

**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY VA O‘RTA MAHSUS TA‘LIM
VAZIRLIGI**

**URGANCH DAVLAT UNIVERSITETI
KIMYOVIY TEXNOLOGIYALAR FAKULTETI**



**“FERMENTLAR INJENERIYASI”
FANIDAN LABORATORIYA UCHUN
O‘QUV USLUBIY QO‘LLANMA**

URGANCH - 2017

5320500 – Biotexnologiya (oziq-ovqat, ozuqa, kimyo va qishloq xo‘jaligi).

Tuzuvchi: Ibragimova N.M. “Kimyoviy texnologiyalar” fakulteti katta
o‘qituvchi

Taqrizchilar: Saparbayeva N.K. “Kimyoviy texnologiyalar”
fakulteti texnologiya fanlari nomzodi.

“Kimyoviy texnologiyalar” fakulteti dekani: t.f.n. Kurambayev Sh.R

O‘quv uslubiy qo‘llanma Urganch Davlat Universiteti Ilmiy – uslubiy kengashida
korib chiqilgan va foydalanishga tavsiya etilgan.

2017 yil «___» _____ dagi «___» sonli majlis bayonnomasi.

Mundarija

№	Annotatsiya	4
1	Ferment produtsentlaridan ozuqa muhiti yuzasi va suyuq ozuqa muhitida o`stirish orqali preparatlar olish jarayonlarini o`rganish	5
2	Ferment produtsent-mikroorganizmlarini qattiq ozuqa muhiti yuzasida o`stirish orqali ko`paytirish usulini o`rganish	10
3	Qattiq ozuqa muhiti yuzasida o`stirilgan mikroskopik zamburug` kulturalaridan fermentlarni ekstraksiya qilish usulini o`rganish	12
4	Suyuq ozuqa muhitida ferment produtsent - mikroorganizmlarini o`rganish	15
5	Ferment eritmalarini dializ usulini tozalash	17
6	Ferment eritmalarini konsentrlash usullarini o`rganish (ultrafiltratsiya, vakuum-bug`latish usuli)	22
7	Suvli eritmalaridan cho`ktirish (fermentlarni organik erituvchilar va tuzlar yordamida cho`ktirish)	26
8.	Fermentlarning ba`zi bir xususiyatlarini o`rganish(ionalmashinish xromatografiyasi, oqsillar va fermentlar disk-ekstravarezi).	34
9	Foydalanilgan adabiyotlar ro`yhati	42

Annotatsiya

Fermentlar injeneriyasi eng taraqqiy etgan va ishlab chiqarish, texnik, qishloq xo'jaligi, tibbiyot, oziq-ovqat va kosmetologiya, farmatsevtika kabi iqtisodiyotning yirik jabhalariga to'g'ridan to'g'ri kirib borgan yo'nalish hisoblanadi. Ayniqsa gen muhandisligi, molekulyar biotexnologiya, gen terapiyasi, hujayra muhandisligi kabi yangi va jadallik bilan taraqqiy etayotgan sohalar uchun o'ta muhim hisoblanadi. Shu boisdan ushbu fanning talabalar tomonidan chuqur o'zlashtirilishi shart bo'lgan omillardan biri hisoblanadi. Ushbu fanda fermentlar injeneriyasi asosida yaratilgan ishlab chiqarish jarayonlarini o'rganish orqali xalq xo'jaligining turli sohalar uchun o'ta zarur ferment preparatlari ishlab chiqarishning imkoniyatlarini yaratish, fanning rivojlanish tendensiyasi va istiqbollari hamda Respublikamizning ijtimoiy-iqtisodiy rivojlanishidagi tutgan o'rni kabi masalalarni o'rganishni ko'zda tutadi.

Ushbu laboratoriya matnlari, davlat ta'lim standarti asosida tayorlangan va «biotexnologiya» yo'nalishi bo'yicha ta'lim olayotgan talabalar uchun mo'ljallangan.

1-LABORATORIYA ISHI

MAVZU: FERMENT PRODUTSENTLARIDAN OZUQA MUHITI YUZASI VA SUYUQ OZUQA MUHITIDA O`STIRISH ORQALI PREPARATLAR OLISH JARAYONLARINI O`RGANISH

Ishdan maqsad: Ushbu ishning maqsadi qattiq sochiluvchan muhitlarda turli xil ferment produtsentlarini o`stirish va olingan kulturalarda ulardagi ferment aktivligini analiz qilish hisoblanadi.

Kerakli asbob va materiallar: mikroskopik zamburug`lar yoki achitqisimon mikroorganizmlar, shuningdek *Asp.oryzae*, *Asp. Flavus*, *Asp.awamori*, *Asp.niger*, *Rh*, *delemar*, *Endomycopsis fibuliger* va boshqalar, Qattiq ozuqa muhitida mikroorganizmlarni ko`paytiruvchi qopqoqning temir kyuvetasi.

Ishning nazariy asoslari:

Qattiq ozuqa muhitlarida yuza usul bilan ferment produtsentlarini – mikroorganizmlarni kulturalash.

Qattiq ozuqa muhitida o`sadigan mikroorganizmlar o`z hayot faoliyati davomida tashqi muhitga turli xil gidrolitik fermentlar ajratadilar. Shunday usul bilan olingan mikroorganizmlar kulturalari turli xil tozalik darajasidagi ferment preparatlarini olish uchun dastlabki material hisoblanadi va quritilgan holatda u tayyor texnik preparat bo`lishi mumkin. Yuza kulturalarda mikroorganizmlar tomonidan sintezlangan fermentlar komplekslari produtsentning fiziologik xossalari, ozuqa muhiti tarkibi va o`stirish sharoitlariga bog`liq. Fermentlar produtsentlari sifatida aktinomitsitlar, mitselial zamburug`lar, bakteriyalar achitqilar ishlatilishi mumkin. Lekin asosan yuza usulda kulturalashda mikroskopik zamburug`lar ishlatiladi.

Ishni bajarish tartibi:

Bu tajriba 2 ta mashg`ulot mobaynida amalga oshiriladi, shuningdek, kulturaning o`sishiga ham ma`lum vaqt talab etiladi.

Agar talabalarga ushbu mavzu bo`yicha ikki yoki undan ortiq omillar bo`yicha optimallashtirish bilan ilmiy – tadqiqot ishini bajarish masalasi turgan bo`lsa, uni bajarish uchun sarflanadigan vaqt sezilarli darajada ortadi.

Tajriba boshlanishigacha muzey – laboratoriyada saqlanayotgan dastlabki kolleksion probirkalardan olingan kultura yangi tayyorlangan suslo (atala) – agar (1,5 – 2% agar qo`shilgan 5-6 % li shirin pivo atalasi)da 6-7 kun ichida katta diametrli probirkalarda (18 mm) qayta o`stiriladi. Mikroorganizmlar ekmalari qiya suslo – agarda bo`lib, ular termostatga 30°C ga 3-4 sutkaga qo`yiladi. Zamburug`larning o`sishi mo`l ko`l sporolash bilan tugaydi.

Asosiy ish boshlanishigacha 3 kun mobaynida qattiq ozuqa muhitiga odatda nam bug`doy kepagiga probirkadan olingan produtsent qayta ko`chirib ekiladi. Buning uchun 250 sm³ hajmli konussimon kolbaga 15-20 g 45 % namlikka ega bo`lgan bug`doy kepagi solinadi va paxta probkalar bilan yopiladi, sterillash vaqtida paxta namlanmasligi uchun qog`oz qalpoqcha kiydiriladi va 1 soat 120°C da avtoklavlanadi.

Kolbalar ichidagi muhit 35-40°C gacha tabiiy sovugandan keyin unga steril sharoitlarda mikroskopik zamburug'lar sporalarining suspenziyasi ekiladi. Sporalar suspenziyasini olish uchun katta probirkadagi qiyshiq suslo – agardan olingan produtsent sporali kulturasini 10 sm³ steril suv bilan yuviladi. Probirkani ekilgan muhiti bilan yaxshilab aralashtirgandan so'ng 30°C termostatga 2-3 sutkaga qo'yiladi. Bu vaqt ichida zamburug' zamburug' mitselliysi ozuqa muhitining ichigacha o'sib kiradi va sariq – yashil rangli zamburug' konidialari bilan qoplangan yumshoq massa hosil bo'ladi. Bu kolbalarda o'stirilgan kepakdagi kultura laboratoriya mashg'ulotlarida kyuvet ekish uchun dastlabki ekma material hisoblanadi.

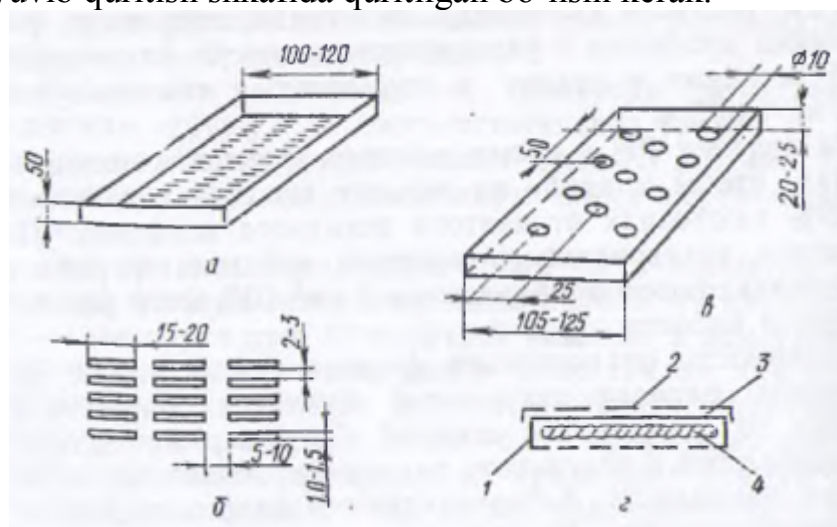
Ekma material mikrobiologik tozalikka va konidiyalar miqdoriga analiz qilinadi. Yaxshi ekma material begona mikroflora tutmasligi kerak va 1 g ekma kulturada 1,5 dan 3 milliardgacha sporalari (absolut quruq moddaga qayta hisoblaganda)bo'lishi kerak.

Birinchi mashg'ulot

Birinchi mashg'ulot quyidagi operatsiyalardan iborat:

- Idishlarni tayyorlash va ularni sterillash;
- Ozuqa muhitining tayyorlanishi va uni sterillash;
- Muhitning dastlabki namligini va undagi mikroorganizmlar komponentlarining o'sishini cheklovchi asosiy jarayonlarning miqdori;
- Ozuqa muhitini namlash uchun zarur bo'ladigan suv miqdorini hisoblash;
- Steril ozuqa muhitini namlash, uni ekish va o'sishi uchun kyuvetlarga taqsimlash;
- O'stiruvchi kameradagi havoning parametrlarini aniqlash.

Idishlarni sterillashga tayyorlash. Barcha idishlar sterillashdan oldin yaxshilab yuvib quritish shkafida quritilgan bo'lishi kerak.



1.1-rasm. Qattiq ozuqa muhitida mikroorganizmlarni ko'paytiruvchi qopqoqning temir kyuvetasi.

a-Kyuvetani umumiy ko'rinishi; b-kyuveta qopqog'i; b-kyuveta qopqog'i; r-qirqim ko'rinishi. 1-kyuveta; 2-qopqoq; 3- qog'oz to'shama; 4-oziqlantiruvchi muhit.

Metall kyuvetlarni sterillashdan oldin qopqog'i va qog'oz yopishtirilmagan listi bilan birgalikda yig'ilgan holda bo'ladi, lekin ozuqa muhitisiz uning massasini o'lchash va bu massani (P) kuzatishlar bayonnomasiga yozib qo'yish kerak. Sterillash uchun quyidagi predmetlarni qog'oz bilan uning butunligini buzmag

holda o'rab bog'lab chiqish kerak bo'ladi: kyuvetlar, kyuvetdagi qopqoq o'lchami bo'yicha kesilgan qog'oz yopishtirilmagan listlar bilan birga qopqoqlar, ozuqa muhitining namlanishi va ekilishi o'tkaziladigan pasti keng 1,5 – 2 dm³ hajmli idishlar, steril suv zarur miqdorini o'lchash uchun 250 sm³ o'lchov silindrlari, ekish kolbasida ekma kulturani aralashtirish uchun shisha tayoqcha yoki qoshiqcha. Bundan tashqari 250 sm³ kolbada vodoprovod suvini ham sterillanadi. Idishlarning va suvning sterilizatsiyasi avtoklavda 120 °C da 0,5 soat mobaynida o'tkaziladi.

Steril idish avtoklavlashdan keyin quritish shkafida 105 °C da quritiladi, chunki sterillashda qog'oz biroz namlanadi.

Ozuqa muhitining tayyorlanishi va sterillanishi. Har bir konkret mikroorganizm uchun mahsus birikmalar to'plamini hosil qiluvchi, aniq fermentlar biosintezini ta'minlovchi o'z ozuqa muhiti tayyorlanadi.

Asp.oryzae uchun, masalan, quyidagi ozuqa muhitlarining variantlari ishlatiladi (%da) : bug'doy kepagi – 100; bug'doy kepagi – 70, arpa nishlari (yoki pista po'chog'i, yoki yog'och qirindisi, yoki makkajo'xori kunjarasi) – 30; bug'doy kepagi – 50, lavlagi jomi – 50; bug'doy kepagi – 80, uzum sharbatini 20; arpa nishlari – 50, guruch qipiqlari – 50.

Agar topshiriq ozuqa muhiti tarkibini optimallashtirish bilan bog'liq bo'lsa, u holda har bir sanab o'tilgan variantlar tajriba markazi bo'lib xizmat qilishi mumkin. Omillarning o'zgaruvchanlik intervallarini talabalar produtsentning fiziologik xossalarini va adabiyotlardagi manbalarni hisobga olgan holda mustaqil o'rganishlari kerak.

Agar muhit komponenti juda yirik zarrachalardan (masalan, pista po'chog'i) iborat bo'lsa, uni muhitga solishdan oldin maydalash kerak bo'ladi.

Muhit komponentlari texnik tarozida tartib olinadi, yaxshilab aralashtiriladi va shundan keyin aralashmadan keyingi analizlar uchun o'rtacha namuna tanlab olinadi, u odatda tahminan 40-60 g atrofida bo'ladi. Bu kattalikka tajriba uchun hisoblangan muhit massasini orttirish kerak bo'ladi. Masalan, tajriba uchta parallellikda o'tkaziladi, har bir kyuvetga 80 g muhit (havoda quruq massa bo'yicha) solinadi, ya'ni 240 g uchta kyuvetga ketadi. Unda tayyorlangan muhitning umumiy miqdori 300 g bo'ladi.

Har bir kyuvet uchun muhit alohida sterillanadi. Tayyor muhitni yoki paketga, yoki ko'p qatlamli doka salftkaga, yoki keng shisha stakanga joylashtiriladi. Sterilizatsiya uchun idish oldindan tarozida tartib ko'rilgan bo'lishi kerak (a). Muhitni sterillash 120°C da 1 soat mobaynida biksda olib boriladi. Idish steril muhit bilan birgalikda yana tarozida tortiladi (b).

Zarur bo'lganda tarozida tortishning ishonchli xatoliklarini baholash texnik tarozida olingan 5-6 ta bir xil massalarni olishni talab qiladi, keyin esa ularning massasini analitik tarozida tartib tekshirib ko'riladi. 1 – ilova 1-mavzuda keltirilgan metodika bo'yicha alohida tortilgan massaning dispersiya qiymati va uning ishonchli xatoligi hisoblanadi.

Muhitning dastlabki namligini (W_{dast} va undagi mikroorganizmlar komponentlarining o'sishini cheklovchi asosiy jarayonlarning miqdori. Sochiluvchan muhitning namligini aniqlash uchta parallel namunalarda

tezlashtirilgan usulda Chijova uskunasida, IK lampali quritish shkafida yoki doimiy massagacha quritib olib boriladi. Uch marta takrorlanganda olingan natijalar qo'pol xatoliklar mavjudligida aniqlash imkonini beradi, va bundan tashqari namlikni aniqlashning, ya'ni keyinchalik balansli hisob kitoblarda hisoblab chiqishga olib keladigan ishonchli xatoliklarni hisoblashga imkon beradi.

Muhitdagi cheklovchi komponentlar uglerod, azot, ba'zi tuzlar manbalari bo'lishi mumkin. Asosan yuza usulda kulturalashda kraxmal, selluloza, gemiselluloza, pektinning mavjudligi katta ahamiyat kasb etadi, ular nafaqat ozuqa manbai bo'libgina qolmay, aniq fermentlarning mikroorganizmlarini hosil qilishga ham imkon beradi. Masalan, amilolitik fermentlar olish uchun muhitda ma'lum miqdorda kraxmal bo'lishi kerak, pektolitik fermentlar uchun kraxmal bilan bir qatorda muhitda ko'p miqdorda pektin va sh,k bo'lishi kerak. Qo'yilgan masalaga qarab mikroorganizmlar o'sishi, qo'shilishi, ularga talab qilinadigan kompleks biosintezining yanada muhimroq cheklovchisi aniqlanadi.

Ozuqa muhitini namlash uchun zarur bo'ladigan suv miqdorini hisoblash. Mikroskopik zamburug'larning normal o'sishi uchun va fermentlarning intensiv hosil bo'lishi uchun muhitda 58-63 % namlik bo'lishi kerak.

Qo'shiladigan suvning miqdorini hisoblash quyidagi ma'lumotlar asosida olib boriladi:

A_{cp} – ozuqa muhitining dastlabki namlik W_{ncx} bilan massasi;

B_{cp} - dastlabki namunadagi absolut quruq moddaning miqdori;

C_{cp} – talab etilayotgan namlikka W_{tp} ega bo'lgan ozuqa muhitining massasi, $B_{cp} * 100 / (100 - W_{tp})$;

Γ_{cp} – sterilizatsiyadan keyingi ozuqa muhitining massasi, $(B-a)$;

Δ – talab etilayotgan namlikka ega bo'lgan muhitni olish uchun qo'shiladigan suv miqdori, $(C_{cp} - \Gamma_{cp})$.

Misol. Hisob kitoblar uchun dastlabki ma'lumotlar $A_{cp} = 100,0$ g; $W_{ncx} = 10\%$, $W_{tp} = 60\%$.

Hisoblash natijasida $B_{cp} = 100,0(100-10)/100 = 90,0$ g. $B = 125$ g; $a = 15$ g; $C_{cp} = 90,0 * 100 / (100-60) = 225$ g; $\Gamma_{cp} = 125-15 = 110$ g; $\Delta = 225-110 = 115$ g. shunday qilib hisoblash natijasida muhitni 60 % gacha namlash uchun steril muhitga 115 g steril suv qo'shish talab qilinishi aniqlandi.

Steril ozuqa muhitini namlash, uni produtsentning toza kulturasi bilan ekib va ekilgan muhitni o'sishi uchun kyuvetlarga taqsimlash. Bu jarayon aseptika qoidalariga amal qilgan holda yonib turgan mash'ala yoki gaz gorelkasidan foydalanib amalga oshiriladi. Ekish mahsus ekish uchun mo'ljallangan xonalarda – bokslarda ekishdan oldin bakteriotsid lampalar bilan 2,5-3,0 soat mobaynida nurlantirib amalga oshirilishi mumkin.

Toza stol ustiga barcha kerakli steril idishlar joylanadi: steril suv solingan kolba, teshikli idishda steril ozuqa muhiti, kyuvetlar, bikslar, qopqoqlar, qog'ozga o'ralgan shisha tayoqcha va zamburug' kulturasi ekilgan kolba. Ishchilarning qo'llari etil spirti bilan yaxshilab tozalangan rezina qo'lqoplar bilan himoyalangan bo'lishi kerak.

Namlash va ekish quyidagi tartibda amalga oshirilishi kerak. Ehtiyotkorlik bilan 1,5 – 2,0 dm³ sig'imli bo'sh idish qisman ochiladi va unga steril muhit sepiladi, shundan keyin idish steril qog'oz chetlari bilan mustahkamlanadi.

Silindr qisman ochiladi va olovdan bevosita yaqinlikda unga hisoblanga miqdordagi steril suv quyiladi (Д). Aseptika qoidalariga amal qilgan holda so'ngra ekma material solingan kolba ochiladi, unga steril tayoqcha solinadi va taxminan o'lchangan steril suv 2/3 ni silindrdan olib solinadi. kolba ichidagilari tayoqcha bilan aralashtiriladi va suvli suspenziya ko'rinishida muhit bilan idishga ko'chiriladi. So'ng ekma kolbani silindrda qolgan suv bilan yana bir marta chayiladi va nam muhitga qo'shiladi. Shisha tayoqcha bilan bo'sh qolgan kolbani tiqin bilan yopib qo'yiladi.

Idish ichidagi moddalar rezina qo'lqop bilan qo'lda yaxshilab aralashtiriladi. Bunday aralashtirish namlik va ekilgan material bir maromda muhitning butun massasi bo'ylab tarqalishi uchun zarur.

Ekilgan muhitni oldinroq o'lchab qo'yilgan steril kyuvetga ko'chiriladi, unga bir tekisda yoyiladi va kyuvetni avval yelimlanmagan qog'oz list bilan, so'ngra qopqoq bilan yopiladi. Yopiq kyuvetni muhit bilan birgalikda tarozida tortib ko'riladi (K). so'ng kyuvetga oddiy qalam bilan yozib qo'yiladi va mahsus o'stirish xonasiga yoki termostatga qo'yiladi.

Xisobot jadvali:

Birinchi mashg'ulot bo'yicha kuzatishlar bayonnomasi quyidagi ko'rinishga ega bo'ladi:

№	Foydalanilgan muhit varianti	Muhitning dastlabki namligi, W _{исх}	Cheklovchi komponent miqdori		W _{тп} bilan muhit miqdori (C _{сп}), g	Qo'shilgan suv miqdori Д, sm ³
			C _{исх} , %	C _{св} , %		
1	2	3	4	5	6	7

Kyuvetning massasi, g		Ekishdan keyin kyuvetdagi nam muhitning miqdori (M _{вЛ}), g	Ekishdan keyin muhitdagi quruq moddaning miqdori, (M _{св}), g	Ekish kamerasidagi havoning parametrlari		
Bo'sh (P)	Muhit bilan (K)			Harorat, °C		Nisbiy namlik, %
				Quruq termometr	Nam termometr	
8	9	10	11	12	13	14

I z o h. kuzatishlar bayonnomasini to'ldirishda o'lchangan kattaliklar qayerda mumkin bo'lsa, shu yerda o'rtacha arifmetik ko'rinishda ishonchli xatoliklari bilan

$P=0,95$ holatda yozib qo'yiladi; masalan, kyuvetning massasi muhit bilan birga $492\pm 0,18$ g ga teng.

2-LABORATORIYA ISHI

MAVZU: FERMENT PRODUTSENT-MIKROORGANIZMLARINI QATTIQ OZUQA MUHITI YUZASIDA O`STIRISH ORQALI KO`PAYTIRISH USULINI O`RGANISH

Ishdan maqsad: Ferment produtsent-mikroorganizmlarini qattiq ozuqa muhiti yuzasida o`stirish orqali ko`paytirish usulini o`rganish.

Kerakli asbob va materiallar: kultura, kyuvet, qog'oz varag'i, tarazi.

Ikkinchi mashg'ulotda quyidagi jarayonlar amalga oshiriladi:

- Tayyor xomashyo kulturasiining massasi aniqlanadi;
- Kulturaning namligi aniqlanadi va uning dastlabki ozuqa muhiti massasidan chiqishi hisoblab topiladi;
- Kulturadagi ferment aktivligi aniqlanadi.

Tayyor xomashyo kulturasiining massasini aniqlash. Birinchi mashg'ulotdan bo'sh kyuvet va yopishtirilmagan qog'oz varag'i (P)ning massasi, kyuvetdagi nam muhitning massasi (M_{BH}) va kyuvetdagi muhit quruq moddasining massasi (M_{CB}) ma'lum.

Kyuvetning kultura (K_1) bilan massasidan bo'sh kyuvetning massasi (P) hisoblanadi va tayyor xomashyo kulturasiining massasi (A_k) grammlarda olinadi:

$$A_k = K_1 - P.$$

Agar kyuvetning massasi bo'sh holda (P) va kultura bilan (K_1) ko'rinmas xatoliklarga yo'l qo'yilgan bo'lsa, u holda tayyor xomashyo kulturasiining massasi (A_k) ko'rinmas xatoliklar yig'indisiga teng qiymatdagi xatolikka ega bo'ladi, bo'sh kyuvet massasini $\varepsilon(P)$ va tayyor xomashyo kulturasi bilan massasi $\varepsilon(K_1)$ ni aniqlash (1-p. 1-ilovaga qarang):

$$\varepsilon(A_k) = \sqrt{\varepsilon^2(P) + \varepsilon^2(K_1)}.$$

Kulturaning namligini aniqlash va uning dastlabki ozuqa muhiti massasidan chiqishi hisoblash. Zamburug' xomashyo kulturasiini kyuvetdan ajratib olinadi va kristallizatorga o'xshash keng hajmli idishga ko'chirib o'tkaziladi va yaxshilab maydalanadi va aralashtiriladi. O'rtacha namuna tanlab olinadi, ya'ni yuzgacha aniqlik bilan ikki-uch marta tarozida tortib olinadi, namlikni aniqlash uchun tezkor metodda Chijov asbobida yoki bilan quritish shkafida doimiy massagacha quritish usuli bilan aniqlanadi.

Qo'pol xatoliklar yo'qligini bilgan holda (1-p. 1-ilovaga q.) tortilgan massaning o'rtacha arifmetik kattaligining sezilmas xatoliklari hisoblanadi. agar bu ishonchli xatolik eng katta tortilgan massaga nisbatan 0,1-0,2 % dan oshsa, u holda tortib olingan massa takrorlanishlarning katta sonlarida qayta o'tkazishga to'g'ri keladi. Bu holatda takrorlanishlarning zarur sonini 1-p. 1-ilovada keltirilgan usul yordamida hisoblash mumkin, so'ngra esa olingan natijalar ishonchli xatoliklari kattaligi bo'yicha taqqoslanishi mumkin.

Kulturaning chiqimi quyidagi sxema bo'yicha aniqlanadi: tayyor kulturadagi quruq moddaning miqdori (B_k) quyidagi formula bo'yicha hisoblab topiladi $B_k = A_k (100 - W_{k,cp}) : 100$; oldingi mashg'ulotlardan dastlabki aralashmadagi quruq moddaning massasi (M_{cb}) ma'lum; kultura chiqimi η (dastlabki muhitga nisbatan % larda) hosil qilinadi $\eta = B_k \cdot 100 : M_{cb}$.

Misol. Ma'lumki, $K_1 = 270,0$ g; $P = 160,0$ g; $W_{k,cp} = 46\%$; $M_{cb} = 86,0$ g. A_k , B_k va η larni topish talab qilinmoqda.

$A_k = 270 - 160 = 110$ g ; $B_k = 110(100 - 46) : 100 = 59,4$ g ; $\eta = 59,4 \cdot 100 : 86,0 = 70,2\%$

I Z O H. keltirilgan hisob kitob sxemasi oldinroq o'tkazilgan statistik analiz natijalarini jumladan, to'g'ridan to'g'ri o'lchov natijalarining ishonchli xatoliklari qiymatining mavjudligini hisobga olmaydi.

Funksiyalarning sezilmas xatoliklarini aniqlash metodikasini hisobga olgan holda (1-p. 1-ilovaga q.) kultura chiqimining ishonchli xatoliklari B_k va η ni qiymatini hisoblash talab etiladi.

Kulturadagi ferment aktivliklarini aniqlash. Produtsentlarning turi va ular sintezlaydigan fermentlarga qarab aktivlikni aniqlash usuli aniqlanadi (I bo'limga q.). aktivlikni aniqlash usulining xatoligini baholash mavjudligi haqida o'ylab ko'rishga to'g'ri keladi. Agar bunday baholash adabiyotlarda bo'lmasa, u holda birgina shu preparatda aktivlikni 5-6 marta aniqlashni amalga oshirib bu qiymatni olish mumkin (1-p. 1-ilovaga q.). keyingi hisob kitoblar uchun kultura namligini, ekstrakt tayyorlash uchun kulturadan olingan tortishlar kattaligi, aktivlikni va bu kattaliklarning ishonchli xatoliklarini aniqlash uchun ishlatiladigan ekstraktlar miqdorini bilish zarur. Kultura aktivligi 1 g quruq va nam kulturaga fermentativ aktivlik (FA) birliklarida ifodalanadi.

Ikkinchi mashg'ulot bo'yicha kuzatishlar bayoni quyidagi ko'rinishga ega bo'ladi:

№	Foydalanilayotgan muhit varianti	Xomashyo kulturasi nomi va namligi $W_{k,cp}$, %	Kultura chiqimi			Fermentlar aktivligi	
			Xomashyo kulturasi massasi ($A_k - 1$),	Kultura quruq moddasining massasi ($B_k - G$),	Dastlabki xomashyodan % larda	1g xomashyo kulturadagi FA birliklarida	Kulturaning 1 g quruq moddasidagi FA birliklarida
1	2	3	4	5	6	7	8

I z o h. Kuzatishlar bayonnomasini to'ldirish jarayonida ushbu laboratoriya ishi natijalarini qayta ishlash jarayonida olingan ishonchli xatoliklar ko'rsatib o'tiladi.

Kuzatishlar bayonnomasini tashkil qilish jarayonida agar guruh talabalarining hammasi turli muhitlardagi bitta produtsent bilan ishlayotgan bo'lsa, xoxishga ko'ra taklif qilingan sxema bo'yicha keltirilgan jadvalni doskada hamma variantlarni to'ldirilishi mumkin. Bu muhitning tarkibi mikroorganizmlarning

shu yoki boshqa fermentlarni sintez qilishiga qanday ta'sir qilishini o'rganish imkonini beradi.

3-LABORATORIYA ISHI

MAVZU: QATTIQ OZUQA MUHITI YUZASIDA O'STIRILGAN MIKROSKOPIK ZAMBURUG' KULTURALARIDAN FERMENTLARNI EKSTRAKSIYA QILISH USULINI O'RGANISH

Ishdan maqsad: Yuza kulturalardan suv bilan ekstraksiya qilish metodi bilan fermentlarni ajratib olinishi jarayonini o'rganish hisoblanadi, bu ekstraktlar asosida tozalangan ferment preparatlari olinishi mumkin.

Kerakli asbob va materiallar:Laboratoriya uchun ekstraktor uskunasi, ferment.

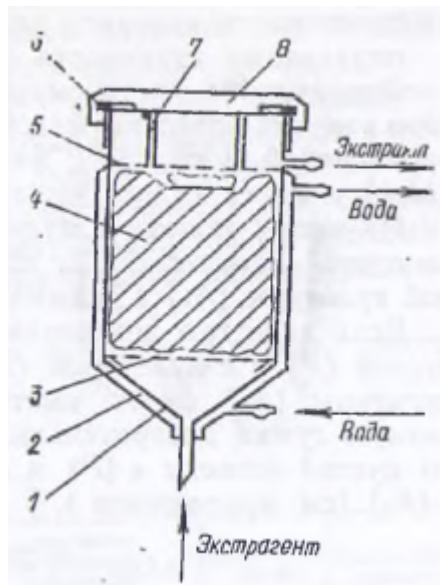
Ishning nazariy asoslari:

Yuza usuli bilan o'stirilgan mikroskopik zamburug'lar kulturasidan fermentlarni ajratib olish.

Mikroskopik zamburug'larning yuza kulturasida 67-78% erimaydigan moddalar bo'ladi. Fermentlar esa eriydigan oqsil moddalarining asosiy ko'pchilik qismini tashkil qiladi va produtsent kulturasidan suv bilan ekstraksiya qilish usuli yordamida oson ajraladi. Kulturaning hujayradan tashqaridagi fermentlari suv bilan juda oson ajraladi, hujayra ichidagi fermentlarning ajratib olinishi esa hujayra devorining o'tkazuvchanligiga bog'liq.

Mikroorganizmlarning yuza kulturalaridan ekstraksiyalash jarayonida fermentlar bilan birga ekstragentga boshqa eriydigan moddalar aminokislotalar, pastmolekular moddalar, uglevodlar, tuzlar, kislotalar va b.q ham o'tib qoladi. Agar dastlabki kultura quruq moddasini 100 % deb qabul qilinsa, u holda ekstraksiya qilish jarayonida ularning 22-33% i eritmaga o'tadi, fermentlar esa deyarli to'liq (90-95%) ajratib olinadi. Shuning uchun 1 g quruq moddadagi preparatning aktivligi ekstraksiyadan keyin 3,0- 3,5 martaga oshadi.

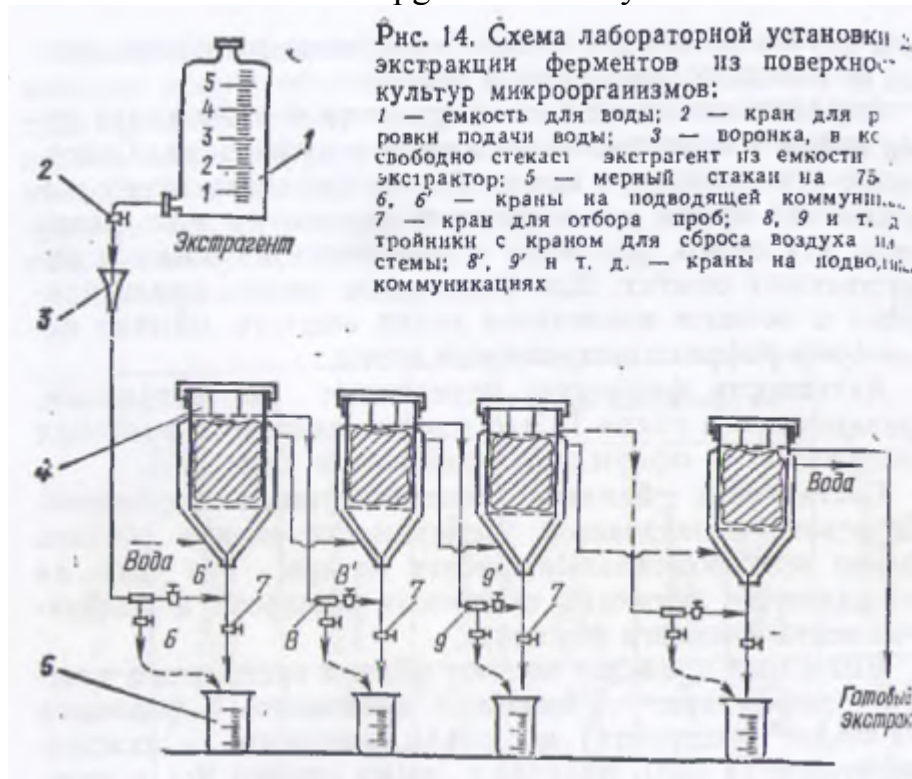
Fermentlarni ekstraksiya qilish vodoprovod suvi bilan 25-27°C haroratda amalga oshiriladi. Yuza kulturalardan fermentlarni ekstraksiya qilish turli xil sistema apparatlarida amalga oshiriladi, lekin bu jarayonni o'quv maqsadlarida o'rganish uchun bir qancha apparatlar - diffuzorlardan tashkil qopgan diffuzion qurilma ko'rgazmali va mavjud (3.1-rasm).



3.1-rasm. Laboratoriya uchun ekstraktor uskunasi.

1-korpus; 2-g'ilof; 3-quyi himoya setkasi; 4-ikki qatlamli doka truba; 5-yuqorigi siqish setkasi; 6-rezinali mahkamlashkolsasi; 7-pichog'i; 8-qorpoq.

7 ta diffuzordan tashkil topgan laboratoriya uskunasi 3.2 - rasmda keltirilgan.



3.2-rasm. Mikroorganizmlardan ekstraksiya usulida ferment olishning laboratoriya uskunasi.

1-suv uchun sig'im; 2-suv uzatishni nazorat qilish uchun vintel; 3-ekstraktor sig'imiga ekstragent tushush uchun voronka; 4-ekstroktor pichog'i; 5-o'lchamli stakan; 6,6'-rostlash uchun kran; 7-namunani tushurish krani; 8,8',9,9'-uch tomongayuboriladigan kran.

Har bir diffuzorning hajmi 0,55-0,60 dm³. Diffuzorga 150 g kultura solish mumkin.

Shuningdek, bitta laboratoriya mashg'uloti mobaynida o'rnatilgan ish rejimidagi batareyani chiqarish mumkin emas, u holda laboratoriya ishi batareyaning bitta aylanmasi chegarasida o'tkaziladi, ekspozitsiya uzunligi bilan har bir diffuzorda 20 min bo'lib 7 ta diffuzorda ekstraksiya uzunligi 7·20: 60= 2 soat 20 min ni tashkil qiladi.

Agar bunday qurilma laboratoriyada bo'lmasa, u holda istalgan ekstraksiya apparati modelini qo'llash mumkin.

Shuningdek, eng muhim umumiy doiralarda ekstraksiya qilish jarayoni qoidalarini, batareya ishini imitatsiya qilib, ekstragent bilan keng stakanlarda ma'lum muddat kulturani ushlab turib, davriy ravishda uni dekantirib va yana keyingi stakanga yangi kulturaga o'tkazib va b,q o'rganish mumkin, eng birinchi stakandagi ekstragentlardan ozod qilingan kulturani har safar dekantatsiyadan keyin suvning yangi portsiyasiga quyiladi. Ishning bunday o'tkazilishi yuza kulturalardan fermentlarni ekstraksiya qilish jarayoni faqat tahminiy fikrlarni beradi.

Mazkur ishning maqsadi yuza kulturalardan suv bilan ekstraksiya qilish metodi bilan fermentlarni ajratib olinishi jarayonini o'rganish hisoblanadi, bu ekstraktlar asosida tozalangan ferment preparatlari olinishi mumkin.

Ishni bajarish tartibi:

Ish quyidagi operatsiyalardan iborat:

- Diffuzor batareyalarining tayyorlanishi, ularning yuklanishi, batareyalarni ishga tushirish;
- Ekstraksiya qilish jarayonida suv balansini hosil bo'lishi;
- Har bir diffuzordan olingan ekstraktidagi quruq moddaning miqdori va ferment aktivligini aniqlash;
- Ekstragirlangan fermentlar balansining hosil bo'lishi.

Diffuzor batareyalarining tayyorlanishi, ularning yuklanishi va ishga tushishi. Barcha diffuzorlar laboratoriya stoli qopqog'idan bir xil balandlikda devorda yig'iladi. Diffuzorlarning qobiqlari ketma ket o'zaro birlashtiriladi va ultratermostatga ulanadi. Suv birinchi diffuzorning qobig'i pastiga tushadi va birinchi diffuzor yuqori qismidan ikkinchi diffuzor qobig'ining pastki qismiga oqadi va shu tariqa. So'nggi diffuzor qobig'idan chiqqan suv ultratermostatga tushadi.

Har bir diffuzorning ostiga diffuzorning konussimon qismiga taqalib turadigan setka o'rnatiladi, keyin esa 150 g kultura tarozida tortiladi va uni ikki qatlamli doka xaltachaga solinadi va kultura bilan birga uni diffuzorga joylanadi. Xaltacha yuqorisiga yuqori to'r bilan shunday siqiladiki, u ekstrakt uchun to'r ustidan chiqish teshigi bo'lib qolsin. Shu tariqa qolgan barcha diffuzorlar ham to'ldiriladi.

Ekstraksiya jarayoni odatda suv bilan o'tkaziladi. Aniq o'lchangan suv miqdori pastki tubusli shisha idishga quyiladi, suv kran orqali ochiq voronkaga tushadi, so'ngra shlang bo'ylab diffuzorning pastki patrubasiga o'tkaziladi.

Diffuzorning qopqog'i ishga tushgan paytda ochiq bo'ladi. 8 va 8' kranlar yopiq bo'ladi.

Suv birinchi diffuzorda kulturaning butun qatlami orqali o'tganda va uning yuqorigi chegarasiga yetib borganda, 6' kran yopiladi va uning ostidan qistirma qo'yib qopqoqni vintlab mustahkamlab qo'yadi. Kultura birinchi 20 min davomida turadi. Keyin 6 va 8 kranlar ochiladi. 8 krandan suv paydo bo'lganda, uni 8' ochadi va yopadi. Ikkinchi diffuzorning ochiq qopqog'i orqali ekstragentning paydo bo'lishi kuzatiladi. 9 va 9' kranlar yopiq bo'ladi. Ekstragent diffuzorning yuqori chegaralarigacha ko'tarilganda 6 va 8 kranlar yopiladi, diffuzorning qopqog'i qattiq yopiladi va ekstragent sistemada yana 20 min ga qoldiriladi. Bunday jarayonlar to hamma diffuzorlar ekstragent bilan to'lmaguncha davom etaveradi va ohirgi diffuzorda kultura reagent bilan 20 min kontaktda bo'lmaydi. Shundan so'ng 8' , 9' kranlar qaytadan yopiladi va sh.k. tushiriladigan patrubkalar ostidan 750 sm^3 li kimyoviy o'lchov kolbalari qo'yiladi, diffuzorlardagi qopqoqlar mustahkamlanadi va 7 kran ochiladi. O'tkazuvchi trubalar va olib boruvchi shlanglar 8, 9 va sh.k kranlarni ochgan holda kranlar oldida ekstragentdan tozalanadi. diffuzorlarning ekstragentlar bilan to'lishiga ketgan vaqtni hisobga olmaganda 2 soat 20 min dan keyin batareyaning birinchi aylanma ishi tugaydi.

Har bir ekstragent porsiyasida ferment aktivligi va quruq modda miqdorini analiz qilib, yuza kulturalardan fermentlarni ajratib olish jarayon-ini izohlash mumkin. Ekstraksiya jarayoni balansini tashkil qilish uchun, dastlabki kulturaning namligini va uning I bo'limda keltirilgan mos keluvchi metodlar yordamida aniqlanadigan dastlabki aktivligini bilish kerak.

I z o h. ushbu mavzu bo'yicha NIRS jarayonini bajarishda batareyalarning 2-3 aylanma ishi o'tkazilishi kerak va faqatgina o'rnatilgan rejimda jarayon haqida xarakteristika olish mumkin.

4-LABORATORIYA ISHI

MAVZU: SUYUQ OZUQA MUHITIDA FERMENT PRODUKTSENT - MIKROORGANIZMLARINI O'RGANISH

Ishni bajarish tartibi:

Kerakli asbob va materiallar:

Ishning nazariy asoslari:

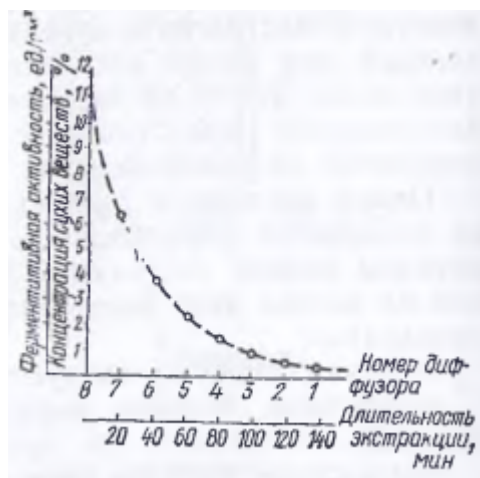
Ekstraksiyada suv balansining hosil bo'lishi. Ekstraksiyaga kiradigan suvning umumiy miqdori idishdagi dastlabki suv miqdori orasidagi farqi bo'yicha aniqlanadi, masalan 6 dm^3 li idishda ohirgi diffuzor to'lgandan keyin qolgan suv miqdori, masalan $1,1 \text{ dm}^3$ bo'lsa, u holda umumiy hisobda $4,9 \text{ dm}^3$ suv sarflangan bo'ladi.

Jarayon tugagandan keyin har bir diffuzordagi ekstragentlar idishga quyiladi va o'lchanadi. Masalan birinchi stakanda 300, ikkinchida 290, uchinchida 310, to'rtinchida 300, beshinchida 300, oltinchida – 310, yettinchida – 290 sm^3 va umumiy hisobda $2,1 \text{ dm}^3$ yig'ib olindi, kulturaning namlanishiga $4.9-2.1= 2.8 \text{ dm}^3$ sarflandi.

Ekstraksiya qilish jarayonida eritmaga 22 dan 33 % gacha kulturaning quruq moddasi o'tadi. Agar kulturaning dastlabki namligi 10% ekanligini inobatga olsak, u holda quruq moddaning massasi 150 g da $150 \cdot 0,9 = 135$ g bo'ladi. Shartli ravishda 1/3 qism quruq modda eritmaga o'tgan bo'lsa, u holda diffuzorda $135 \cdot 2 : 3 = 90$ g quruq modda qoladi. Tahmin qilish mumkinki, har bir diffuzordagi kulturaning namlanishiga bir xil miqdorda suv sarflangan bo'lsa u holda, $2,8 : 7 = 0,4$ dm³ suv tarkibida 90% quruq modda bo'lgan bioshrot (erimaydigan qattiq qoldiq)ni namlash uchun sarflanadi. Bioshrotning namligi $400 \cdot 100 : 490 = 81,6\%$ ni tashkil qiladi. Nazariyaga ko'ra, isrofgarchilikni hisobga olmaganda, har bir diffuzordagi ekstrakt hajmini hisoblash mumkin. U ekstragentning namlanadigan bioshrot hajmidan (bizning holatda u 400 sm³ etib belgilangan) va har bir diffuzordan ajralib stakanga quyiladigan suyuqlik hajmidan yig'iladi.

Har bir diffuzordan olingan ekstrakt tarkibidagi quruq moddaning miqdori va ferment aktivligini aniqlash. Quruq moddaning miqdorini namunalarni doimiy massagacha quritish yo'li bilan aniqlanishi mumkin, lekin bu usul juda ko'p mehnat talab qiladigan, uzoq davom etadigan va faqat mas'uliyatli tajribalarda qo'llaniladi. Quruq moddani to'lig'icha ajratib olish uchun odatda refraktometrik usuldan foydalaniladi.

Ferment faolligi I bo'limda keltirilgan usullar bo'yicha aniqlanadi. Bu ma'lumotlar kuzatishlar bayonnomasiga kiritiladi va grafik ravishda joylashtiriladi (4.1- rasm).



4.1-rasm. Ekstragirlangan fermentlar balansining hosil bo'lishi.

O'tkazilgan tajriba asosida faqatgina isrofgarchilikning tahminiy hisob kitobini bajarish mumkin, shuningdek bioshrotning haqiqiy namligi va ajratib olinmagan ferment miqdorini aniqlab bo'lmaydi.

Yuqorida har bir diffuzordagi ekstrakt hajmi hisoblab chiqildi. Ferment aktivligini (FA/sm³ ekstrakt birligida) har bir diffuzordagi (sm³ larda) ekstrakt hajmiga ko'paytirib, har bir diffuzordagi suyuq fazadagi FA birliklari yig'indisi olinadi va barcha diffuzorlardagi ekstraktdagi FA birliklari umumiy miqdori hisoblanadi: $\sum FA (\text{ekstrakt}) = FA_1$ (1-diffuzordagi ferment aktivligi) + $FA_2 + \dots$ va h.k. So'ngra diffuzorda joylashgan kulturadagi FA birliklarining umumiy miqdori hisoblanadi: $\sum FA (\text{kultura}) = 135 \cdot n$ ekstraktning FA si, bu yerda 135 – namunadagi quruq moddaning miqdori; n – diffuzorlarning miqdori (n=7). Kultura $\sum FA$ birligi

100% ga teng deb qabul qilingan. U holda ekstraksiyalanmagan ferment miqdori quyidagiga teng bo'ladi: $\sum FA \text{ ekstrakt} / \sum FA \text{ kultura} \cdot 100\%$ da.

Kuzatishlar bayonnomasini to'ldirish uchun ma'lumotlar quyidagilar hisoblanadi: idishdagi tajriba boshlanishidan oldingi suvning umumiy hajmi (dm^3 larda), ohirgi diffuzor to'lgandan keyin idishdagi suvning umumiy hajmi (dm^3 larda), har bir diffuzorga kiritilgan kulturaning miqdori (g larda), kulturaning namligi (%larda) kulturadagi ferment aktivligi (absolut quruq moddaning FA birliklarida).

Bayonnoma quyidagi ko'rinishga ega bo'ladi:

diffuzorning №	Ekstraksiya davomiyligi, min	Quruq moddaning konsentratsiyasi %	FA, birlik/ sm^3	Ekstragent hajmi sm^3			Suyuuq fazadagi FA birliklari yig'indisi
				Diffuzordan yig'ib olingan	Namlanadigan bioshrot	Suyuuq massaning yig'indisi	
1	2	3	4	5	6	7	8

I z o h. o'quv laboratoriya sharoitida ekstraksiyalangan kulturalarni bir necha takrorlashlar natijasida olish amaliy jihatdan ilojsizdir. Agar har qanday sharoitda kattaliklarning ishonarli xatoliklarini aniqlash masalasi turgan bo'lsa, jarayonning ushbu parametrlari asosida kulturadan ferment ajratib olinishini hajmni, fermentativ aktivlik, namlikni aniqlash jarayonida yo'l qo'yilgan ishonarli xatoliklarni baholab bu xatolikni baholash mumkin (1 – p. 1-ilovaga q), albatta jarayonga ta'sir qiluvchi boshqa omillarni ham hisobga olgan holda.

5-LABORATORIYA ISHI

MAVZU: FERMENT ERITMALARINI DIALIZ USULINI TOZALASH

Ishdan maqsad: Ushbu ishning maqsadi mikroskopik zamburug' yuza kulturalaridan ekstraktlarni dializ va elektrodializ qilish jarayonlarini o'rganish hisoblanadi. Tadqiqot obekti sifatida oqsil bilan birga sezilarli miqdorda quyi molekular moddalar aralashmasi bo'lgan istalgan ferment eritmasi bo'lishi mumkin. Ish ikkita mashg'ulot mobaynida o'tkaziladi.

Kerakli asbob va materiallar: Dializ uskunasi, elektrodializ uskunasi, ferment eritmali.

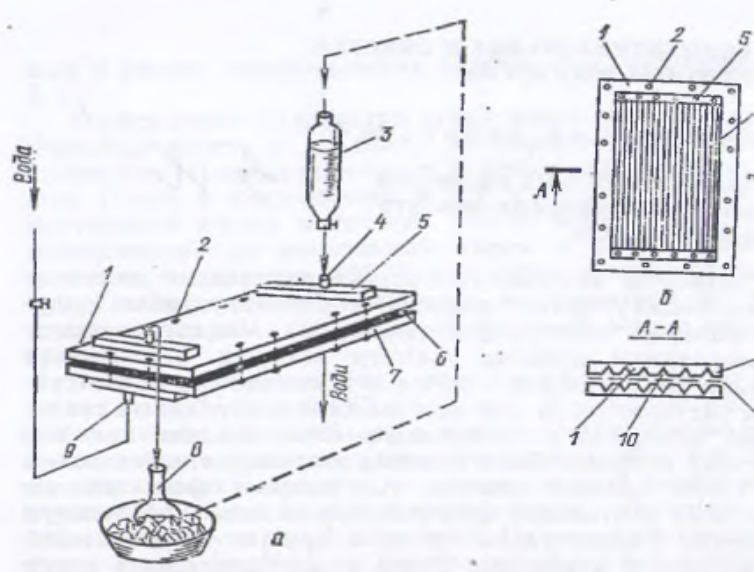
Ishning nazariy asoslari:

Ferment eritmalarini dializ metodi yordamida past molekular tuzilishli moddalardan tozalash.

Quyi va yuqori molekular moddalarni yarim o'tkazgich membranalardan foydalanib ajratish jarayoni dializ deb aytiladi. quyi molekular moddalarning diametri poralarning diametridan ancha kichik bo'lganligi sababli, ular membrana orqali eritmaga erkin o'ta oladi, yuqori molekular moddalar esa o'ta olmaydi. Ushbu prinsip preparativ maqsadlarda dializning ishlatilishi asoslariga mos keladi.

Dializ jarayoni yuqori samarali bo'lishi uchun yarim o'tkazgich membrananing u yoki bu tomonida uzoq vaqt konsentratsiyaning sezilarli farqini ushlab turish zarur. Bunda mahsus apparatlar – dializatorlarda amalga oshirish mumkin, bu apparatlar uzluksiz rejimda dializ qilinadigan eritma va eritmaning yuvuvchi membranasi uchun turli xil yo'nalishda ishlaydi.

Dializ uchun qurilma (5.1-rasm), yarim o'tkazgich membrana bilan ajratilgan suv va ferment eritmasini oqib o'tishi uchun navbatlashib turadigan kassetalar (yacheykalar) to'plamidan iborat.



5.1-rasm. Uzluksiz ishlaydigan dializ sxemasi.

a-umumiy ko'rinishi; b-yacheyka; 1-yuqori plastina; 2-mustahkamlash uchun boltlar; 3-fermentlar eritmasini ajratuvchi voronka; 4-fermentli eritma kirish joyi; 5-kollektor kiradigan teshuklar; 6-rezinali qistirmalar (prodkladka); 7-pastki plastinka; 8-muzli dializlangan eritmani

yig'ish uchun kolba; 9- suv kirish joyi; 10-egatning uchburchak shakli; 11-yarim o'tkazgichli membrana.

Laboratoriya amaliyotida dializ uchun asosan modifikatsiyalangan sellulozadan yasalgan mahsus naychalardan yoki qog'oz sellofandan tayyorlangan xaltachalardan foydalanadilar. Dializ uchun eng keng tarqalgan mahsus naychalardan (Viskingcellulose tubing) foydalaniladi.

Turli xil tipdagi "Visking" dializ naychalarining xarakteristikasi II ilova 8-jadvalda ko'rsatib o'tilgan.

Odatda dializ naychalari va qog'oz sellofanlar ularga elastiklik berishi uchun tayyorlash jarayonida suv bilan yuvganda oson ketkaziladigan glitserinning suvli eritmasi orqali o'tkaziladi. Yumshatuvchidan yuvilgan material havoda tutib turilmaydi, chunki u uvalanuvchan qilinadi, bundan tashqari quritilganda bo'laklanish darajasi ham o'zgaradi. Dializ uchun ishlatiladigan nam naychalar butunligicha muzlatilgan holda yoki antiseptiklar bo'lmagan holda saqlanadi.

Sellofan va dializ naychalari partiyasi modomiki ifloslangan bo'ladi va metall ionlari aralashmasini saqlaydi, ularni foydalanishdan oldin bevosita pH 7 bo'lgan sharoitda 0,01 – 0,005 M li etilendiamintetraatsetat(EDTA) eritmasida 2-5 daqiqa davomida qaynatish tavsiya etiladi va keyin bir necha marta suv bilan yuvib tashlanadi. Xaltacha naychalarini yoki tekis dializator dializdan oldin germetiklikka tekshirib ko'rish kerak.

Dializga namunalarni o'rnatish jarayonida unga antiseptik qo'shish zarur va xaltachadagi suyuqlik balandligi idishdagi tashqi suyuqlikdan 1-2 mm ga balandroq bo'lishi kerakligini e'tiborga olish kerak, chunki bu dializ qilinadigan eritmaning mumkin bo'lgan qaydlarini aniqlashga imkon beradi.

Dializ tezligi konsentratsiya gradiyenti tenglashishi sababli sekinlashadi, shuning uchun dastlab oddiy dializ o'tkaziladi, tugallanuvchi bosqichlarda esa qiyin ajratiladigan ballast moddalarni yo'qotish uchun elektrodializ usulidan foydalaniladi.

Ferment eritmalarini ishlov berish uchun ko'pincha oddiy izotonik dializdan foydalaniladi, bunda ballast moddalarning 2/3 qismini ajratib olish mumkin, ferment preparatlarining aktivligi esa (quruq modda nisbatan qayta hisoblaganda) 3-10 martagacha ortadi, ferment komplekslarini molekular massalari bo'yicha ba'zi fraksiyalarga ajratish jarayonlarini o'tkazish mumkin va h.k. lekin barcha holatlarda dializ qilinadigan eritma hajmining 1,1-1,4 martagacha ortishi kuzatiladi.

Ishni bajarish tartibi:

Birinchi mashg'ulot

Birinchi mashg'ulotda quyidagi operatsiyalar amalga oshiriladi:

- Zamburug' yuza kulturasidan ekstraktning olinishi;
- Ekstraktni suspenziyalardan tozalash;
- Dastlabki ekstraktni analiz qilish
- Dializatsion uskunani yig'ish va dializ va elektrodializni o'tkazish.

Zamburug' yuza kulturasidan ekstraktning olinishi. Mashg'ulotni guruh bo'lib (8-10 talabalar bilan) o'tkazish uchun istalgan holda ikki yoki uch produtsent fermentlarining 10-12% namlikka ega tayyor yuza kulturalar olinadi.

Dializ o'tkazishdan oldin diffuzion batareyada yoki oddiy amalga oshirish yo'li bilan hamma fermentlar eritmaga o'tib ketishini hisobga olmasdan ham ekstrakt tayyorlanadi. Ohirgi holatda ekstrakt tayyorlash uchun 0,5 kg havoli – quruq kulturasini olinadi va unga 3 dm³ suv qo'shiladi, 30°C ga qizdirib hamma moddalar aralashiriladi va 10-15min ga qoldiriladi. Keyin aralashma ikki qatlamli doka yordamida filtrlanadi va yengil siqiladi. Bu usulda 1,2-1,5 dm³ filtratni ajratish mumkin. Bu filtrat yangi kulturada qayta ishlatishga qo'yib foydalanilishi mumkin, filtratga 0,25-0,30 kg miqdorda qo'shiladi. Aralashma ishlatib bo'lingandan so'ng yana filtrlanadi va 0,6-0,7 dm³ ikkinchi filtrat yig'iladi. Yana shu jarayonlar takrorlanadi, ikkinchi filtratga 0,10-0,15kg yangi kultura qo'shib ishlatiladi. Uchinchi filtrat hajmi odatda 0,25-0,30 dm³ ortadi. Bu ekstraktidagi quruq moddaning miqdori 10% atrofida bo'ladi.

Suspenziyalardan ekstraktlarni tozalash. Shunday usul bilan yuza kulturalardan olingan ekstrakt tarkibida odatda suspenziyalar bo'ladi. Uni yoki Byuxner voronkasida qog'oz filtr orqali filtrlash kerak, yoki sentrifugada 5000 min⁻¹ aylana chastotasida sentrifugalash kerak va cho'kmani ehtiyotkorlik bilan dekantirlash zarur. Ekstrakt to'liq shaffof bo'lishi, lekin suspenziya tutgan bo'lishi kerak.

Dastlabki ekstraktning analiz qilish. Dializ o'tkazishdan ekstraktning ma'lum qismi (30-50 sm³) quruq modda miqdorini, ferment aktivligini, ekstrakt pH ini, oqsillar, zollar, redutsirlovchi moddalar miqdorini aniqlash uchun ajratib olinadi. Ushbu ko'rsatkichlarni aniqlash metodikasi I bo'limda keltirilgan.

Analiz 2-3 marta takrorlanadi, bu esa qo'pol xatoliklar bo'lmasligiga ishonch hosil qilishga va eksperimental qiymatlarning ishonchli xatoliklarini hisoblashga imkon beradi (1-p. 1- ilovaga q.).

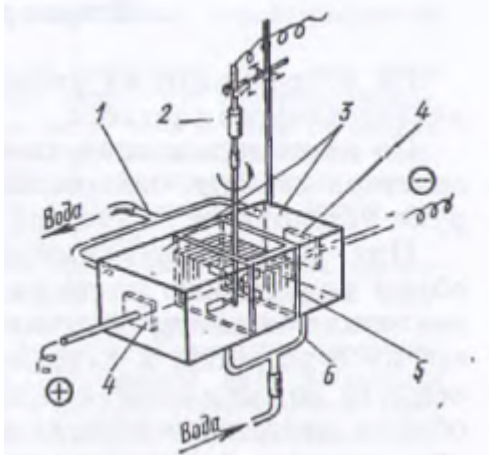
Dastlabki ekstraktning xarakteristikasi quyidagi jadvalda beriladi:

Ekstraktning pH i	Miqdori						Ferment aktivligi		
	Redutsirlovchi moddalar		Oqsillar		zollar		FA/sm ³ birliklarida	Butun hajmdagi FA birliklari summasi	1 g quruq modda nisbatan FA birliklarida
	mg/sm ³	butun hajmga nisbatan mg	mg/sm ³	butun hajmga nisbatan mg	mg/sm ³	butun hajmga nisbatan mg			

I z o h. jadvalda keltirilgan parametrlarning o'rtacha arifmetik qiymati bilan birga ularning ishonchli xatoliklari qiymati kattaliklari ham keltirilishi kerak.

Dializatsion qurilma yig'ish va dializ va elektrodializni o'tkazish.

Laboratoriya mashg'ulotlarini o'tkazish uchun uzluksiz (5.1-rasm) yoki davriy (5.2-rasm) harakatlanuvchi dializatsion qurilma yig'ilishi kerak. Plastinkasimon uzluksiz harakatlanuvchi dializator ishida talaba dializ yacheykasini yig'adi va uning suvga germetikligini qattiq tekshiradi. Keyin yacheykaning pastki plastinkasini suv bilan bosim beruvchi idishga kran bilan suv uzatish tezligini nazorat qilgan holda birlashtiriladi. Chiqindi suv kanalizatsiyaga tashlanadi.



5.2-Davriy ishlaydigan elektrodializning sxemasi.

1-suv chiqarish tizimi; 2-elektrik haydash uchun aralashtirgich; 3- suv uchun bo'linmalar; 4-elektrodlar; 5-yarim o'tkazgichli membrana; 6-suv ta'minot tizimi.

Dializ qilingan eritmani $0,5 \text{ dm}^3$ ajratuvchi voronkaga quyiladi va uni yuqori plastinkaning kollektoriga birlashtiriladi; ferment eritmasi uzatilishining tezligi ajratuvchi voronkaning krani yoki qisqichi bilan nazorat qilinadi va suv tezligiga nisbatan taxminan 15-25 martagacha kamroq beriladi.

Dializlanadigan eritma uchun priyomnik idishga muz bilan birga qo'yiladi. Ajratuvchi voronka ichidagi narsalar dializator orqali deyarli to'liq o'tkazilganda, ferment eritmasini priyomnikdan olib va yana qayta ajratuvchi voronkaga quyib jarayon yana takrorlanishi mumkin va h.k.

Ferment eritmasining suv bilan suyultirish darajasini aniqlash mumkin bo'lishi uchun uning hajmini dializgacha aniq o'lchab olish kerak bo'ladi.

Elektrodializatorida ishlash jarayonida talaba suvni ikkita yon seksiyalarga, markaziylariga esa ferment eritmasi quyiladi. Suv bo'lmalarda pastga tushadi va yuqorida yig'iladi. Suvli seksiyalarda elektr to'g'irlagichdan yasalgan elektrod plastinalari, ferment eritmasi seksiyasiga aralashtirgich kiritiladi.

Davriy elektr maydonini aralashtirib yoki bir joyda ushlab turib dializ qilish davomiyligi 4-6 soatni, uzluksiz dializ 3-4 soat mobaynida (2 aylanma) amalga oshiriladi.

Ikkinchi mashg'ulot

Ikkinchi mashg'ulotda dializ qilingan eritmani hamma tomonlama analiz qilish o'tkaziladi.

Dializ qilish belgilangan vaqti mobaynida dializatoridan dastlabki dializ qilingan eritma quyib olinadi, qurilmalar qayta yig'iladi va uni juda yaxshilab yuviladi.

Dializ qilingan eritmani analiz qilishda olingan eritmaning hajmini o'lchaydilar, uning tarkibidagi quruq moddaning miqdori aniqlanadi, dastlabki eritmaga nisbatan suyultirish darajasi hisoblanadi, dastlabki eritmaning butun hajmida va dializ qilingan eritmaning butun hajmida quruq modda massasining yig'indisi hisoblanadi (ushbu kattaliklarning xilma xilligi membrana orqali dializ qilish jarayonida diffuzirlangan quruq modda miqdorini ko'rsatadi).

Masalan, dializ uchun refraktometrik usul bilan aniqlangan, 9,3 % quruq modda tutgan 300 sm³ eritma belgilangan bo'lsa, dializdan keyin 350 sm³ dializlangan eritma yig'ilgan bo'lsa, undagi quruq modda miqdori 5,1 %ni tashkil qiladi, mos holda, dastlabki eritmada $9,3 \cdot 300:100 = 27,9$ g quruq modda, dializ qilingan eritmada – $5,1 \cdot 350:100 = 17,85$ g quruq modda tutadi. Tajriba ma'lumotlariga asosan suyultirish darajasi $350:300 = 1,17$ martani tashkil qiladi. Dializ jarayonida yuvilgan modda miqdori $27,9 - 17,85 = 10,05$ g ga teng, dastlabki quruq moddaga nisbatan $10,05 \cdot 100:27,9 = 36,02$ %.

Keyinchalik dializ qilingan eritmada dastlabki ekstraktda aniqlangan barcha ko'rsatkichlar (pH, redutsirlovchi moddalar, oqsillar, zollar, ferment aktivligi va b.q) aniqlanadi. Barcha bu ko'rsatkichlarning va ularning ishonchli xatoliklari kuzatishlar bayonnomasiga kiritib qo'yiladi.

Kuzatishlar bayonnomasi quyidagi ko'rinishga ega bo'ladi:

Produtsent fermentining nomlanishi _____

Ekstraktdagi quruq moddaning konsentratsiyasi _____ %

Dializga qo'yilgan ekstraktning miqdori _____ sm³

Suvning o'tish tezligi _____ dm³/soat

Yarim o'tkazgich membrananing xarakteristikasi va nomlanishi _____

Ferment eritmasi o'tish tezligi (uzluksiz harakatlanuvchi dializator qo'llanilganda) _____ sm³/soat

Dializ qilingan eritmaning hajmi _____ dm³

Dializ qilingan eritmada quruq moddaning miqdori _____ %

Dializatning pH i	Miqdori						Ferment aktivligi		
	Redutsirlovchi moddalar		Oqsillar		zollar		FA/sm ³ birliklarida	Butun hajmdagi FA birliklari summasi	1 g quruq modda nisbatan FA birliklarida
	mg/sm ³	butun hajmga nisbatan mg	mg/sm ³	butun hajmga nisbatan mg	mg/sm ³	butun hajmga nisbatan mg			

So'ngra dializ jarayonida har bir analiz qilingan moddaning yuvilish darajasi hisoblab topiladi, diagramma tuziladi va yakunlovchi jadval yaratiladi.

Analiz qilinadigan ko'rsatkichlar	Butun hajmdagi miqdori		Dializ jarayonida yuvish darajasi, %
	Dializgacha	Dializdan keyin	
Quruq moddaning miqdori, g			
Redutsirlovchi moddalar miqdori, mg			
Oqsillar, mg			
Zollar, mg			
FA birliklari yig'indisi			

Agar dializ jarayonini o'rganish bo'yicha NIRS ga topshiriq qo'yilgan bo'lsa, hammasidan oldin olingan natijalarning ishonchliligini o'rnatish va o'rtacha arifmetik qiymatlarning ishonchli xatoliklarini hisoblash uchun tajriba 3-5 marta parallel ravishda o'tkaziladi.

Keyin jarayonning dinamikasida namunalar olinadi va grafik bog'liqlik quriladi. Jarayonga dastlabki pH, tuzlar mavjudligi, quruq moddaning konsentratsiyasi, xaltachaning markasi va sifati, suv va ekstraktning oqish kattaligi va b.q larning ta'sirini o'rganish mumkin. Jarayonga bir qancha omillarning ta'sirini o'rganishda ko'p faktorli eksperimentlarni rejalashtirish matematik usullarini qo'llash kerak bo'ladi (3 -p. 1-ilovaga q.).

6-LABORATORIYA ISHI

MAVZU: FERMENT ERITMALARINI KONSENTRLASH USULLARINI O'RGANISH (ULTRAFILTRATSIYA, VAKUUM-BUG'LATISH USULI)

Ishdan maqsad: ultrafiltratsiya va vakuum- bug'latish usullari yordamida konsentrlangan ferment eritmalarini olish hisoblanadi.

Kerakli asbob va materiallar: Ultrafiltratsiya uskunasi, vakuum-bug'latish uskunasi.

Ishning nazariy asoslari:

Ferment eritmalarini konsentratsiyalash

Vakuum – bug'latish usuli ferment eritmalarini konsentratsiyalashning an'anaviy usuli hisoblanadi. Lekin fermentlarning eritmalarini vakuum – bug'latish apparatlarida quritilishi ularning issiqlik inaktivatsiyasi sababli past qaynash haroratlarida o'tkazilishi kerak. Boshqa yo'l bilan vakuum – quritishda ferment aktivligini yo'qolishining oldini olish eritmaning teploagent bilan minimum bog'lanishi hisoblanadi. vakuum – quritishda ferment aktivligining o'rtacha yo'qolishi 5-25% ni tashkil qiladi.

So'nggi yillarda olingan yuqori molekular moddalar eritmalarini ultrafiltratsiya qilish usuli keng tarqalgan. Bu usulning mohiyati shundaki, erigan moddani ushlab qoladigan yarim o'tkazgich membrana orqali erituvchining jadal o'tishiga olib keladi. Qo'yilgan musbat yoki manfiy bosim ultrafiltratsiyani oddiy diffuziyaga asoslangan dializdan farqlaydi, dializda molekularning harakati konsentratsiya gradiyentiga bog'liq.

Ultrafiltratsiya sababli atrof muhit haroratida fazoviy o'zgarishlarsiz konsentratsiyalash jarayonini o'tkazish imkoniyati, shuningdek ferment eritmalarini ballast birikmalardan chuqur tozalash imkoniyati paydo bo'ladi.

Ultrafiltratsiya yo'li bilan eritmalarini konsentratsiyalash quyi molekular moddalar miqdorining ortishi va ion kuchining ko'payishi bilan bir vaqtda sodir bo'ladi. Pora diametridan kichik bo'lgan zarrachalar va molekular ultrafiltratsiyada filtr (yarim o'tkazgich) membrana orqali suyuqlik bilan birga o'tadi.

Globular oqsillarning ultrafiltratsiyalash usuli eng yaxshi natijalarni beradi, chunki zarrachalar diametri bilan uning filtrlanuvchanligi orasida yetarlicha aniq korrelyatsiya mavjud.

Filtr orqali ultrafiltratsiya qilish hatto distillangan suv bilan ham oxir oqibatda bu jarayonning sekinlashishiga olib keladi.

Biologik turlarning suyuqliklarini filtratsiya qilishda bu sekinlashish yanada tezroq ro'y beradi. Qoidaga ko'ra bunday sekinlashish uchta omilning minimum ta'siri bilan bog'liq: birlamchi adsorbsiya, ya'ni zarrachalarning membrana yuzasiga va poralarning devorlariga ion va molekular adsorbsiyalanishi; bloklanib qolish, ya'ni zarrachalarning poralar ichida mehanik tutilib qolishi va biroz yirikroq zarrachali suyuqliklar uchun membrana yuzasida yomon o'tkazuvchan yoki umuman o'tkazmaydigan qatlamning hosil bo'lishi; konsentratsion polyarizatsiya.

Toza sellulozaning adsorbsion o'tkazuvchanligi kam, uning hosilalari nitro- va atsetatsellulozalarda u yanayam kamroq bo'ladi, lekin porali selluloza strukturasi bunday munosabatda o'zini boshqacha namoyon qiladi. 1 sm² membrana filtridagi (tahminan 3 mg quruq kletchatka) poralarning yuzasi 10 m² ga yetadi, milliporali filtrlar uchun bu kattalik 5-10 marta yuqoriroq. Bunday yuzalar bir qatlam ko'rinishida 10-50 mg oqsilni adsorbsiyalashi mumkin.

Molekular adsorbsiyadan tashqari ion adsorbsiya amaliy jihatdan barcha ultrafiltrlar uchun ancha yuqori, ion adsorbsiya selluloza, shisha, infuzoriyali tuproq va boshqa filtr tayyorlanadigan materiallarning manfiy zaryadi bilan bog'langan. Filtrdagi moddalarning birlamchi adsorbsiyasi qoidaga ko'ra bosim o'zgarishi ortganda kamayadi. Uning kuchli darajadagi kamayishi filtrlanadigan eritmadagi sirt – aktiv moddalarning ishtirok etishini ifodalaydi.

Poralarning bloklanishi konsentrlangan eritmalarda birdaniga ortadi. Unga shuningdek poralar yuzasida bir qatlamli oqsillarning hosil bo'lishi mos keladi va natijasida poralar diametrining torayishiga olib keladi.

Bunday sa'lbiiy omillarning ta'siri faqatgina filtratsiya tezligining pasayishi bilan chegaralanmaydi. Filtrlar qoidaga ko'ra, ma'lum miqdorda poralar diametridan kichik diametrli zarrachalar tutadi. Bu fenomenni shartlovchi sabablar juda ham xilma – xil. Ulardan eng asosiylari : Van-der-vaals kuchlari ta'siridagi adsorbsiya, defekt poralarga zarrachalarning tushib qolishi, ilgariroq ushlab qolingani zarrachalarning adsorbsiyasi va eng kichik zarrachalarning ularning haqiqiy o'lchamining ortishiga olib keladigan agregatsiyasi.

Ultrafiltratsiyaning preparativ maqsadlardagi hamma variantlari ichida filtratsiyaning oqish usuli eng yaxshi natijalarni beradi. Bu holatda filtrning yuzasida ushlab qolingani zarrachalardan qiyin eriydigan qatlam (“dinamik membrana”) ning hosil bo'lishi, suyuqlikning doimiy harakati yordamida filtrning yuzasini parallel ravishda pasaytiradi. Oqish filtratsiyasida poralarning bloklanishi ro'y bermaydi.

Ultrafiltratsiyada diametri poralar diametridan kichik bo'lgan komponentlarning yo'qolishi kuzatiladi. Ultrafiltratsiya tezligi komponentlar uchun $v < 1$, ya'ni suvdagiga nisbatan kichik koeffitsiyent bilan, va $v > 0$ da, ya'ni filtrlanmagan zarrachalardagiga nisbatan katta koeffitsiyent bilan ifodalanadi, va bir xil emas va zarrachalarning o'lchami bilan proporsional hisoblanadi. shuning uchun ultrafiltratsiyada moddalarning konsentratsiyasi $v=1$ dan o'zgarmas bo'lib qoladi, konsentratda moddalarning miqdori $v=0$ dan konsentratsiyaning proporsional omiliga darajalarda ortadi, shunda komponentlar konsentratsiyalari kattaliklari kabi $1 > v > 0$ dan oraliq bo'ladi.

Ultrafiltratsiya uchun ishlatiladigan membranalar aniq o'lchamli poralarga ega bo'lishi, yetarlicha yuqori tezlik bilan eritmani o'tkaza olishi va minimal adsorbsion qobiliyatga ega bo'lishi kerak. Hozirgi kunda bir qator mamlakatimizdagi korxonalar va chet el firmalari filtratsiya uchun bu talablarga yuqori yoki past darajada javob bera oladigan membranalarni ishlab chiqarmoqdalar.

Eng keng tarqalganlaridan anizotrop atsetatsellulozali membranalar olindi, ular porali qoplamalarga qoplanadi. Kataloglarda membranalarda ushlab qolingani

moddalarning molekular massalari kattaligi ko'rsatilgan, lekin membrananing holatida mos makromolekulalarni ushlab qolish 100% emas, biroz kichikroq. Bu yerdan shu narsa aniqki, ko'proq ushlab qolinishi uchun katalogda poralar kattaligi bilan ko'rsatilgan membrananing kichikrog'ini olish kerak bo'ladi. Shu narsani yana eslash kerakki, membrana orqali moddalarning o'tishi faqatgina ularning molekular massalariga emas, balki molekulaning tuzilishiga ham bog'liq.

Ishni bajarish tartibi:

ULTRAFILTRATSIYA USULI BILAN KONSENTRLASH

Ish quyidagi operatsiyalardan iborat:

- Dastlabki ferment eritmasini analiz qilish;
- Ultrafiltratsiya jarayonini o'tkazish;
- Konsentrlangan eritma va ultrafiltratni analiz qilish.

Dastlabki ferment eritmasini analiz qilish. Ferment eritmasidagi quruq moddaning miqdori (refraktometrik usul bilan), oqsilning miqdori (modifikatsiyalangan Louri usuli bilan) va fermentativ faollik(ferment uchun mos keluvchi standart usul bo'yicha) miqdorlari aniqlanadi.

Ultrafiltratsiya jarayonini o'tkazish. Laboratoriyada ultrafiltratsiyani kichik hajmli eritmalarda yurtimizda ishlab chiqarilgan membrana ustida suyuqlikni doimiy aralashtirib UF 10-50-20 (CKБ БΦА) yoki Amicon (AQSH) firmasi apparatlarida o'tkaziladi. Apparatga uning hajmiga qarab ma'lum miqdorda dastlabki eritmadan quyiladi. Apparat magnit aralashtirgich ustiga o'rnatiladi va reduktor orqali azotli ballonga ulanadi. Aralashtirgich yoqilgandan keyin apparatda 0,3-0,5 MPa bosim hosil bo'ladi. Ultrafiltrat tajriba jarayonida o'lchov silindriga yig'ib olinadi. Jarayon konsentrat miqdori 5-7 sm³ ni tashkil qilganda tugatiladi. Konsentrat to'kib tashlanadi va apparatni suv bilan yaxshilab yuviladi.

Konsentrlangan eritma va ultrafiltratni analiz qilish. Konsentratda va ultrafiltratda dastlabki ferment eritmasidagi kabi ko'rsatkichlar aniqlanadi.

Analiz natijalarini kuzatishlar bayonnomasiga quyidagi ko'rinishda kiritiladi:

Tajriba vaqti _____ daqiqa

Analiz qilinadigan mahsulot	Hajm, sm ³	Miqdori		Aktivlik, FA/sm ³ birligida	Konsentrlanish darajasi, marta		
		Quruq modda, %	Oqsillar, mg/sm ³		Hajm bo'yicha	Quruq modda bo'yicha	FA bo'yicha
Dastlabki ferment eritmasi							
Konsentrat							

Ishni bajarish tartibi:

VAKUUM – QURITISH USULI BILAN KONSENTRLASH

Ish quyidagi operatsiyalardan iborat:

- Dastlabki ferment eritmasini analiz qilish;
- Vakuum – quritish jarayonini amalga oshirish;

- Konsentrlangan eritmani analiz qilish.

Dastlabki ferment eritmasini analiz qilish. Ferment eritmasidagi quruq moddaning miqdori (refraktometrik usul bilan), oqsilning miqdori (modifikatsiyalangan Louri usuli bilan) va fermentativ faollik(ferment uchun mos keluvchi standart usul bo'yicha) miqdorlari aniqlanadi.

Vakuum – quritish jarayonini o'tkazish. Laboratoriyada vakuum – quritish jarayoni o'zimizda ishlab chiqarilgan rotorli bug'latuvchilarda o'tkaziladi. Dastlab apparat vakuum sharoitida sovunli suv yordamida germetiklikka tekshiriladi. O'lchov kolbasiga aniq miqdordagi tadqiqot eritmasi quyiladi. Bug'latish jarayoni tugagandan so'ng, konsentrat to'kib tashlanadi va o'lchov silindri bilan uning hajmi o'lchanadi.

Konsentrlangan eritmani analiz qilish. Konsentratda ham dastlabki ferment eritmasida aniqlangan ko'rsatkichlar aniqlanadi.

Analiz natijalarini kuzatishlar bayonnomasiga quyidagi ko'rinishda kiritiladi:

Tajriba vaqti _____ daqiqa

Analiz qilinadigan mahsulot	Hajm, sm ³	Miqdori		Aktivlik, FA/sm ³ birligida	Konsentrlanish darajasi, marta		
		Quruq modda, %	Oqsillar, mg/sm ³		Hajm bo'yicha	Quruq modda bo'yicha	FA bo'yicha
Dastlabki ferment eritmasi							
Konsentrat							

7-LABORATORIYA ISHI

MAVZU: SUVLI ERITMALARDAN CHO'KTIRISH (FERMENTLARNI ORGANIK ERITUVCHILAR VA TUZLAR YORDAMIDA CHO'KTIRISH)

Ishdan maqsad: Fermentlarni organik erituvchilar va tuzlar yordamida cho'ktirish usullarini o'rganish.

Kerakli asbob va materiallar: Sentrifuga, byuxner voronkasi, etil spirt, izopropil spirt, atseton, 2% li xlorid kislotasi

Ishning nazariy asoslari:

Suvli eritmalardan fermentlarning cho'kishi

Ferment eritmaları murakkab kolloid sistemalar hisoblanadi, ikki fazadan tashkil topgan: suyuq dispersion muhit va qattiq (kolloid) dispers fazalar. Dispers faza zarrachalarining o'lchamlari 1-100 mkm gacha bo'ladi.

Kolloid eritmalar turg'un emas, ma'lum sharoitda ularning zarrachalari agregatsiyalanadi va cho'kmaga tushishi mumkin. Oqsilning solvat qobig'i mahsus yo'naltirilgan suv molekullari va molekulaga yopishgan erkin radikallar bilan hosil bo'ladi. Solvat qatlam qancha ko'p bo'lsa, shunchalik stabil kolloid eritma bo'ladi. Solvat qobig' erituvchi va kolloid zarrachalar orasidagi bog'lovchi zveno hisoblanadi.

Suvli eritmalardan fermentlarni cho'ktirish organik erituvchilar (etil yoki izopropil spirti, atseton bilan) va turli xil tuzlar (ammoniy, natriy, rux sulfatlar, natriy xlorid) bilan o'tkazish mumkin.

Suvli eritmaga cho'ktiruvchining kirishi ferment molekulasiga suv molekulalarining tortishini kamaytiradi, cho'ktiruvchining konsentratsiyasi ortishi bilan oqsil molekulasining solvat qobig'ini hosil qilishda qatnashuvchi suv molekulalari miqdori cho'ka boshlaydi. Fermentning solvat qobig'i buzila boshlaydi, cho'ktiruvchi molekulasiga tortish kuchi pasayadi, fermentning hamma molekulalari solvatlanishining umumiy energiyasi kamayadi. Qaysidir vaqtda cho'ktiruvchining aniq konsentratsiyasida muhitda solvatlanish energiyasi ikkita oqsil molekulasida orasidagi bog'lanish energiyasidan kamroq bo'lib qoladi va molekulalarning agregatsiyasi va oqsillar koagulyatsiyasi yuz beradi.

Organik erituvchilar va tuzlar mavjudligida fermentlarning eruvchanlik qobiliyatini yo'qotishi dielektrik doimiylik bilan bog'liq, uning pasayishi esa cho'ktiruvchilar mavjudligida o'zi bilan oqsillarni ham cho'kmaga olib ketadi. Shunindek, dielektrik doimiylik turli xil cho'ktiruvchilar uchun har xil bo'ladi, va ularning fermentlarni to'liq cho'kishini chaqiradigan konsentratsiyalari ham, turlicha bo'ladi. Bundan tashqari fermentlar turli xil cho'ktiruvchilarga nisbatan har xil munosabatda bo'ladi, ko'pincha esa ferment komplekslarining fraksiyalash imkonini beradi.

Cho'kishning optimal sharoitlari har bir konkret holatda eksperimental usul bilan aniqlanadi. Organik erituvchilar va tuzlarning turi va konsentratsiyasidan tashqari cho'kish va cho'kmadagi ferment aktivligini saqlash jarayoniga eritmadagi elektrolitlar, cho'kish harorati, erituvchi bilan bog'lanish vaqti, pH, cho'kish jarayoni ketayotganda ferment eritmasidagi quruq moddaning konsentratsiyasi, ularning tarkibi va shu kabilar ta'sir qiladi.

Ushbu ishning maqsadi cho'ktiruvchi tabiati va ferment qoldiqlariga to'liq tushishiga cho'kish sharoitlarining ta'sirini o'rganish.

Ishdan maqsad:

ORGANIK ERITUVCHILAR BILAN FERMENTLARNI CHO'KTIRISH

Ish quyidagi operatsiyalardan iborat:

- Zamburug' kulturasi yoki chuqurlikdagi kulturadan olingan filtrat (konsentrat)dan tayyorlanadigan suvli ekstrakt (suspensiya) ning tayyorlanishi;
- Filtrat yoki suspensiyadagi fermentlar aktivligini aniqlash;
- Organik erituvchilar bilan fermentlarni cho'ktirish;
- Olingan qoldiq analizi.

Zamburug' kulturasi yoki chuqurlikdagi kulturadan olingan filtrat (konsentrat)dan tayyorlanadigan suvli ekstrakt (suspensiya) ning tayyorlanishi. Tortib olingan eritma (ekstrakt) ning tayyorlanish usuli dializ bo'yicha 4 - laboratoriya ishida batafsil yozib o'tilgan. Ekstraktni yoki filtrlanadi yoki unda suspensiya bo'lmasligi uchun sentrifuga qilinadi. 7-10% quruq modda tutgan tiniq eritma (ekstrakt) fermentlarni cho'ktirish uchun dastlabki eritma hisoblanadi. ishni amalga oshirish uchun har bir variantga 250 – 300 sm³ ekstrakt talab etiladi.

Agar chuqur kulturadan cho'ktirish amalga oshirilishi mo'ljallanayotgan bo'lsa, u holda qattiq suspenziya muhitidan uni ajratib olish kerak bo'ladi. Buni sentrifugalash yoki Byuxner voronkasida qog'oz filtr orqali filtrlash yo'li bilan bajarish mumkin.

Agar mikroorganizm kambag'al ozuqa muhitida o'stirilgan bo'lsa, tayyor kultural suyuqlik juda kam miqdorda quruq modda tutadi, bu esa cho'kmadagi fermentlarni ajratishni qiyinlashtiradi. Istalgan ma'lum usullardan foydalanib: (vakuum quritish, ultrafiltratsiya va b.q) quruq moddaning miqdorini xoxishga qarab orttirish mumkin.

Eritma yoki suspenziyadagi ferment ektivligini aniqlash. I bo'limda keltirilgan usullarga asosan fermentlarning aktivligi ularning produtsentlariga qarab aniqlanadi. Ekstrakt yoki filtrat bu konsentrlangan ferment eritmasi bo'lib, ularni bir necha marta ajratib olish kerakligini nazarda tutish kerak.

Organik erituvchilar bilan fermentlarni cho'ktirish. Kultural suyuqlikdan olingan eritma yoki filtrat (konsentrat)ni 2-3 °C gacha sovutish kerak. Cho'ktiruvchi (etil spirt, izopropil spirt, atseton) tahminan -5 - 10°C gacha sovutadi. Ushbu ishni o'tkazishda fermentlarning to'liq cho'kishiga cho'ktiruvchilar, elektrolitlar, ferment eritmasining pH i, cho'ktiruvchi va ferment eritmasining harorati, ferment bilan cho'ktiruvchi kontaktining davomiyligi va b.q.larning ta'sirini o'rganish mumkin.

Faraz qilamiz, ishda α -amilaza va proteaza sintez qilishga qodir bo'lgan mikroskopik zamburug'lar kulturasidan tayyorlangan suvli eritmadan fermentlarni to'liq cho'ktirishga ta'sir qiladigan muhitning pH i va cho'ktiruvchining konsentratsiyasi ta'sirini o'rganish masalasi qo'yilgan bo'lsin. Eritma tarkibida 9% quruq modda bo'ladi, uning pH=5,0 va fermentning aktivligi 20 birlik AC/sm³ va 5 birlik PC/sm³. Cho'ktirish uchun uchta cho'ktiruvchidan foydalanamiz, pH diapozoni 2,5 dan 9,0 gacha bo'ladi. Ushbu konkret masala uchun 9-jadvalda keltirilgan variantlarni taklif qilish mumkin.

Erituvchilarning turi va muhit pH i eritmalaridan fermentlarni cho'ktirishni o'rganish uchun

7.1- jadval

Erituvchi (cho'ktiruvchi)	Ferment va cho'ktiruvchi eritmasi hajmlarining o'zaro nisbati	Ferment eritmasining pH i	Cho'kmada aniqlangan ferment aktivligi
Atseton	1:1,0 1:1,5 1:2,0	5,0	AC, PC
Etil spirti	1:2,0 1:2,5 1:3,5	5,0	AC, PC
Izopropil spirti	1:1,0 1:1,3 1:2,0	5,0	AC, PC

Atseton	1:2,0	2,5 4,0 5,0 6,0 7,5 9,0	AC, PC
Etil spirti	1:3	2,5 4,0 5,0 6,0 7,5 9,0	AC, PC
Izopropil spirti	1:1,3	2,5 4,0 5,0 6,0 7,5 9,0	AC, PC

Cho'ktirishni eng yaxshisi 150-200 sm³ o'lchamli sentrifuga stakanlarida o'tkazish kerak. Cho'ktirish kultural suyuqlikning ekstrakt yoki filtrat (konsentrat)idan 25 sm³ dan olib uchta parallellikda o'tkaziladi. Ikkita namuna cho'kmadagi ferment aktivligini aniqlash uchun ishlatiladi, uchinchi namuna massa bo'yicha preparatning chiqishini aniqlash uchun belgilanadi.

Masalaning birinchi variantidagi eksperimentning o'tkazilish tartibini ko'rib chiqamiz. Dastlab eritma yoki filtrat umumiy hajmidan cho'ktirishdan oldin 30-50 sm³ miqdorda o'rtacha namuna ajratib olinadi. Uning tarkibidagi quruq modda miqdori va ferment faolligi aniqlanadi.

Cho'ktirish uchun 9 ta sentrifuga stakanlari olinadi, ularni belgilab chiqiladi, uchta sentrifuga stakani aniqlik bilan yuzgacha ko'tariladi. Barcha 9 ta sentrifuga stakanlariga 25 sm³ dan sovutilgan ferment eritmasidan quyiladi. Keyin kimyoviy stakanlarga nozik shisha tayoqcha bo'ylab kerakli miqdordagi cho'ktiruvchi (birinchi variantda atseton) quyiladi: 3 ta stakanga 25 sm³ dan, boshqa 3 tasiga 37,5 sm³ dan, keyingi 3 tasiga 50 sm³ dan. Cho'ktirishning har bir variantida bitta muallaq stakan bo'lishi kerak. Cho'ktiruvchi solingan kimyoviy stakanlar aniq ketma ketliklar asosida bevosita sentrifuga stakanlari bilan shtativga o'rnatiladi. Keyin ketma –ket tayoqcha bilan aralastirib cho'ktiruvchi asta sekin ferment eritmasi solingan sentrifuga stakaniga quyiladi. Tayoqchani ohirgi 2-3 sm³ erituvchi bilan yuviladi, shundan keyin sentrifuga stakanlari rotor uyasiga o'rnatiladi. Sentrifugalash 5 daqiqa davomida rotorning 8000-10000 min⁻¹ aylanish chastotasida olib boriladi. Keyin sentrifuga o'chiriladi va rotor to'liq o'chgandan keyin stakanlar olinadi. Cho'kmaning ustidagi suyuqlik dekantirlanadi. Stakan ichidagi massasi aniq moddalar doimiy massagacha 105°C da 3-4 soat quritishga qo'yiladi va quruq moddaga nisbatan cho'kmaning miqdori aniqlanadi. Boshqa

ikkita namunalarda parallel hisoblanadi va ulardagi ferment aktivligi, uglevodlar, oqsillar, zollar miqdori aniqlanadi.

Qayta hisob kitoblarni oldini olish uchun har bir sentrifuga stakani ichidagi moddalar ehtiyotkorlik bilan juda kam miqdordagi suv bilan intensiv aralashtirish va eritish yo'li bilan 25 sm³ li o'lchov kolbasida yuviladi, ya'ni eritilgan cho'kmaning hajmi cho'ktirishga qo'yilgan dastlabki ferment eritmasining hajmiga aniq teng bo'lishi kerak.

Agar cho'kmadagi va cho'kma ustidagi suyuqlikdagi ferment miqdorini aniq hisoblash talab etilayotgan bo'lsa, eksperiment yanayam qiyinlashadi. Bunda cho'kma usti suyuqligini dekantatsiya qilgandan so'ng cho'kмага shu konsentratsiyadagi ushbu tajriba uchun qabul qilingan cho'ktiruvchi qo'shiladi, cho'kma bilan cho'ktiruvchi aralashtiriladi va yana sentrifuga qilinadi, shu tariqa 2-3 marta takrorlanadi. Barcha bitta stakandan yuvilgan aralashmalar birinchi cho'kma usti suyuqligi bilan birlashtiriladi.

Agar o'rganilayotgan ferment juda labil bo'lsa, uni sentrifugada sovutish yo'li bilan analiz qilishga va muzlagan hammomga tushirilgan idishdagi barcha manipulyatsiyalarda ushlab turishga to'g'ri keladi.

Ferment cho'kish darajasiga eritma muhiti pH kattaligining ta'sirini o'rganishda odatda ammiak bilan (10%li eritmasi bilan) ishqoriy qilinadi yoki sulfat kislota bilan (6 %li eritmasi bilan) nordonlashtiriladi, pH kattaligi uchun nazorat potensiometr bilan o'tkaziladi. Shunday qilib hajm o'zgaradi, titrlash 75 sm³ ferment eritmasi bilan darhol o'tkaziladi va hajm pH zarur qiymatga yetgandan keyin 100 sm³ gacha yetadi. Bu ayirma (75 sm³ dastlabki eritmadan 100 sm³ gacha) balansli hisob kitoblarda hisobga olinadi.

Olingan qoldiq analizi. sentrifugalangan namunalarni (25sm³) doimiy massagacha quritishdan keyin olingan qoldiq massasini eritma bilan sentrifuga stakanlarining massalari farqi bo'yicha ikkita parallel namunalarda fermentlarni cho'ktirishgacha va cho'ktirishdan keyin va quritgandan keyin aniqlanadi. Olingan kattalikni 100 sm³ da qayta hisoblab preparatning unumini topamiz.

Dastlabki eritmadagi quruq modda miqdorini bilgan holda uni 100% da qabul qilib, dastlabki quruq moddadan preparatning unumini foizlarda hisoblab topish mumkin. Cho'kmaning unumini aniqlagandan keyin zarur bo'lganda zollikni aniqlash uchun ishlatilishi mumkin.

Fermentlar aktivligi dastlabki eritmani cho'ktirishdan oldin o'tkazilgan usullar va ayirmalar bilan cho'kma eritmalarida aniqlanadi.

Eritmadagi oqsilning miqdorini asosan Louri usulida aniqlanadi, yoki Yaroshning biuretli mikrometodi bilan, yoki analizga namunaning kam miqdorini talab qiladigan boshqa qandaydir usul bilan aniqlash mumkin.

Uglevodlar miqdorini eritmani 2% li xlorid kislotasi bilan 2-2,5 soat mobaynida dastlabki gidroliz qilingandan keyin istalgan ma'lum metodlar bilan aniqlash mumkin bo'lgan redutsirlovchi moddalar to'planishiga qarab aniqlanadi.

Cho'kmaning zollik darajasini aniqlash uchun cho'kmaning astoydil aralashtirilgan suspenziyasi olinadi (cho'kma qismlari cho'ktirishdan keyin erimaydi), tahminan doimiy massagacha quritilgan namunani tigelga qo'yiladi. Agar zollik darajasini aniqlash uchun quritilgan cho'kma olinadigan bo'lsa (bu

qulayroq), u holda analiz uchun olingan tortmani aniq bilish kerak. Zollikni aniqlash mufel pechida oddiy qizdirish usuli bilan olib boriladi.

Ushbu ish bo'yicha kuzatishlar bayonnomasi quyidagi ko'rinishga ega bo'ladi:

Ferment produtsentining nomi _____

Ferment eritmasini olish usuli _____

Ferment eritmasidagi quruq moddaning miqdori _____ %

Ferment eritmasining pH i _____

Filtrat yoki ekstraktdagi ferment aktivligi _____

Kultural suyuqlik _____ bir./g

Dastlabki eritmaning pH i	Dastlabki eritmadagi quruq moddaning miqdori		Cho'kmaning xarakteristikasi		
			Quruq moddaning miqdori		
	% da	25sm ³ dagi g da	25sm ³ dagi g larda	4 -grafadagi natijalardan hajmlarda	100 sm ³ dastlabki eritmadagi % larda

Cho'kmaning xarakteristikasi

Fermentning aktivligi					Fermentning aktivligining unumi, %
Dastlabki eritmaning 1 sm ³ dagi FA birligi	25 sm ³ dagi FA birligi yig'indisi	Cho'kmadagi FA birligi yig'indisi	Cho'kmaning 1 g quruq moddasidagi FA birligi	1 mg oqsildagi FA birligi	

Cho'ktirish o'tkazish metodikasi hajmlar va bo'linmalarni aniqlashda barcha ishtirok etuvchilarni ko'rsatish bilan iloji boricha batafsilroq yozib qo'yiladi.

Agar cho'kma usti suyuqligini analiz qilish zarur bo'lsa, dastlab 28-30°C dan yuqori bo'lmagan haroratda vakuum-quritish shkafida yoki ventilyator ostida erituvchi yo'qotiladi va shundan keyin barcha bo'linmalarni hisoblab analiz o'tkaziladi.

Shuningdek bayonnomada preparatdagi uglevodlar, oqsillar va zollar miqdorini ko'rsatish kerak.

Aralashmadagi erituvchining dastlabki kattaliklari va konsentratsiyalaridan cho'kmadagi ferment aktivligi unumini foizlardagi grafik ko'rinishini hamda cho'kma massasi unumining ham grafik ko'rinishini tuzish mumkin.

To'liq cho'kish jarayoniga pH ta'sirini o'rganish jarayonida preparat va ferment aktivligi unumining pH kattaligiga bog'liqligi quriladi.

I z o h. yuqorida aytilganlarning hammasi bir marta takrorlangan tajribalarga taalluqli. Biroq faqatgina qandaydir g'oyat muhim holatlar bir marta takrorlanganlikda tajribaning o'tkazilishini to'g'ri ekanligini tasdiqlashi mumkin. Majburiy qoidalar kabi tajribani 3 marta (ba'zan ikki marta) va undan ham ko'proq

takrorlab o'tkazish qabul qilingan. Bu esa o'zgaruvchan parametrlarning o'rtacha arifmetik qiymatlarini hisoblashga, qo'pol xatoliklar mavjudligida ishonishga, olingan qiymatlarning ishonchli xatoliklarini hisoblashga imkon beradi (1 – p. 1- ilova). Ushbu ishning tajribalarining katta hajmi sababli 2 ta mashg'ulotda o'tkazilishi mumkin, lekin analiz obektlari ferment stabiligi va ulardagi aktivlikni saqlashga mo'ljallangan kafolatlangan saqlash sharoitlari bilan ta'minlanishi kerak.

FERMENTLARNI TUZLAR BILAN CHO'KTIRISH

Tuzlash obekti sifatida turli ferment produtsentlarining kultural suyuqliklarining konsentrati yoki filtrati hamda mikroorganizmlar 7-10%li quruq modda tutgan yuza kulturalarining ekstraktlari bo'lishi mumkin.

Ish quyidagi operatsiyalardan iborat:

- Tadqiqot obektini tayyorlash;
- Fermentlarni tuzlar bilan cho'ktirish;
- Preparatlarning analizi.

Tadqiqot obektini tayyorlash. Ushbu laboratoriya ishida tuzlash jarayoni ammoniy sulfatli *Endomycopsis fibuliger* chuqur kulturasidan olingan amilolitik ferment komplekslarining cho'kishi misolida ko'rib chiqiladi.

Ushbu achitqiga o'xshash organizm chuqur o'stirilganda α -amilaza, glyukoamilaza va glikoziltransferaza fermentlar kompleksini hosil qiladi. Ushbu kulturadan olingan preparatlarning keyinchalik qo'llanilishi uchun ulardagi glikoziltransferazalarning bo'lmasligi yaxshiroq bo'ladi. Adabiyotlardan ma'lumki, ammoniy sulfatning konsentratsiyasi aniq bo'lganda u bilan tuzlash ferment komplekslarining fraksiyalarga ajralishi kuzatiladi va asosan glyukoamilaza unga bog'liq bo'lgan glikoziltransferazasiz cho'kmaga tushadi.

Endomycopsis fibuliger kultural suyuqligi konsentratdagi quruq modda miqdori 5-7% bo'lguncha ultrafiltratsiya usuli bilan konsentrlanadi. Bu konsentratdagi quruq moddaning miqdori (refraktometrik usulda), pH (potensiometrik usulda), α - glyukoamilaza va glikoziltransferazalar aktivligi oqsilning miqdori aniqlanadi.

Olingan natijalar kuzatishlar bayonnomasiga kiritiladi. 1 sm³ konsentratdagi, 1 g quruq moddadagi va 1 mg oqsildagi fermentlarning aktivligi hisoblanadi.

Fermentlarni tuzlar bilan cho'ktirish. Bu ishni bajarishda masalaning quyidagi variantlarini taklif qilish mumkin.

I – fermentlarning cho'kishiga, ularning fraksiyalanishiga va ballastlardan qisman halos bo'lishiga ammoniy sulfat konsentratsiyasining ta'sirini o'rganish (tuzning konsentratsiyasi 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 va 100% li) ;

II – tuzning aniq konsentratsiyalarida to'liq cho'kishga ferment eritmasi pH ining ta'sirini o'rganish (pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9);

III – ferment eritmasidagi quruq modda konsentratsiyasining cho'kish jarayoniga ta'sirini o'rganish (QM konsentratsiyasi 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0%);

IV – fermentlarning to'liq cho'kishiga harorat va tuzlash jarayoni davomiyligining ta'sirini o'rganish (harorat 5, 20 va 35°C, tuzlash davomiyligi 0,25; 1,0; 2,0 soat).

I variant misolida ishning bajarilish tartibini ko'rib chiqamiz. Har bir tajriba uchta parallel namunalarda o'tkaziladi, ulardan biri preparat massasini (unumini) aniqlash uchun, qolgan ikkitasi esa preparatdagi qolgan barcha ko'rsatkichlarni aniqlash uchun mo'ljallangan.

Cho'ktirish butun guruh talabalari bilan birgalikda kultural suyuqlikning bitta konsentrati yoki filtratidan foydalanib o'tkaziladi. Cho'ktirish rejimi aniq yozib olinadi (misol uchun harorat 20°C, tuzlash davomiyligi 1 soat, tutib turilishi 30 daqiqa, cho'kma 20 daqiqa davomida 8000 ayl/min chastotali sentrifugada ajratiladi va b.q).

Cho'ktirish 50 sm³ ferment eritmasidan olib boriladi. Cho'ktirishni oson kuzatish uchun tuzlashni maqsadga muvofiq holda 150 sm³ shisha stakanlarda olib boriladi.

Ammoniy sulfat solishdan avval uni hovonchada yaxshilab maydalanadi, teshikchalarining o'lchami 0,1 mm ipak elak orqali elanadi va bug'latuvchi kosachalarda o'ntagacha aniqlikda texnik tarozilarda tortiladi.

Har bir stakanga Mor pipetkasi bilan 50 sm³ dan 20°C haroratli ferment eritmasi solinadi. Shu yerga uchida rezinasi bor nozik shisha tayoqchani ham tushiriladi. Tuz doimiy aralashtirib turilganda ferment eritmasiga juda kichik porsiyalarda juda sekin kiradi. Tuzning keyingi porsiyasini eritmaga faqat oldingi porsiya erigandan keyingina kiritiladi. Hamma tuz solib bo'lingandan so'ng uning qoldiqlarini bug'latish kosachasidan u solingan eritma bilan yuvish mumkin. Keyin stakan bir muddat o'z holicha qoldiriladi. Kam singdirilgan holatlarda maqsadga muvofiq ma'lum muddat sovutgichga qo'yiladi.

Cho'kma hosil bo'lganda uni sentrifugalash yo'li bilan ajratib olinadi, bitta sentrifuga stakanining ichidagi moddalari cho'kma usti suyuqligini dekantatsiyasidan keyin 5-10sm³ 50% li etil spirti bilan tahminan byuksning doimiy massagacha yetkazilishi o'kaziladi (spirt quritish jarayonini tezlatish uchun solinadi) va qoldiq vakuum – quritish shkafida yoki oddiy quritish shkafida 105°C da doimiy massagacha quritiladi.

Boshqa ikkita namunalar sentrifuga stakaniga o'tkaziladi va sentrifuga qilinadi, suyuqlik dekantatsiya qilinadi, qoldiq distillangan suv bilan yoki mos keluvchi bufer bilan 50 sm³ li o'lchov kolbasiga (dastlabki hajm) o'tkaziladi. Olingan eritmalar analiz uchun dastlabki material hisoblanadi.

Preparatlar analizi. Odatda bunday tajribalarda olingan namunalarni quritish qabul qilinmagan, chunki quritishda fermentning qo'shimcha inaktivatsiyasi bo'lishi mumkin, natijada tuzlashning umumiy ko'rinishi buziladi. Shuning uchun yuqorida aytilganidek, cho'kma dekantatsiyadan keyin darhol eritiladi va hajmi tuzlashdan oldingi dastlabki ferment eritmasi hajmiga, ya'ni 50 sm³ ga yetkaziladi. Odatda cho'kma oqsilning qisman denaturatsiyasi sababli ohirigacha erimaydi va shuning uchun qoldiqdagi oqsil, uglevodlar, zollar va b.q larning miqdorini aniqlash uchun namuna tanlashda kolbaning ichidagi narsalar yaxshilab aralashtiriladi.

Filtratdagi fermentlarning aktivligi umumiy analiz uchun namunalar tanlagandan keyin aniqlanadi. Preparatlarni analiz qilish metodikasini I bo'limdan

tanlash mumkin. Barcha olingan tadqiqot natijalari kuzatishlar bayonnomasiga kiritiladi va statistik ishlanadi.

Bayonnoma quyidagi ko'rinishga ega bo'ladi:

Ferment produtsenti _____

Cho'ktiruvchi _____

Dastlabki ferment eritmasidagi quruq moddaning miqdori _____

Dastlabki eritmadagi _____ birlik/ sm³ , quruq moddadagi _____ birlik/g, oqsildagi _____ birlik/mg fermentning aktivligi

cho'kmaning unumi		eritmadagi eritma quruq moddasidan, %	Dastlabki eritmadagi Σ FA bir.	Butun preparatdagi Σ FA bir.	Cho'kmaga o'tadigan aktiv ferment miqdori,	Preparatning xarakteristikasi				
dastlabki eritmaning 100	100					aktivlik		Tarkibi, %		
						Bir.FA/g	Oqsilning FA/mg birligi	Oqsil	Uglevod	Zollar

Tuzlash jarayonini o'tkazish metodikasi hajmlar va bo'linmalarni aniqlashda barcha ishtirok etuvchilarni ko'rsatish bilan iloji boricha batafsilroq yozib qo'yiladi.

8-LABORATORIYA ISHI

MAVZU: FERMENTLARNING BA`ZI BIR XUSUSIYATLARINI O`RGANISH(IONALMASHINISH XROMATOGRAFIYASI, OQSILLAR VA FERMENTLAR DISK-EKSTRAVAREZI).

Ishdan maqsad: Ionalmashinish xromatografiyasi, oqsillar va fermentlar disk-ekstravarezi jarayonlari orqali fermentlarning ba`zi bir xususiyatlarini o'rganish.

Kerakli asbob va materiallar: Ionalmashinish xromatografiyasi uskunasi, poliakrilamidli gelda disk-elektroforez olib borish qurilmasi, oqsillar.

Ishning nazariy asoslari:

Oqsillarni ionoalmashuv xromatografiyasi.

Ionalmashuv xromatografiya 2 ta operatsiyani bajarishga asoslangan: Tekshirilayotgan ionlarni almashinishlarini bog'lash va ularni keyingi differensial elyuironlash buni natijasida bu ionlarni parchalanishiga erishiladi. Birinchi

jarayon tekshirilayotgan bog'larni alashinuvchi bilan maksimal ta'sirlashuvuni ta'minlovchi sharoitga o'tkaziladi.

Odatda bunday holatga erishish uchun eritmani past ion kuchi va shunday pH kattaligi zarurki, u tekshirilayotgan aralashma komponentlarini maksimal ionlashuviga ta'sir qilsin.

Almashinuvchidagi oqsillarni saralash asosan elektrostatik kuchlar orqali aniqlanadi, shuning uchun almashinuvchini va sorbsiyalash sharoitini tanlashda hal qiluvchi qiymat zaryad kattaligi, pH va eritmani ion kuchi hisoblanadi. Kuchsiz buffer eritmalarda eritmani pH ni beruvchioqsilni izoelektrik nuqtasidan foydalanish lozim.

Turli yuqorimolekulyar oqsillarni fraksiyalash uchun ishlatiladigan xromotografik usulni intensiv qo'llanilishi selyulozali ionalmashinuvchilarni biokimyo amaliyotiga kiritilishidan boshlangan, keyinroq esa sefads polimerlarini ionalmashinuvchilarini.

Oqsillarni amfoterligi ionalmashinuvchi jarayonlarni bir qator xususiyatlarini yoritadi, xususan anionalmashinuvchi va kationalmashinuvchi xromatografiya o'tkazish imkonini beradi. Anionitlarni keng oqsillarni bir qismini kuchsiz nordon elektrolitlar tashkil etishi bilan ifodalanadi. Ular neytral muhitda o'zini anionlar kabi tutadi.

Agar oqsilni ionogen guruhini- OOC-R-NH_3^+ deb belgilasak, unda uni anionit bilan almashinishi reaksiyasi quydagicha yoziladi:



Oksillarni anionalmashinuvchilarga xromotografilsida elyuirlangan eritma pH ni izoelektrik nuqtadan oshiq bo'lmasligi lozim. Ikki xolatda xam oksilni qayta zaryadlash lozim bo'ladi. Natijada oksilli molekula almashinuvchini zaryad belgisini oladi va ular orasida elektr qarshilik kuchlari paydo bo'ladi.

Mazkur ishni maqsadi bo'lib kompleks ferment preparatini fraksiyalash va uni keyingi tekshirish. Ish ikki mashg'ulotda olib boriladi.

Ishni bajarish tartibi:

Birinchi mashg'ulot

Birinchi mashg'ulotda talaba quyidagi jarayonlarni amalga oshiradi:

-mos keluvchi ionalmashinuvchini tanlaydi;

-ionalmashinuvchini tayyorlaydi;

-kalonkalarni tayyorlab ionitni kiritadi;

1.Mos keluvchi ionalmashinuvchini tanlash. Oksillarni absorbsion xromotografiyasida xam anionli, xam kationalmashinuvchilar ishlatilishi mumkin. Oksilli molekulani summarli zaryadi bo'lib pH funksiyasi xisoblanadi. Izotermik nuqtadan pastda oqsil (+) summarli zaryadga ega va kationalmashinuvchi bilan adsorbsiyalanadi. Bunday xolatda ionalmashinuvchini tanlash tekshirilayotgan oksilni pH stabillik zonasidan belgilanadi.

Agarda oksilni izoelektrik nuqtasi haqida ma'lumot bo'lmasa unda dastlabki tajribalar olib boriladi. Anionalmashinuvchini dastlabki tajribasida pH 8,0 bufer tayyorlanadi, kationalmashinuvchi uchun esa- pH 5,0. Xar bir ionalmashinuvchiga

aloxida probirkalarda 0,5 gr dan tortilib, 0,1 M mos keluvchi buferdan 30 sm³ dan qo'shiladi. Ionalmashinuvchini yuvish orqali massa bir xil taqsimlanadi. Ionalmashinuvchi cho'ktiriladi va superkantakt shunday to'kiladiki bunda ionalmashinuvchi egallab turgan xajmi 10 sm³ ga teng bo'lsin. Xar bir ionalmashinuvchiga teng miqdorda ferment eritmasdan qo'shiladi.

Ferment eritmasi ionalmashinuvchi bilan kantaktga kiritishi uchun suspensiya aralashtiriladi. Cho'ktirilib superkantakt ajratilib olinib unda tekshirilayotgan fermentni faolligi aniqlanadi. Superkantaktidagi faollikni mavjudmasligi faol oksilni ionalmashinuvchi tamonidan adsorbsiyalanganligidan dalolat beradi.

2. Ionalmashinuvchini tayorlash.

Ionalmashinuvchini qanday xolatda bo'lishidan qat'iy nazar, uni birinchi qo'llaganda kislota va miqdor bilan tozalash lozim. Bu orqali regeneratsiya ta'minlanadi, og'ir metallarni izlari yo'qotiladi, va kerakli forma olinadi. Selulozali yoki denstranli materiallar bilan ishlashda kislota yoki ishqorlarni konsentratsiyasi 0,5 normadan oshmasligi va kontakt davomiyligi ikki soatdan oshmasligi lozim.

Oldin almashinuvchi na'munasi distirlangan suvda yoki kuchsiz buferda – shishish uchun suspenziyalanadi.

Selyulozalangan kukun va granulalangan selyuloza xolatida shishirishning mahsus pog'onasi tushirilgan va unlash jarayoni bilan birlashtirilgan bo'lishi mumkin.

Selyulozali anionitlar uchun kuchsiz buferga (0,005-0,01 M, pH 7,0) bir necha soat shishirilgandan so'ng ionalmashinuvchini toza buffer portsiyasiga suspenziyalash tavsiya etiladi.

(1 g quruq kukun 30 sm³ eritmaga). Agar tahlil uchun oldinginam ion almashinuvchi ishlatilsa unda 1 massaga 6 sm³ eritma yetarli bo'ladi. Merkali silindrda suspenziya yaxshilab aralashtiriladi va tindirishga qoldiriladi.

Bo'kkan va elangan dekstran yoki sellyulozali ionalmashgich (yoki quruq sellyuloza kukuni) 15 hajm kislota yoki ishqor (0,5 n) da suspenziyalanadi va xona haroratida 30-60 min qoldiriladi. Bu keyingi bosqichlarda keskin aralashtirishdan qochish kerak. Cho'kma ustidagi suyuqlik to'kiladi yoki filtrlanadi, cho'kma distillangan suv bilan kislotadan yuvishda muhit reaksiyasi kuchsiz kislotali (pH 4,0) yoki ishqordan yuvishda kuchsiz ishqoriy muhitgacha (pH 8,0) yuviladi. Yuvilgan cho'kma yana 15 hajm 0,5 n li ishqor (keyinchalik kislota bilan ishlanganda) yoki 0,5 n li kislota eritmasi (keyinchalik ishqor bilan ishlanganda) suspenziyalanadi. 30 minut inkubatsiyadan keyin cho'kma ustidagi suyuqlik to'kiladi va cho'kma yuvmasdan kerakli qarshi ion bilan almashtirishni to'liq ta'minlash uchun aynan shu eritma quyiladi. Keyin material filtrda distillangan suv bilan neytral reaksiyagacha yuviladi.

Regeneratsiyalangan ion almashgich qisqa yuviladi yoki aksincha bufer eritma bilan yaxshilab yuviladi. Oxirgi operatsiya maxsus "muvozanatlash" termini bilan ifodalanadi. Bufer eritmalar bilan regeneratsiyalashdan keyin ion almashgichlarni yuvish zarurati

tugʻilishiga sabab oqsillarni adsorbsiyalashda va keyin eritma eiyuirlanganda kolonkadagi eritma pHi keskin oʻzgarishi mumkin. Shuning uchun regeneratsiyalangan ionalmashgich kuchsiz bufer eritma bilan yuvilishi kerak. Bu operatsiya qator xolatlarda adsorbsiya vaqtida talab qilingan pH va ion kuchini taʼminlaydi. Kolonkaga kiritilayotgan tajriba eritmasi pHi va ion kuchi ham aynan shu kattalikkacha olib boriladi.

Kolonkalarni tayyorlash va ionitlarni kiritish. Ion almashinuvchi sefadekslar kolonkalarga mos raqamli oddiy sefadekslar kabi suspenziyani dastlabki deaeratsiyalashdan keyin kiritiladi. Bu CO₂ ni bogʻlovchi anionitlar ishlatilganda juda muhim. Bunda deaeratsiyani quyidagicha amalga oshirish tavsiya qilinadi: anionit ishchi buferni kislotali komponentida pH kattaligi 4,5 atrofida boʻlguncha suspenziyalanadi. Suspenziya magnit aralashtirgichli byuxner kolbasiga joylanadi va 15 kPa bosim siyraklashish hosil qilishi mumkin boʻlgan vakuum sistemasiga ulanadi. Soʻrib olish pufaklar chiqishi toʻxtaguncha davom qilinadi. Juda chuqur vakuum boʻlishi maqsadga muvofiq emas, chunki bunda suyuqlik “qaynashi” mumkin. Keyin aralashmaga talab qilingan pH qiymatni olish uchun talab qilingan miqdorda buferni ishqoriy komponenti qoʻshiladi va suspenziya darhol kolonkaga kiritiladi.

Kolonkaga kiritishda kukunsimon sellyuloza materiallari suspenziyasining optimal hajmi elashdan keyin oʻlchov kolbasida choʻkishdan keyingi hajmini 150% ini tashkil qilishi kerak.

Barcha suspenziya kolonkaga kiritilgach u darhol buferni 1 sm² yuzaga 45 sm/soat tezlikda bufer xaydaydigan sistemaga ulanadi, bu esa suyuqlik oqimi boʻlganda choʻkayotgan ion almashgichda konveksion oqimlarni oldini oladi.

Adsorbsiyalangan materialli ion almashgichlarni tuni bilan qoldirish tavsiya qilinmaydi. Shuni esdan chiqarmaslik kerakki, sellyuloza kukunlari nam xolatda bakteriyalar va zamburugʻlarning sellyulolitik fermentlari bilan nisbatan tez parchalanadi. Shuning uchun bufer eritmalar iloji boricha antiseptiklar tutishi kerak.

Sellyuloza va dekstran matritsalarining nisbatan inerligiga qaramasdan davriy ravishda ishqor va kislotalar bilan kontaklashishi regeneratsiya vaqtida mos ravishda glikozid va galaktozid bogʻlarni parchalanashiga moyillik qiladi, bu esa matritsani asta-sekin degradatsiyalanishiga olib keladi. Aralashtirish va resuspenziyalashdagi mexanik omillar ham shunga moyillik qiladi. Natijada preparatda mayda zarrachalar toʻplanib, ular eritmalarini filtrlanishini keskin sekinlashtiradi.

Kolonka toʻldirilgach ion almashgich sirtini himoyalash maqsadida aynan shu buferda erigan sefadeksin G-25 ni 0,5 sm li qatlami kiritish kerak. Ion almashgichning 20 sm balandlikdagi qatlami odatda 1-2 sm qatlamli moddani adsorbsiyalashga etarli boʻladi. Ionalmashgichning talab qilingan sirtidan kelib chiqib diametr tanlanadi.

Ikkinchi mashg'ulot

Ikkinchi mashg'ulotda quyidagi operatsiyalar bajariladi:
taxlil qilinayotgan namunani kiritish va oqsilni elyusiyasi;
fraksiyalarda optik zichlik va fermentativ faollikni aniqlash

Taxlil qilinayotgan namunani kiritish va oqsil elyusiyasi. Taxlil qilinayotgan namuna kolonkaga odatiy usulda kiritiladi.

Ionalmashlagichdan oqsil desorbsiyasi eritmada tuz konsentratsiyasini oshirish yoki eritma pH ini o'zgartirish yo'li bilan malga oshiriladi. Konsentratsiya gradientini yaratishni ikki usuli mavjud: uzluksiz va bosqichli. Gradient hosil qilishni xar bir usuli o'zining kamlichik va afzalliklariga ega va shunga bog'liq ravishda o'zlarining xususiy qo'llanilish sohalari mavjud. Gradient hosil qilishni uzluksiz usuli ko'p qo'llaniladi, analitik usullarda monopol xolatga ega.

Fraksiyalarda optik zichligi va fermentativ faolligini aniqlash. Xar bir fraksiyaning optik zichligi fotokolorimetrda yorug'lik o'tkazishni maksimumi $\lambda=280$ nm bo'lgan svetofiltrda o'lchanadi. Optik zichlik aniqlangandan keyin eritmalar fermentativ faollikni (ikki va undan ko'p fermentlar) aniqlashda ishlatiladi.

Barcha fraksiyalar taxlil qilingandan keyin kuzatishlar protokoli tuziladi, unga ferment preparati tavsifi (uning faolligi, undagi oqsillar, kolonkaga kiritilgan namuna hajmi), kolonkalar (uning diametri va balandligi, ion almashgich turi, elyusiya gradienti va tezligi), olingan fraksiyalar taxlili natijalari (birlik/sm³ dagi faolligi) kiritiladi. Oxirida xromatogramma tuziladi.

Oqsil va fermentlarning disk-elektroforezi

Oqsil va fermentlarning disk-elektroforez usulida ajratish zonal elektroforezning oddiy usullariga nisbatan qator afzalliklarga ega: materialni kam miqdorlarini taxlil qilish imkoni (1-100 mkg); ajratilishi kerak bo'lgan moddalarning suyultirilgan eritmaları bilan ishlash, apparaturaning soddaligi, tez ajratilishi (30—60 min), turli o'lcham va shaklli molekulalar uchun yuqori taxlil xususiyati, ajratishni qayta takrorlash yuqoriligi. Ushbu afzalliklarga bog'liq ravishda usul turli maqsadlarda qo'llaniladi: preparatlar va xromatografik fraksiyalar tozaligini sinashda, eksraksiya, tozalash usullarni baxolashda va h.k.

Disk-elektroforez nafaqat analitik maqsadlarda, balki preparativ ajratishda, shuningdek modda miqdori nano- va pikogrammlarda o'lchangan ultramikroanalitik usullarda ham qo'llaniladi.

Disk-elektroforez tashuvchi sifatida poliakrilamidli gel ishlatiladigan bir jinsli bo'lmagan ajratuvchi sistema ishlatiladigan usul hisoblanadi.

Poliakrilamid gel akrilamid $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ va boshqa biror tikuvchi agent, ko'pincha N'N'-metilenbisakrilamid: $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ sopolimerizatsiyasi mahsuloti bo'ladi. O'sib

borayotgan qo'shni poliakrilamid zanjirlari orasida vinil guruhining polimerlanishi natijasida hosil bo'ladigan ko'ndalang bog'lar tufayli bunday gel strukturasi uch o'lchamli to'r shaklida bo'ladi. Gelning qovushqoqligi, elastikligi va mustahkamligi polimerlanish darajasiga va tikilish darajasiga bog'liq bo'ladi.

Disk-elektroforezda turli tarkibli va turli pH qiymatli buferlar juftlari ishlatiladi, tashuvchi esa g'ovaklar o'lchami bilan farq qiluvchi gelning ayrim qatlamlaridan iborat bo'ladi. Bunga bog'liq ravishda ajralayotgan moddalar juda tor start zonasida to'planadi, bu esa aralashmani yaxshi ajratishda muhim rol o'ynaydi.

Disk-elektroforezning yuqori aniqligi ikkita fizik xodisa: konsentrlash effekti va molekulyar elak effektiga bog'liq bo'ladi. Moddalar aralashmasining eruvchan komponentlarini ajratishda ushbu aralashma dastlab yirik g'ovakli poliakriloamid gelining tor chegarasida to'planadi, keyin mayda g'ovakli qismida molekullar o'lchami, shakli va zaryadiga ko'ra qayt taqsimlanadi.

Disk-elektroforezda odatda ikkita qismdan iborat poliakrilamidli gelning kichik kolonkalaridan foydalaniladi: modda konsentrlanishi sodir bo'ladigan yirik g'ovakli va ushbu moddalar ajratiladigan mayda g'ovakli qismlardan. Disk-elektroforez to'plamiga shuningdek elektrodlar, bufer eritma bilan to'ldirilgan elektrodlar uchun idishlar, va manbalar kiradi.

Elektroforezda fraksiyalanuvchi moddalar bilan bir yo'nalishda harakatlanuvchi va konsentrlash effektini ta'minlovchi ionlarni ikki turga bo'lish mumkin: etakchi va yopuvchi. Ajratish boshida etakchi ionlar kolonkaning barcha qismida, yopuvchilar esa faqat elektrod buferida bo'ladi.

Bufer va konsentrllovchi gel pH qiymati shunday tanlanadiki, bunda ionlar samarali harakatchaligi bo'yicha quyidagi tartibda joylashadi: etakchi ionlar, oqsillar, yopuvchi ionlar. Oqsillar harakatchaligi etakchi ionlar harakatchaligidan biroz past, ammo yopuvchilardan yuqori bo'lganligi sabab, oqsillar oldingi fronti harakatchan chegara bo'ladigan tor zonada konsentrlanadi. Ayrim oqsillar o'z harakatchaligiga mos ravishda kolonkada etakchi va yopuvchi ionlar orasida to'planadilar va bir necha mikron qalinlikli disklar hosil qiladi.

Harakatchan oqsil zona etakchi va yopuvchi ionlar orasiga "kirganda", konsentrllovchi va ajratuvchi gellar orasidagi chegaraga etadi va qo'sh "uzluksizlikni buzilishiga" uchraydi, chunki ajratuvchi gel pH ni va g'ovaklar o'lchamini turlicha qiymatlari bilan xarakterlanadi. Ammo ajratuvchi gel pH qiymati shunday tanlanadiki, bunda yopuvchi ionlar dissotsiatsiyasi bir necha marta ortadi. Natijada yopuvchi ionlar xarakatchaligini ortib etakchi ionlarga yaqinlashadi, shuning uchun ular oqsillardan o'tib etakchi ionlar izidan harakatlanadi. Bunda elektr maydon o'zgarishi sodir bo'ladi, va endi

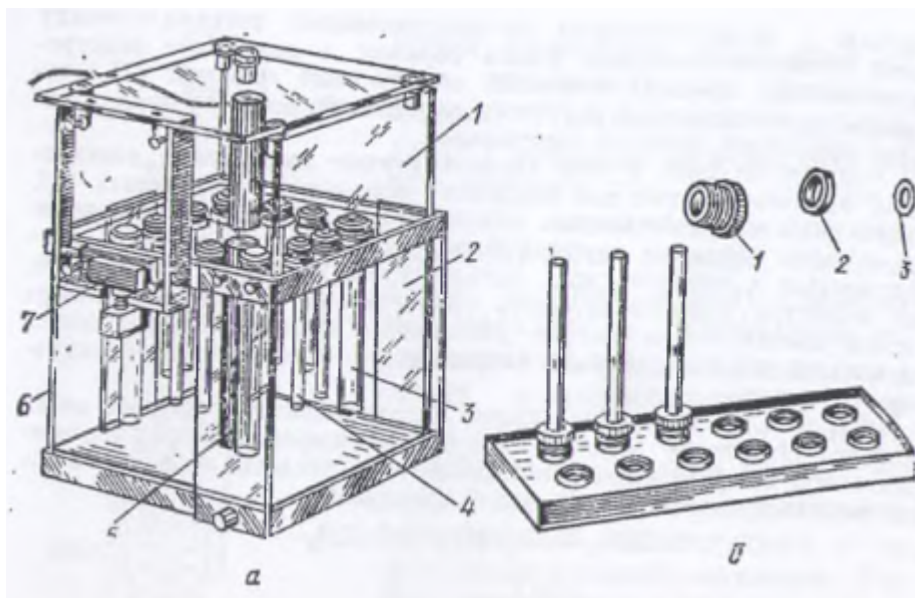
oqsillar maydonni doimiy kuchlanish sohasiga va doimiy pH qiymatiga tomon harakatlanadi; bu erda ular haqiqiy zonal elektroforezga uchraydi va o'z shakli, o'lchami va elektr zaryadi bo'yicha taqsimlanadi. Turli molekulyar massali oqsillarda bir hil harakatchanlikda ham harakatlanish tezligi turlicha bo'ladi va aynan shuning uchun ularni ajratish mumkin bo'ladi.

Shunday qilib, konsentrlash va molekulyar elak effektlarini birlashtirish natijasida disk-elektroforezni yuqori ajratuvchi xususiyatiga ega bo'ladi. Yuqorida aytilganlardan ko'rinib turibdiki, disk-elektroforez yordamida moddalarni ajratishda pH qiymatini e'tiborga olish kerak.

Umumiy prinsip bufer sistema moddalarni eruvchanligi, kimyoviy va biologik barqarorligini o'zgartirmasdan turib maksimal ajratish imkonini ta'minlashi kerakligidan iborat. Konsentrllovchi va ajratuvchi gellarni pH qiymatlarida ajraluvchi moddalar etakchi va yopuvchi ionlar bilan bir xil ishoraga ega bo'lishi kerak. Ajraluvchi moddalar eritmasi pH i shunday tanlanadiki, bunda ular kolonkaga kiritilganda konsentrllovchi gel pH i sezilarli o'zgarishligi kerak. SHuning uchun eritma kiritilishidan oldin pH o'lchanishi va zarur bo'lganda pH qiymati buferning $\pm 0,75$ qismigacha olib kelinishi zarur.

Disk-elektroforez o'tkazish uchun "Reanal" zavodi qurilmasi 71 modeli rasm 18, a da keltirilgan. Qurilmani asosiy qismi oyoqlar yordamida birlashtirilgan elektrod buferlar uchun vertikal joylashgan ikkita kvadrat idishdir. Idishlar o'rtasidagi aylana shaklidagi chuqurlar silindrik elektrod-tutkichlarni mahkamlash uchun xizmat qiladi. Elektrod-tutuvchi yonlarida teshilgan teshiklar elektrodarga bufer satxiga bog'liq bo'lmaslikni ta'minlaydi. Elektrodlar spiral shaklda bo'lib, maxsus qotishmadan tayyorlangan.

Elektroforetik jarayon davomida gellarni quyish va ularni maxkamlash uchun uzunligi 100 va ichki diametri 6 mm bo'lgan shisha naycha 4 va uzunligi 120 hamda ichki diametri 12 mm bo'lgan naycha 3 dan foydalanadilar. Elektroforez vaqtida naychalar yuqori idish asosida joylanadi. Analitik maqsadlarda diametri 100 mm, preparativ maqsadlarda esa 120 mm diametrli naychalar ishlatiladi. Elektroforez davomida qurilma avtomatik o'chirgichga ulangan g'ilof bilan yopiladi. O'chirgich ulaovchi simlar yordamida barqarorlashgan kuchlanishli manbaga ulangan. Ish vaqtida qurilma g'ilofi ochilganda o'chirgich avtomatik tarzda uni manbadan ajratadi.



Rasm 8.1. Poliakrilamidli gelda disk-elektroforez olib borish qurilmasi (model 71):

a — qurilmani umumiy ko‘rinishi (1, 2 — elektrod buferlar uchun idishlar; 3 — 120 mm uzunlikli naychalar; 4 — 100 mm uzunlikli naychalar; 5 — elektrod tutuvchi; 6 — birlashtiruvchi oyoqchalar; 7 — avtomatik o‘chirgichli zichlashtiruvchi sistema; *b* — qurilma naychalari uchun shtativ (1 — qalinlashtiruvchi gayka; 2 — taglik xalqa; 3 — rezina taglik-xalqa.

Qurilmani bir xil o‘lchamli shisha naychalari uchun ikkita quyish shtativlari bo‘lib (rasm 18,b), ular chuqurlikli plastinka shaklida. SHisha naychalar plastinkaga gelni polimerlash vaqtida zichlashtiruvchi sistema yordamida mahkamlanadi.

Ferment preparatni disk-elektroforez yordamida ajratishda talabalar quyidagi operatsiyalarni amalga oshiradi:

Ferment preparatda oqsil miqdorini aniqlaydilar va elektroforez uchun eritma tayyorlaydilar;

Gel va bufer eritma tayyorlaydilar;

Elektroforez olib boradilar;

Oqsil zonalarini bo‘yaydilar;

Oqsil fraksiyalarida fermentativ faollikni aniqlaydilar.

Ferment preparatida oqsil miqdorini aniqlash va elektroforez uchun eritma tayyorlash. Preparatda oqsil miqdori Lourini modifikatsiyalangan usulida aniqlanadi. Ferment preparatida oqsilning foiz miqdori asosidagi ma’lumotlarga ko‘ra taxlil uchun namuna tayyorlanadi. 5% li saxaroza tutgan namunada oqsil miqdori 50-100 mkg bo‘lib, uning hajmi 0,1 sm³ dan oshmasligi kerak.

Gellar va bufer eritma tayyorlash. Gellar va elektrod uchun bufer eritmalar ilova II dagi 8 jadval asosida tayyorlanadi. Odatda 7,5% li poliakrilamidli gel ko‘pgina ferment preparatlarining oqsil komponentlarini elektroforetik ajratish uchun mos keladi. Oqsil kompleksini ajralishini to‘liqligini tekshirish maqsadida akrilamid konsentratsiyasi 3,45-15% bo‘lgan oraliqda nazorat tajribalari olib borish kerak.

Elektroforezni olib borish. Tekshirilayotgan namuna gel sirtiga surkalgandan keyin shisha naychalar elektroforez qurilmasi o'rinlariga joylanadi. YUqori va pastki rezervuarlarga bufer eritma quyiladi, shundan keyin elektrodlar doimiy tok manbaiga ulanadi. Elektroforez tugaganini nazorat naychada bromfenol ko'ki chegarasi naychaning pastki chizig'iga kelishidan aniqlanadi.

Oqsil zonalarini bo'yash. Gel naychadan olinadi va sig'imi 400-600 sm³ bo'lgan enli kimyoviy stakanga o'tkaziladi. Stakanga bo'yoq eritmasi (qora amidli 10 V; brilliant ko'ki protsion RS; brilliant ko'ki kumasi R250) quyiladi. Davriy ravishda aralashtirib turib gel bo'yoqda 0,5 soatdan 2 soatgacha ushlab turiladi. Keyin bo'yoq eritmasi ajratiladi va bo'yoqni mo'l miqdori 7% li sirka kislotasi eritmasi bilan yuviladi. YUvish- uzoq jarayon, u ko'p marta sirka kislotani almashtirishni talab qiladi, ammo ishda densitometrik aniqlash ko'zda tutilmagan bo'lganligi sababli fon to'liq yo'q bo'lishiga erishish shartmas.

Oqsil fraksiyalarida fermentativ faolligikni aniqlash. Tekis sirtida bir biriga parallel qilib bir xil tekshirilayotgan namunali bo'yalgan va bo'yalmagan gel joylanadi. Bo'yalmagan geldan gelning bo'yalgan zonalariga mos keluvchi fragmentlar kesib olinadi. Ayrim bo'laklar mos buferda gomogenizatsiyalanadi, elyuatlarda esa ferment faolligi aniqlanadi.

Ushbu ishni mustaqil ilmiy tadqiqot ishi sifatida bajarishda tajribalarni kamida uchta qaytarishda amalga oshirish kerak, bu esa tajribadagi qo'pol xatoliklarni aniqlash va olingan natijalarni o'rtacha qiymatlarini aniqlash imkonini beradi.

Qo'shimcha topshiriq sifatida elektroforezni optimal sharoitlarini aniqlash masalasi qo'yilishi mumkin. Bunda keyinchalik optimal sharoitlarni izlash bilan boradigan ko'p omilli taxlillarni matematik usullari qo'llaniladi.

Ushbu ish bo'yicha kuzatuvlar bayonnomasi dastlabki fermentativ preparatni oqsilga miqdori fermentlar faolligi va gel sistemasi bo'yicha tavsiflanishini; tekshirilayotgan namunada oqsil hajmi va miqdorini; elektroforez olib borish sharoitlari tavsifini (harorat, tok kuchi, davomiyligi); oqsil fraksiyalari bilan bo'yalgan gel naychasi rasmini; ajratish sxemasini, ayrim fraksiyalarda fermentlar faolligi haqidagi ma'lumotlarni jadval shaklidagi ma'lumotlarni o'z ichiga oladi.

Foydalaniladigan adabiyotlar ro'yxati

Asosiy adabiyotlar

1. Туракулов Ё. Х. "Биохимия", Дарслик.Т.: Ўқитувчи. 1996 й. -496 б.
2. N.A.Хо'jamshukurov, Q.D.Davranov, Oziq-ovqat va ozuqa mahsulotlari biotexnologiyasi. Darslik. Т.:Tafakkur bo'stoni. 2014. 176b.
3. Zikryaev A., Mirxamidova P. Biologik kimyo va molekulyar biologiya. Darslik. Т.:Tafakkur bo'stoni. 2013.-223 b.
4. Рахматов Н.А., Махмудов Т.М., Мирзаев С. Биокимё. Дарслик. -Т.:Таълим, 2009. -528 б.
- 5.И.М.Грачева, Ю.П. Грачев, М.С.Мосичев и др. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. –М.: Легкая и пищевая пром-ст, 1982.-240 с.

