

**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIJ VA O‘RTA MAXSUS TA‘LIM VAZIRLIGI
MIRZO ULUG‘BEK NOMIDAGI
O‘ZBEKISTON MILLIJ UNIVERSITETI**

**Qo‘lyozma huquqida
UDK: 579/578:582.657.24**

MAXKAMOV SARDOR ANVARJONOVICH

**Otquloq o‘simligidan peroksidaza fermentini ajratish, xususiyatlarini
o‘rganish va toza ferment preparatini olish**

5A140102-Mikrobiologiya va virusologiya

Magistr

Akademik darajasini olish uchun yozilgan

DISSERTATSIYA

Ilmiy rahbarlar: b.f.n. Fayziyev V. B.

TOSHKENT-2018

MUNDARIJA

	KIRISH	5
1-BOB.	ADABIYOTLAR SHARHI.....	9
1.1.	Peroksidazaning o‘ziga hos xususiyatlari, klassifikatsiyasi va ta’sir mexanizmi.....	9
1.2.	Peroksidazaning katalitik xususiyatlari va vodorod peroksidining parchalanish mexanizmi.....	16
1.3.	Peroksidazaning spetsifik substrat muammosi.....	25
1.4.	Peroksidazaning o‘simlik kasallanish jarayonidagi va himoya reaksiyasidagi ro‘li.....	34
1.5.	O‘simlik peroksidazasini ajratish va tozalash muammolari.....	36
	I bob bo‘yicha xulosa.....	40
2-BOB.	TADQIQOT MATERIALLARI VA USLUBLARI	41
2.1.	O‘simlik barg to‘qimasidan peroksidaza fermentini ajratish uchun namuna tayyorlash.....	41
2.2.	Peroksidaza fermentini aniqlash uchun substrat tayyorlash.....	42
2.3.	A.N.Boyarkin metodi yordamida o‘simlik peroksidazasi aktivligini o‘rganish.....	42
2.4.	Peroksidaza fermentining temperatura va pH optimumini aniqlash.....	42
2.5.	O‘simlikdagi hujayra devori bilan kuchsiz bog‘langan va eruvchan peroksidaza formasini o‘rganish.....	43
2.6.	Peroksidaza aktivligini fotokolorometrik (FEK) usuli yordamida aniqlash.....	44
2.7.	Virus bilan kasallangan o‘simlikdagi peroksidaza	45

	miqdori o'rganish.....	
2.8.	Otquloq barg to'qimasidan peroksidaza fermentini ajratish va tozalash usullari.....	45
	II bob bo'yicha xulosa.....	47
3-BOB.	OLINGAN NATIJALAR VA ULARNING MUHOKAMASI.....	48
3.1.	Turli yovvoyi o'simliklardan peroksidaza fermentini ajratish va yuqori faolikka ega bo'lgan o'simlik peroksidazasini aniqlash.....	48
3.2.	O'simlikdagi ferment faolligini mavsumga bog'liq holda o'rganish.....	51
3.3.	Otquloq peroksidazasining temperatura optimumini aniqlash.....	53
3.4.	Otquloq peroksidazasining pH optimumini aniqlash.....	54
3.5.	Peroksidazaning hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan va eruvchan formasini o'rganish.....	55
3.6.	Virus bilan kasallangan o'simlikdagi ferment miqdorini aniqlash.....	57
3.7.	Peroksidazani gelfiltratsiya usuli yordamida elektroforetik gomogen holatigacha tozalash.....	58
	III bob bo'yicha xulosa.....	68
	Yakunlovchi qism.....	69
	Xulosalar.....	71
	Foydalanilgan adabiyotlar ro'yxati.....	72

QISQARTMA SO‘ZLAR

1. HRP- Horseradish peroxidase
2. LIP- Ligninperoksidaza
3. MnP- marganesperoksidaza
4. IAA- Indonil 3-uksus kislotalari
5. BHA- Benzigidroksam kislotalari
6. ABTS- 2,2'-azino- bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) ammoniy
7. His- gistidin
8. Arg-arginin
9. Ala- alanin
10. Glu- glutamine
11. Asn- asparagin
12. Trp- triptofan
13. EDTA- etilendiamintetraatsetat
14. PAAG- poliakrilamidgel

KIRISH

Dissertatsiya mavzusining dolzarbligi. Tirik organizmlarda kechadigan asosiy biokimyoviy jarayonlar, jumladan nafas olish, oziqlanish kabi qator jarayonlar fermentlar ishtirokida amalga oshadi. Bu fermentlar qatoriga oʻsimliklarda uchraydigan peroksidaza fermentini keltirish mumkin boʻlib, bu ferment oʻsimlik hujayrasida oksidlanish-qaytarilish jarayonlarini boshqaradi. Soʻngi yillarda turli qishloq xoʻjaligi, meditsina, veterinariyada kasalik keltirib chiqaruvchi patogenlarni aniqlashda tezkor va aniqligi yuqori boʻlgan usullarni qoʻllab ularni diagnostika qilish bugungi kunda juda muhim masalalardan biri hisoblanadi. Bunday tezkor biosensorga immunologik usullardan biri boʻlgan immunoferment analiz kabi usullarni kiritish mumkin.

Bu usulning asosini aniqlanayotgan patogenga tayyorlangan antitana (AT) va unga immobillangan ferment tashkil etadi. AT ga imobillangan fermentning stabilligi, arzonligi va bir qator xususiyatlari mavjudki bu diagnostikumlar narxini belgilab beradi.

Soʻnggi yillarda butun dunyoda keng qoʻllanilayotgan fermentlardan biri bu - peroksidaza fermenti hisoblanadi. Peroksidaza - juda koʻp tarqalgan ferment oqsillaridan biri boʻlib, uni oʻrganishga boʻlgan qiziqish yillar oʻtsa ham susaygani yoʻq. Bu fermentni oʻsimlik va hayvonlarning toʻqimalarida, shuningdek zamburugʻlar va bakteriyalarning tarkibida mavjudligi uni yuqori va quyi organizmlarning muhim birikmasi deb hisoblashga asos yaratadi. Dunyo bozorida 1 gr toza ferment 2 ming AQSh \$ ni tashkil etadi.

Mamlakatimizda esa bugungi kunda ham bu fermentni boshqa davlatlardan import qilinishi, bu fermentni oʻzimizda ajratish, hususiyatlarini oʻrganish, toza preparatini olish bugungi kunning dolzarb masalaridan biri hisoblanadi. Ayniqsa mamlakatimizning turli iqlim sharoitida oʻsuvchi turli oʻsimliklardagi peroksidazaning izofermentlarini oʻrganish juda muhim hisoblanadi. Bir qator mualliflarning maʼlumotiga qaraganda bu ferment stress fermenti boʻlib, ayniqsa turli ekstremal sharoitda (qurgʻoqchil va shoʻrlangan tuproqlarda) oʻsuvchi oʻsimliklarda, turli fitopatogenlar bilan kasallangan

o‘simliklarda bu fermentning miqdori sog‘lom o‘simliklarga nisbatan bir necha baravar oshib ketishi ko‘pgina adabiyotlarda keltirib o‘tilgan [35,42].

Bugungi kungacha bu ferment zamburug‘lardan *Aspergillus* avlodiga qarashli *Aspergillus niger* va boshqa bir qator zamburug‘lardan hamda xren (*Armorasia rusticana*) o‘simlikligidan ajratib olingan va amaliyotda asosan xren peroksidazasi ko‘p ishlatiladi. Xren peroksidazasi o‘zining stabilligi, substratga nisbatan juda yuqori aktivlikka ega bo‘lishi bilan alohida ajralib turadi.

Peroksidaza olishning zamonaviy texnologiyasi ko‘p mehnat talab qiladi va kam mahsulot beruvchi, mavsumiy xomashyo qo‘llanilishida qimmat turuvchi xorijiy xromotografik sorbentlar qo‘llanilishi bilan bog‘liq. Bu esa o‘z navbatida ferment yuqori qiymatga tushishiga olib keladi. Shu sababli peroksidazaning yangi o‘simlik manbalarini va uni ajratib olish usullarini izlashni taqozo etadi. Shunday ekan, mamlakatimizning turli iqlim sharoitida o‘sovchi turli Otquloq (*Rumex crispus*) o‘simligidan peroksidaza fermentini ajratish va uning xususiyatlarini o‘rganish hamda toza preparatini olish yo‘llarini ishlab chiqish dolzarb masalalardan biri hisoblanadi. Shuning uchun ushbu magistrlik dissertatsiyasida quyidagi maqsadni amalga oshirish belgilab olindi.

Tadqiqotning obekti va predmeti:

Obekt - O‘zbekiston iqlimi sharoitida tabiiy holda o‘sovchi otquloq (*Rumex crispus*) o‘simligi

Predmet – o‘simlik barg to‘qimasidan ajratib olingan va turli fizik-kimyoviy hususiyatlari o‘rganilgan peroksidaza ferementi

Tadqiqotning maqsadi: Ushbu ishning maqsadi Otquloq (*Rumex crispus*) o‘simligidan peroksidaza fermentini yuqori faollikga ega bo‘lgan preparatini ajratib olish, tozalash va xossalarini o‘rganish belgilangan.

Ishning vazifalari: qo‘yilgan maqsadga mos ravishda quyidagi vazifalar belgilab olindi:

1. Otquloq o'simligining barg to'qimasidan peroksidaza fermentini ajratish va faolligini aniqlash;
2. Virus bilan kasallangan va sog'lom o'simlikdagi peroksidaza miqdorini aniqlash.
3. Peroksidazani asosiy fizikaviy-kimyoviy va katalitik xossalarini o'rganish;
4. Peroksidazani gelfiltratsiya usuli yordamida elektroforetik gomogen holatigacha tozalash;

Tadqiqotning ilmiy yangiligi. Ushbu magistrlik ishida ilk marta O'zbekiston iqlimi sharoitida tabiiy holda o'suvchi, turli yovvoyi: yirik bargli zubtuum (*Plantago major*), otquloq (*Rumex crispus*), yer qalampiri (*Armoracia rusticana*) va oq sho'ra (*Chenopodium album*) o'simliklarini skrining qilish yo'li bilan yuqori peroksidaza aktivligiga ega bo'lgan o'simlik peroksidazasi aniqlandi va bir qancha xususiyatlari o'rganildi. Otquloq (*Rumex crispus*) o'simligidan ajratilgan peroksidaza fermenti gelfiltratsiya usuli yordamida tozalandi va aktivligi o'rganildi.

Mavzu bo'yicha qisqacha adabiyotlar taxlili. Bu fermentning mavjudligi haqidagi dastlabki ma'lumotlar 1855 yillarda, Shenbeyn bir qator organik moddalarning o'simlik va hayvonlardan ajratilgan ekstrakt hamda vadorod peroksidi bilan qo'shib solinishi natijasida parchalanishini kuzatgan paytdan paydo bo'lgan. Bu fermentga «peroksidaza» nomini Linoze bergan bo'lib, u birinchilardan bo'lib «oksidaza» va «peroksidaza» orasidagi farqni tavsiflab bergan. Bugungi kungacha bu ferment zamburug'lardan *Aspergillus* avlodiga *Aspergillus niger* va bir qator zamburug'lardan hamda xren o'simlikligidan ajratib olingan va amaliyotda asosan xren peroksidazasi ko'p ishlatiladi [5].

Tadqiqotda qo'llanilgan uslublarning qisqacha tavsifi.

Tadqiqotda umumiy qabul qilingan mikrobiologik, biokimyoviy va biotexnologik usullardan foydalanildi.

Ishning tuzilishi va xajmi.

Ushbu magistrlik dissertatsiya ishi kirish, adabiyotlar sharhi (1-bob), materiallar va ish usublari (2-bob), tadqiqot natijalari va ularning tahlili (3-

bob) va uning tarkibiga kiruvchi bir qator bo'limlardan, xulosalar va foydalanilgan adabiyotlar ro'yxatidan iborat. Mazkur magistrlik ishining hajmi 80 betdan iborat bo'ib, 5 ta jadval, 11 ta rasm va 68 ta adabiyotlardan foydalanilgan.

1-BOB. ADABIYOTLAR SHARHI

1.1. Peroksidazaning o‘ziga hos xususiyatlari, klassifikatsiyasi va ta‘sir mexanizmi

2007 yilda A.N. Bax tavallud topgan yiliga 150 yil to‘ladi. Uning XIX asr oxiri XX asr boshlarida olib borgan izlanishlari butun dunyoga tanilgan. Uning ilmiy yangiliklaridan biri biologik oksidazasining peroksidli nazariyasining isbotlanishi va eksperimental tasdiqlanishidir. Bu nazariyaning asosi bo‘lib 1902-yilda «Tirik hujayra kimyosida peroksidni ro‘lini o‘rganish» nomli ishi hisoblanadi. A.N.Bax va R.Shoda bilan birgalikda bajarilgan bu izlanishlar jarayonida 1903-yilda xren ildizlaridan peroksidaza qisman tozalangan preparatini olindi [1].

Organik molekulalar oksidlanishini katalizlovchi fermentli preparatlarni ajratishda, olimlar bir emas balki ikkita faol fraksiyani oldilar. Birinchi fraksiya oksigenaza, ikkinchi fraksiya esa peroksidaza deb nomlandi. Xren ildizidan ajratib olingan peroksidazaning gomogen preparati bir necha o‘n yillardan keyin Vilshatter va Teorellar tomonidan olindi, uning aminokislotali ketma-ketligi esa Karin Velinder tomonidan 1979 yilda aniqlangan [10, 17]. Bir asrlik tarixga qarasak peroksidazalarni o‘rganish va qo‘llashga bo‘lgan qiziqish kuchsizlangani yo‘q, xren ildizi peroksidazasi spektrofotometrik detektsiya (HRP) testlari keng qo‘llaniladigan belgilaridan biri hisoblanadi. Avvalgi asrning 80-90 yillarida Amersham firmasi (Amersham, Buyuk Britaniya), (Angliya) Ampleks Red nabori yordamida amalga oshiriladigan flyurosensli analiz kabi keng qo‘llaniladigan HRPdan foydalaniladigan xemiliyuminestentli analizni tadbiiq etdi [10, 17]. Hozirgi kunda rekombinant peroksidazalar asosida murakkab ko‘p komponentli aralashmalarda shu bilan birgalikda atrof-muhitning ifloslanishi analizida turli birikmalarni aniqlashda qo‘llaniladigan yuqori sezgirlikka ega biosensorlar ishlab chiqarilgan. Oxirgi yillarda bozorda yangi manb‘alardan ajratilgan peroksidaza preparatlari paydo bo‘ldi. Ularga zamburug‘ peroksidazasi *caprinus cinereus* keng miqyosda nativ va rekombinant formada ishlab chiqariladi. Soya ishlab chiqarish chiqindilaridan

ajratilgan peroksidaza va Batatning superprodutsirlovchi hujayra kulturalaridan olingan peroksidaza (Dusan firmasi, Janubiy Koreya) [13]. Shuni ta'kidlash lozimki amaliyotda qo'llash uchun eng samarali ferment bo'lib ekstrimal sharoitda yuqori stabilikka ega bo'lgan peroksidaza bo'lib zamburug' peroksidazasi rekombinant varianti hisoblanadi [14]. Moskva Davlat universiteti kimyo fakultetida I.Yu.Saxarov tomonidan ajratilgan palma peroksidazasi juda yuqori termostabilikka egaligi bilan farqlanadi [13, 15].

Peroksidaza molekulasi tuzilishining o'ziga xosligi

Peroksidaza - ikki komponentli ferment bo'lib, o'zida faol guruh birikmalarini tutib, ushbu guruhlar substrat bilan kimyoviy ta'sirlashadi yoki bo'lmasa katalitik fa'ollikni oshirishda kolloid oqsillar bilan ham ushbu fa'ol guruhlar yordamida ta'sirlashadi. Peroksidaza fermenti globulyar oqsil bo'lib diametri 50 A oqsil qismda 43% α spiral qismlari mavjud [5, 15]. Ferment nomenklaturasi bo'yicha 1979 yil xalqaro siezda qabul qilingan, peroksidaza fermenti akseptor sifatida vodorod peroksidiga ta'sir ko'rsatuvchi ferment hisoblanadi [15].

Gem tutuvchi peroksidazalar klassifikatsiyasi va reaksiyon sikli

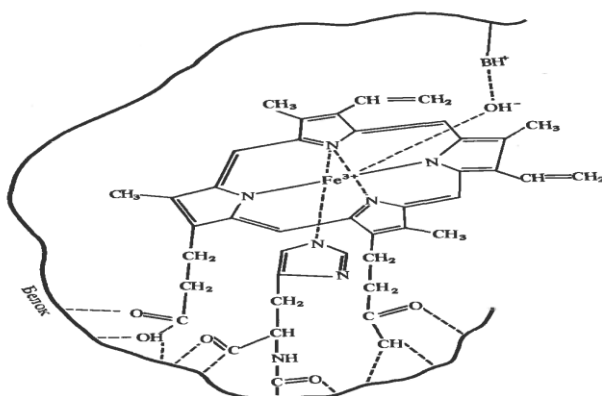
Gem - tutuvchi peroksidalar ikkita superonlaga bo'linadi: o'simliklar va hayvon peroksidazalari. Bu fermentlar vodorod peroksidini elektron donorli turli substratlarning oksidlanishini katalizlaydi, katalik bosqich ferment va H_2O_2 tezlik bilan o'zaro ta'sirlashib, birinchi birikma deb nomlangan modda hosil bo'lishidan boshlanadi. U ikkita oksidlovchi ekvivalent tutadi oksiferrilgem va erkin radikal [23, 35]. Gem tutuvchi peroksidazalar oqsil injineriyasi progressi va ular kristalitlik strukturasi aniqlanishi (sitoxrom C peroksidaza no'xat askorbam peroksidazasi, lignin va marganets peroksidazalar va h.k.) faol markazda H_2O_2 ning geterologik parchalanishini va uning fenolli substrat molekulasi bilan keying qaytarilishini ifodalovchi bosqichli mexanizmini taxmin qilish imkonini berdi [2, 23].

Peroksidaza yana oksigenazali faolikni ham namoyon qiladi, oksigenazali bosqich o‘simlik o‘sinh gormonlari, indolil, uksus kislotasining oksidlanishiga ta’sir qilinishi taxmin qilinadi. O‘simliklar peroksidazalri superoilasi aminokislota ketma-ketlik gomologiyasi va va post-translatsion modifikatsiya o‘ziga xosliklari asosida 3ta sinfga bo‘linadi. Ularning 1-sinfga mikrobial peroksidazalar, bakterial katalazalar - peroksidazalar (KF1.11.1.6), achitqi tsitoxrom C peroksidazasi (KF 1.11.1.5) va o‘simliklar askorbam peroksaidazalari kiradi (KF1.11.1.11) [4, 19, 23].

II-sinf bu o‘simlik tipidagi sekretor peroksidalar marganets peroksidaza (MnP) va ligninperoksidaza (LIP) kabi peroksidazalardir [19]

III sinf - o‘simliklar klassik peroksidazalari oxirgi 2ta sinf peroksidazalari (KF 1.11.1.7) glikozilirlangan 4ta disulfidli bog‘ va bir ferment molekulasida kaltsiyning 2ta kationini tutadi [4, 19]

Hozirgi kungacha olingan ma’lumotlar shuni ko’rsatadiki peroksidaza fermaenti rangsiz glikoprotein va shu moddaga bog’langan qo’ng’ir qizg’ish rangli ferriporfinindan tashkil topgan. Ferment molekulasining geminli qismi (gem, gemin) ya’ni temirprotoporfirin IX bo’lib 1 - rasmda ko’rsatilgan. Ushbu qism faol markaz vazifasini bajarib, vodorod peroksidining parchalanishi yoki aktivatsiyasida ishtirok etib, natijada mos substrat bo’lib xizmat qiluvchi radikallar paydo bo’ladi [6, 20].



1-rasm. Peroksidaza fermenti molekulasining geminli qismi

Peroksidazasining prosetetik guruhi yerqalampiri va yapon rediskasidagi xloroperoksidazasining sitaxrom C, ferriprotorfirin XI hisoblanadi.

Ferriprotoporfirin IX faol markazi hisoblanib, profirinli gem halqasidan tashkil topgan va ushbu birikma yuqori aromatik gidrofob birikma hisoblanadi. Proferinning oqsil bilan o'zaro gidrofob bog'lanishi tufayli aktiv peroksidazaning uchlamchi strukturasi shakillanadi. Ma'lumki protoproferin gem tutuvchi fermentlardagi oqsilning globulyar holatini barqarorlashtirishda katta ahamiyatga ega. Kompleks hosil qiluvchi yerqalampirining gemin tutuvchi apoperoksidazasi oqsilning issiqlikka va ultrabinafsha nurlariga barqarorligini oshiradi. Fermentdagi prostetik guruhlarining olib tashlanishi peroksidaza faolligini yuqotadi, ammo oksidaza xususiyatlariga ta'sir etmaydi [18, 36].

Xill va Xolden tomonidan 1926 yil HCl kislotasi va atseton yordamida ishlov berish orqali ilk bor peroksidaza fermentini prostetik guruhlariga va proteinlarga parchalashga erishdilar [24]. Gem - proteinli bog'larni gidroliz qilish uchun xar hil kislota va ishqorlar yordamida amalga oshirdi. Tajribalar natijasida aniqlanishicha, parchalash jarayoni kechayotgan tegishli bufer tarkibidagi HCl kislotasini ishqor yordamida neytrallash orqali protogemin va proteinni rekombinatsiyalanadi, natijada peroksidaza fermentining faollashishiga olib keladi. Xuddi shu jarayon bir necha marotaba takrorlasa ham bo'ladi, bu ferment faolligiga sezilarli ta'sir ko'rsatmaydi. Mua'llif yana shuni ta'kidladiki yerqalampiridan ajratib olingan peroksidaza ishqoriy muhitda faolligini saqlaydi, bu holda gem rangi to'q qizildan, och qizilga o'zgaradi [26].

Ushbu ma'lumotlar shunisi bilan qiziqki, gemin moddalari ko'plab biologik molekulalar tarkibiga kirib tuzilishi jihatidan ko'plab oqsil molekulalari bilan bog'lanadi. Ma'lum bo'lishicha gemin moddalari gem tutuvchi fermentlar, sitaxrom P-450, mioglobini kabi moddalarnig oqsil globula turg'unligini ta'minlaydi. Yerqalmpiri peroksidazasining molekulyar og'irligi 44 kDa bo'lib shundan 1.48% gemin moddasi tashkil etadi [6, 33]. Labarjevskiy izlanishlarida ikkita zamburug` (Juonotus radiatus) peroksidazasining (Ia -1.09 % IIa 1.48%) gematin moddasini protsent

miqdorini aniqladi. Erkin geminlar (oqsil bilan bogʻlanmagan) bir qator xususiyatlarga ega, masalan ligantlar bilan kompleks hosil qilish, elektronlarni tashish reaksiyalarida va oksidlanish qaytarilish reaksiyalarida ishtirok etish kabi xususiyatlarga ega [7, 8].

Gem va oqsil molekulasi qismlari bilan bogʻlar, yerqalampiri peroksidazasi kinetikasiga taʼsirini oʻrganishda, batafsil izlanish MDU dagi kimyoviy enzimalogiya kafedrasida olib borilgan [8, 35]. Mualliflar shuni koʻrsatdiki apoperoksidaza bilan gemin va protoproferin bilan kompleks hosil boʻlishi, sezilarli darajada oqsilning uchlamchi strukturasi taʼsir koʻrsatadi, bu esa yerqalampiri peroksidazasining har hil pH da oqsil globulyarining konformatsiyasi barqarorligini taʼminlashda katta ahamiyatga ega. Turp va yerqalampiri peroksidazalarning gem atrofidagi uchlamchi tuzilishdagi oqsillar orasidagi farq koʻrildi. Natijasida turp va yerqalampiri peroksidazalarining orasidagi farq ularning aminokislotalar ketma - ketligida ekan degan taxminga keldilar [38, 39].

Peroksidaza fermentining birlamchi tuzilishi

Yerqalampiri peroksidazasi birlamchi tuzilishi nisbatan uzoq vaqtlardan beri oʻrganiladi [35]. Shenon va hamkasblari bilan birga yerqalampiri ildizidan olingan peroksidazani alohida beshta faraktsiyaga ajratdi; A₁, A₂, A₃ B va S. Ajratib olingan faraktsiyalar gidrolizlanib xromotografiya yordamida alohida aminokislotalargacha ajratildi. Aniqlanishicha peroksidazaning ushbu oqsil qismlari 18 ta aminokislotalardan tashkil topgan. Peroksidazaning A₁, A₂, A₃ fraktsiyalari tarkibida oksiprolin boʻlib, B va S fraktsiyalari tarkibida oksiprolin yoʻq. Oʻsha vaqtdagi usullar yordamida fraktsiyalarni toza holda ajratib va sinchiklab oʻrganish imkonini bermadi, ammo olingan natijalar peroksidazalar orasidagi farqni ajratishga va ushbu fermentga qiziqishning ortishiga olib keldi [8, 35]. Tadqiqotlar natijasida shu maʼlum boʻldiki, peroksidazaning B va S fraktsiyalaridan, A-fraktsiyalarida nisbatan aromatik aminokislotalar koʻproq boʻlib, yana ular fizik kimyoviy xususiyatlari bilan

ham ajralib turadi. Yerqalampirining barcha izoperoksidazalari bitta polipeptik zanjirga ega bo`lib, ular oqsil molekulasi birlamchi tuzilishi bilan farqlanad. Mualliflarning aniqlashicha yerqalampirining izoperoksidazasining har bir izofermentida oltitadan politsestein qoldiqlari mavjud bo`lib, ular o`zaro disulfid bog`lar bilan bog`lanadi, nativ peroksidazada esa erkin SH - guruhlar yo`q [8, 16, 35].

Yerqalampiri peroksidazasi fermenti yuzasidan Velinder va xodimlari tomonida izlanishlar olib borilgan [10, 11]. Aniqlanishicha birlamchi oqsil tuzilishida 203 dan 300 ga yaqin aminokislotalardan tashkil topgan va izlanishlar olib borilayotgan peroksidazalarning N - va C - ichli aminokislotalar aniqlangan. 1986 yil yapon olimi tomonidan chop etilgan maqolasida yerqalampiri peroksidazasining ishqoriy izoenzimlarini toza va kristall holda ajratishga muvaffaq bo`lganini yozgan [10, 11]. Oltita izoenzimlarning o`zaro farqi aminokislotalar (296 dan 318 gacha) qoldiqlari va uglevod komponentlari bilan ajraladi. Ma`lum bo`lishicha oltita izoperoksidazadan to`rttasi (E_3E_6) da ekstrimal darajadagi yuqori pH izoelektrik nuqtaga ega (12 dan yuqori), uglevod miqdori esa juda kam bo`lib 0,8 dan 4,2% tashkil etadi. E_1E_2 izoenzimlar tarkibida 12 va 14.1 % uglevod va izoelektrik nuqta esa 10.6 pH [9, 31].

Yerqalampiri peroksidazasining uglevod molekulasida 20 % gacha neytral aminoshakarlar borligi aniqlangan [13, 16]. Aminoshakarlar tarkibida galaktoza, glyukoza, mannoza, arabinoza, ksiliza, fruktoza va geksoza kabi moddalardan tashkil topganligi aniqlandi [13, 15]. Ma`lumki shakar molekulasida polipeptit zanjirini tashkil etuvchi 20 aminokislota qoldiqlaridan beshtasi bilan bog`lanadi [15]. Ko`pchilik glikoproteinlarning (atsetilgalaktozomin) bosh qismi asparaginga bog`lanadi.

Har xil o`simliklardagi peroksidazalarning shakarlar va aminokislotalarning sifat va moqdoriy jihatdan bir biridan farqi aniqlangan [15, 17]. Olimlarning aniqlashicha bu peroksidazalarning oqsilli qismi 18 ta aminokislotalardan iborat. A_1 , A_2 , A_3 peroksidazalari tarkibida oksiprolin

mavjud. B va S fraksiyalarida esa oksiprolin yo‘q. O‘sha yillarda qo‘llanilgan usullar peroksidazani to‘liq tozalash va ajratish imkoniga ega emasdi, biroq olingan ma‘lumotlar katta qiziqish uyg‘otgan, chunki ular boshlang‘ich material peroksidazalari orasida sezilarli farqlar borligi haqida tasavvur berardi. Olimlar A-peroksidaza B va C ga nisbatan ancha ko‘proq aromatik aminokislotalar tutushini ko‘rsatganlar. Ular shuningdek ba‘zi fizik-kimyoviy xususiyatlari bilan ham farq qiladi. Xren o‘simligining hamma izoperoksidazalari 1 ta polipeptidi zanzirga ega. Biroq oqsil molekulasi birlamchi strukturasi bilan farq qiladi [12, 33]. Mualliflar xren izoperoksidazalari uchtadan disulfidin bog‘dan tashkil topgan izoekzil har birida 6 ta yarimsisteinli qoldiqlarga ega va nativ peroksidazada erkin SH-guruhlar yo‘qligini aniqlaganlar [15, 19].

Peroksidaza birlamchi strukturasi Velinder va boshqalar o‘rganganlar. Ular, oqsil birlamchi strukturasi 203 tadan 300 tagacha aminokislotali qoldiq kirishi mumkinligini aniqlaganlar [19].

1981 yilda xren peroksidazasini ajratib, tozalab va uning 6 ta ishqoriy izoenzimlarini kristalga aylantirgan yapon olimlarining ishlari chop etildi. [45, 46]. Aminokislotali qoldiqlar miqdori (296 dan 318 tagacha) va hamma 6 ta izoenzimlar uglevodli komponentlari nisbati bir-biridan sezilarli farq qiladi. 6 ta peroksidazadan 4 tasi (E_3 - E_6) pH ezoelektrik nuqtasining ekstremal yuqori ko‘rsatkichiga (12 dan yuqori) va nisbatan kam miqdordagi atigi 0,8 dan 4,2% gacha uglevodlar tutishi aniqlandi. E_1 va E_2 izoenzimlari 12,0 va 14,1% uglevod tutadi va izoelektrik nuqtasi 10,6 ga egaligi aniqlangan.

Turli o‘simliklar peroksidazalari birlamchi strukturalarida aminokislotalar va qandlar sifat va miqdor tarkibi bo‘yicha farqlar aniqlangan [46]. Shuni ta’kidlash kerakki peroksidazalar izoenzimlari orasida shundaylari borki, ular uglevodni komponentlar tutmaydi. W-38 tamakisi to‘qima kulturasidan va WR-132 tamakisi suspektdial kulturasidan 2 ta apodil (A_1 va A_2) va 2 ta katodil (S_3 va S_4) izoperoksidazalar ajratilgan va S_4 izoenzim uglevodli qoldiqlar tutishi aniqlangan [46, 47].

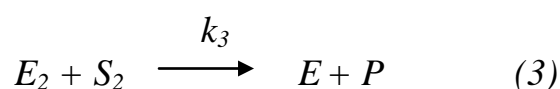
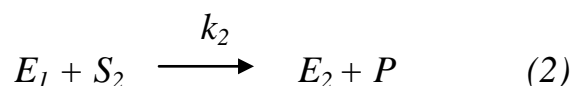
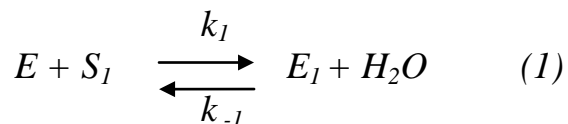
Peroksidaza molekulasidagi uglevodli komponentlar roli hali oxirigacha aniqlanmagan, chunki ba'zi uglevodlarning olib tashlanishi fermentativ faollikning o'zgarishiga olib kelmadi. Peroksidaza molekulasidan glyukoza yoki galaktozaning yo'qotilishi faollikni pasaytirmadi, balki proteolitik fermentlarga chidamlilikni oshirdi [19, 20]. Mualliflar taxminicha, uglevodlar peroksidazalarning membrana orqali o'tishini osonlashtiradi va o'pferment 3 o'lchamli strukturasi stabillaydi. I.I.Ugarova va boshqalar [19, 24] ko'rsatishicha, xren peroksidazasi taxlanish konformatsiyasi shundayki, oqsilli qism ozgina funksional uchastkalari molekula yuzasiga yaqinroqda joylashadi va modifikatsiya oson yuz beradi. Bu guruhlarning ko'pchiligi u yoki bu tarzda chekkadan uzoqlashgan, karbogidratli qoldiqlar bilan himoyalangan va shu sababli ularga yetishish juda qiyin. Peroksidazaning bunday strukturaviy organizatsiyasi ehtimol katalitik aktning ma'lum o'ziga xosligini ifodalaydi [24]

1.2. Peroksidazaning katalitik xususiyatlari va vodorod peroksidining parchalanish mexanizmi

Peroksidazaning asosiy xususiyatlari peroksid kislorod hisobiga turli spektral xarakteristikaga ega oraliq komplekslar hosil bo'lishi bilan kimyoviy birikmalarning oksidlanishini katalizlash. Hozirgi kunda 4 tur komplekslar aniqlangan. Kompleks I H_2O_2 qo'shilishi bilan darhol hosil bo'ladi va odatda tezda kompleks II ga aylanadi; kompleks III va IVlar peroksid ortiqchaligida, juda ko'pligida hosil bo'luvchi birikmalardir. Kompleks III va IV katalitik faollikka ega emas, ularning hosil bo'lishi reaksiyaning tormozlanishiga olib keladi [26, 27].

Bu masalani o'rganish bo'yicha an'anaviy ishlar bo'lib Teorell va Chans ishlari hisoblanadi [27]. Ular substratli fermentning oraliq mahsulotlari mavjudligini ko'rsatib berdilar. Chans spektrofotometrik usul bilan substratli fermentning 4 ta oraliq birikmasini aniqlay oldi, ulardan ikkitasi (I va II)

yaxshi o‘rganilgan. Kompleks I ning kompleks II ga aylanishi vodorod donori, masalan polifenollar mavjudligida tezroq kechadi. Peroksidaza ta‘sirining umumiy sxemasi Chans tomonidan taklif qilingan:



Bu yerda E -nativ ferment, E_1 va E_2 - I va II ning oraliq birikmasi; S_1 va S_2 – vodorod peroksidi va vodorod donori mos ravishda k -reaksiya tezligi konstantasi, P -reaksiya mahsuloti. Reaksiya (2) va (3) E_1 va E_2 oraliq oksidlangan formalar bir elektronli qaytarilish jarayonlari hisoblanadi, E_1 kativ ferment bilan taqqoslanganda ikkita E_2 –esa bitta qo‘shimcha oksidlovchi ekvivalentga ega. Fromm izlanishlariga ko‘ra [23, 25], peroksidazaning ta‘sir mexanizmi “ping-pong” tipidagi 3 ta substrat reaksiyasini eslatadi, bu yerda fenollar- 2 ta mustaqil substrat, vodorod peroksidi esa uchinchi substrat hisoblanadi. Bunday tip reaksiya natijasida erkin radikallar hosil bo‘ladi. Fenoksilli radikallar kataliz ikkita alohida bosqichlarida paydo bo‘lishi [25] va fimerlarga birlashishi mumkin. Dinner va boshqalar ko‘rsatishicha eritmada radikallar erkin holda bo‘la olmaydi, agar bunday bo‘lganida edi ular shunday aralash mahsulotlar bergan bo‘lard, masalan *o-o*-difenol, *n-n*-difenol va *o-n*-difenol. Biroq, bunday holatlarda fermentativ reaksiyaning faqatgina bitta mahsuloti mavjud bo‘ladi, xususan *o-o*-difenol. Bu shundan darak beradiki, radikallar peroksidaza oqsili bilan birlashadi. Olingan natijalar, katalitik akt

oqsil yuzasida kechadi, bunda fenollar ferment molekulasi modifikatsiyasi effektini kuchaytiradi degan fikrni tasdiqlaydi [23]. Chans va Fredovich peroksidazalar substratlarini ikkita guruhga bo'lish mumkin degan fikrni bildirganlar. Birinchi guruh substratlari bevosita gen bilan o'zaro ta'sirlashadi. Ikkinchi guruh substratlari esa gen bilan muloqotda bo'lmaydi. Demak, molekula oqsilli qismi funksional guruhini yoquvchi qandaydir bir elektron-transportli zanjir mavjud bo'lishi kerak. Substratlar orasidagi farqlar E_1 va E_2 oraliq birikmalari o'zaro ta'sirlashuvida pH ga turli bog'liqlikda va aktivatorlar ta'siriga substratlarning sezgirligida namoyon bo'ladi [12].

Peroksidazada mavjud temir yagona ioni vodorod peroksidni faollashtirish xususiyatigagina emas, balki unga turli substratlar oksidlanishi reaksiyasiga kirishishi xususiyati ham unga ma'lum qilib turadi. Peroksidazaning katalitik ta'sirida faol kislorod manbai bo'lib organik oksidlovchilar, shu jumladan to'yinmagan yog' kislotalari va karotin ham xizmat qiladi. Oksidlovchi mavjudligida peroksidaza tomonidan oksidlanuvchi substratlarga ko'pchilik fenollar (pirokatexin, pirogallol, gidroksinon...) shuningdek, benzidin, adreialin, anilin, *n*-toluidin, aromatik kislotalar (benzoy, salitsil, gallovin), askorbin kislotasi, nitritlar va bir qator boshqa birikmalar kiradi [26].

Peroksidazaning geterologik parchalanishida His 42 va Arg 38 distal qoldiqlari muhim ro'l o'ynaydi. Peroksidaza 40, 42 va 170 holatdagi gistidin 3ta qoldig'ini tutadi. Oxirgisi temir peroksimal ligandi hisoblanadi. His 40 va His 42 qoldiqlarigina kimyoviy modifikatsiyaga uchraydi. His 170 proksimal qoldig'i faol markazda gemning mustahkam bog'lanishiga javob beradi. Uning alanin qoldig'iga almashtirilishida bir birikma hosil bo'lishi konstantasi 5 ta tartibga kamayadi, imidazolning qo'shilishi bu konstantasini 1500 marta oshirish imkonini beradi. Bunda u native ferment faolligi ko'rsatkichining atigi bir ulushinigina to'playdi. His 170 gemi proksimal ligandi Asp 247 qoldig'i bilan vodorod bog'i hosil qiladi deb taxmin qilinadi. Bu uning asoslanganligini oshiradi, peroksidazaning oksidlangan formalarida zaryadning stabillashuvini

osonlashtiradi va temir atomini koordinatsion sonda ushlab turish imkonini beradi [27, 28]. Distal yoki katalitik His 42 H_2O_2 ning parchalanishi uchun javob berdi. Bir birikmaning hosil bo'lish mexanizmi gistidin distal qoldig'ining protonirlanishida III valentli temir va peroksianion kompleksining o'tuvchi hosil bo'lishini o'z ichiga oladi His 42 dan protonni gidroksil guruhga o'tkazish va suv molekulasining hosil bo'lishini oksiferril gem va 1-birikma porfirinin halqasidagi kation radikal generiraydi, 1-va 2-birikmalar ferril kislorod va gistidin distal qoldig'i orasidagi vodorodli bog' aniqlanmagan. Ala, Ley, Val, qoldiqlarida His 42 ning almashtirilishida mutant fermentlar reaksiyasi birinchi bosqich tezligi konstantasi yovvoyi tip fermentga nisbatan bir necha baravar kamayadi. Masalan, 42 holatda leysin qoldig'ining kiritilishida ferment bilan H_2O_2 o'zaro tasirlashuvi tezligi biomolekulyar konstantasining 5 baravarga kamayishi kuzatiladi. Nativ HRP va yovvoyi tip rekonbinant fermentiga nisbatan 1-birikma hosil bo'lishidagi O-O bog'ning geterologik parchalanishi birinchi tartibi konstantasi 4 baravarga kamayadi. HPR His 42 Ala mutant holatida reaksiyon muhitga 2-o'rin almashgan imidazollarni qo'shish protonlar bog'lanishi alternative markazi hosil bo'lishi tufayli katalitik faolligini qisman tiklaydi [27, 28].

HRP molekulasidagi muhim strukturaviy o'ziga xosligi bo'lib, His42 dan Asp 70 gacha va undan keyin Glu 64 va distal Ca^{2+} bog'lovchi markazgacha vodorodli bog'lar sistemasining mavjudligi hisoblanadi. Taxminlarga ko'ra peroksidazali kataliz maksimal samaradorligi uchun His 42 ning imidazolli halqasining porfirinli halqaga nisbatan ma'lum bir oriyentatsiyasi talab qilinadi, u esa His42 va Asp70 orasidagi vodorod bog'i yordamida realizatsiyalanadi Asp 70ni valin qoldig'iga almashtirilishida bu vodorodli bog' parchalanadi va mutant ferment juda past bo'lgan katalitik faolligini namoyon qiladi [27].

Ferment faqatgina peroksidazali emas, balki oksidazali xususiyatga ham ega, bunda u faollashmagan molekulyar kislorod hisobiga bir qator birikmalarning oksidlanishini katalizlaydi. Peroksidazada ikkita turli

funksiyalar mavjudligiga shubha yo‘q, biroq uning molekulasida bitta yoki ikkita faol markaz mavjudligi haqidagi masalaga bir javob mavjud emas. Bu esa o‘z navbatida ferment strukturasi va uning molekulyar bir xil emasligi haqidagi ma‘lumotlar yetarli emasligi bilan belgilanadi [34, 35,36].

Oksidazali funksiyani birinchi bo‘lib Teorellyu [34] aniqlagan. Ba‘zi o‘simliklarda u kislorodning yutilishi bilan digid roksifumar kislotani (OGF) oksidlovchi fermentni va ferment peroksidaza ekanligini aniqlagan. Fermentning oksidazali funksiyasi turli kimyoviy tabiatli birikmalar bilan o‘zaro ta’sirlashuvda namoyon bo‘ladi [34, 38]. Oksidazali reaksiya uchun zarur sharoit bo‘lib marganes kofaktor-ionlari va turli fenolli birikmalarning mavjudligi hisoblanadi.

Peroksidazali va oksidazali faollik yeryong‘og‘idan ajratilgan peroksidaza bilan tekshirilgan [35, 37]. Olimlar genning olib tashlanishi molekula o‘lchamini o‘zgartirmasligi, biroq peroksidazani faollikning butunlay yo‘qolishiga olib kelishini aniqladilar. Bunda ferment oksidazali faolligi atigi 20% gagina pasayadi. Rekonstruirlangandan so‘ng faollik nativ enzim faolligining 50% gina tashkil qiladi. Peroksidazaning oksidazali funksiyasining namoyon bo‘lishi substratlari bo‘lib gidro- naftoxinonlar indolil uksus kislota, qaytarilgan koenzimlar NAD^*H_2 va $NADP^*H_2$ xizmat qiladi [31]. Shuningdek NAD va NAD^*H larning peroksidazalar tomonidan oksidlanishi sharoitlarini o‘rganish bo‘yicha izlanishlar olib borilgan [37].

Peroksidazaning trimetafenol-floroglyusin bilan taxminiy oksidlangan NAD^*H_2 va $NADP^*H_2$ kabi biologik muhim birikmalarni oksidlash xususiyati o‘ziga xos qiziqish uyg‘otadi. Fermentning bu xususiyati hujayraning nafas olish oddiy substratlari-Krebs sikli metabolitlari oksidlanishi uchun havo kislorodini faollashtirish yo‘li bilan hujayraning normal nafas olishida peroksidaza fermentining ishtirok etishi haqida dalolat beradi [41, 46] .

Shennon bilan hammualliflari ishlarida xren ildizi peroksidazasi yettita ionenzimlari katalitik xususiyatlari haqida ma‘lumotlar mavjud. Substrat sifatida *o*-dianizidin (peroksidazali funksiyasi) qo‘llanilganda, anodli enzimlar

faolroq bo'lishi aniqlangan. Shavel kislotasi (oksidazali funktsiya) tekshirilganda esa katodli izoekzimerlar yuqori faollikni namoyon qilgan. Substrat sifatida floroglyusinni qo'llab, ferment ikkita preparatini taqqoslab o'rganilganlar. Aniqlanishicha, peroksidazaning oksidazali faolligi uning peroksidazali faolligiga proporsionaldir. Olingan natijalardan xulosa qilingan holda, mualliflar shunday taxmin qildilarki, unga ko'ra kislorod bilan faollashtirilgan (peroksl) kabi nefaollashtirilgan (molekulyar) fermentning oksidlanish uchun javobgar bo'lgan markazi birginadir. Boshqa olimlar ham shunday xulosaga kelishgan [46]. Biroq boshqa ishlarda peroksidazaning fermentativ faolligi ikkita turli markazlari mavjudligi haqida ma'lumotlar keltiriladi. Bu masala bo'yicha qiziqarli natijalar peroksidazali indolil uksus kislotasining oksidlanishida olingan. Xren peroksidazasi apofermenti geminli guruhi olib tashlangandan keyin peroksidazali faollikdan mahrum bo'ldi (substratlar-pirogallol, benzidin, gvayakol), biroq indoliluksusli kislotasi mavjudligida oksidazali faolligini saqlab qoldi. Apofermentning geni bilan rekombinatsiyasi peroksidazaning oksidazali faolligini o'zgartirmasligi tufayli, yuqorida keltirilgan olimlar fermentning ikkita turli faol markazi mavjudligini taxmin qilganlar.

L.X.Ramazonova va boshqalar (1971) ba'zi ingibitorlarning peroksidaza fermentining geminli va oqsilli qismiga ta'sirini o'rgandilar. Natijada sianid va qaynatish peroksidazali, azid va dimetilformaldegid esa floroglyusinoksidazali faollikni ko'proq ingibirlashini ko'rsatdilar. Bu izlanishlar ferment molekulasida peroksidazali bilan bir qatorda oksidazali faol markaz mavjudligini taxmin qildilar. Bu taxminlarni inkor etish uchun asos yo'q [40, 45].

IUK-oksidazali faollikning namoyon bo'lishi mexanizmi va bu jarayonda uchta turli ob'ektdan ajratilgan peroksidazalar karboksil va aminoguruhlarining roli haqida polyak izlanuvchilari ma'lumot berganlar [41, 44]. Agarda fermentning matriksga "tikilishi" erkin aminoguruhlar bo'ylab amalga oshirilgan bo'lsa, peroksidazada IUK-oksidazali faollik mavjud bo'lmagan. Fermentning karboksilli guruhlar orqali immobilizatsiyasi bu

faollikning to'liq tiklanishiga olib kelgan. Har ikkala holatda ham matriks bilan bir xil miqdordagi peroksidaza bog'langanligi sababli, unda IUK-oksidazali faollikning yo'qotilishi shuni anglatadiki, peroksidaza faol markazida IUK oksidlanishi reaksiyasining kechishi uchun, ferment oqsili olinishi guruhi bilan *in vivo* bog'lana oladigan erkin karboksil guruh mavjud bo'lishi zarur [44].

Peroksidazaning yuksak o'simliklardagi ribulozodifosfatkarboksilaza oksigelazaga xos oksigelazali funksiyasining paydo bo'lishidagi roli ko'rsatilgan [46]. Arpa va lojnitsa ildizlaridagi peroksidazalar peroksidazali va oksidazalidan tashqari oksigenazali xususiyatlarni ham namoyon qildi, biroq bunda reaksiya uchun mis ionlari bo'lishi zarur bo'ldi. Ba'zi reaksiyalarda peroksidaza katalitik faolligining namoyon bo'lishi uchun kofaktorlar bo'lishi shart. Bu ferment uchun kofaktorlar rovida Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} va boshqa metallar yoki peroksidaza molekulasi bilan vaqtinchalik o'zaro ta'sirlashuvchi murakkab organik birikmalar ishtirok etishi mumkin [46, 49].

Yuqorida keltirilganlar shundan dalolat beradiki, peroksidaza turli fermentativ faollikni namoyon qilib, regulyator faktorlar qatoriga kirishi mumkin. Bundan tashqari u kovalent yoki ionli modifikatsiya yo'li bilan, ferment katalitik samarasini to'liqroq namoyon qilishi uchun zarur bo'lgan o'zining spesifik funksional guruhlari faolligini o'zgartira olishga qodir. Ular qatoriga O-dianizidinning oksidlanishida ishtirok etuvchi peroksidaza aktiv oqsilining uch karboksil guruhlari kiradi. Ba'zi olimlar [50, 51] ferment faol markazi dinamik strukturasi, faol markaz guruhining yarim funkcionalligi, peroksidazadagi elektron transporti bir nechta yo'llarining realizatsiyasi yuqori potentsialli imkoniyatlari, u tomonidan fiziologik funksiyalarni samarali bajarilishini ta'minlovchi asosiy faktorlar bo'lib hisoblanadi. Peroksidazali faollikning pH, ingibitor va aktivatorlar yordamida regilirlash fermentning substratli spesifikligini qisqartirish, ko'p sonli mumkin bo'lgan reaksiyalardan bitta zarurini samaraliroq qilish imkonini beradi [51].

Substratlarga o'xshashlik turli tabiatli substratlarga nisbatan peroksidazaning juda keng spesifikligi katta qiziqish uyg'otadi. Hozirgi kunda

bu ferment izoenzimlarining oksidlovchi substratlar stereokimyoviy joylashishiga nisbatan tanlovchanligi aniq to'liq tahlili bo'yicha izlanishlar mavjud emas. Ferment va substrat o'zaro ta'siri reaksiyalarida substrat molekulasini ikkita strukturaviy o'ziga xoslikka ega bo'lishi kerak: 1) ferment parchalay oladigan spesifik kimyoviy bog'ga; 2) faol markazdagi substrat molekulasini substratning parchalanuvchi bog'ida orietnlanuvchi funksional guruh ferment katalitik markaziga nisbatan to'g'ri joylashgan bo'lishi kerak. Ko'pchilik fermentlar uchun reaksiyaning limitirlovchi bosqichi bo'lib substrat, koferment yoki effektor tomonidan indutsirlanuvchi oqsil konformatsiyasining o'zgarishi hisoblanadi [51, 52].

Ferment substrat birikmasining hosil bo'lish tezligi juda katta va ferment faolligi shu kompleks parchalanishi tezligi- Mixaelis-Menten K_m konstantasi bilan limitirlanadi. Biroq K_m ko'rsatkich berilgan reaksiyada qanday izoenzim katalizlanishiga bog'liq Gibson va Lilar no'xat nihollari peroksidazasidan ajratilgan ikkita izoenzimni sun'iy (*o*-dianizidin va benzidin) va tabiiy (eugenol, kofeli va ferul kislotalar) substratlar bilan solishtirib o'rgandilar. Bunda K_m ko'rsatkich bu peroksidaza izoenzimlari uchun u yoki bu substrat foydalanganiga bog'liq holda farq qiladi. Shu beshta substratlar bilan no'xat nihollari rivojlanishi dinamikasida peroksidazaning izoenzimli tarkibi o'rganilganda kofeli kislotali tajribalarda urug'lar o'sishidan keyingi yettinchi kunda faollikning eng yuqori cho'qqisi kuzatilgan. Elektrofarez usuli bilan shu reaksiyaga javobgar izoferment aniqlangan va u boshqa substratlarga ta'sir qilmagan [52].

K_m ko'rsatkich substrat turiga, reaksiyon aralashma pH ga va t ga bog'liq. Agarda ferment bir qancha yaqin substratlar hosil bo'lishini katalizlasa, unda har bir substrat uchun o'zining K_m ko'rsatkichi mos keladi. Birinchi yaqinlashishida kataliz reaksiyasi K_m ga nisbatan tezroq kechadi. Xren sushilar peroksidazasi K_m ko'rsatkichi ko'p sonli substratlar uchun qiyosiy berilgan. *n*-gidroksifeniluksusli kislota uchun $K_m \cdot 10^{-5}$ M ko'rsatkich 500 ga teng. *m*-kreon

uchun esa bu atigi 1ga teng. Bu esa izoperoksidazalarning bu fenolli birikmalarga turlicha o'xshashligidan dalolat beradi [52, 54].

Lobarjevskiy xren peroksidazasi K_m ni 16 turli substratlarga nisbatan aniqlagan va ular orasidagi farqlarni ko'rsatadi. Troyanovskiy bilan u zamburug'dan (*Trametes versicolor*) ajratilgan peroksidazali keng tarqalgan substratlar uchun K_m ni aniqladi va zamburug' peroksidazasi K_m *n*-fenilendiaminga nisbatan 10,0 ga o-dianizidin uchun esa $-0,006 \text{ m}^{-1}$ ga tengligini aniqladi, ya'ni oxirgi substratda fermentga o'xshashlik ancha yuqoridir [16, 54]. Shunday taxminlar borki turli substratli reaksiyalarda peroksidazali kataliz mexanizmi turlichadir. Kaliy ferritsianidi bevosita geni bilan reaksiyaga kirishadi, o-dianizidin esa ferment molekulasini oqsil funksional karboksil guruhlari bilan o'zaro ta'sirlanadi. Galston o'z shogirdlari bilan qiziqarli tajribalar olib borgan. Individual izoperoksidazalar ularga mos kelgan ko'pgina substratlarni turli tezlikda oksidlaydi, biroq ferment ko'pgina izofermentlari o'simlikda har doim ham uchrayvermaydi. Filogenetik jihatdan turli bo'lgan o'simliklarda ham benzidin, gvayakon va piragallol kabi substratlarga o'xshashlikni namoyon qilish bo'yicha farq qilishi aniqlangan. Izoperoksidazalar faoliyatida bo'yalgan mahsulotlar beruvchi fermentga nisbatan ko'p o'xshovchi substratlar (benzidin, uning hosilasi o-dianizidin va gvayakon) turli izoenzimlarni aniqlash uchun boshqalarga nisbatan ko'proq ishlatiladi. Keltirilgan izlanishlarda keltirilgan substratlar ro'yxati peroksidazalar spesifik ta'sirining kengligi haqida ba'zi tasavvurlarni beradi [58].

Shunday qilib, peroksidaza gem tutuvchi glikoproteiddir. Uning katalitik xususiyatlari vodorod peroksidiga nisbatan keskin spesifikdir, biroq bu ferment tuzilishi bo'yicha juda turli-tuman bo'lgan substratlarga nisbatan keng miqyosdagi spesifiklikni namoyon qiladi. Bir qator olimlar peroksidaza bitta faol markazga ega, uning tarkibiga o'z valentligini o'zgartirmaydigan temir 3 valentli atomi kiradi deb hisoblaydilar. Biroq, peroksidazaning ko'p

funksionalligi oqsil kativ molekulasi yuzasida ikkinchi katalitik uchastka mavjudligini inkor qilmaydi.

1.3. Peroksidazaning spetsifik substrat muammosi

O‘simliklar klassik peroksidazalarining substratli spetsifikligi muammosi hali ham yechilmagan. Har bir ferment o‘zining shaxsiy profildagi substrati spetsifikligiga ega. Hozirgi kunda elektronlar tanlangan donoriga nisbatan fermentning faolligi qanday bo‘lishini avvaldan aniqlash mumkin emas. Prokariotlar va zamburug‘lar peroksidazalari klassik sun‘iy donorlariga qo‘shimcha sifatida o‘zining spetsifik substratlariga egadir. Lignin peroksidazada Trp171 veratrov spirtini (lignin molekulasi qismini imitirlovchi model substrat) bog‘lovchi spetsifik markaz ro‘lini o‘ynaydi. Ligninperoksidazani imitirlovchi Ser168Trp Mn-peroksidaza mutant veratrov spirtiga nisbatan faoldir. Bu ma’lumotlar ligninperoksidaza faol markazi gemi bilan undan 16A masofada joylashgan Trp171 orasida elektronlarni o‘tkazish zanjiri birligidan dalolat beradi [27, 29].

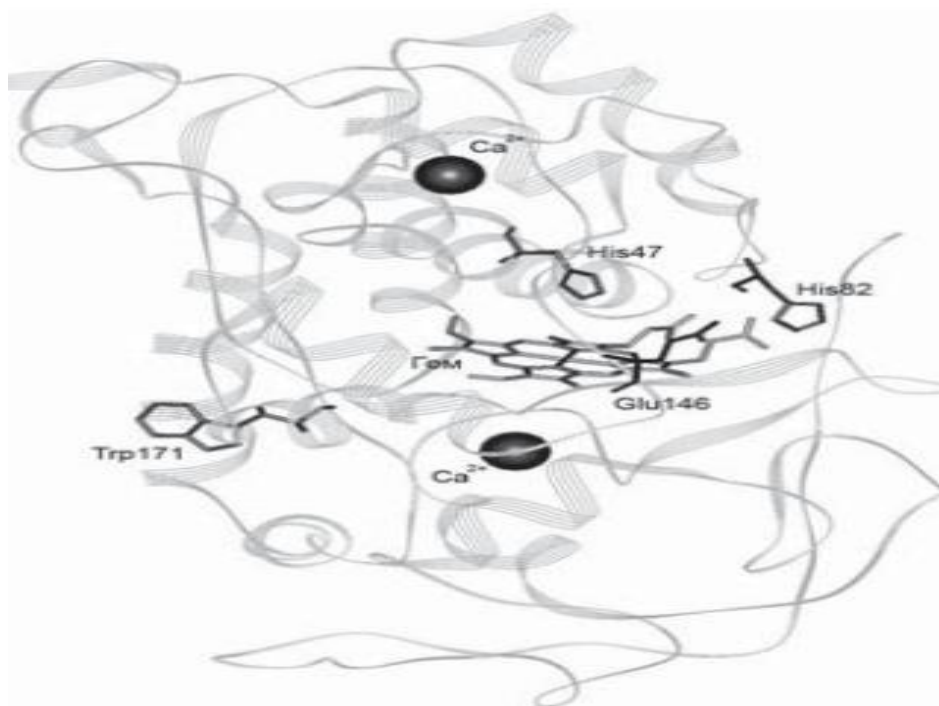
Ligninperoksidazaning substrat- bog‘lovchi markazi

Phanerochaete chrysosporium oq zamburug‘i LIP 2 ta izofermentlari kristalitik strukturasi o‘rganishda Trp 171 uglerodi β atomida ma’lum darajadagi electron zichlik aniqlangan. Bu elektron zichlik gidroksil guruhining mavjudligi bilan belgilanadi. Trp 171 dagi uglerod β -atomining gidroksilirlanishi avtokatalitik reaksiya bo‘lib, uning uchun H_2O_2 ning ozgina miqdori va ferment ozgina sonli o‘zgarishigina yetarlidir. Rekombinant ferment modifikatsiyasi bir-necha birlamchi katalitik sikllar davomida yuz beradi [12, 13]

LIP molekulasida 2 ta turli substrat bog‘lovchi markazlar mavjudligi taxmin qilingan. Buning to‘g‘ridan to‘g‘ri tasdig‘i bo‘lib nativ ferment rentgenostrukturaviy analizi ma’lumotlari hisoblanadi. Ya’ni rekombinant fermentda Trp 171 modifikatsiyasining mavjud emasligi, LIP Trp 171 Phe va Trp 171 Ser mutantlarida boshqa donor elektronlar bo‘yicha faollik

saqlanganligi holatida veratron spirt bo'yicha faollikning to'liq yo'qotilganligi hisoblanadi [12].

Birinchi (nospetsifik) substrat-bog'lovchi markaz gen- bog'lovchi oblast chegarasida, ikkinchisi (spetsifik) Trp 171 yaqinida joylashgan, u veratrov spirtining oksidlanishi va mediatorli hususiyatlarining namoyon bo'lishi uchun zarurdir.



1.1-rasm. Ligininperoksidaza molekulasining umumiy ko'rinishi. Kalsiyning 2 ta kationi , gem, distal, gistidin- 47 ko'rsatilgan. Faol markazga kirish fermentning past pH-optimum harakati bilan belgilanadigan vadorod bog'larni His 82 – Glu 146 bilan nazorat qilinadi.

LIP ning II birikmasining veratrov spirti bilan tiklanishi reaksiyasining tezlik-limitrlovchi bo'lib elektronni o'tkazish hisoblanadi. LIP-veratron spirti kation–radikal kompleksining veratrov spirti qo'shimcha molekulasi bilan o'zaro tasirlashuvi mexanizmi taklif qilingan. Bu mexanizmning asosiy momenti kation-radikalining oqsilli mikro qismi bilan stabilizatsiyasidir [12, 17]

LIP ning kristalitlik strukturasi o'rganish Trp 171 yaqin atrofi elektrosalbiy (-) bo'lib , u veratrov spirti kation-radikali stabillashuviga o'z xissasini qo'sha oladi.

Mn-peroksidazaning substrati bo'lib (Mn P) ferment molekulasi ichida to'plangan 2 valentli Mn ioni xizmat qiladi [17].

Gem temiridan 11A masofada joylashgan Mn ionini kodlovchi qoldiqlar yo'naltirilgan mutagenezi, ferment katalitik faolligini pasaytiradi (Борзионов, 1999). Prof. Osta laboratoriyasida Mn-peroksidazasining yo'naltirilgan mutagenezi bo'yicha bajarilgan ishning ko'rsatishicha MnP dagi ligninperoksidazada Trp 171 analogik qoldiq pozitsiyasini egallovchi Ser 168 qoldig'ini triptofan qoldig'iga almashtirish Mn-peroksidazadagi veratrov spirtining bog'lanish markazining yaratilishiga imkon beradi. Yovvoyi tip nativ va recombinant fermentidan farq qilgan xolda, MnP Ser168 Tip mutant forma Mn^{2+} ga nisbatan faollikni to'liqligicha saqlabgina qolmay LIP ning ko'p sonli substratlarini unchalik katta bo'lmagan molekulalari kabi polimerlarni ham oksidlaydi. MnP molekulasiga kiritilgan triptofan qoldig'i, MnP nativ formasi uchun yomon substrat xisobangan LIP turli substratlarning samarali oksidlanishi uchun markaz bo'lib qoldi. MnP Ser 168 Tip mutant forma va ligninperoksidaza orasidagi funksional o'xshashlik Tip 171 ning LIP substratli spetsifligidagi asosiy rolini tasdiqlash uchun xizmat qiladi [17].

O'simlik peroksidazasining substrat-bog'lovchi markazlari

Hozirgi kunda shunday fikrlar mavjudki, ularga ko'ra o'simliklar klassik peroksidazalarini 3 ta guruhga bo'lish mumkin. Birinchi elektronlar ikkinchi elektronni donorlari kiritiladi, ular uchun faol markaz yaqinida bog'lanishi yoki faol markaz ichiga kirib olishi muhim hisoblanadi [58].

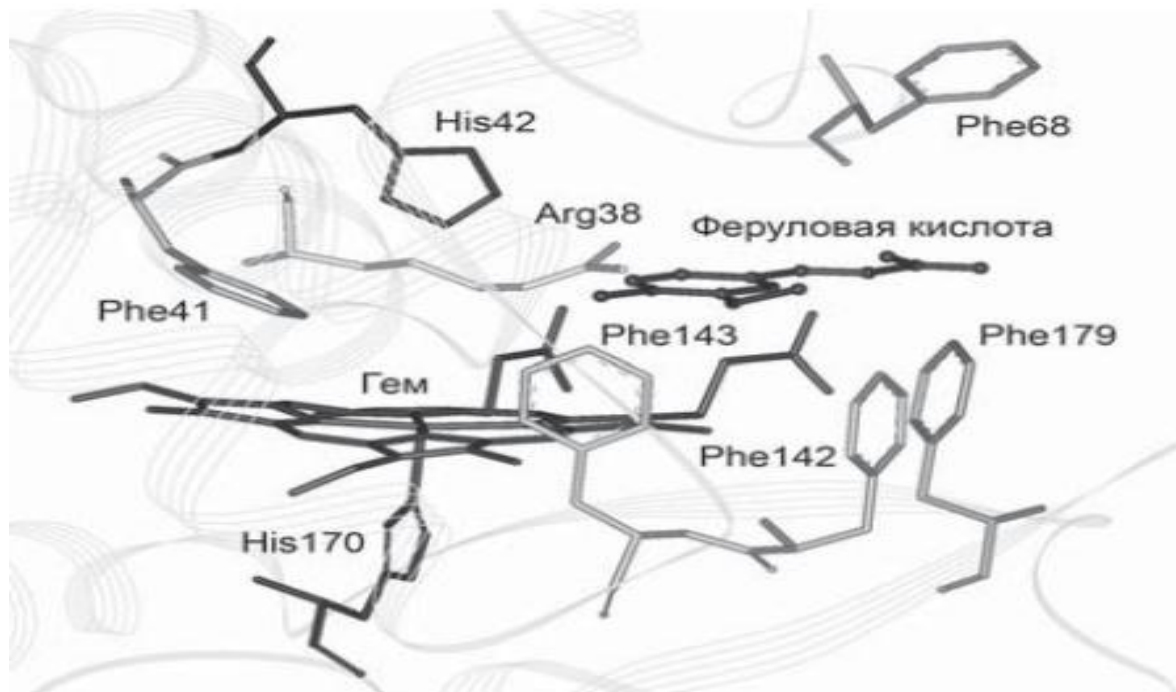
2-guruh bir elektronli aromat kiradi substratlar aromatik substratlar kiradi. Ular HRP faol markazi yaqinida bog'lanadilar 3-guruhga bu elektronlarning uzatilishi zanjiri bo'ylab oksidlovchi substratlardir (ABTS, IAA).

Substratlar 1-guruhi xolatida ular nining oksidlanishi mexanizmi ferrili kislorodning substratga o'tkazilishini o'z ichiga oladi, bunda bu substratning ferrili kislorod bilan to'g'ridan-to'g'ri o'zaro ta'sirlashuvi zarurdir.

HRP His 42 Ala, His 42 Glu mutantlari va His 42 val/ Arg 38 His His Ala ikkilamchi mutantida kislarodni o'tkazish yuqoro faolligi keltirilgan mutantlarni kirirtishda distaln (cho'ntakdagi) yon tomonning katta ochiqlikdaligining to'g'ridan-to'g'ri nisbati hisoblanadi. 2-guruh substratlari ferment faol markazi yaqinida bog'lanadi. HRP oqsil muhandisligi natijasida va ingibitorli ferment kompleksi substratlardan birinchi kristallik strukturasi aniqlash, faol markazning fenolli substratlar uchun sezgirligini ko'rsatadi. Xren peroksidazasining benzigidroksom kislota (BHA) ingibitori o'zaro tasirini o'rganish [58] mutant HRP His 42 Leu yovvoyi tip nativ yoki rekombinant fermentiga nisbatan 1000 marta kuchsizroq bog'lanish aniqlangan. His 42 kabi Arg 38 qoldiqlarini almashtirish BHP ning bog'lanishini keskin kuchsizlantiradi. Xren peroksidzasining benzigidroksam kislota bilan kompleksi kristallik strukturasi peroksidazaning fan markazida H₂O₂ ning bog'lanishi modeli sifatida qarash mumkin, BHA shaxsan xren peroksidazasi spetsifik ingibitori xisoblanadi. Boshqa peroksidazalar xususan tamaki fermentining emas yana shunisi qiziqki, BHA bilan kompleksida Phe 68 qoldig'i HPR molekulasi gidrofob cho'ntak "qopqog'ini" xosil qiladi. (15-rasm) bu esa erkin rekombinant ferment bilan taqqoslaganda bu kompleksning prinsipial boshqa kristalitik strukturasi olib keladi [58]. Agar erkin rekombinant ferment o'zgaruvchan sonliy molekulari kristalitik strukturasi olib keladi. Agar erkin rekombinant ferment o'zgaruvchan sonly molekulari kristalitik yacheykani xosil qilsa unda uning BHA bilan kompleksi kristalitik yacheykaga ikkita molekulari yuqori tartibga solingan strukturaga ega bo'ladi. Bu ma'lumotlar bizning laboratoriyamizda xren rekombinant peroksidazasi rekombinant dimer shaklini o'rganish bo'yicha olib borilgan izlanishlar natijalari bilan o'xshashdir [58, 61].

Ferulli kislota [(3-(4-gidroksi -3-metoksifenil)-2-propion kislota] o'simlik peroksidazalari uchun in vivo substrat hisoblanadi. Ba'zi olimlar (Борзионов, 1999) ishlarida ferul kislotali xren peroksidazasi ikkilamchi

kompleksi va uchlamchi-HPR ning ferul kislotali va sianidli komplekslari kristalitik strukturasi kestirilgan [58].



1.2-rasm. Benzigidroksam kislotasining xren peroksidazasi faol markazida gem beziga yo‘l ochadigan Phe 179 Ser bilan almashinadigan bog‘lanishining sxematik ko‘rinishi. Faol markazni qopqoq singari yuqoridan yopadigan Phe 68, doirasining o‘zgarishi axamiyatli.

Oltinchi ligand sifatida sianidning mavjudligi gem distal cho‘ntagida steritik qiyichiliklarni yuzaga keltiradi va ma’lum darajda bu effekt I va II birikmalarda ferril kislorodning mavjudligiga o‘xshashdir. Bu komplekslar strukturasi analizi xren peroksidazasidagi aromati substratlar bog‘lanish markazi dinamik xarakterga egaligidan va qayishqoqligidan dalolat beradi. Arginin distal qoldig‘i. (Arg 38) ning substrat oksidlanishidagi kabi ligandni bog‘lash jarayonlaridagi ro‘lini belgilaydilar [61, 63]. Bu qoldiq sianid bilan vadorodli bog‘lar xosil qiladi, shu tarzda peroksidaza –sianid kompleksini stabillashtiradi. Mualliflar fikricha, Arg 38 o‘tuvchi xolatni va keying O-O bog‘ning parchalanishining stabillashuvida ishtirok etadi, shuningdek distal gistidin , suv molekulasini va Arg 39 orasidagi vadorodli bog‘ zanjirida xam ishtirok etadi. Vadorod peroksidi faol markazga kanalbo‘ylab o‘tadi, kanal

o'lchami va gidrofaoligi gem temiriga yetishishini nazorat qiladi. HRP holatida kanal Phe (41,68,142,143,179) ning ko'p sonli qoldiqlarini xosil qiladi. Yo'naltirilgan mutagenez usul yordamida Phe 179 maromatik molekulalarni bog'lovchi qoldiq sifatida bidentifikatsiyalangan [61].

Uni alanin qoldig'iga almashtirish ferment sianokompleksining benzgidroksan kislota bilan bog'lanish konstantasining 80-marta kamayishiga olib keldi. Phe 179 ni serin qoldig'iga almashtirish ham bog'lanish effektivligiga salbiy tasir ko'rsatdi, biroq gistidin qoldig'iga almashtirish BHA ning HRP sianokompleksi bilan bog'lanishi konstantasining bunchalik keskin pasayishiga keladi. Phe 68 va Phe 142 ning uchlamchi kompleks xosil bo'lishidagi ro'li nisbatan kam ahamiyatli bo'ldi. Olingan natijalar Phe 179 ning aromatik molekulalarning bog'lanishidagi ishtirokini birinchi to'g'ridan-to'g'ri isbot bo'ldi. Shunday qilib xren peroksidazasi substratlarini bog'lovchi markazlaridan biri Phe 179 qoldig'i yaqinida joylashgan [61].

Olimlar tomonidan o'zgartirilgan substrat spetsifikligiga ega xren Phe 143 Glu peroksidazasi mutant olingan. Yovvoyi tip rekombinant ferment bilan taqqoslanganda yodid va fenolli HRP mutant faolligi kamaydi, biroq uning ko'rsatkichi aminofenol va benzidinga nisbatan oshdi shunday qilib substratlarning gemin temiriga yetib borishini nazorat qilishda Phe 143 qoldig'ining ro'li haqida ma'lumotlar olindi [63].

Substratlar 3-guruhida, agar substratning faol markaz bilan spetsifik o'zaro ta'sirilashuvi mavjud emasligi taxmin qilinsa, ayonki substrat spetsifikligi substratlar va ferment oksidlangan formalari redoks-potensiallari va ular stabilligi bilan aniqlanishi kerak, chunki katalitik jarayon oksidlanish – qaytarilish reaksiyasidan iborat. Substratli spetsifiklikning I va II birikmalar oksidlanish potentsiali bilan nazorat qilinishi Danfordning ma'lumotlariga asoslangan. HRP ning fenollar va indonil 3-uksus kislotasi hosilalari (IAA) kabi substratlarining I birikma bilan reaksiyalari tezligi mos keluvchi kation-radikal maxsulotlar qaytariluvchi potentsiali bilan yaxshi mos tushadi [1]. HRP I va II birikmalarining fenollar bilan qaytarilishi 2-tartibi reaksiyasi tezlik

konstantasi Markusning elektronli o‘tkazish nazariyasi chegaralarida interprintsityalangan II birikmaning pastroq faolligi elektronli o‘tkazish, I birikmadagi shunday masofa bilan taqqoslanganda, juda uzoq masofadali bilan tushintiriladi. Biroq bunday oksidlanish bir xil strukturali guruh ichidagi faqatgina o‘zini tutishligigina yaxshi tushintira oladi, biroq turli kimyoviy tuzilishga ega substratlarni taqqoslash uchun qo‘llab bo‘lmaydi [63].

Indonil -3-uksus kislotasining o‘simliklar peroksidazasi bilan oksidlanishi va shu fermentlarda 2-substrat –bog‘lovchi markazning mavjudligi

Bizning laboratoriyamizda indonil-3-uksus kislotasi tabiiy gormonining molekulyar kislorod bilan oksidlanish mexanizmi aniqlandi. Reaksiya 1-bosqichi bo‘ylab uchtali kompleksining xosil bo‘lishi hisoblanadi: ferment – kislorod –substrat, undan keyin superoksid–anion radikali va substrat kation-radikali generirlanadi, u nordon muhitda skotal radikali hosil bo‘lishi bilan dekarboksilirlanadi, oxirgisi kislorod bilan o‘zaro tasirlashib peroksidradikal hosil qiladi va keyin substratdan vadorodni ajratib olib skatal oksidiga aylanadi [17].

Skatal oksidi faol markazda indolmetanol hosil bo‘lishi bilan parchalanadi, u esa keyin bir elektronli oksidlanadi va faol markazni (blokirlaydi) to‘sib qo‘yadi.

Faqatgina IAA ortiqcha miqdorida yoki peroksidaza boshqa bir “yaxshi” substrati mavjudligida kiritilgan ikkinchi substrat oksidlanishi bilan yuzaga keluvchi indonilmetanolning ajralib chiqishi yuz beradi. Bu holat prostaglandinsintaza tasirini esga soladi, unda fermentativ siklni tugatish uchun ikkinchi substrat mavjud bo‘lishi zarur, araxidon kislotasining bog‘lanish markazi esa gemdan 12 A⁰ masofada joylashgan [17]. Bu ferment bilan analogiya o‘simlik peroksidazasi molekulasida bog‘lanish 2-markazi mavjudligini taxmin qilish imkonini yaratdi. O‘simlik peroksidazasi va auksin – bog‘lovchi oqsillar aminokislotali ketma-ketligini taqqoslash 5 ta gomologik uchastkalarining aniqlanishiga olib keldi. Xren peroksidazasi molekulasida

liniyali uchastkalarining fazoviy joylashishi analizi ferment distal domeni tarkibida kompakt subdomeni aniqladi. Subdomen o‘z ichiga faol markaz va yuqori konservativ (faqat o‘simlik peroksidazasida) His 40 va Trp 117 qoldiqlarini oladi. Oxirgi qoldiq peroksidaza molekulasi folding uchun asosiy hisoblanadi, His 40 esa hozirgi kunda yo‘naltirilgan mutatsiya yordamida tekshirilmoqda. Yapon guruhi izlanuvchilari, peroksidaza molekulasida indonil uksus kislotasini bog‘lovch spetsifik markaz mavjud degan xulosaga keldilar. Bu xulosa zamburug‘ tabiatli auksin tabiiy antogonik tipini gipoforining oksigenazasi reaksiyada superoksid–radikal genaratsiyasiga ta’sirini va III birikmaning auksin qo‘shilgandagi stabilligini o‘rganish davomida qilindi. Ikkala jarayonning gipoforin bilan ingibirlanishi konkret xarakteri omillar tomonidan biz taklif qilgan oksigenazali sikl modeli ramkasida interpretirlandi.

Unda IAA bog‘lanishi spetsifik markazi mavjudligi vadorod , auksin va gipoforin peroksidaza bilan oksidlanadi, oxirgisi peroksidazali sikl ingibitori hisoblanmaydi . IAA ning biz taklif qilgan oksidlanish mexanizmi shaxsiy ma’lumotlar bilan birgalikda T. Kavano tomonidan o‘simliklardan IAA-peroksidazali signalli yo‘l mavjudligi taxmini ilgari surish uchun ishlatildi. Shunday qilib, peroksidazalar substratlarni bog‘lovchi spetsifik markazlarga ega bo‘lishidek, elektronlar donorlarini elektronlarni o‘tkazish ichki molekulyar zanjiri bo‘ylab ham oksidlay oladi. Huddi shu hususiyat elektrodan fermentga elektronlarni to‘g‘ridan-to‘g‘ri o‘tkazish hodisasini kuzatish imkoniyatini beradi[.

Peroksidazalar tuzilishi va faolligida Kalsiyning (Ca^{2+}) ro‘li

Avvalgi izlanishlarda HRP molekulasi Ca^{+2} 2ta ioni tutishi va ularning yo‘qotilishi ferment destabilizatsiyaga va inaktivatsiyasiga olib kelishi ko‘rsatilgan. Kalsiyning boshqa 2 valentli metallarga va Ln^{3+} o‘rin almashishi bilan yuzaga kelgan samarani o‘rganish proksimal va distal kalsiy-bog‘lovchi markazlarining noekivalentligi ko‘rsatdi. Oxirgi markaz metal tabiatiga kamroq spetsifik bo‘ldi va aynan u birinchi navbatda kalsiyni

yo‘qotadi. Zamonaviy fizikaviy usullarning qo‘llanilishi, proksimal kalsiyning umumiy strukturasi va katalitik funksiyaning bajarilishini ta‘minlovchi gemning egarsimon konformatsiyasini ushlab turishi uchun muhimligini tasdiqlash imkonini berdi. Distal Ca^{2+} ko‘proq darajada ferment distal domeni strukturasi uchun uchu n kritikdir. Bu domenning Ca^{2+} ionini yo‘qotishdagi yuqori harakatchanligi fermentni saqlashda yoki ekstremal ko‘rsatkichli pH ga uning inaktivatsiyasiga olib keldi. Ikkala xolatda hali eritiladi 1 mm kalsiy mavjudligi HRP ni inaktivatsiyasidan saqlaydi [26].

Araxis kationli peroksidazasi ma‘lum darajada kamroq faol va stabildir, xren peroksidazasiga nisbatan, bunga sabab distal markazda kalsiy ioni bog‘lanishining past konstantasidir Ca^{2+} fermentning xatto konsentrlangan preparatlari uchun xam zarurdir va faqatgina uning mavjudligi ularni uzoq saqlashda RI ni doimiy ko‘rsatkichda ushlab turishga yordam beradi [16].

Arpa peroksidazasi holatida, ferment faollashuvidagi kalsiyning prinsipial roli ko‘rsatilgan pH= 5,5; 7,5 va 8,5 ko‘rsatkichida olingan arpa peroksidazasi nafaol formasi kristallari ferment molekulasida bittadan Ca^{2+} va Na^+ ionlari tutdi. Distal markazda kalsiy ionlarining yo‘qligida katalitik gistidin gem temiridan 8A^0 dan ortiq masofada joylashgan va faol markazda H_2O_2 ning parchalanishi katalizida ishtirok eta eta olmaydi. Faqatgina fermentning protonirlanishi keyin esa Ca^{2+} ionining distal markazga kira olishi vadorod periksiga nisbatan peroksidazaning faollanishini tiklaydi [17]. Shunday qilib o‘simliklar bir qator peroksidazalarida yuqori gomologiyadan va globulaning amaliy bir xil foldingida distal markazda kalsiy ioning bog‘lanishi effektivligi keng chegardi o‘zgarishi mumkin, bu esa ferment preparati faolligi va stabilliga ta‘sir qiladi [64, 65].

Zamburug‘lar peroksidazasi xolatida distal markazdan kalsiy ioning dissotsiyasi salbiy oqibatlariga ega. O‘simlik va zamburug‘ peroksidazalari orasidagi prinsipial farq disulfidli bog‘lardan (xren peroksidazasi xolatida Cys 49-Cys 44) birining turlicha roolidan iborat. O‘simliklar peroksidazasida bu disulfideli bog‘ Ca^{2+} ioni bo‘lmagan holda zaburug‘ peroksidazasida u distal

markazda kalsiy ioni mavjud emasligini kompensirlanmaydi va oqsil strukturasi ushlab turishga qodir emas. Bunday strukturaviy o'ziga hoslik natijasi bo'lib zamburug' fermentlarining sezilarli darajadagi kamroq stabilligidir, bu fermentlarda kalsiy ionining yo'qotilishi kuchli strukturaviy o'zgarishga va faollikning to'liq yo'qotilmasligiga olib keldi.

Ferment strukturasi ushlab turish uchun bunday bunday bog'ni mavjudligi boshqa peroksidalar uchun ham kreativ o'tilgan. Masalan o'simlik peroksidazasidan bilan analogiyasi bo'yicha Mn peroksidazasiga qo'shimcha ikkilamchi mutatsiyasi Ala 38Cys \ Ala 63 Cys disulfidli bo'g'lanish kiritish shu ferment termostabilligi oshiradi [65].

1.4. Peroksidazaning o'simlik kasallanish jaroyonidagi va himoya reaksiyasidagi va ro'li

Zamonaviy qishloq xo'jaligi amaliyotida katta maydonlarga bir turdagi urug'larni sepish, fungitsitlarni qo'llash va boshqalar patogenlarni yangi turini paydo bo'lishiga yordam bermoqda, bunday patogenlar o'simliklarning oldingi chidamli navlarini kuchli darajada zararlaydi. Agar oldingi yillarda navlar 2-3 o'n yillikgacha saqlanib qolgan bo'lsa, endi qo'zg'atuvchilarga bo'lgan chidamlilik 5-7 yil o'tib yo'qolmoqda. Bularning hammasi fitoimmunitet mexanizmlarining biokimyoviy asoslarini chuqur o'rganish, olingan nazariy ishlanmalardan o'simliklarni patogenlardan himoya qilish va unga qarshi kurashish uchun samarali ravishda foydalanish zaruriyatini keltirib chiqaradi [3].

Peroksidaza – judayam keng tarqalgan ferment oqsillaridan biri bo'lib, uni o'rganishga bo'lgan qiziqish yil o'tgani sayin susaygani yo'q. o'simlik va hayvonlar to'qimalarida, shuningdek, zamburug'larning va bakteriyalarning tarkibida bunday fermentning mavjudligi, uni yuqori va quyi organizmlarning muhim hayotiy birikmasi sifatida xisoblashga asos bo'ladi [3, 26]. U indutsibel bo'lib, turli-xil ta'sirlarni keltirib chiqaradi, bunda u yoki o'zining

izofermentlari to'plamini o'zgartiradi, yoki oldindan mavjud bo'lgan molekulyar shakllarni faolligini oshiradi [3, 17].

Peroksidaza bilan oksidlanadigan reaksiyalar substrat molekuasidan perikslarga vodorodni olib o'tishi bilan xarakterlanadi, bunday olib o'tish natijasida substratlarning kuchli reaksiyon birikmalar xisoblangan radikallari hosil bo'ladi. Bunday fermentning ko'pgina substratlari fenol tabiatli birikmalardir. Xinonlargacha oksidlanib, ular kuchli reaksiyon ta'sirlarga ega bo'ladi [3,12, 26]

Tamaki o'simligi barglarining virusli zararlanishi paytida peroksidaza faolligining oshishi 1899-yili aniqlangan [14]. Keyinroq esa peroksidaza vodorod periksi ishtirokida fenollarning bakteriotsit ta'sirini oshirish va shu usul bilan himoya mexanizmida qatnashish xususiyatiga ega ekanligi aniqlangan [14]. Keyinchalik tamaki mozaika virusiga o'ta chidamli bo'lgan tamaki o'simligining immunitet tizimli chidamliligi alomatlari aniqlangan va bunday chidamlilik bilan peroksidaza fermenti faolligi oshishini korrelyatsiyalashi ko'rsatib berilgan.

Kasallanish jarayonida peroksidazaning faolligi yangi izofermentlarning sintezi xisobiga va oldindan sintezlangan ferment hisobiga ham oshishi mumkin [14, 17]. Hozirgi vaqtda mikoorganizmlar bilan zararlangan o'simliklarda izoperoksidaza faolligining o'zgarishi haqida bo'lgan haqiqiy ma'lumotlar yig'ilgan. Xo'jayin o'simlikning hujayrasi bilan o'zaro ta'sirlashib, patogen unda bir-biri bilan sababli va funksional bog'liq bo'lgan reaksiyalarni butun bir zanjirini indutsiyalaydi. Oksidalanish- qaytarilish jarayoning ortishi peroksidaza faolligi – metabolizmning biokimyoviy va fiziologik jarayonlarini murakkab xalqalaridan birining ta'siri xolos.

Peroksidaza faolligini o'zgarishi bakterial, zamburug'li, virusli va boshqalar kabi bo'lgan turli infeksiyalarning ta'siri ostida sodir bo'ladi. Fitopatogenlar bilan kasallangan o'simliklarning to'qimalaridagi peroksidazaning faollashuvi birinchidan, patogenni o'zi bilan sintezlanadigan peroksidaza xisobiga, ikkinchidan hujayrada oldindan mavjud bo'lgan izoperoksidazaning

faollashuvi xisobiga, uchinchidan, de novo peroksidazasining sintezi xisobiga sodir bo'lishi mumkin.

Peroksidaza ko'pgina molekulyar shakllar mavjud bo'lgan fermentlarga taaluqli, bu esa o'simlikga muhitning doimiy o'zgarib turadiga sharoitiga moslashish imkoniyatini beradi. Individual peroksidazalar turli substratlarning oksidlanish reaksiyasini katalizlash xususiyatiga qarab farqlanadi. Shuningdek izofermentlarning to'plami va faolligi bo'yicha o'simliklarga bo'lgan biotik va abiotik stress holatlarining ta'sirini baxolash mumkin. Peroksidaza izofermentlaridan foydalanib, o'simlikning himoya mexanizmini ancha to'liq tavsiflash va qishloq xo'jalik kulturalarining turli navlarida patogenga bo'lgan chidamlilikni aniqlash uchun kerakli bo'lgan usullarni topish mumkin.

So'nggi yillarda o'simlik hujayralarining hujayra yuzasida hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan peroksidazalar mavjudligi va bu peroksidazalar hujayra devoridan osongina ajralib chiqishi va butun o'simlikning apoplasti bo'yicha sirkulyatsiyalanishga qodirligi, patogen bilan to'qnashgan joyda "immun javob"ni ishlab chiqishi haqida ma'lumotlar paydo bo'ldi. Aynan shunday peroksidazalar birinchilardan bo'lib patogen "hujumi" bilan to'qnash keladi, u bilan kurashga chiqadi, o'simlik hujayrasining genomiga patogen paydo bo'lganligi haqida signal "uzatadi" va shu bilan birga uni himoya reaksiyasini ishga tushiradi. Biroq bunday masalalarning barchasi, o'zining muhimligiga qaramay judayam kam o'rganilgan. Shuning uchun kasallikning eng dastlabki davrida hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan peroksidaza qatnashuvi yordamida o'simlikning immun javobini shakllanish masalalarini o'rganish dolzarb masala bo'lib qolmoqda [14, 17].

1.5. O'simlik peroksidazalarini ajratish va tozalash muammolari

Fermentativ kataliz bu - ishlab chiqarish fan va tibbiyotning turli sohalaridagi eng istiqbolli jarayonlaridan biridir. U ko'pgina o'ziga xosliklarga ega bo'lib, ular odatdagi katalizatorlarga nisbatan fermentlarning qo'llanilishi

afzalliklarini namoyon qiladi. Ishlab chiqarishdagi biokatalitik jarayonlarda turli-tuman fermentlardan foydalaniladi, biroq oksireduktazalar xususan o‘simlik peroksidazalari katta qiziqish uyg‘otadi [25]. Klassik peroksidaza ikkita komponentli ferment bo‘lib, faol markaz va oksidlovchiga nisbatan yuqori spetsifiklikni namoyon qiluvchi vadorod peroksidi kolloidli oqsil “tashuvchisi” rollarini bajaruvchisi faol guruhlar (protogematin IX) birlashmasidan iborat. Peroksidaza substratlari ichida turli tabiatli moddalar uchraydi, biroq oson oksidlanuvchi substrat fenollar hisoblanadi. Hozirgi kunda yaxshiroq o‘rganilgan va keng qo‘llanilayotganlaridan biri xren peroksidazasi hisoblanadi. Peroksidaza olishning zamonaviy texnologiyasi ko‘p mehnat talab qiladigan kam mahsulot beruvchi va mavsumiy xomashyo qo‘llanilishi qimmat turuvchi xorijiy xromotografik sorbentlar qo‘llanilishi bilan bog‘liq [8]. Bu esa o‘z navbatida ferment yuqori qiymatini belgilaydi. “Sigma” firmasi peroksidaza preparatlarining 1 grammini 2 mingdan 7 ming AQSh dollarida baholaydi [25, 29]). Shu sababli peroksidazaning yangi o‘simlik manbalarini va uni ajratib olish usullarini izlash dolzarb masala hisoblanadi.

O‘simliklar bilan ishlaganda ma’lum bir murakkabliklarni hisobga olish lozim, ochiq tuproqda o‘stirilgan materialning variabelligi, o‘simlik ekstraktlarida oqsil miqdorining kamligi kabi muammolar mavjud. Bundan tashqari fermentlar tuzilishi va funksiyalarini o‘rganish yuqori darajada tozalangan preparatlarning ishlatilishini talab qiladi. Fermentni gomogen holatda olish esa juda murakkab masala, odatda ajratish manbayi hisoblangan biologik material ko‘p sonliq oqsillar bir-biri va va boshqa biopolimerlar bilan komplekslardan iborat bo‘ladi. Bu aralashma komponentlarining o‘xshash xususiyatlarini ajratishda individual oqsillarni qo‘llashni, turli tuman usullar va ular turli birlashmalarini qo‘llashni talab qiladi. Toza oqsilni olishdagi qiyinchiliklar shuningdek oqsillar labilligi va ular denaturatsiyasi xavfi bilan bog‘liq. Bu esda o‘z navbatida ajratish usullarini tanlanishini chegaralaydi [25]. Nativ fermentli preparatlarni tozalash asosan fraksiyalarga ajratishdan

iborat bolib, hozirgi kunda nisbatan kam sonliy standart usullar qo'llaniladi, ular samarali va qulaydir. Odatda fraksiyalarga ajratish boshlang'ich bosqichida sistema pH ni pasaytirish, bu ko'pchilik nukleoproteidlarning cho'kishiga olib keladi yoki fermentni denaturatsiyasi haroratidan birozgina pastroq haroratda isitish yordamida fraksiyali denaturatsiyani amalga oshiriladi, bunda ko'pchilik ballast oqsillar cho'kadi [25, 31, 35]. Organik erituvchilar yordamida fraksiyalash - bu oqsillarni ajratish standart usullardan biridir. Buning uchun ko'pincha atseton, etil spirit va elektrolitlar suvli eritmasi bilan birgalikda trixloruksus kislotasi (masalan sulfat ammoniy bilan) ishlatiladi. Oqsillarni atseton bilan fraksiyalarga ajratishda yaxshi natijalar olish uchun elektrolitlar past konsentratsiyasi (masalan 30 dan kamroq) talab qilinadi va shu sababli oqsilli eritmani taxminan dializ qilib olish maqsadga muvofiqdir. Ko'pchilik fermentlar xona haroratida organik erituvchilar tasirida inaktivatsiyaga uchrashi sababli izlanish davomida doimo past haroratda ushlab turish uchun maxsus choralar ko'rish zarur .

Qatlamlarda fraksionirlash juda keng qo'llaniladi. Oqsillarni fraksionirlash uchun ko'pincha sulfat ammoniydan foydalaniladi, chunki suvda yaxshi eriydi va ko'pchilik fermentlarga nisbatan negative tasirga ega emas, bundan tashqari u ko'pchilik fermentlarga nisbatan stabilizirlovchi tasirga ega va shu sababli u bilan ishlaganda oqsilarni fraksiyalashni past haroratda olib borish shart emas. Sulfat ammoniyni toza preparatlari ham kuchsiz nordon reaksiyaga ega, shu sababli pH ni aniq nazorat qilish uchun oqsilli eritmaga odatda qattiq tuz solinadi. Tuzlanish boshlanadigan vaqtdagi tuzning aniq miqdori faqatgina pH ko'rsatgichi emas balki, harorat va tuzning tabiati, shuningdek ferment miqdori bilan aniqlanadi [25]. Fraksion adsorbsiyani 2 ta usulda bajarish mumkin; birinchisida doimiy ravishda aralashtirib turilib ferment eritmasiga adsorbent qo'shiladi, keyin esa har bir portsiyani sentrifugalash bilan ajratib olinadi. Ikkinchi usulda fermentli eritma adsorbentli kolonkadan o'tkaziladi va kollektor yordamida eluat fraksiyalari yig'iladi. birinchi usulda ferment adsorbsiyasida uni eritma boshqa

komponentlaridan ajratiladi yoki adsorbentdan elyuirlanadi. Agarda ferment adsorbsiyalanmasa unda adsorbent bilan ishlov berishini ferment eritmasidan ballast moddalarni yo‘qotishda qo‘llash mumkin [25]

Elektr maydonida turli oqsillarni (elektrolitlar kabi) aralishtirish tezligidagi farqlar fermentlarni tozalash elektroforetik usullarini ishlab chiqish uchun asos bo‘lib xizmat qiladi. Ularning ko‘pchiligini nisbatan kamroq miqdordagi moddalar bilan ishlashdagi analitik izlanishlarda qo‘llash mumkin. Biroq ularni nisbatan ko‘p miqdordagi oqsillarni ajratish uchun qo‘llashda ma’lum qiyinchiliklar yuzaga keladi. Bular bo‘lingan moddalarni preparativ ajratish bilan bog‘liq, biroq elektroforez usuli zaryadlangan zarralar-ionlarning elektr toki ta’sirida qarama-qarshi zaryadlangan elektr tomon harakatlanishga asoslangan bu usul – turli xildagi og‘irlikka ega bo‘lgan oqsil molekulari aralashmasini fraksiya va individual oqsillarga ajratish imkonini beruvchi statsionar elektr maydonidir va shu sababli fermentlarni ajratishda keng qo‘llaniladi [25].

Ferment yetarlicha tozalangan bo‘lsa unda alohida holatlarda uni kristallga aylantirish mumkin. Fermentlar kristalizatsiyasini odatda sulfat ammoniy eritmasida amalga oshiradi. Odatdagi usul fermentning yetarlicha kontsentrlangan eritmasiga kuchsiz loyqalanish paydo bo‘lgunicha tuz qo‘shishdan iborat. Keyin eritma ma’lum muddatda qoldiriladi. Keyin yana seki-asta (juda sekin) tuz miqdori oshirilib boriladi. Avvalgi bosqichlardan biri organik erituvchilar bilan fraksionirlash bo‘lganda, odatda kristalizatsiya osonlashadi. Bu holat balkim, kristalizatsiyaga halaqit beruvchi qandaydir bir lipid tabiatli materialning yo‘qotilishi bilan bog‘liqdir. Fraksiyaning ketma-ketligi eksperimentall yo‘l bilan aniqlanadi, biroq, umuman olganda aytish mumkinki, anchagina tezroq tozalash fraksiyalash turli usullarini almashtirish bilan amalga oshadi. Bir xil usullarni qaytarish fermentni preparat faolligiga ekstrat buferi tarkibi bevosita tasir qilishi aniqlangan. Uni to‘g‘ri tanlash esa fermentlarni tozalashning birinchi bosqichi hisoblanadi [25, 35].

I bob bo'yicha xulosa

Peroksidaza fermenti bugungi kungacha o'simliklardan, mikroorganizmlar va hayvonlardan ajratib amaliyotga foydalanib kelinmoqda. Asosan amaliyotga juda keng miqyosda ishlatilayotgan peroksidaza xren o'simligidan ajratilgan va amaliyotga keng miqyosda qo'llaniladi.

O'simlik hujayrasida erkin hujayra organellalari mavjud bo'lib, ular antimikrob ta'sirga ega bo'lgan peroksidaza tutadi. Peroksidazaning aktivligi o'simlik hujayrasida hosil bo'ladigan vododrod peroksidining paydo bo'lishi bilan namoyon bo'ladi. Meditsinada peroksidaza o'tkir, og'ir bakterial va virus (shu jumladan OITS), infeksiyalar, allergik, autoimmun, endokrinologik va o'sma kasalliklarini aniqlashda qo'llaniladigan immunologik usullarda keng qo'llaniladi. Bundan tashqari peroksidaza periyodatli oksidlanishdan so'ng, nishonlangan uglerod-14 ga ega bo'lgan va monoklonal antitana sintezida qatnashuvchi glikoproteidlarning sintezida ishtirok etadi. Ushbu ferment preparati bugungi kungacha O'zbekistonga chet davlatlardan import qilinadi. Shunday ekan ushbu ferment preparatini o'zimizda toza holda ajratish va ishlab chiqarishga tadbir qilish muhim masala ekanligi, iqtisodiy jihatdan mablag' tejashiga erishilgan bo'lardi.

2-BOB. TADQIQOT MATERIALLARI VA USLUBLARI

Ushbu magistrlik dissertatsiyasi fakultetning Mikrobiologiya va biotexnologiya kafedrasidagi Virusologiya ilmiy laboratoriyasida bajarildi. Tekshirish uchun zarur bo'lgan o'simliklar esa Botanika ilmiy-ishlab chiqarish bog'i hududidan yig'ib olindi. Tajribalarni bajarish uchun zarur bo'lgan xloroform, ammoniy sulfat, polietilenglikol (M.M. 6000), etilendiamintetraatsetat (EDTA), natriy teosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 5\text{H}_2\text{O}$), atsetat buferi (pH=4,7), benzidin gidroxlorid ($\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$)₂ × 2HCl, fosfat buferi (K_2HPO_4 ba Na_2HPO_4), tris-HCl (tris - oksimetilaminometan), Natriy atsetat (CH_3COONa) tuzi kabi kimyoviy reaktivlar va moddalar ishlatildi. Foydalanilgan barcha reaktivlar «kimyoviy toza» yoki «analizlar uchun toza» belgisiga ega. Bundan tashqari ishda asosiy tadqiqot ishlari turli yovvoyi o'simliklardan ajratib olingan va qisman tozalangan peroksidaza fermenti ustida olib borildi.

2.1. O'simlik barg to'qimasidan peroksidaza fermentini ajratish uchun namuna tayyorlash

Buning uchun tabiiy holda o'suvchi otquloq o'simligini bargini olib, elektron tarozi yordamida barg to'qimasidan teng miqdorda 10 mg olib, chinni hovonchaga solinadi. So'ngra uning ustiga 1:1 nisbatda 10 ml atsetat (CH_3COOH) buferidan (pH=4,7) 0,04 M li eritmasidan solib, hovonchada yaxshilab ezildi va hosil bo'lgan massani to'rt qavatli doka yordamida suzib probirkalarga quyildi. Har bir gomogenatni sentrifuga yordamida 4000 ayl./daq.da 15 daq. sentrifuga qilinib, hujayra komponentlaridan tozalab olinadi. Sentrifugalashdan so'ng cho'kma usti suyuqligini maxsus raqamlangan probirkalarga quyilib, cho'kma esa tashlab yuborildi. Hosil bo'lgan bu cho'kma usti suyuqligi ferment aktivligini aniqlash uchun dastlabki namuna bo'lib xizmat qilad

2.2. Peroksidaza fermentini aniqlash uchun substrat tayyorlash

Benzidin suvda qiyin suyuqlanadi atsetat buferida suyuqlanishi esa pH ga bog'liqdir. Buning uchun 92 mg benzidin 100 ml 0,2 M-li atsetat buferida pH 4,7 da suyiltiriladi, bu qiyidagicha tayyarlanadigan 0,005 M-li eritmaga to'g'ri keladi. Buning uchun 200 ml-li kolba olinib unga 2/3 (66,6 ml) qism atsetat buferi solindi, uning ustiga 2,3 ml (2,4 mg) konstentrlangan (ledyannoy) uksus kislota va 184 mg benzidin solindi. Kolbani taxminan 50-60⁰ gacha suv hammomida doimiy ravishda aralastirilib qizdirildi. Benzidin to'liq erib ketgandan keyin (10-15 min) kolbaga 5,45g natriy uksus solinib eritildi, so'ngra kolba sovutildi va unga distillangan suv solinib, 200 ml ga yetkazildi. Qorong'uda aralashmani 7-10 kungacha saqlab ishlatish mumkin.

2.3. A.N.Boyarkin metodi yordamida o'simlik peroksidazasi aktivligini o'rganish

Yuqorida keltirilgandek (2.1) tayyorlangan namunalar tarkibida peroksidaza fermenti mavjudligi, Boyarkin usuli (1951) asosida aniqlandi [8]. Buning uchun shisha plastinka yuzasiga 2 tomchi elyuent + 0,4 ml benzidin eritmasi + 0,2ml distillangan suv + va 0,2 ml H₂O₂ solib reaksiya borish tezligi asosida ferment aktivligi aniqlanadi.

Ko'pgina adabiyotlarda bu usul yordamida ferment aktivligini aniqlash uchun Reason aralashmasidan foydalaniladi. Reason aralashmasining umumiy o'lchami 10 ml ni tashkil etadi va ular: 1) o'rganilayotgan suyuqlik yoki suyiltirilgan holdagi 2ml; 2) 0,2 M li atsetat buferida (pH 4,7) suyiltirilgan 0,005 M li benzidin 4ml; 3) distillangan suv -2ml; 4) 0,04 M vodorod peroksid-2ml [8].

2.4. Peroksidaza fermentining temperatura va pH optimumini aniqlash

Buning uchun yuqorida keltirilgandek tayyorlangan ferment namunasi bir nechta probirkaga solib chiqildi va ulardan bittasi nazorat uchun qoldirilib,

qolgani esa turli haroratlarda (45, 50, 55, 60, 65, 70, 75°) suv hammomida 10 daqiqadan qizdirildi. Suv hammomidan olingan probirkalar oqar suv tagida sovutildi. Soʻngra ferment aktivligi nazoratga nisbatan fotokollorometriya (FEK) usuli yordamida oʻrganib chiqildi.

Oʻsimlik peroksidazasining pH optimumini aniqlash

Buning uchun yuqorida keltirilgandek tayyorlangan ferment namunasi olinib 10 marotaba qoʻshimcha suyultirildi. Ushbu namunalarni bittasini nazorat sifatida qoldirilib qolgan namunalarni 10 ta alohida raqamlangan probirkalarga quyib chiqildi. Soʻng har namunani pH i, pH metr asbobi yordamida (2,3,4,5,6,7,8,9,10) gacha oʻzgartirildi va har bir namunani ferment aktivligi FEK qurilmasi yordamida aniqlandi.

2.5. Oʻsimlikdagi hujayra devori bilan kuchsiz bogʻlangan va eruvchan peroksidaza formasini oʻrganish

Hujayra devori bilan kuchsiz bogʻlangan peroksidaza miqdorini oʻrganish uchun qaychi yordamida yaxshilab maydalangan oʻsimlik barg toʻqimasi (1 g) 5 ml sovuq atsetat bufer (pH 4,7) bilan shpritsga solindi va 2-3 marta 1 daqiqadan siqilgan holda ushlab turiladi [36]. Olingan-hujayra devori bilan kuchsiz bogʻlangan peroksidaza 15 daqiqa 8000 ayl./daq.da oʻsimlik toʻqimasidan ajratib olindi, olingan choʻkma usti suyuqligidan keyinchalik peroksidaza aktivligini oʻrganish uchun foydalanildi. Choʻkma esa hujayra devori bilan kuchli bogʻlangan peroksidazani ajratish uchun 5 ml sovuq atsetat bufer (pH 4,7) bilan chinni xovonchaga solinib yaxshilab eziladi. [36]. Hosil boʻlgan gomogenat 3000 ayl./daq.da 15 daqiqa sentrifuga qilinib, choʻkma usti suyuqligi olinib peroksidaza aktivligi oʻrganildi.

2.6. Peroksidaza aktivligini fotokolorimetrik (FEK) usul yordamida aniqlash

Buning uchun yuqorida tayyorlangan o‘simlik bargidan olingan namuna va peroksidazani aniqlash uchun tayyorlangan substratdan foydalanilgan holda fotokolorimetr qurilmasi yordamida ferment aktivligi aniqlanadi. Buning uchun 4 ta 2 sm li kyuveta olib, ularning har biriga 2 ml dan ferment suyuqligidan pipetka yordamida quyib chiqildi. So‘ngra ularning ustiga (har bir kyuvetaga) 2ml dan benzidin va 2 ml distillangan suv solindi. O‘lchash fotokolorimetr asbobining qizil svetofiltrida 440 nm da amalga oshirildi. Dastlab FEK ning strelkasi nol nuqtaga tog‘rilanadi, so‘ng o‘ng baraban yordamida galvanometer strelkasi o‘ng tomondagi chetki holatiga tog‘rilandi ($E=0,125$ yoki $0,250$) chap kyuvetaga 2 ml distillangan suv, o‘ng kyuvetaga esa 2 ml ($0,04$ M li) vodorod peroksid (H_2O_2) pipetka yordamida tomiziladi. Vodorod peroksid konsentratsiyasi obyektga bo‘g‘liq bo‘ladi. Boyarkin ma‘lumotiga $0,04$ M hisoblanadi. Bir tomchi H_2O_2 solingan zahoti FEK qopqog‘i yopilib sekundomer qo‘yiladi. Ferment aktivligi reaksiya borish tezligiga qarab quyidagi formula yordamida aniqlanadi (A).

$$A = \frac{E(\alpha \times \beta \times \gamma)}{d \times t}$$

Formuladagi: E-standart plastinka ekstinsiyasi ($0,120$ - $0,130$ oralig‘ida bo‘ladi); d-probirkaning 1 sm da harakatlanadigan nurning to‘lqin uzunligi; t-reaksiya vaqti, sekunda α - olingan to‘qima gr massasiga solingan suyuqlikning ml miqdori; β - o‘rganilayotgan suyuqlikning sentrifuga yoki filtrlash jarayonida qo‘shimcha suyultirish darajasi. γ - reaksiya aralashmasidagi o‘rganilayotgan suyuqlikning suyultirish darajasi; umumiy reaksiya miqdori 10 ml, shuning 2 ml ni o‘rganilayotgan suyuqlik tashkil etadi, bu faktor 5 ml ni tashkil qiladi. $E=0,125$ va $d=1,6$ bo‘lganda formula quyidagi ko‘rinishni oladi.

$$A = \frac{0,125}{1,6} \times \frac{5(\alpha \times \beta)}{t} = \frac{0,39(\alpha \times \beta)}{t}$$

2.7. Virus bilan kasallangan o'simlikdagi peroksidaza miqdorini o'rganish

Virus bilan kasallangan va sog'lom o'simlikdagi peroksidaza fermenti miqdorini o'rganish uchun tabiiy holda o'suvchi otquloq o'simligini virus bilan zararlangan va sog'lom bargini olib, elektron tarozi yordamida barg to'qimasidan teng miqdorda 10 mg olib, chinni hovonchaga solinadi. So'ngra uning ustiga 1:1 nisbatda 10 ml atsetat (CH_3COOH) buferidan ($\text{pH}=4,7$) 0,04 M li eritmasidan solib, hovonchada yaxshilab ezamiz va hosil bo'lgan massani to'rt qavatli doka yordamida suzib probirkalarga quyiladi. Har bir gomogenatni sentrifuga yordamida 4000 ayl./daq.da 15 daq. sentrifuga qilinib, hujayra komponentlaridan tozalab olinadi. Sentrifugalashdan so'ng cho'kma usti suyuqligini maxsus raqamlangan probirkalarga quyilib, cho'kma esa tashlab yuboriladi. Hosil bo'lgan bu cho'kma usti suyuqligi ferment faolligini aniqlash uchun dastlabki namuna bo'lib xizmat qiladi.

2.8. Otquloq barg to'qimasidan peroksidaza fermentini ajratish va tozalash usullari

Buning uchun dastlab yer qalampiri o'simligi barg to'qimasidan ferment preparatini olish uchun dastlabki namuna, o'simlik barg to'qimasini teng miqdordagi atsetat buferi ($\text{pH}=4,7$) bilan chinni xovonchada maydalandi va to'rt qavat dokadan o'tkazib olish orqali tayyorlab olindi. Ekstrakti hujayra komponentlaridan tozalash uchun esa 4000 ayl/daq.da 15 daqiqa davomida sentrifuga qilinib, cho'kma usti suyuqligi olindi, cho'kma esa tashlab yuborildi. Bu tozalash uchun zarur bo'lgan ferment aralashmasi bo'lib, undan fermentni tozalash uchun esa tuzlar yordamida cho'ktirish, izoelektrik nuqtada cho'ktirish, gelfitratsiya qilish kabi usullari keng qo'llaniladi [24]. Ularning ichidan gelfitratsiya usuli yumshoqligi, ko'p mehnat talab qilmasligi hamda yirik molekulyar moddalarni molekulyar massasiga asosan ajratib berishi bilan alohida ajralib turadi [24]. TSK-gelini gel xromotografik kolonkaga solishdan

oldin uni yaxshilab magnitli mishalka yordamida 4-5 marta gel hajmiga nisbatan 2-3 marotaba ko'p distillangan suv bilan 3-4 marotaba yuviladi. Bu jarayonda gel tarkibidagi keraksiz birikmalar gel tarkibidan suv bilan chiqib ketadi. Gel solingan suv tindirilganda tiniq holatga kelgandan so'ng kolonkaga ehtiyotlik bilan solib chiqiladi. Kolonkaning umumiy uzunligi 50 sm, gel bilan to'ldirilgan qismi 38 sm. Kolonkadagi gelni bufer bilan yuvishda solinadigan elyuent miqdoridan ikki hissa ortiq atsetat buferi 0.2Mli (pH=4.7)da yuviladi peristaltik nasosning 2ATM bosimda haydaladi. Kolonkaga solingan geldan (TSK-HW-65Fine) ferment preparatini ajratib olish jarayoni quyidagicha amalga oshiriladi. Buning uchun ish holatiga keltirilgan gel xromatografik kolonkani gel bilan to'ldirilgan (38sm) qismiga ehtiyotkorlik bilan aylana shaklda kesilgan filtr qog'ozni gelni ustiga quyamiz. Biroz vaqt o'tgandan keyin gelni yuqoridagi buffer eritmasi (atsetat buferi 0,2M pH=4.7)pipetka yordamida ehtiyotkorlik bilan tortib olamiz. Bunda filtr qog'oz tagidagi gel qo'zg'alib ketmasligi kerak. Kolonkani pastki qismidagi shlangni maxsus raqamlangan 1-20 gacha bo'lgan probirkalarga 3mldan (har bir probirkaga 3ml dan elyuent yig'ilishi uchun o'rtacha 5 min) yig'ib olindi. Olingan fraksiyalarda ferment mavjudligini Boyarkin metodi yordamida aniqlanadi [8].

II bob bo'yicha xulosa

Otquloq o'simligidan peroksidaza fermentini ajratish va hususiyatlarini o'rganishda otquloq bargidan obekt sifatidqa, benzidin va vadorod peroksididan substrat sifatida foydalanildi. Bundan tashqari fermentning fizik kimyoviy va katalitik xossalarini o'rganishda har xil tadqiqot usullari qo'llanildi. Birlamchi manbaa tarkibidagi ferment oqsillarini ajratishda mikrobiologik, biokimyoviy va biotexnologik usullardan foydalanildi. Ferment faolligi har qaysi usullardan so'ng o'rganib borildi.

3-BOB. OLINGAN NATIJALAR VA ULARNING MUHOKAMASI

3.1. Turli yovvoyi o‘simliklardan peroksidaza fermentini ajratish va yuqori faollikka ega bo‘lgan o‘simlik peroksidazasini aniqlash

Bugungi kunda tibbiyot, veterinariya, qishloq xo‘jaligida turli patogen mikroorganizmlarni aniqlashda sezgir diagnostika usullari ishlatilayotgan bo‘lib, bu usullar immunologiya va biotexnologiyaning rivojlanishi asosida ishlab chiqilgan immunologik usullar hisoblanadi. Bunday sezgir usullar qatoriga immunoferment analizi, immunobloting, virobakterial agglutinatsiya kabi usullarni kiritish mumkin. Bunday sezgir usullarni ishlab chiqish toza ferment bugungi kunda peroksidaza, ishqoriy fosfataza kabi stabil fermentlar ishlatilib kelinmoqda [36].

Peroksidaza fermenti bugungi kungacha o‘simliklardan, mikroorganizmlar va hayvonlardan ajratib amaliyotga foydalanib kelinmoqda. Asosan amaliyotga juda keng miqyosda ishlatilayotgan peroksidaza xren (*Armoracia rusticana*) o‘simligidan ajratilgan va amaliyotga keng miqyosda qo‘llaniladi [38].

O‘simlik hujayrasida erkin hujayra organellalari mavjud bo‘lib, ular antimikrob ta‘sirga ega bo‘lgan peroksidaza tutadi. Peroksidazaning aktivligi o‘simlik hujayrasida hosil bo‘ladigan vododrod peroksidining paydo bo‘lishi bilan namoyon bo‘ladi. Bundan tashqari, peroksidaza lignin hosil bo‘lishida ham ishtirok etadi. Lignifikasiya jarayonida ligninga yaqin bo‘lgan fenilpropanoid sintezlanadi va u bevosita vodorod peroksidi ishtirokida uni polimerizasiyalanishida qatnashadi [5].

Meditinada peroksidaza o‘tkir, og‘ir bakterial va virus (shu jumladan OITS), infeksiyon, allergik, autoimmun, endokrinologik va o‘sma kasalliklarini aniqlashda qo‘llaniladigan immunologik usullarda keng qo‘llaniladi. Bundan tashqari peroksidaza periyodatli oksidlanishdan so‘ng, nishonlangan uglerod-

14 ga ega bo'lgan va monoklonal antitana sintezida qatnashuvchi glikoproteidlarning sintezida ishtirok etadi [18].

Bir qator tadqiqotchilar (Regalado, Henriksen va boshqalar) ma'lumotiga ko'ra turli o'simliklarda bu ferment miqdori va izoferment turlari bir-biridan farqlanadi. Shuning uchun mamlakatimiz iqlim sharoitida o'suvchi o'simliklardan ferment ajratish mumkin bo'lgan manbalarni aniqlash bugungi kunning dolzarb masalalaridan biri hisoblanadi. Bugungi kungacha peroksidaza fermenti turli tirik organizmlar, jumladan o'simlik, hayvon va mikroorganizmlardan ajratib olingan va ularning miqdori bir xil bo'lmaydi. O'simlik peroksidazasi yer qalampiri (*Armoracia rusticana*), palma bargi kabi bir qator o'simliklardan ajratilgan va hozirgi kunda yer qalampiridan ajratilgan peroksidaza keng mashstabda ishlatiladi [22]. Shunday ekan fermentni ajratish, toza preparatini olish bugungi kunning dolzarb masalalaridan biri hisoblanadi. Bu ferment juda ko'pchilik o'simliklarda uchraydi, ammo ulardagi ferment miqdori, izofermentlari va bir qator xususiyatlari bilan bir-biridan farqlanadi.

Shuning uchun ushbu ishda O'zbekiston iqlim sharoitida o'sadigan turli yovvoyi o'simliklardan fermentni ajratish, xususiyatlarini o'rganish hamda yuqori peroksidaza aktivligiga ega bo'lgan fermentni aniqlash maqsad qilib olindi. Buning uchun yirikbarg zubturum (*Plantago major*), otquloq (*Rumex crispus*), yer qalampiri (*Armoracia rusticana*), oq sho'ra (*Chenopodium album*) kabi o'simliklardan (3.1-rasm) namuna (barg) olinib, materillar va ish uslubida keltirilgandek (2.1-bo'lim) namuna tayyorlab olindi va ferment xususiyatlarini o'rganish ustida tadqiqot ishlari olib borildi. Ferment xususiyatlariga uning termostabilligi, pH optimumi kabi xususiyatlari mavjudki bu ulardagi farqlarni aniqlashga asos bo'lib xizmat qiladi .

Shuning uchun dastlab har bir o'simlikdan ajratilgan ferment aralashmalaridan foydalanilgan holda fermentning temperatura optimumi 2.4-bo'limda keltrilgandek o'rganib chiqildi. Ferment aktivligi Boyarkin usuli yordamida aniqlandi. Olingan natijalar jadvalda keltirilgan (3.1- rasm).



3.1 - rasm. **Peroksidaza fermenti o'rganilgan o'simliklar:** A) yirikbarg zubtutum (*Plantago major*); B) Otquloq (*Rumex crispus*) C) yer qalampiri (*Armoracia rusticana*); D) oq sho'ra (*Chenopodium album*).

3.1- jadval

Turli yovvoyi o'simliklardan ajratilgan peoksidaza fermentining issiqlikdan faolligini yo'qotish nuqtasini aniqlash

№	O'simlik nomi	Qizdirish darajasi, °C							
		50°	55°	60°	65°	70°	75°	78°	80°
1.	Zubtutum (<i>Plantago major</i>)	++++	++++	+++	++	+	-	-	-
2.	Otquloq (<i>Rumex crispus</i>)	++++	++++	++++	+++	++	+	+	-
3.	Yer qalampiri (<i>Armoracia rusticana</i>)	++++	++++	++++	++	+	-	-	-
4.	Oq sho'ra (<i>Chenopodium album</i>)	++++	++++	+++	++	+	+	-	-

Izoh: + + + + 100% fermentativ faollik;
 + + + 70% fermentativ faollik;
 + + 50% fermentativ faollik;
 + 30% fermentativ faollik;
 - 0% fermentativ faollikning kuzatimasligi

Jadvaldan ko‘rinib turibdiki, zubtutum va otquloq o‘simliklaridan ajratib olingan ferment suyuqlanmasi ancha termostabil bo‘lib, bunda ferment o‘z aktivligini 78°C gacha saqlab, undan yuqori haroratda ferment aktivligining yo‘qolganligi kuzatildi. Yer qalampiri o‘simligidan ajratib olingan ferment boshqa o‘simliklarga nisbatan nostabil bo‘lib, bunda ferment aktivligini 75°C gacha bo‘lgan haroratda yo‘qotganligini, oq sho‘ra o‘simligidan olingan ferment esa o‘z aktivligini 75°C gacha bo‘lgan haroratda namoyon qilib, undan yuqori haroratda esa aktivligini yo‘qotganligi aniqlandi (3.1-jadval).

Demak, olingan natijalar asosida shunday xulosa qilish mumkin, o‘rganilgan turli yovvoyi o‘simliklardan otquloq va zubtutum o‘simliklaridan ajratilgan peroksidaza boshqa o‘rganilgan o‘simlik peroksidazalaridan o‘zining yuqori haroratga chidamli ekanligi aniqlandi. Bu o‘z navbatida amaliy jihatdan termostabil ferment preparatini aniqlash va amaliyotga tadbiq etish kabi muammolarning hal qilinishiga qaratilgan ishlardan biri hisoblanadi. Shuning uchun keyingi tadqiqotlarimizda otquloq o‘simligidan ajratilgan ferment ustida olib borildi, bu yangi, arzon va mahalliy xomashyolarni izlab topishga qaratilgan amaliy ishlardan hisoblanadi.

3.2. O‘simlikdagi ferment faolligini mavsumga bog‘liq xolda o‘rganish

O‘simliklarnin turli rivojlanish fazalarida ularning tanasidagi tuli fiziologik jarayonlar biri-birdan farqlanishi haqidagi ma‘lumotlar mualliflar tomonidan keltirib o‘tilgan [25]. Shuning uchun keying tadqiqotlarda otquloq o‘simligi bargida peroksiodaza miqdorining o‘zgarishini uning aktivligiga asosan o‘rganib chiqildi. Olingan natijalar jadavalda keltirilgan (3.2-jadval).

Otquloq peroksidazasi faolligining mavsumga bog'liq xolda o'zgarishi

Namuna uchun olingan o'simlik a'zosi	Tajriba o'tkazilgan vaqti			
	Mart	Aprel	May	Iyun
	Ferment faolligi, Ed/ml			
Uchki	12,35	14,1	73.52	74.62
O'rta	18,71	17,1	61.13	87.2
Pastki	24,54	33.2	76.02	84.74

Olingan natijalardan ko'rinib turibdiki o'simlik turli yarusidagi ferment har xil faollikni namoyon qilib, mavsumiy o'zgarish hususiyatiga ega ekanligi aniqlandi. Mart oyida o'tkazilgan tajribalarda pastki yarusdagi ferment faolligi uchki va o'rta yarusga nisbatan yuqori ekanligi aniqlandi. Aprel oyida olingan natijalar mart oyiga nisbatan sezilarli o'zgarmaganligi ma'lum bo'ldi. May va iyun oyida o'tqazilgan tajribalar esa oldingi oylarda olingan natijalardan ancha farqli bo'lib, bu davrdagi namunalarda shingil hosil qilib gullagan o'simlikdagi uchki o'rta va pastki yarusdagi fermentning solishtirma faolligi yuqori bo'lib chiqdi. Bir qator adabiyotlarda keltirilishicha peroksidaza fermenti o'simlikning har xil stress holatlarida va gullash bosqichida hujayralarda miqdori ortishi keltirib o'tilgan. Xulosa o'rnida shuni aytish mumkinki keyingi tadqiqotlarda ferment oqsilini ajratish va tozalash ishlari pastki va o'rta yarusdagi va gullash davridagi o'simlikda amalga oshirilsa ko'zlangan maqsadga erishish ancha osonlashadi.

3.3. Otquloq peroksidazasining temperatura optimumini aniqlash

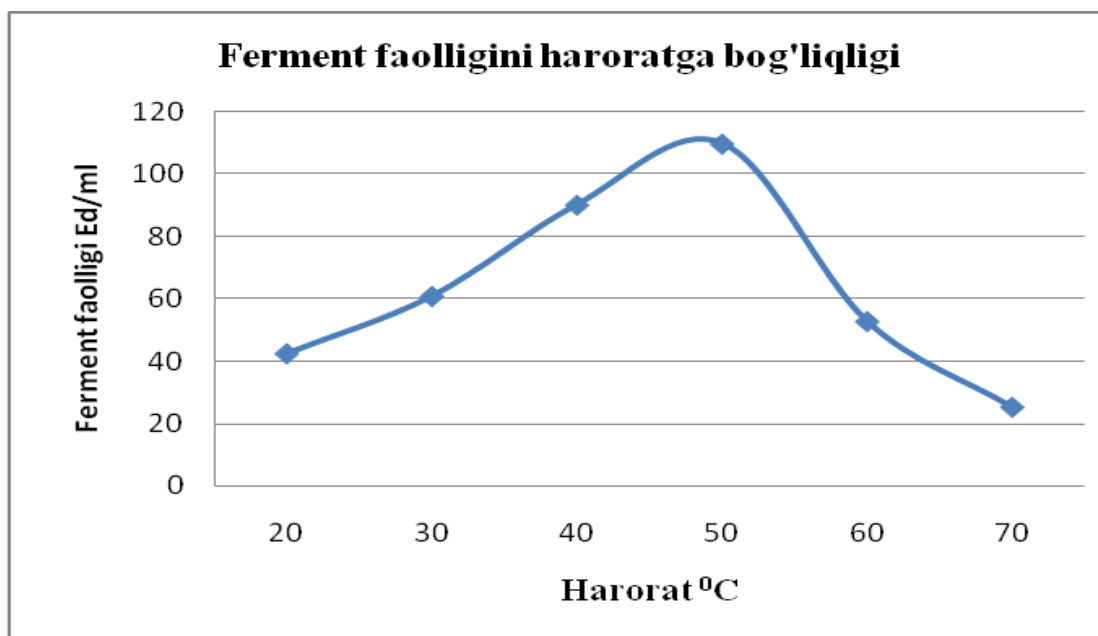
Fermentativ kataliz bu - ishlab chiqarish, fan va tibbiyotning turli sohalaridagi eng istiqbolli jarayonlaridan biridir. Ishlab chiqarishdagi biokatalitik jarayonlarda turli-tuman fermentlardan foydalaniladi, oksireduktazalar sinfining vakili sifatida xususan o‘simlik peroksidazalari katta qiziqish uyg‘otadi [16].

Peroksidaza olishning zamonaviy texnologiyasi ko‘p mehnat talab qiladigan kam mahsulot beruvchi va mavsumiy xomashyo qo‘lanilishi qimmat turuvchi xorijiy xromotografik sorbentlar qo‘lanilishi bilan bog‘liq bo‘lib, bu o‘z navbatida ferment narxining oshishiga olib keladi [16]. Shuning uchun mamlakatimizda turli sohalar uchun zarur bo‘lgan termostabil bo‘lgan peroksidaza fermenti manbalarini aniqlash muhim amaliy va nazariy ahamiyat kasb etadi.

Ushbu ishda optimum haroratda yuqori aktivlik namoyon qiluvchi peroksidaza izofermentini aniqlash va aktivligini o‘rganish maqsad qilib olindi. Bu ishni amalga oshirish uchun tabiiy holda o‘sovchi otquloq (*Rumex crispus*) va yer qalampiri (*Armorasia rusticana*) o‘simliklari barg to‘qimasidan ajratilgan ferment preparatining aktivligi turli haroratda qizdirilgandan so‘ng o‘rganib chiqildi. Bu jarayonni amalga oshirish uchun har ikkala o‘simlikdan ajratilgan ferment preparati 100 marotaba suyultirib o‘rganildi, nazorat sifatida esa har ikkala o‘imlikdan olingan qizdirilmagan ferment preparatidan foydlandi. Ferment aktivligi haroratning ortib borish tartibida Boyarkin usulida, KFK-3 qurilmasida aniqlandi.

Olingan tadqiqot natijalari shuni ko‘rsatdiki, harorat ortib borishi natijasida ferment aktivligi nazoratga nisbatan quydagi natijani ko‘rsatdi: *Armorasia rusticana* o‘simligidan ajratilgan ferment preparatining aktivligi nazoratga nisbatan 35=38,2, 40=46,5, 45°=50,4, 50°=52,1, 55°=64,4, 60°=53,9, 65°=63,4, 70°= 34,2, 75°=25,2 Ed/mg ni taskil qilgan bo‘lsa, *Rumex crispus* o‘simligidan

ajratilgan ferment preparatining aktivligi esa nazoratga nisbatan $35=52,1$, $40=76,3$, $45=128,8$, $50=109,8$, $55=94,0$, $60=98,2$, $65=60,88$, $70=32,5$ Ed/ml ni tashkil etgan bo'lsa, 75° da esa umuman aktivlik namoyon bo'lmaganligi kuzatildi.



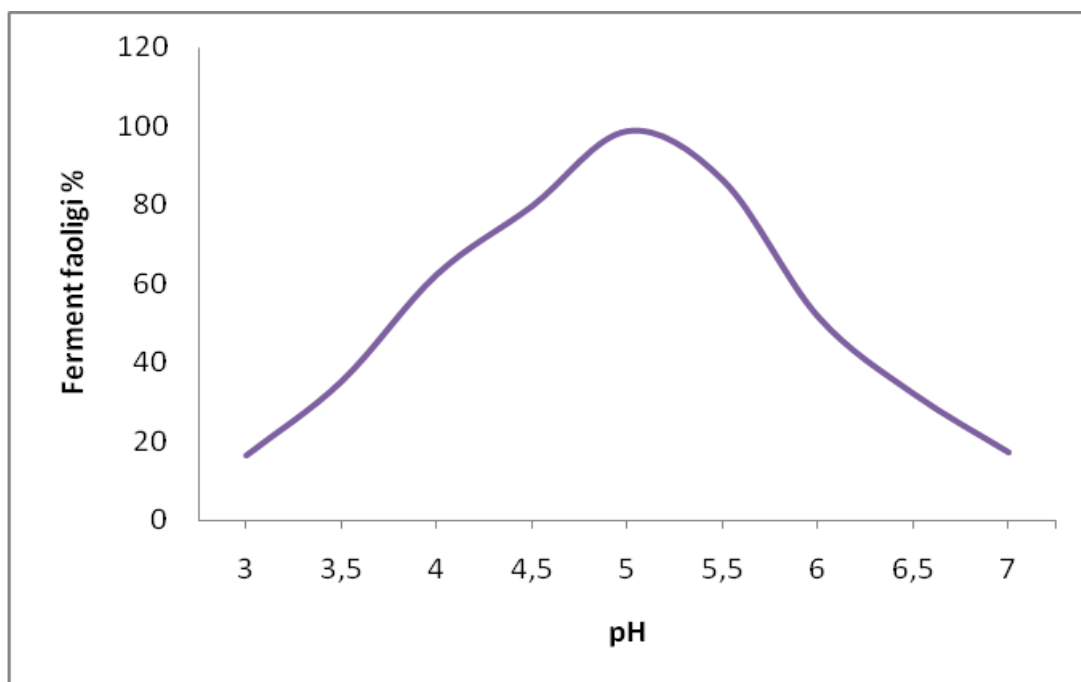
3.2 – rasm. **Otquloq peroksidazasining temperatura optimumi**

Umuman olganda, otquloq o'simligidan ajratilgan peroksidaza aktivligining yuqoriligi, keyinchalik bu o'simlikdan yuqori aktivlikka ega bo'lgan ferment preparatini olish imkonini beradi. Bu esa keyingi tadqiqotlarda fermentning boshqa xususiyatlarini ham yanada chuqurroq o'rganishni talab etadi.

3.4. Otquloq peroksidazasining pH optimumini aniqlash

Ushbu tajribida peroksidazaning pH optimumi o'rganib chiqildi. Buning uchun ikkinchi bobda keltirilgandek o'simlik bargidan ferment suyuqlanmasi tayyorlab olindi va bitta probirkaga nazorat uchun qoldirilib, qolganini esa pH kuchli kislotalidan kuchli ishqoriyga qarab (pH 10) o'zgartirib borildi hamda har birining aktivligi alohida-alohida o'rganib chiqildi. Olingan natijalardan

xulosa o'rnida shuni aytish mumkinki pH = 1 dan 3 gacha bo'lgan probirkalarda kuchli kislotali muhitda ferment aktivligining namoyon bo'lmasligi aniqlandi. pH=3,5 dan 10 gacha bo'lgan namunalarda esa peroksidaza turli aktivlikka ega bo'lgan sifat reaksiyasi kuzatildi.



3.3 – rasm. **Otquloq o'simligidan ajratilgan peroksidazasining pH optimumi**

Eng yuqori aktivlikni esa pH=5 bo'lgan muhitda namoyon qildi. Demak keyingi tadqiqotlarda fermentni ajratish va toza preparatini olishda optimum pH muhitidan foydalanish yaxshi natija beradi.

Olingan natijalar asosida quyidagicha xulosa qilish mumkinki, peroksidaza bilan olib boriladigan barcha katalitik reaksiyalar pH 4,5-5 da olib borilsa yaxshi natijalarga erishish mumkin.

3.5. **Peroksidazaning hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan va eruvchan formasini o'rganish**

Bugungi kungacha peroksidaza fermenti kartoshka, rediska, bugdoy o'simtasi kabi qator o'simliklardan ajratilgan bo'lib, ularning barchasidan

ajratilgan peroksidazalar aktivligi, izoferment spektri kabi xususiyatlari bilan bir-biridan farqlanishi aniqlangan bo'lsada, ular uchun umumiy bo'lgan ikki xil ya'ni hujayra devoir bilan kuchsiz bog'langan va eruvchan formasi uchraydi [3]. Bu o'z navbatida o'simliklarning turli kasalliklarga, turli tabiiy omillarga chidamliligini aniqlashda muhim hisoblanib, turli osimliklarda bu fermentlarning miqdori farqlanishi haqidagi fikrlar bir qator mualliflar tominidan ta'kidlab o'tilgan [3]. Shuning uchun ushbu ishda *Rumex crispus* o'simligi bargidagi bu fermentlarning miqdori o'rganib chiqildi. Solishitirsh uchun esa yerqalampir o'simligi bargidan ajratilgan ferment preparati olindi (3.3.-jadval)ga qaralsin.

3.3 - jadval

Otquloq va Yer qalampiri bargidagi hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan va eruvchan peroksidaza miqdorini aktivligi asosida aniqlash

Tajriba tartib raqami	Yer qalampiri		Otquloq	
	Hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan	Eruvchan	Hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan	Eruvchan
	Ferment aktivligi, Ed/ml			
1	2,0	1,78	1,43	2,0
2	2,7	2,27	1,61	1,78
3	2,5	1,31	2,0	1,42
O'rtachasi	2,4	1,78	1,68	1,73

Olingan natijalar shuni ko'rsatdiki o'simlik tarkibida uchrovchi 2 tur; hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan va eruvchan peroksidazani formasini yer qalampiri o'simlikaridagi ferment aktivligi qiyosiy solishtirilgan holda o'rganildi, o'rganishlar asosida yerqalampiri o'simligi bargida hujayra devori

bilan kuchsiz bog'langan peroksidaza fermenti miqdori yuqori ekanligi, eruvchan peroksidaza fermentining miqdori esa past darajada ekanligi aniqlandi.

3.6. Virus bilan kasallangan o'simlikdagi ferment miqdorini aniqlash

Biq qotir mualliflarning fikricha peroksidaza himoya funksiyasini bajarib, o'simlikni turli patogenlardan himoya qiladi [3, 15]. Ayrim manbalarda virus bilan kasallangan o'simliklarda virus konsentrasiyasini oshishiga ushbu ferment to'sqinlik qilishi va ferment konsentrasiyasining pasayishi virus konsentrasiyasining oshishiga olib kelishi haqida ma'lumotlar uchraydi [15]. Shuning uchun keying tadqiqotlarda virus bilan kasallangan otquloq o'simligi bargida ferment konsentrasiyasini o'rganildi. Olingan natijalar jadvalda keltilgan (3.3-jadval).

3.4-jadval

Sog'lom va virus bilan kasallangan o'simlik bargida peroksidaza miqdorini o'rganish

Sog'lom		Kasal	
Hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan	Eruvchan	Hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan	Eruvchan
Ferment aktivligi, Ed/mg			
1,65	1,72	5,73	2,54

Olib borilgan tadqiqotlar natijasi shuni ko'rsatdiki sog'lom o'simlikka nisbatan virus bilan kasallangan otquloq o'simligining hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan peroksidaza faolligining nazoratga nisbatan qariyb uch marotaba ortganligi aniqlandi. Bu esa o'simlikning turli stress holatlarda himoya mexanizmi sifatida peroksidaza ishtirok etib o'simlikning immun

tizimini oshirishda alohida ro'li borligidan dalolat beradi.

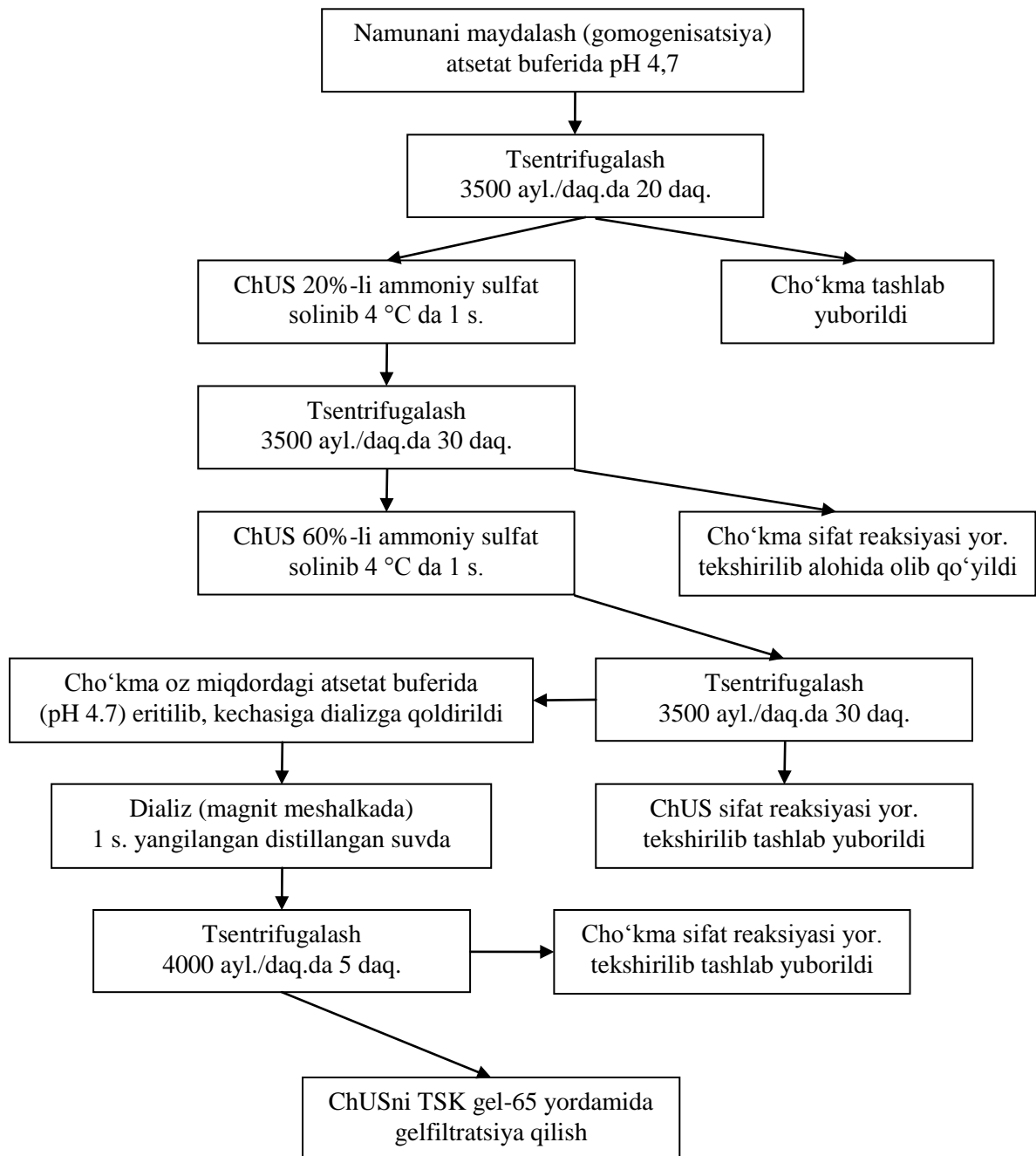
3.7. Peroksidazani gelfiltratsiya usuli yordamida elektroforetik gomogen holatigacha tozalash

Fermentativ kataliz bu - ishlab chiqarish fan va tibbiyotning turli sohalaridagi eng istiqbolli jarayonlaridan biridir. U ko'pgina o'ziga xosliklarga ega bo'lib, ular odatdagi katalizatorlarga nisbatan fermentlarning qollanilishi afzalliklarini namoyon qiladi. Ishlab chiqarishdagi biokatalitik jarayonlarda turli-tuman fermentlardan foydalaniladi, biroq oksireduktazalar xususan o'simlik peroksidazalari katta qiziqish uyg'otadi [32]. Klassik peroksidaza ikkita komponentli ferment bo'lib, faol markaz va oksidlovchiga nisbatan yuqori spetsifiklikni namoyon qiluvchi vadorod peroksidi kolloidli oqsil "tashuvchisi" rollarini bajaruvchisi faol guruhlar (protogematin IX) birlashmasidan iborat. Peroksidaza substratlari ichida turli tabiatli moddalar uchraydi, biroq oson oksidlanuvchi substrat fenollar hisoblanadi. Hozirgi kunda yaxshiroq o'rganilgan va keng qo'llanilayotganlaridan biri xren peroksidazasi hisoblanadi. Peroksidaza olishning zamonaviy texnologiyasi ko'p mehnat talab qiladigan kam mahsulot beruvchi va mavsumiy xomashyo qo'llanilishi qimmat turuvchi xorijiy xromotografik sorbentlar qo'llanilishi bilan bog'liq [32]. Bu esa o'z navbatida ferment yuqori qiymatini belgilaydi. "Sigma" firmasi peroksidaza preparatlarining 1 grammini 2 mingdan 7 ming AQSh dollarida baholaydi. Shunday ekan toza ferment preparatini olish bugungi kunning dolzarb masalalaridan biri hisoblanadi. Shuning uchun ushbu ishda mamlakat turli sohaları uchun zarur bo'lgan peroksidazani yer qalampiri ildizidan ajratish va tozalash usulini ishlab chiqish asosiy maqsad qilib belgilandi.

Buning uchun 500 gr otquloq o'simligining barg to'qimasidan namuna olinib ikkinchi bobda keltirilgandek dastlab qiymalagichda, keyinchalik atsetat buferi solingan holda 10 daqqa davomida gomogenizatorida maydalandi hamda

dokadan suzib olindi. Suzib olingan ferment suyuqlanmasi (jami 800 ml) 4000 ayl./daq.da 20 daqiqa savomida sentrifuga qilindi, hamda cho'kma usti shirasi (ChUS) olib qolinib, cho'kma esa tashlab yuborildi. Qolgan bosqichlar quyidagi sxema asosida olib borildi (3.4 -rasm).

Yuqorida keltirib o'tilgan sxemadan ko'rinib turibdi-ki, bu ishlab chiqilgan tozalash usulida dastlabki 20%-li ammoniy sulfat yordamida cho'ktirishda molekulyar massasi peroksidazadan yirik bo'lgan oqsillarni cho'ktirishga qaratilgan bo'lib, o'tkazilgan tekshirishlar natijasida bu bosqich o'ziga qo'yilgan maqsadni oqladi. Keyingi 60%-li ammoniy sulfati yordamida esa ChUSda bo'lgan fermentni cho'ktirishga qaratilgan bo'lib, bu bosqichda fermentni to'liq cho'kmaga tushishi o'tkazilgan sifat reaksiyasi tekshiruvi natijasini o'z tasdig'ini topdi. Fermentning tozalangan preparatini olishda bugungi kunda bir qator usullar qo'llanilgan bo'lib ushbu ishda gelfiltratsiya usulidan foydalanildi. Gelfiltratsiya qilish uchun kolokaga TSK-gel 65 dan foydalanildi. Bir qator keltirilgan manbalarni o'rganish maqsadida TSK-gel 65 ning ajratish imkoniyati 5000-65000 D ekanligini hisobga olsak, ajratilayotgan peroksidaza fermentining molekulyar massasi 11-50 kD ni tashkil etadi, bu TSK-gel 65 ning fermentni bemalol tozalash imkonini beradi.



3.4 –rasm. **Otquloq peroksidazasini tozalash sxemasi**

Ferment oqsilini ammoniy sulfat va turli organik erituvchilar bilan fraksiyalash

Fermentlarni ajratib olish va tozalashning umumiy prinsiplari ma'lum bo'lishiga qaramay, o'rganilayotgan fermentning hujayradagi lokalizatsiyasi va hujayra devorlari bilan bog'langan yoki eruvchan formalarining mavjudligi, faollik darajasi, stabilligi va boshqa xususiyatlariga uchun maxsus

yondashuvni zarurligini izoxlaydi. Fermentlarni, ularning eritmalaridan ajratib olish paytida dastlabki xomashyo ko'p bo'lishiga qaramay ferment oqsil miqdori juda oz mikromiqdorlarda to'planadi. Ushbu ishda peroksidazali faollikga ega bo'lgan fraksiyalarni tozalash va ajratish uchun otquloq barg to'qimasidan olingan o'simlik shirasidan foydalanildi.

Fermentlarni *Rumex crispus* ning o'simlik a'zolari shirasidan cho'ktirishni etanol organik erituvchisi yordamida va (40-80%) konsentratsiyali ammoniy sulfat tuzi bilan 4 °C da 30 daq. ichida 4000 aylana/daq li sentrifugalash vaqtida shakllanayotgan cho'kmani navbati bilan ajratib olish orqali amalga oshirildi.

3.4.-jadvalda fermentning barcha preparatlarini olish bo'yicha ma'lumotlar tasvirlangan. Ularni *Rumex Crispus* ning ferment suyuqlanmasidan ajratib olishni eng yaxshi usullaridan fermentlarni 1:4 nisbatda etanol bilan cho'ktirish va oqsillarni 40 va 60% ammoniy sulfat bilan fraksiyalash hisoblanadi.

3.5-jadval

Otquloq peroksidaza oqsilini turli usullar yordamida tozalash

Reagentlar	Hajmlar nisbati O'Sh : reagent	Fermentlar faolligi	
		Umumiy faollik	Solishtirma faollik Ed/mg
Etanol	1: 2	8572	1,36
	1: 3	10500	10,44
	1: 4	750	11,93
Ammoniy sulfat %	20	821	2,08
	40	11050	22,34
	60	13230	26,81
	80	621	1,13

Olingan natijalardan ko'rinib turibdiki, yuqori faollikka ega bo'lgan kompleks ferment preparatini va boshqa oqsilli birikmalarni cho'ktirishda etanolning 1:4 hajm nisbatdagi faolligiga qaraganda Ammoniy sulfat tuzining 4°C haroratda 60% li eritmasidan foydalanish yuqori faollikka ega bo'lgan ferment preparatini qo'lga kiritish imkonini beradi.

Gel filtratsiya usuli yordamida toza ferment preparatini olish

Tirik organizmlarda kechadigan qator biokimyoviy jarayonlar: nafas olish, oziqlanish, moddalar almashinuvi kabi jarayonlar fermentlar ishtirokida amalga oshadi. Bunday muhim fermentlar qatoriga ko'pgina tirik organizmlarda uchraydigan peroksidaza fermentini keltirish mumkin bo'lib, bu ferment osimlik hujayrasida muhim oksidlanish-qaytarilish jarayonlarini boshqaradi. So'ngi yillarda turli qishloq xo'jaligi, meditsina, veterinariyada kassalik keltirib chiqaruvchi patogenlarni aniqlashda tezkor va aniqligi yuqori bo'lgan usullarni qo'llab ularni diagnostika qilish bugungi kunda juda muhim masalalardan biri hisoblanadi. Bunday tezkor biosensorga immunologik usullardan biri bo'lgan immunoferment analiz kabi usullarni kiritish mumkin.

Bu usulning asosini aniqlanayotgan patogenga tayyorlangan antitana (AT) va unga immobilangan ferment tashkil etadi. AT ga immobilangan fermentning stabilligi, arzonligi va bir qator xususiyatlari mavjudki bu diagnostikumlar narxini belgilab beradi.

Bundan tashqari mamlakatimizda bu ferment chet eldan sotib olinadi. Chunki fermentni ajratish va toza ferment preparatini olish bo'yicha hech kim ilmiy tadqiqot ishlari olib borayotgani yo'q. Gelxromotografik usulda bu fermentning toza preparatini olish mamlakatimizga chet eldan olib kirilayotgan import o'rnini bosa oladi. Buning uchun esa fermentning tabiiy manbalarini aniqlash, ajratish, hususiyatlarini o'rganish, toza ferment preparatini olish va zarur sohalarga tadbiq etish bugungi kunda dolzarb masala hisoblanadi. Mamlakatimizning turli iqlim sharoitida o'suvchi o'simliklarda mavjud

peroksidazaning izoferment spektrini o'rganish muhim sanaladi. Bir qator mualliflarning ma'lumotiga qaraganda bu ferment stress fermenti bo'lib, ayniqsa turli ekstremal sharoitda o'suvchi o'simliklarda, patogenlar bilan kasallangan o'simliklarda fermentning miqdori sog'lom o'simliklarga nisbatan bir necha baravar oshib ketishi keltirib o'tilgan. Peroksidazaning mavjudligi haqidagi dastlabki ma'lumotlar Shenbeyn tomonidan aniqlangan, u qator organik moddalarning o'simlik va hayvonlardan ajratilgan ekstrakt hamda vodorod peroksidi bilan qo'shib solinishi natijasida parchalanishini kuzatgan paytdan paydo bo'lgan. Bu fermentga «peroksidaza» nomini Linoze bergan bo'lib, u birinchilardan bo'lib o'simlik hujayrasida uchraydigan boshqa bir qator fermentlarning farqini tavsiflab bergan. Peroksidaza olish zamonaviy texnologiya ko'p mehnat talab qiladigan kam maxsulot beruvchi va mavsumiy xomashyo qo'llanilishi, qimmat turuvchi xorijiy xromotografik sorbentlar qo'llanilishi bilan bog'liq. Bu esa o'z navbatida ferment yuqori qiymatini belgilaydi. Ushbu ishda O'zbekiston iqlim sharoitida o'suvchi yovvoyi o'simliklardan yuqori aktivlikka ega bo'lgan peroksidaza fermentini ajratish va hususiyatlarini o'rganish asosiy maqsad qilib olindi. Buning uchun dastlab *Rumex crispus* o'simligi (1-rasm) barg to'qimasidan ferment preparatini olish uchun dastlabki namuna o'simlik barg to'qimasini teng miqdordagi atsetat buferini (pH=4,7) bilan chinni xovonchada maydalanish va to'rt qavat dokadan o'tkazib olish orqali tayyorlab olindi. Ekstraktni hujayra komponentlaridan tozalash uchun esa 4000 aylanish tezligida 15 daqiqa davomida sentrifuga qilinib, cho'kma usti suyuqligi olindi, cho'kma esa tashlab yuborildi. Bu tozalash uchun zarur bo'lgan ferment aralashmasi bo'lib, undan fermentni tozalash uchun esa tuzlar yordamida cho'ktirish, izoelektrik nuqtada cho'ktirish, gelfiltratsiya qilish kabi usullari keng qo'llaniladi. Ularning ichidan gelfiltratsiya usuli yumshoqligi, ko'p mehnat talab qilmasligi hamda yirik molekulali moddalarni molekulyar massasiga asosan ajratib berishi bilan alohida ajralib turadi.

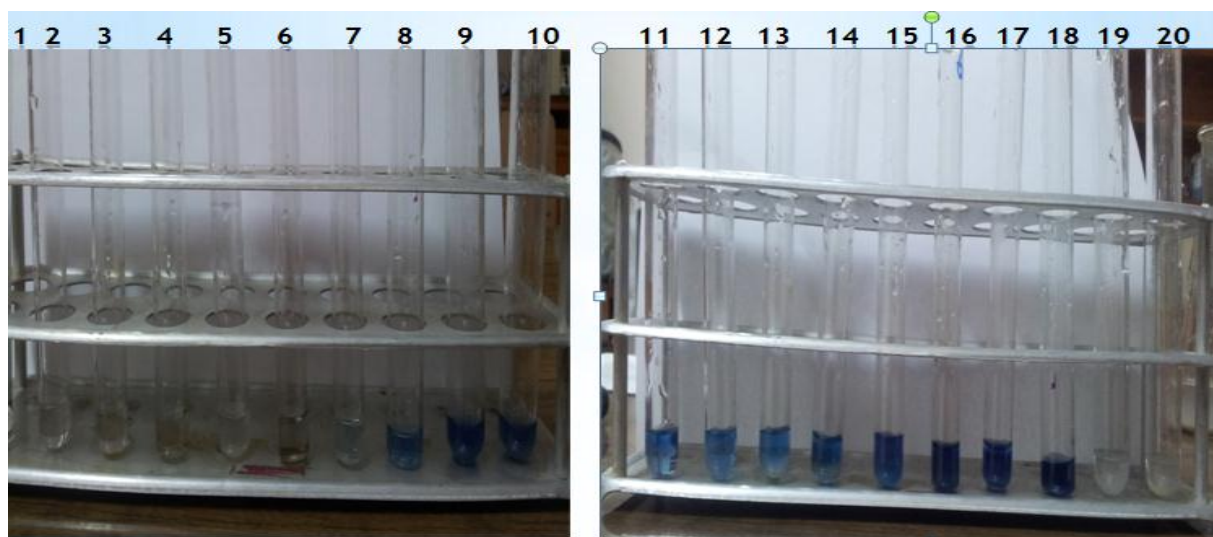
Ferment preparatini gel filtratsiya usuli yordamida tozalashda 20×450 mm-li xromotografik kolonkada TSK HW - 65 gelida 0, 2 M atsetat buferida pH 4,7 dan foydalangan holda 1,7 atm.da amalga oshirildi. Bunda dastlab kalonkaga yuqorida keltirilgandek tayyorlangan ferment aralashmasidan 4 ml solinib elyutsalandi, elyutsiyalangan fraksiyalar 3 ml dan 30 ta probirkaga alohida-alohida yig'ib olindi elyutsiya tezligi soatiga 34 ml ni tashkil etdi. Olingan fraksiyalarda ferment mavjudligini Boyarkin metodi yordamida aniqlandi. O'tkazilgan

sifat reaksiylari natijasida dastlabki peroksidaza aktivligi 9 probirkada namoyon

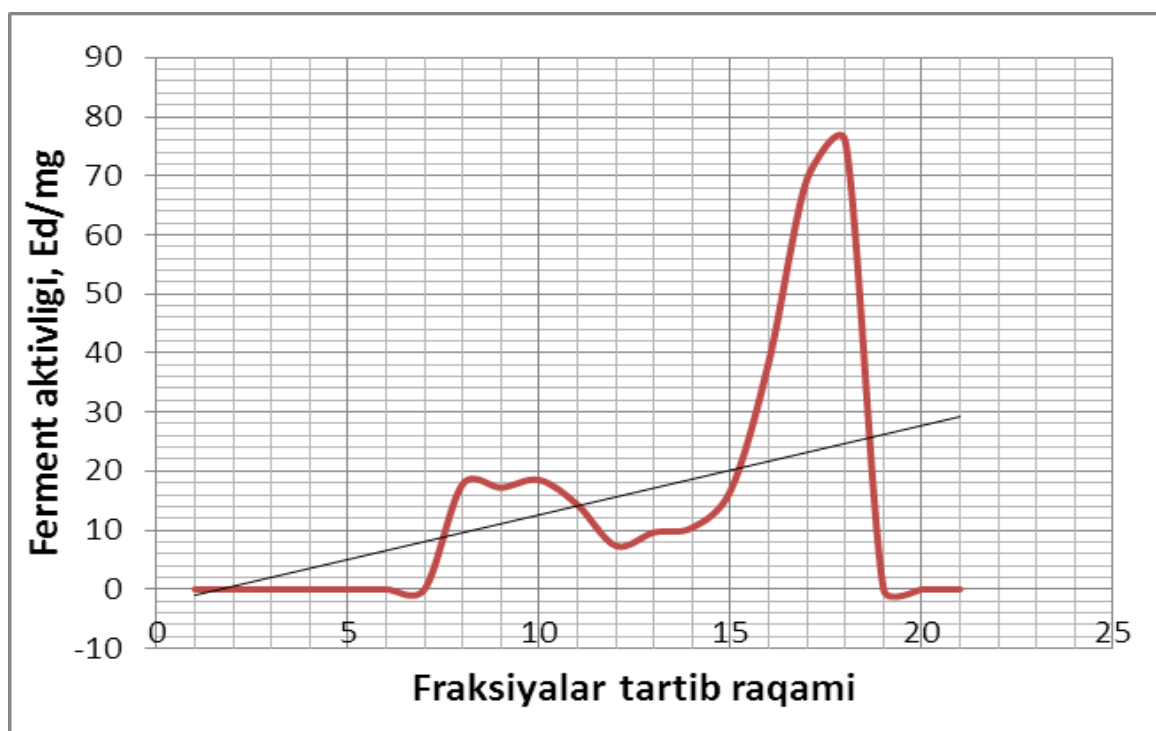
bo'lib, 17-19 fraksiyalarda eng yuqori aktivlikni namoyon qildi va undan keyingi fraksiyalarda esa biroz pasayib borishi, fermentning asosan yuqoridagi fraksiyalarda chiqqanligidan dalolat beradi. Buni yanada aniqlashtirish uchun esa spektrofotometriya usuli yordamida tekshirish ishlari olib borildi va haqiqatdan ham ferment 17-20 faraksiyalarda ajralib chiqqanligi namoyon bo'ldi (3.8.-rasm). O'tkazilgan tajribalar asosida otquloq peroksidazasi toza ferment preparatini olishning modifikatsiyalangan usuli ishlab chiqildi va natijada toza ferment preparatini TSK G – 65 geli yordamida olishga erishildi.



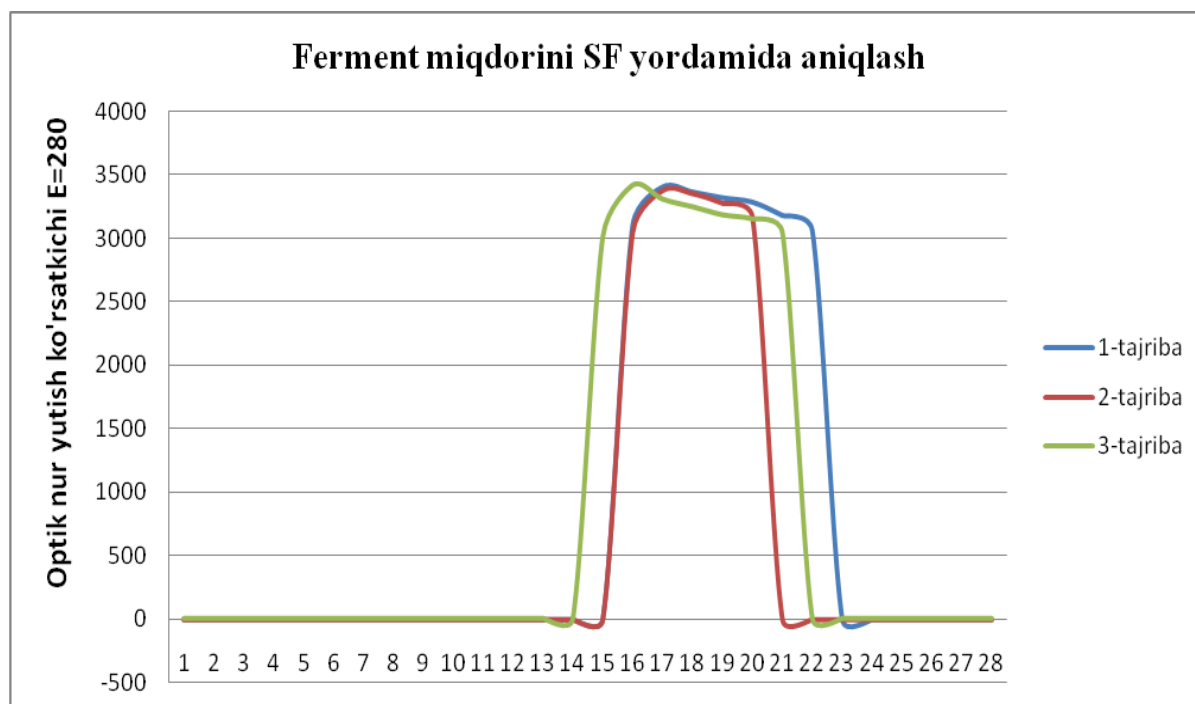
3.5-rasm. **Gelxromotografik kolonkaning umumiy ko'rinishi**



3.6 - rasm. *Rumex crispus* o'simligidan ajratilgan peroksidaza fermentining gelxromotografik kolonkadan elyutsiyalangan namunalardagi ferment faolligi



3.7.-rasm. TSK G - 65 gelida peroksidaza fermenti elyutsiyalanish nuqtasining ferment aktivligiga bog'liq holda aniqlanganishi (Boyarkin metodi bo'yicha)



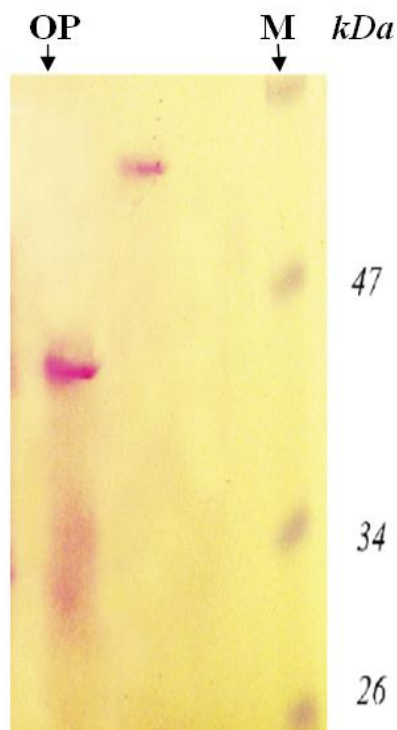
3.8 – rasm. **Gelxromotografik kolonkada TSK G-65 gelida elyutsiyalangan fraksiyalarni 280 nm da nur yutish ko'rsatkichi**

Olingan natijalar asosida quyidagicha xulosa qilish mumkin, demak xar bir fraksiyalarda turli peroksidaza aktivligining kuzatilishi, o'simlikda molekulyar massasi jixatdan bir-biridan farqlanuvchi izofermentlar mavjudligidan dalolat beradi. Gelxromotografik kolonkada elyutsalangan ferment qo'shimcha birikmalardan ancha xoli bo'lib ajralib chiqadi.

Tozalangan ushbu ferment suyuqlanmasini keyingi bosqichda tuzlar yordamida cho'ktirish, leofilizatsiya qilish kabi usullar yordamida toza ferment preparatini olish mumkin va ushbu fermentni turli immobilash yo'llari orqali uzoq vaqtgacha saqlash va qayta foydalanish mumkin.

Bugungi kunda ushbu ferment O'zbekiston tabiiy iqlim sharoitida o'suvchi o'simliklardan ajratishning zamonaviy usullarini ishlab chiqish va uni amaliyotga tadbiq qilish, ushbu fermentni chet davlatdan import o'rnini egallaydi va iqtisodiy jihatdan ancha mablag' tejatishiga olib keladi.

Gelfiltratsiya jarayonida elyutsiyaangan otquloq peroksidaza preparatining 12%li PAAGdagi elektroforezi



M - standart massali oqsil molekulari (Fermentas, Litva)

OP - TSK G-65 gelida tozalangan otquloq peroksidasi

Elektroforetik taxlilni amalga oshirish jarayoni vertikal DDC-Na mavjud bo'lgan 10%li PAAG (Poliakrilamid gel) dagi elektroforez asbobida amalga oshirildi. Gelfiltratsiya jarayonidan elyutsiyalangan fraksiyalardagi yuqori faolligiga ega bo'lgan namunalardagi peroksidaza fermentining molekulyar massasi elektroforez aswbobidan foydalangan holda 42-43 kDa ekanligi aniqlandi. Keyingi tadqiqotlarni amalga oshirish jaroyoni yuqoridagi ketma-ketlikka asoslangan holda olib borilsa otquloq peroksidazasini toza preparatini ajratib olish imkonini beradi. Ushbu tajribalar O'z RFA qoshidagi O'simlik moddalar kimyosi instituti Molekulyar genetika labaratoriyasida amalga oshirildi.

III bob bo'yicha xulosa

Olib borilgan tadqiqot natijalarida o'tquloq o'simligidan yuqori faolikka ega bo'lgan ferment preparatini ajratish va xususiyatlarini o'rganishda xar xil tadqiqotlar o'tqazildi. Ushbu tajribalar asosida, o'simlik barg to'qimasida ajratilgan peroksizadaning temperatura optimumi, eng yuqori faollik namoyon qiluvchi pH muhiti aniqlandi. Hujayra devori bilan kuchsiz bog'langan va eruvchan peroksidazaning hususiyatlari o'simlikning o'sish fazasiga bog'liq xolda o'rganildi. Bundan tashqari sog'lom va kasallangan o'simlikdagi fermentning miqdori, faolligining nazoratga nisbatan qay darajada o'zgarishi aniqlandi. Peroksidaza fermentini ajratishning ayovchi usullaridan biri bo'lgan gelxromotografik kolonka orqali yuqori faolikka ega bo'lgan ferment oqsilli birikmasi ajratib olindi xususiyatlari o'rganildi.

Yakunlovchi qism

Bugungi kunda tibbiyot, veterinariya, qishloq xo'jaligida turli patogen mikroorganizmlarni aniqlashda sezgir diagnostika usullari ishlatilayotgan bo'lib, bu usullar immunologiya va biotexnologiyaning rivojlanishi asosida ishlab chiqilgan immunologik usullar hisoblanadi. Bunday sezgir usullar qatoriga immunoferment analizi, immunobloting, virobakterial agglutinatsiya kabi usullarni kiritish mumkin. Bunday sezgir usullarni ishlab chiqish toza ferment bugungi kunda peroksidaza, ishqoriy fosfataza kabi stabil fermentlar ishlatilib kelinmoqda.

Peroksidaza fermenti bugungi kungacha o'simliklardan, mikroorganizmlar va hayvonlardan ajratib amaliyotga foydalanib kelinmoqda. Asosan amaliyotga juda keng miqyosda ishlatilayotgan peroksidaza xren (*Armoracia rusticana*) o'simligidan ajratilgan va amaliyotga keng miqyosda qo'llaniladi.

O'simlik hujayrasida erkin hujayra organellalari mavjud bo'lib, ular antimikrob ta'sirga ega bo'lgan peroksidaza tutadi. Peroksidazaning aktivligi o'simlik hujayrasida hosil bo'ladigan vododrod peroksidining paydo bo'lishi bilan namoyon bo'ladi. Bundan tashqari, peroksidaza lignin hosil bo'lishida ham ishtirok etadi. Lignifikasiya jarayonida ligninga yaqin bo'lgan fenilpropanoid sintezlanadi va u bevosita vodorod peroksidi ishtirokida uni polimerizasiyalanishida qatnashadi.

Meditinada peroksidaza o'tkir, og'ir bakterial va virus (shu jumladan OITS), infeksiyalar, allergik, autoimmun, endokrinologik va o'sma kasalliklarini aniqlashda qo'llaniladigan immunologik usullarda keng qo'llaniladi. Bundan tashqari peroksidaza periyodatli oksidlanishdan so'ng, nishonlangan uglerod-14 ga ega bo'lgan va monoklonal antitana sintezida qatnashuvchi glikoproteidlarning sintezida ishtirok etadi.

Bir qator tadqiqotchilar (Regalado, Henriksen va boshqalar) ma'lumotiga ko'ra turli o'simliklarda bu ferment miqdori va izoferment turlari bir-biridan farqlanadi. Shuning uchun mamlakatimiz iqlim sharoitida o'suvchi

o‘simliklardan ferment ajratish mumkin bo‘lgan manbalarni aniqlash bugungi kunning dolzarb masalalaridan biri hisoblanadi. Bugungi kungacha peroksidaza fermenti turli tirik organizmlar, jumladan o‘simlik, hayvon va mikroorganizmlardan ajratib olingan va ularning miqdori bir xil bo‘lmaydi. O‘simlik peroksidazasi yer qalampiri (*Armoracia rusticana*), palma bargi kabi bir qator o‘simliklardan ajratilgan va hozirgi kunda yer qalampiridan ajratilgan peroksidaza keng mashstabda ishlatiladi. Bugungi kunda mamalakatimizda meditsinada diagnostikumlar, qishloq xo‘jaligi va qator sohalar uchun zarur bo‘lgan ferment preparatlari chet davlatlardan eksport qilib olinadi. Shunday ekan fermentni ajratish, toza preparatini olish bugungi kunning dolzarb masalalaridan biri hisoblanadi. Bu ferment juda ko‘pchilik o‘simliklarda uchraydi, ammo ulardagi ferment miqdori, izofermentlari va bir qator xususiyatlari bilan bir-biridan farqlanadi.

XULOSALAR:

1. O'zbekiston iqlim sharoitida yovvoyi holda o'suvchi yirikbarg zubtutum (*Plantago major*), otquloq (*Rumex crispus*), yer qalampiri (*Armoracia rusticana*), oq sho'ra (*Chenopodium album*) o'simliklaridan peroksidaza fermenti aniqlandi va ularning ichidan otquloq o'simligi barg to'qimasidan peroksidaza fermenti ajratildi va uning solishtirma faolligi 1,65 Ed/mg ekanligi aniqlandi.
2. Sog'lom va virus bilan kasallangan o'simlikdagi ferment faolligini o'rganish orqali, virus bilan zararlangan o'simlik tarkibidagi ferment miqdori va solishtirma faolligi (sog'lom 1,65 Ed/mg; kasallangan 5,73 Ed/mg) ortishi aniqlandi.
3. Tajribalar natijasida otquloq peroksidazasining termostabilligi 45 °C, pH optimumi esa 5 ekanligi aniqlandi.
4. Otquloq o'simligidan peroksidaza fermentini ajratishda gelfiltratsiya metodi yordamida tozalash usuli ishlab chiqildi va fermentning tozalangan preparati ajratib olindi va elektroforez usuli yordamida ferment oqsilining molekulyar massasi 42-43 kDa ekanligi aniqlandi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR RO‘YXATI

1. М.А.Живетьев, Е.И.Раченко, Т.Е. Путилина, В. А. Краснобаев Активность и изоферментный спектр пероксидазы некоторых видов растений, произрастающих на берегах озера Байкал, при абиотическом стрессе Серия «Биология. Экология» 2010. Т. 3, № 3 С. 7-11
2. Александрова Е.Ю. Изучение пероксидазной активности в экстрактах из корневища и корней хрена и ее стабильности к различным воздействиям/Е.Ю. Александрова, М.А.Орлова, П.Л. Нейман // Вестник Московского университета. Сер. Химия. – 2006. – Т. 47, – №5. – С. 350–352.
3. Граскова И.А. Роль пероксидазы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили. Диссертации. Иркутск-2001. С. 12-24.
4. Алпеева И.С. Анионные пероксидазы и их применение в биоанализе: Автореферат. дис. канд. хим.наук: 02.00.15, 03.00.23 // МГУ им. М.В. Ломоносова.– Москва, 2007.– 28 стр.
5. Алпеева И.С., Сахаров И.Ю., Окисление люминола, катализируемое пероксидазой, выделенной из листьев королевской пальмы, Прикладная биохимия и микробиология, 2007, 43 (1), 31-35.
6. Андреева В.А. Фермент пероксидаза // В.А. Андреева– М.: Наука, 1988. – С. 54–55.
7. Айзенштадт М.А. Пероксидазное окисление лигнина и его модельных соединений // М.А. Айзенштадт, К.Г. Боголицын// Химия растительного сырья. – 2009. – №2. – С. 5–18.
8. Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. – 1951. – Т.16. – С. 352–357.
9. Лаврентьева И.В. Пероксидаза редьки черной– биокатализатор окисления фенолов в водных системах // И.В. Лаврентьева, О.В. Вяткина/ Збірка тез доповідейIII Міжнародної конференції студентів,

- аспірантів та молодих вчених НТУУ“КПІ”, ХТФ. – Київ. –2010. – С. 242.
- 10.Рогожин В.В. Peroxidaza как компонент антиоксидантной системы живых организмов // В.В. Рогожин. – М.: ГИАРД, 2004. – 240 стр.
 11. Рогожин В.В. Роль индолил-3-уксусной кислоты в реакциях окисления быстро и медленноокисляемых субстратов пероксидазы// В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина // Вестник Московского университета, Сер. 2. Химия. – 2004. – Т. 45, – №6. – С. 423–428
 12. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Влияние строфанина G на кинетику пероксидазного окисления медленно окисляемых субстратов пероксидазы // Биохимия. 2000. Т.65(5). С.657-664.
 - 13.Д.В. Бочков (РФ), Т. Г. Толстикова(РФ), А. О. Брызгалов (РФ), М. В. Хвостов (РФ). Фермент пероксидаза – №2007135916/13; Заявлено27.09.2007.; Оpubл. 27.04.2009-С. 116-118
 14. Дмитриев А.П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 4. С. 465-474. Плакунов В.К. Основы энзимологии // В.К. Плакунов. – М.: Логос. 2001 –128 стр.
 - 15.Способ получения пероксидазы/ А.А.Гусев(РФ), В.Д.Борзионов(РФ), А.С.Красоткина(РФ). №97119125 // -С.13; Заявлено 24.11.1997.; Оpubл.1999. 15-18 стр.
 16. Орлова М.А., Чубарь Т.А. и др., Газарян И.Г. Конформационные различия реактивной и рекомбинантной форм пероксидазы, выявленные методом тритиевой планетрии // Биохимия. 2003. Том. 68. № 11. С. 15221529.
 17. Тарчевский И. А. Метаболизм растений при стрессе/ И. А. Тарчевский. – Казань: ФЭН, 2001. – 448 стр.
 18. Alpeeva I.S., Sakharov I.Y., Soybean peroxidase-catalyzed oxidation of luminol by hydrogen peroxide, Journal of agricultural and food chemistry, 2005.-P. 53

19. Alpeeva I.S., Niculescu-Nistor M., Leon J.C., et al. Palm tree peroxidasebased biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21(5), 742-748.
20. Alpeeva I.S., Berlina A.N., Zherdev A.V., Efremov E.E., Dzantiev B.B., Sakharov I.Yu. Advantages of application of anionic soybean peroxidase in chemiluminescent ELISA. *Proc. Intern. Congress on Analytical Sciences*, Moscow, Russia, 25-30 June 2006, 137-138
21. Аверьянов А.А., Ланикова В.П. Пероксидазная активность выделений здоровых и зараженных пирикуляриозом листьев риса // Доклады Академии Наук. 1995. - Т.340. - С.702.
- 22.. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. М.: Наука, 1988. С. 128. Апашева Л.М., Комиссаров Г.Г. Влияние пероксида водорода на развитие растений // Известия РАН. Серия биологич. - 1996. - №5. - С. 621-623.
23. Аксенова В.А., Кожанова О.Н., Рубин Б.А. О некоторых свойствах пероксидазы инфицированных тканей растений // Физиология растений. -1991. Т.18, вып.2. - С.387-391.
24. Кулаева О.Н., Микулович Т.П., Хохлова В.А. Стрессовые белки растений. Современные проблемы биохимии. М.: Наука, 1991. С. 174-185.
25. Вяткина О.В. Проблемы выделения и очистки растительных пероксидаз Серия «Биология, химия». Том 25 (64). 2012. № 3. С. 271-276.
26. Федулов А.Л., Спиридович Е.В., Рахманько Е.М. Выделение пероксидазы из оболочек семени сои Белорусский государственный университет, Доклады Академии Наук. 2007. - Т.65. - С.4-1
27. Иванова З.А., Вафина Г.Х. Физиологическая роль пероксидазной активности клеточных ядер на ранних этапах онтогенеза растений // Физиология и биохимия культурных растений. 1997. - Т.29, №2. -С.129-132.

28. Г.Ф. Давыдова, О.А. Ермаков, А.И. Панасенко, А.М. Тищенко Химия Лекарственные препараты из растительного сырья. пероксидаза растительного сырья. 1998. №1. С. 15-18
29. Карташова Е.Р., Руденская Г.Н., Юрина Е.В. Полифункциональность растительных пероксидаз и их практическое использование // Сельскохозяйств. биология. 2000. - №5. - С.63-70.
30. Дмитриев А.П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 4. С. 465-474.
31. Иванова З.А., Вафина Г.Х. Физиологическая роль пероксидазной активности клеточных ядер на ранних этапах онтогенеза растений // Физиология и биохимия культурных растений. 1997. - Т.29, №2. -С.129-132.
32. И. Г. Газарян Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии – 2006. – Т. 46. – С. 303-322.
33. Шеховцова Т.Н., Чернецкая С.В., Белкова Н.В. и др. Тест-метод определения ртути на уровне ПДК и использованием пероксидазы, иммобилизированной на бумаге. // Ж. Аналит. Химии. – 1995. – 50, №5. – С. 538 – 542.
34. Константинова Т.Н., Аксенова Н.П., Сергеева Л.И. Изучение пероксидазы у фотопериодически нейтрального табака в процессе его генеративного развития // Физиология растений. 1982. Т. 29. № 4. С. 639-643.
35. И.Г.Газарян Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений. Успехи биологической химии. -2006. - Т.46. С. 303-312.
36. Гамалей И.А., Клюбин И.В. Перекись водорода как сигнальная молекула//Цитология. 1996. Т.38(12). С.1233-1247.

- 37.Газарян И.Г. Молекулярная и генетическая структура пероксидаз // Итоги науки и техники. Серия Биотехнология. 1992. Т.36. С.28-54.
- 38.Орлова М.А., Чубарь Т.А. и др., Газарян И.Г. Конформационные различия реактивной и рекомбинантной форм пероксидазы, выявленные методом тритиевой планетрии // Биохимия. 2003. Том. 68. № 11. С. 15221529.
39. Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция суноксидов и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 4. с. 459-464.
40. Almagro L., Gómez Ros L.V., Belchi-Navarro S. et al. Class III peroxidases in plant defence reactions // J. Exp. Bot. – 2009. – Vol.60. – P. 377–390.
41. ML Kus J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks // Phytopathology. - 1992, V.82.-P.696-699
42. Иванова З.А., Вафина Г.Х. Физиологическая роль пероксидазной активности клеточных ядер на ранних этапах онтогенеза растений // Физиология и биохимия культурных растений. 1997. - Т.29, №2. -С.129-132.
43. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Влияние экзогенного кальция на интенсивность пероксидазного окисления липидов в колеоптилях озимой пшеницы и их теплоустойчивость // Физиология и биохимия культ, растений. 2003. Т.35(1). С.67-73.
44. Сахаров И.Ю., Использование новых пероксидаз растений в ттуноферментном анализе с хемилюминесцентной детекцией. II Биохимические методы анализа, под ред. Дзантиева Б.Б. 2010, Наука: Москва, р. 349-365
- 45.Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A. et al. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of

- reactive oxygen species // *Plant Cell Environ.* – 2009. – Vol.32. – P. 497–508.
46. Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death // *Bioessays.* – 2006. – Vol.28. – P. 1091–1101.
47. Berlina A.N., Zherdev A.V., Efremov E.E., Dzantiev B.B., Sakharov I.Yu. Advantages of application of anionic soybean peroxidase in chemiluminescent ELISA. Proc. Intern. Congress on Analytical Sciences, Moscow, Russia, 25-30 June 2006.- P. 137
48. Wahid A. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves / A. Wahid, T. J. Close // *Biol. Plant.* –2007. – Vol. 51. – P. 104–109.
49. Blinkovsky A.M., Mceldoon J.P., Arnold I.M. et al. Peroxidase-catalysed polymerization and depolymerization of coal in organic solvents. // *Appl. Biochem. and Biotechnol. A* – 1994. – 49,N2. – P. 153 – 164.
50. Blee K.A., Jupe S.C., Almagro L G. et al. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members // *Plant Mol. Biol.* –2001. – Vol.47. – P. 607–620
51. Ngo T.T Peroxidase in Chemical and Biochemical Analysis // *Analytical Letters*; -2010. –Vol. 43, № 10. –P. 1572-1587.
52. Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants / S. Bhattacharjee // *Curr. Sci.* – 2005. – Vol. 89. – P. 1113–1121.
53. Diaz-Vivancos P., Rubio M., Mesonero V. et al. The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection // *J. Exp. Bot.* – 2006. – Vol.57. – P. 3813–3824.
54. Gay C., Gebicki J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xyleneol orange hydroperoxide assay // *Anal. Biochem.* – 2000. – Vol.284. – P. 217–220.

55. Leon J.C., Alpeeva I.S., Chubar T.A., et al., Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers, *Plant Science*, 2002, 163 Vol.5. -P. 1011-1019.
56. Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A. et al. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species // *Plant Cell Environ.* – 2009. – Vol.32. –P. 497–508
57. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* – 2002. – Vol.7. – P. 405–409.
58. Okushima Y., Koizumi N., Kusano T., Sano H. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol.42. – P. 479–488.
59. Otte O, Pachten A, Hein F., Barz W. Early elicitor-induced events in chickpea cells: functional links between oxidative burst, sequential occurrence of extracellular alkalization and acidification, K⁺/H exchange and defence-related gene activation // *Z. Naturforsch [C]*. – 2001. – Vol.56 (1–2). – P. 65–76
60. Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plants / S. Penfield // *New Phytol.* – 2008. – Vol. 179. – P. 615–628
61. Regalado, C. Biotechnological applications of peroxidases // C.Regalado, B. E. García-Almendárez, M.A. Duarte-Vázquez. // *Phytochem.Rev.*–2004.– Vol.3, №1–2.–P.243–256
62. Henriksen A. Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions Henriksen A. et al. // *Protein Science.* – 2001. – Vol.10. – P. 108 – 115.
63. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress / C. D. Georgiou [et al.] // *Integr. Compar. Biol.* – 2006. – Vol. 46. – P. 691–712.

64. Clemente E. Purification and thermostability of isoperoxidase //Phytochemistry. 1998. V. 38. N 1. P. 18-25.
65. Olmos E., Piqueras A., Martinez-Solano J.R., Hellin E. The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants //Plant Science. 1997. V. 130. P.97-105.
66. Bestwick C.S., Brown JR., Mansfield J.W. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of nonhost hypersensitive reaction in lettuce // Plant Physiol. - 1998. V.118, №3. - P.1067-1078.
67. Calderon A.A., Pedreno M.A., Ros Barcelo A., Munoz R. A spectrophotometric assay for quantitative analysis of oxidation of 4-hydroxystilbene by peroxidase H₂O₂ systems // J. Biochem. Biophys. Methods. - 1990. - V.20, N2. - P.171.
68. Bestwick C.S., Brown J.R., Mansfield J.W. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of nonhost hypersensitive reaction in lettuce // Plant Physiol. 1998. V.1 18, №3. P.1067-1078.

