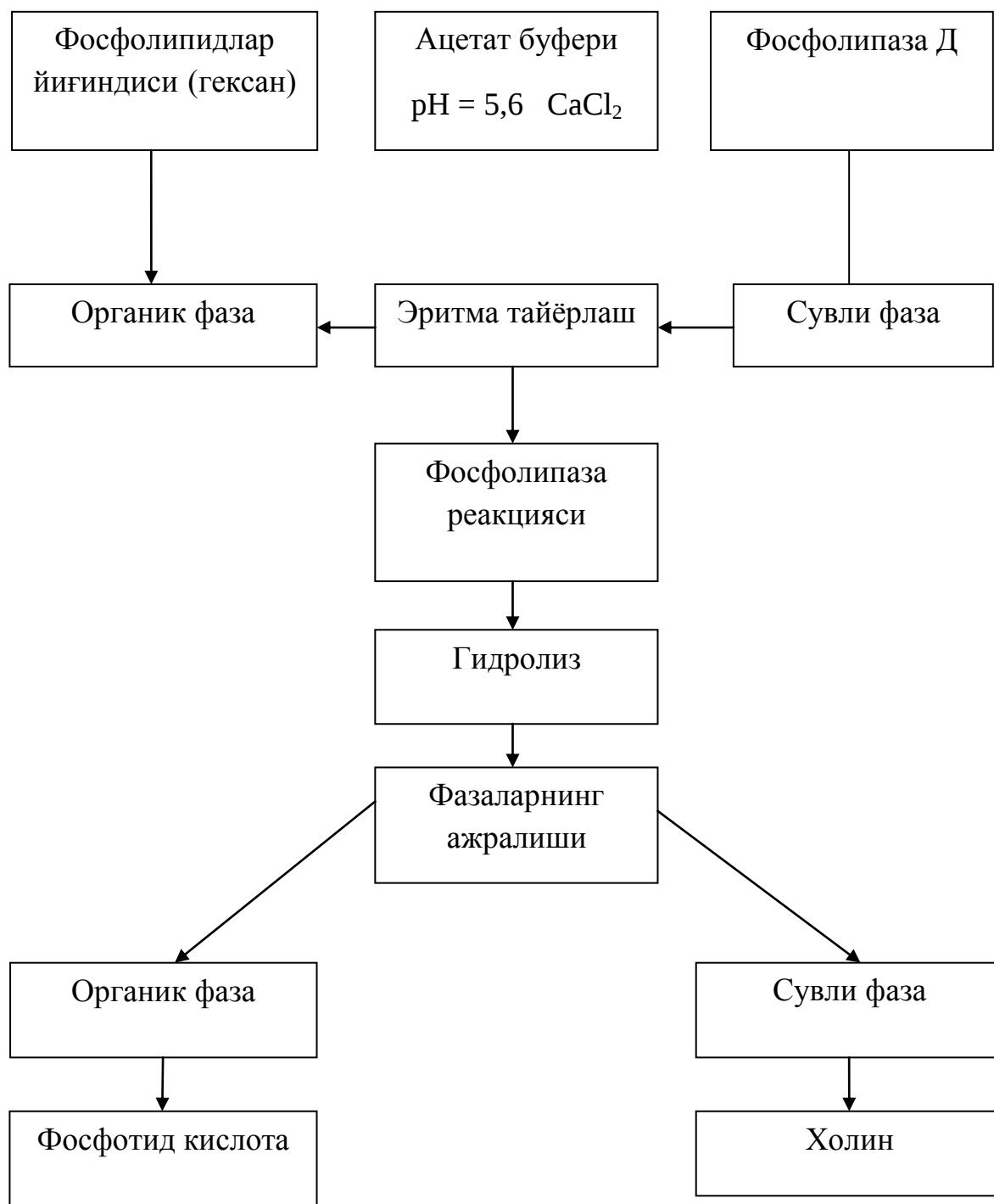
Шундай қилиб, ўтказилган текширишлар натижасида асосий маҳсулотнинг чиқиши юқори бўлган фосфотид кислотани арзон хом ашёдан биотехнологик йўл билан олиш усули ишлаб чиқилди.

Биоспецефик агент сифатида фосфолипаза Д га эга турп (*Pharphanus sativis*) экстракти ва тухум сариғидан олинган фосфолипид субстратларидан фойдаланиб, реакцион системанинг бир қатор фаоллаштирувчи ва тезлаштирувчиларидан фойдаланган ҳолда ферментатив гидролиз ёки трансalkиллаш реакцияларини ўтказиш натижасида фосфотид кислота олинди. Шу асосда уларни олишнинг биотехнологик чизмаси таклиф қилинди. Ушбу чизма мавжуд кимёвий технологияларга хос кўп босқичлилиқ ва кўп меҳнат талаб қилмаслиги билан ажралиб туради.

Келтирилган схема бўйича фосфотид кислота олиш қуйидаги асосий босқичлардан иборат: фосфолипидлар йиғиндисини олиш, фермент препаратини олиш (фосфолипаза Д), эритмаларни тайёрлаш, гексан - сув

системасида фосфолипаз реакциясини ўтказиш ва фосфотид кислотани сувли фазадан ажратиш.

10. Фосфотид кислотани биотехнологик усулда олиш технологик схемаси



ХУЛОСА

Магистрлик диссератациясини тайёрлашда қуйидаги хулосаларга келдик:

1. Фосфолипидлар йиғиндисидан фосфотид кислота олиш шароитлари ишлаб чиқилди. Бунда фермент препарати сифатида Ўрта Осиё турпидан ажратилган фосфолипаза Д қўлланилди.

2. Фосфолипаз реакциясини ўтказиш учун гексан - сув тизими танлаб олинди. Ферментнинг каталитик фаоллигини ошириш учун реакцион массага 3,2 мкМ/мин.мг миқдорда кальций ионлари қўшиш мақсадга мувофиқлиги аниқланди.

3. Олиб борилган тажрибалар асосида фосфотид кислота олиш технологияси ишлаб чиқилди ва унинг технологик чизмаси таклиф қилинди.

АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ

Норматив ҳуқуқий ҳужжатлар:

1. Ўзбекистон Республикасининг “Фуқаролар соғлиғини сақлаш тўғрисида”ги Қонуни. 29 август 1996 йил.
2. Постановление Президента Республики Узбекистана “ О программе модернизации технического и технологического перевооружения предприятий фармацевтической отрасли на период до 2011 года”, // Народное слово – Ташкент 20 ноября 2007г.
3. Постановление Кабинета Министров Республики Узбекистана “ О мерах государственной поддержки развитие медицинской и фармацевтической промышленности в Республики Узбекистана” // Народное слово – Ташкент 15 август 1997г.
4. Каримов И.А. “Ўрта асрлар Шарқ алломалари ва мутафаккирларининг тарихий мероси, унинг замонавий цивилизация ривожигаги роли ва аҳамияти” Самарқанд Қабуллар уйи // Халқ сўзи – Тошкент, 16 май 2014й.
5. Каримов И.А. Мамлакатни модернизация қилиш ва иқтисодиётимизни барқарор ривожлантириш йўлида. Т.16. – Тошкент: Ўзбекистон, 2008.- 368 б.

Дарслик ва ўқув қўлланмалар:

6. Бронкерхорф М., Дженсен Р. Липолитические ферменты – М., Издво. “Мир”, 1978 с. 396.
7. Мееров Г.И., Трасько У.И., Михальская К.Г., Норнина С.Н. Использование обезжиренного в специальных условиях ядра семли клещевины в качестве препарата липазы для гидролиза жиров. – Прикладная биохимия и микробиология. Т. 12, 1976, № 6, с. 934-939.

8. Joshio Tauyisaka, Susumu Okumura, Milko Iwai. Glycaride sywthesis by four kinols of microbial lipase. – Biochemica at Biophysica Acta, 485, 1977, p. 415-422.
9. Рахимов М.М., Джанбаева Н.Р. Липолитические ферменты. Успехи современной биологии, М., т. 84, 1977, с.323-336.
10. Brocherhoff M.A model pancreatic lipase and the orientation of enzymes at interfaces. – Chem. And Fhys. Lipids, 1973, v.10, № 3, p. 215-222.
11. Рахимов М.М., Джанбаева Н.Р. Роль гидрофобных взаимодействий в проявлении каталитической активности липолитических ферментов. – Биохимия, 1977, т. 42, вып. 6, с. 971-984.
12. Pleterson W.A., Vidal J.S., Volwerk J.J., de Hass G.H. Lymogen – catalezed hydrolysis of monomerio substrates and the presenses of a recogultion site for lipid – water interfaces in Phospholipase A₂. – Biochemistry, 1974, v. 13, N 7, p. 1455-1450.
13. Maylic M.F., Charles M., Desnuelle P. Action of organophoaphates and sulfonly halides on porcine pancreatic lipase. – Biochim. At Biophys. Acta, 1972, v. 276, N, p. 162-165.
14. Chapus C., Saki H., Semeriva M., Desnuelle P. Role of colipase in the interfacial adsorption of pancreatic lipase at hydrophilic interfaces. – FEBS Letters, 58, 1975, p, 155-158.
15. Jensen R.G. Lypolytic enzymes. – Progress chem. Fats and other Lipids, v. 11, 1971, p. 347-390
16. Desnuelle P.W. The pancreatic lipase. – Enzymes, 1972, 7, p. 575.
17. Ory R., Angelo A., Re Cruy J., Altschul A. Castor bean lipase role of the lipide cofactor can. – J. Biochemistry, 1976, v. 45, p. 1445-1450.

18. Рахимов М.М., Мадьяров Ш.Р., Джанбаева Н.Р., Юлдашев П.Х. Характеристика липолитических ферментов. – Химия прир. соедин., 1970, № 6, с. 738-744.
19. Давранов К.Д., Дияров Ж. Выделение внутриклеточной липазы термотолерантного гриба *Rhizopus microspores*. Штамм Уз ЛТ – I и его свойства. – Химия прир. соедин., 1977, № 4, с. 566-570.
20. Давранов К.Д., Дияров Ж., Ризаева М. Изучение внеклеточных липаз гриба “*Rhizopus microspores*”. – Прикладная биохимия и микробиология, т. 14, 1978, с. 389-397.
21. Мадьяров Ш.Р., Рахимов М.М., Джанбаева Н.Р., Атауллаева А.Х., Абдумаликов А.Х. Липолитические ферменты семян хлопчатника и их стабильность. – Прикладная биохимия и микробиология, 1975, с. 437-447.
22. Джанбаева Н.Р., Рахимов М.М., Юлдашев П.Х. Изучение липолитических ферментов семян хлопчатника. – Химия прир. соедин., 1972, № 2, с. 222-228.
23. Brogstrom B., Erlanson C. Lipase of pancreatic juice its physiological significance. – Biochim. Et Biophys. Acta, 1971, v. 242, p. 509-513.
24. Давранов К.Д., Ахмедова З.Р., Алимджанова М.И., Ризаева М.И., Рахимов М.М. Свойства липаз *Ospora lactis*. – Биохимия, т. 48, 1983, № 5, с. 739-746.
25. Рахимов М.М., Мадьяров Ш. Состояние фосфолипазы D в растворе и ее каталитическая активность. – Биохимия, 1977, № 4, с. 622-634.
26. Корогезян К. Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма. М. Медицина, 1972. с. 562.

27. Кейтс М. Техника липидология. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. С. 322.
28. Дженкинс Г. И. др. Химия органических лекарственных соединений. М.: Госиздат., 1949. Сю 117.
29. Шрагин Л.С., Кузьмина Ю.В. и др. Полусинтетический подход модифицированных фосфотидилинозитов // Биоорганическая химия. 1985 Т. 11. Вып. 12.с. 1669-1674.
30. Рахимов М.М., Ахмеджанов Р И др. Разделение и свойства молекулярных форм фосфолипазы Д из растений. // Биохимия, 1982. т. 74. Вып. 9. С. 1454-1465.
31. Мирсалихова И.М., Рахимов М.М. Действие фосфолипазы А и Д на Mg^{+2} ; Na^{+} ; K^{+} - АТФ – азы микросом мозга // ДАН. СССР, 1989 Т.233. с 981-984.
32. Рахимов М.М., Бабаев М.У. и др. Изменение фосфолипидного свойства семян хлопчатника // Хим. Природ. Соед. 1978. Вып. 12. С. 9-12.
33. Рахимов М.М., Ахмеджанов Р., Бабаев М.У. и др. Гидролитическая и трансалкилирующая функции фосфолипазы Д из семян хлопчатника. // Физиология растений 1989. Т. 36. Вып. 3. С. 502-511.
34. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты – М., Издво. “Мир”, 1978 с. 396.
35. Реут Е.Н., Рахимов М.М. Выделение мио – инозита из растворов ферментативной биотрансформацией. // Приклад. Биохим. и микробиол. 2003. Т. 39. Вып4. С 413-418.

36. Селищева А.А. и др. Особенности кинетики гидролиза фосфолипидов фосфолипазой С из *Bacillus cereus*. Гидролиз фосфотидилхолина в присутствии дезокисхолата // Биохимия, 1990. Т. 55 Вып – 1 с 87-94.
37. Мадьяров Ш., Рахимов М.М. Состояние фосфолипазы Д в растворе и её каталитическая активность. // Биохимия 1977. Т. 42 Вып. 4 с 622-633.
38. Бабаев М.У. Изучение ферментативных превращений фосфолипидов на границе раздела фаз (фосфолипаза Д) Автореф. На соис.уч.степ.канд.биол.наук. Инст-т биохимии АН, Уз ССР. Ташкент, 1990.
39. Ташмухамедов Б.А. Транспорт ионов через биологические мембраны и механизм действия физиологически активных веществ. Ташкент, ФАН. 1982. С 230.
40. Сагатова Ф.А, Рашидова Д.Ш. и др. Ферментативное превращение фосфатидилхолин в фосфотидилглицерин // Прикладная биохимия и микроб., 1996. Т. 32. Вып. 5. с. 500-505.
41. Рахимов М.М., Ахмеджанов Р. И др. Свойства фосфолипазы Д из *Rhaphanus sativus* // Биохимия, 1981. Т. 46, Вып. 2 с. 240-249.
42. Аптекарь С.Г., Веленкина Г.Я. Витаминоподобные вещества, витамины. М. Медицина, 1974.-451 с.
43. Evans E.A.Yr. The biological action of the vitamins A // Symposium/ The university of Chicago press.-1994.-P.207-210.

Илмий журналлардаги мақолалар:

44. Рахимов М. Изучение липолитических ферментов и некоторых закономерностей гетерогенного ферментативного катализа. – Дис. Докт. Биол. наук – Ташкент, 1981.-380 с.

45. Verger R., Mieras Maria C.Z., Hass G.H. Actions of Phospholipase at Interface. – J. Biol. Chem., 1975, v. 248, N 11, p. 4023-4034.
46. Mayes P.A., Feets J.M. The functional status of Lipoprotein lipase in Rat Liver. – Biochem. Journal, 1968, 108, p. 483.
47. Kartha A.R.S. Studies of the Natural Fats. – Journal of the American Oil Chem. Society, 1953, v. 30, 280, 326.
48. Кадиров З.Х., Абдурахимов А., Давранов К.Д., Рахимов М.М. Ферментативный синтез глицеридов. – Узб. Биол. журн., 1983, № 1, с. 46.
49. Мадьяров Ш., Рахимов М.М. Активация фосфолипазы Д на границе раздела фаз. – узб. биол. Журн., 1977, № 1. с. 7-10.
50. Oler A., Lombardi R. Further studies on a defect in the intracellular transport and secretion of proteins by the liver of choline – deficient rats. // J.Biol Chem., 1970, 425. P. 1289.
51. Сафанова Е.Ф., Селеменов В. И др. Изучение сорбции фосфотидилхолина сорбентами различного типа. // Хим. Фарм.ж-л. 2005.М.: Фолиум т.1. Вып.3. с. 38-40.
52. Balint J. Studies in the biosynthesis of hepatic and billiary lecithins. // J. Lipid. Res. 1997. 8.486
53. Baraldi E. Structure of the pH domain from Brutons tyrosinr kinase in complex with inositol 1,2,3,4-tetrakisphosphate//J.Biology, 1999, Vol 7. P. 449-460.
54. Yang S.F., Frur S., Benson A.A. Transphosphat: dilation by phosphalipase D // J. Biol.Chem. 1967. Vol 242, #3-P 477-484.
55. Eldin N.M. Methods for choline assay. J.Rharmac. Sci. UAR. 1997. 102.307.

56. Singleton W.S., Gray M.S., Brown M. // J.Am. Oil. Chem. Soc 1965. Vol 42.1.p. 53-56.
57. Vaskovsky V.E., Latyshev N.A. // J. Chromatogr 1975. v. 115 p 246.
58. Rachelem J.R. The biogenesis of choline // J.Biol Chem.-2000.-P.152-263.
59. Perlman J. Biochemistry of lipids // J.Biol.Chem.-2000.V.7.-P 394-396.

Интернет сайтлари:

60. Фосфолипиды / Медицинский словарь и каталог статей... храпом (и ни одно не действует:). <http://med/kat.ru/850>
61. Фосфолипид. Гепатопротекторы § гагг, фосфолипид См. также Methionine Латинское название phospholipidum Фармакологическое действие Гепатопротективное. <http://pharmabook.net/organotropnye-Sredstva-jelud> .
62. Независимая лаборатория ИНВИТРО-№137,138. Антитела к фосфолипидам LgM/LgG (anti-Phospholipid antibodies). Пациентам > Анализы и цены> Антитела к фосфолипидам LgM/LgG (anti-Phospholipid antibodies) ... против собственнoч клеток и тканей организма. Фосфолипида могут быть отрицательно заряженными (фосфотиделсерин, ...) <http://www.invitro.ru/aphla.htm>
63. Лаборатория ЦИР – Анализ на аутоантитела (аутоиммунные антитела), антитела к фосфалипидам. Анализ на аутоантитела (аутоиммунные антитела), антитела к фосфалипидам... ... (РАР 1) не только является белком, связывающем фосфолипиды, но и является возможным антикоагулянтным протинoм. <http://www.cirlab.ru>.
64. Фосфолипиды. Фосфолипиды Область использования: ... Фосфолипиды Наименование: Фосфолипиды. Примечание: Упаковка: 5x10. <http://www.ld.ru/catalog/item-9294.html>

65. ХиМиК.ru – Фосфолипиды (phospholipids). Биохимический справочник. Фосфолипиды (phospholipids) Фосфолипиды (phospholipids) – Липиды, содержащие в своем составе...
66. <http://www.xumuk.ru/biospravochnik/750.html> www.xumuk.ru.
67. Фосфолипиды и гликолипиды. Биомолекулы. Липиды Фосфолипиды и гликолипиды 57 А ... Фосфолипиды (2) служат главными компонентами биологических мембран.
<http://yanko.lib.ru/books/biolog/nag/-biochem/56.h>
68. Оптическое детектирование транспорта протонов в фосфолипидах. Ключевые слова трансмембранный ионный транспорт, фосфолипиды ... что мембрана представляет собой фосфолипидный бислой, фосфолипиды имеют гидрофобные «хвосты».
<http://www.nanometer.ru/fosfolipidi-485>
69. АТМА: : Лецитин гранулированный 170 гр ... а также путем его образования в печени. Фосфолипиды, входящие в состав лецитина, являются компонентами клеточных мембран ... Фосфолипиды, входящие в состав лецитина, являются компонентами клеточных мембран <http://shop.atma.ru/?id=1261>
70. Фосфолипиды.<http://www.dr185.ru/medinfo/3640/> www.dr185.ru.