

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ  
СОҒЛИҚНИ САҚЛАШ ВАЗИРЛИГИ  
ТОШКЕНТ ФАРМАЦЕВТИКА ИНСТИТУТИ

Кўлёзма ҳуқуқида

УДК. 582.153.2

АБДУРАХИМОВ НОДИРЖОН АБДУЖАББОР ЎҒЛИ

МАВЗУ: ЛИПАЗА ФЕРМЕНТИНИНГ ФИЗИК-КИМЁВИЙ ВА  
КАТАЛИТИК ХУСУСИЯТЛАРИНИ ЎРГАНИШ

**Ихтисослик:** иммунобиологик ва микробиологик препаратлар технологияси  
мутахассислиги бўйича магистр илмий даражасини олиш учун

ДИССЕРТАЦИЯ ЙШИ

Илмий раҳбар:

Илмий маслаҳатчи:

Оппонент



б.ф.н.Махсумхонов А.А.

б.ф.д. проф. Ахмедова З.Р.

Нурмухамедов А.А.

Кафедра мудири  
“ ” 200\_ й

МАГИСТРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИНИ ЁЗИШ  
БЎЙИЧА ТОПШИРИҚЛАР

Тошкент Фармацевтика институти ректорининг 200\_8 й “ 21 ” 06 73 -  
сон буйруғи билан тасдиқланган

Биотехнология кафедраси буйича  
Липаза ферментининг оқизик - кимёвий  
магистрлик диссертациясининг номи

ва каталитик хусусиятлари  
ўрганиши мавзудаги магистрлик диссертацияси  
илмий раҳбар

Б.Ф.И. Махсумхонов А.А. бошчилигида  
илмий раҳбарнинг исми-фамилияси, лавозими, илмий даражаси ва илмий унвони)  
томонидан

(тингловчининг исми-фамилияси)

Тасдиқланган ҳолда 200\_8 й “ 25 ” Июнь да

Биотехнология кафедрасига дастлабки химоя учун тақдим этилади.  
Тадқиқот ишида Илмий китоблардан, илмий  
мақолалардан, муолафираник хушҳудидан  
Берувчи хужжалардан

фоидаланилади

фармацевтика соҳаси, тиббиёт соҳаси буйича чоп этилган адабиётлардан, замонавий усул  
услугулардан ва х.к.)

Ишда  
берилиши кўзда тутилади

Ишда куйидаги масалалар баён этилади:

1-боб Адабиётлар шарҳи  
(номи)

2-боб Адабиёт кичими  
(номи)

3-боб Олимларнинг ишлари ва ҳуқуқлари  
(номи)

(сана, ой, йил)

Илмий раҳбар Б.Ф.И. Махсумхонов А.А.  
(исми, фамилияси, илмий даражаси ва унвони)

Магистрант 200\_ й “ ” да топшириқни қабул қилди.

## МУНДАРИЖА

Кириш .....	4
1. Адабиётлар шарҳи .....	7
1.1. Микроб липазалари ҳақида умумий маълумотлар .....	10
1.2. Липазаларнинг глицеридлардаги боғларга таъсирига кўра гуруҳланиши .....	13
1.3. Қаттиқ фазаларда замбуруғлар липазасининг стабиллигини ошириш ( <i>Penicillium sp.</i> мисолида) .....	15
1.4. Микроб липазалари биотехнологияда .....	16
1.5. Липолизда фаол марказнинг ҳосил бўлиши .....	17
1.6. Хужайра экзолипазасини клонлаш ва экспрессия қилишни тадқиқ қилиш .....	18
1.7. Липолитик фермент продуцентларининг экспериментал адаптацияси ...	20
1.7.1. Микроорганизмларнинг янги озуқа муҳити манбаларига адаптацияси	21
2-бўлим .....	25
2.1. Материаллар ва усуллар .....	25
2.2. <i>Oospora lactis</i> замбуруғини ўстириш учун қаттиқ ва суюқ озуқа муҳитларини тайёрлаш .....	25
2.3. Липаза фаоллигини миқдорий аниқлаш .....	25
2.4. Оксил миқдори аниқлаш .....	26
2.5. Кислота сонини аниқлаш .....	28
2.6. Ферментларни гель-хроматография усулида ажратиш .....	29
2.7. Ион-алмашилиш хроматографияси .....	32
2.8. Электрофорез .....	36
3-бўлим .....	42
Олинган натижалар ва уларнинг таҳлили .....	42
3.1. <i>Oospora lactis</i> замбуруғ культурасини соапстокли қаттиқ озуқа муҳитида адаптациялаш шароитини ўрганиш .....	43
3.2. Адаптацияланган <i>Oospora lactis</i> замбуруғи культурал суюқлигида липаза фаоллигининг ўзгариш динамикаси .....	44



## Кириш

**Тадқиқот мавзусининг долзарблиги.** Гидролитик ферментлар синфининг асосий намоёдаларидан, ҳамда муҳим ферментлардан бири бўлган липолитик, яъни турли хил қаттиқ ва суюқ ёғларни, уларнинг табиий ва сунъий формаларини, полимерланган ҳамда эфирланган кичик ва катта занжирли липид молекулаларини гидролизловчи липазалар (триацил-глицерол гидролазалар, КФ. 3.1.1.3) ўзининг тарқалиши, хилма-хиллиги ва хусусиятлари билан алоҳида эътиборга молик бўлган ферментлар қаторига киради. Улар табиий липидлар ва синтетик триглицеридларни бири-бирларига бириктирувчи мураккаб эфир боғларини парчалаб, эркин мой кислоталари, моно-, диглицеридлар ва ниҳоят ёғлар ва липидларни глицерингача гидролизлайдилар. Липолитик ферментлар халқ ва қишлоқ хўжалигининг, ишлаб чиқариш ва саноатнинг турли тармоқларида (озиқ-овқат, енгил, кимёвий, фармацевтика ва тиббиётда) кенг қўлланиб келинмоқда. Фармацевтика ва тиббиётда липазалардан фойдаланишнинг янги йўналиши - улар ёрдамида турли терапевтик дори-дармонлар, сиртки суртмалар тайёрлаш бўлиб, улар асосида инсонлар, ҳайвонлар, паррандалар ошқозон-ичак системасида истеъмол қилинган озуқани ҳазм қилишда, ошқозон ости бези, 12-бармоқли ичак, ошқозон, тери ва жарроҳлик яралари, чоклари касалликларини даволовчи препаратлар ишлаб чиқарилмоқда.

Липолитик ферментлар ва уларнинг вакиллари табиатда кенг тарқалган бўлиб, ўсимликлар ва уларнинг мевалари, дон маҳсулотлари, ҳайвонлар ва инсон организми энг бой бўлган манбаълардандир. Бироқ, ушбу манбаъларнинг етиштириш, ўстириш цикллари узок ва даврий бўлиб ҳамда ферментларни кўп миқдорда олиш учун ҳайвонларни махсус етиштириш ва ишлари мураккаб ва қимматли жараёндр.

Бу борада тупроқ, сув, ҳаво ва турли озуқа маҳсулотлари таркибида кенг учрайдиган микроорганизмлардан фойдаланиб, липаза ферментларининг комплекси, турли фаолликга эга бўлган аралаш ва тоза препаратларини турли қолдиқлар ва тез вақт мобайнида олиш усул ва

услугларини яратиш аввалдан ва ҳозирда ҳам энг долзарб муаммолардан бири бўлиб қолмоқда. Ҳозирги кунда юқори даражада тозаланган липазалар табиий липидларнинг структурасини стереоспецифик анализ қилиш, биологик мембраналарнинг таркиби ва тузилишини ўрганишда, янги структурали липидларни синтез қилишда қўлланилмоқда. У ёки бу даражада қўшимчалар сақловчи липазаларнинг комплекс препаратлари ёғ ва мойларни гидролизлашда, маргарин ва мойнезлар ишлаб чиқаришда фойдаланилади. Бундан ташқари липазаларнинг комплекс препаратлари синтетик ювиш воситалари ишлаб чиқаришда, табиий шарбатларни тиндиришда, терини ошлашда кенг қўлланилмоқда.

Юқоридагилардан келиб чиққан ҳолда замонавий биотехнология ва фармацевтика саноати физик-кимёвий ва каталитик хусусиятлари маълум бўлган, юқори даражада тозаланган липазаларга эҳтиёж сезмоқда.

**Тадқиқотнинг мақсад ва вазифалари.** Мазкур магистрлик диссертациясининг мақсади бўлиб, Тошкент шаҳри «Ёғ-мой комбинати» мой экстракция қилиш» цехи майдони тупроғи таркибидан ажратиб, монокультура холига келтирилган микроолд организм- *Oospora lactis* замбуруғини арзон ва қулай озуқа муҳити, яъни ёғ-мой ишлаб чиқариш корхоналарининг чиқиндиси – соапсток асосида ўстириш орқали липаза ферменти биосинтезини урганиш, фаол культура суюқлигидан липазани ажратиб тозалаб олиш, ҳамда унинг физик-кимёвий ва каталитик хусусиятларини ўрганишдан иборат

**Диссертациянинг илмий янгилиги** – *Oospora lactis* замбуруғини юқори концентрацияли соапстокли муҳитда (3-10 %) адаптацияланди, юқори ёғли муҳитга мослаштирилиб, фаол липаза биосинтези, ажратиб олиш, тозалаш асосида липазанинг 2-та хужайрадан ташқарида ҳосил булган формаси борлиги, ҳамда каталитик ва физик-кимёвий хусусиятлари, олинган ферментнинг турли ёғларни гидролизлаши хайвон ва усимлик липазаларига ухшашлиги аниқланди.

**Тадқиқотнинг амалий аҳамияти.** Лаборатория шароитида микроб продуцентларидан фаол липаза ажратиб олиш усули ишлаб чиқариш шароитларида мазкур ферментни ажратиб олишга асос бўла олади. Ажратиб, тозалаб олинган липаза лаборатория амалиётида ва фармацевтика саноатида дори-дармонлар олишда қўлланилиши мумкин.

**Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми.** Мазкур магистрлик диссертацияси кириш, адабиётлар шарҳи (1-бўлим), изланиш материаллари ва усуллари (2-бўлим), олинган натижалар ва уларнинг таҳлили (3-бўлим), хулосалар ва фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертация иши 64 вароқдан иборат бўлиб, 10 та расм ва 5 та жадвални ўз ичига олган.

## 1. Адабиётлар шархи

Липолитик ферментлар ихтиёрий тирик организмда липидлар алмашинувида муҳим роль ўйнайди. Улар липидларни бир организмдан иккинчисига кўчиради (ўсимликдан ҳайвонга, ҳайвондан ҳайвонга), организмда ёғларни тўпланишини бошқаради. Ўз навбатида тўпланган ёғлар ҳужайранинг энергетик захираси сифатида фойдаланилади. Бундан ташқари липазалар биологик мембраналар фаолиятини бошқаришда иштирок қилади [1].

Липолитик ферментлар деб камида 12 атом углерод сақловчи тўйинган ёки тўйинмаган алифатик кислоталарни эфирларининг гидролазаларига айтилади. Кимёвий, физикавий ва биологик хусусиятлари бўйича энг типик мой кислотаси олеин кислотаси бўлгани учун олеин кислотасининг эфирини гидролизлай оладиган ихтиёрий эстеразага липолитик ферментлар дейилади. Ушбу эфирнинг спирт гуруҳи глицерин (липаза) ёки унинг ҳосилалари (фосфолипазалар 1 ва 2, лизофосфолипаза, галактолипаза) ёки стерин (холестерол-эстераза) бўлиши мумкин. Юқоридаги ҳамма эфирлар табиий ёки физиологик субстратлар бўлсада, кўпгина липолитик ферментлар структураси табиий эфирлардан тубдан фарқ қилувчи сунъий эфирларни гидролизлай олади.

**Номенклантура.** Халқаро биохимиклар иттифоқи тавсиясига кўра ҳамма липолитик ферментлар гидролазалар 3 синфга киритилган ва улар эфирлар гидролазалари бўлгани учун I синф остга киритилган. Ҳақиқий липолитик ферментлар мой кислоталари эфирларини гидролизлаши учун улар карбон кислоталари эфирлари синфи остига тааллуқли, яъни уларнинг КФ 3.1.1. Мазкур синф вакиллари, яъни фосфолипазалар фосфолипидлар таркибидаги 3 ва 4 фосфодиэфир боғларини гидролизловчи липолитик ферментлар синф остига тааллуқли (КФ 3.1.4), фосфатид-фосфогидролазалар эса фосфомоноэфирлар гидролазалари синфостига тааллуқлидир (КФ 3.1.3) [6,7,8].

1-жадвалда Халқаро ферментлар номенклатураси бўйича Комиссиянинг тавсиясига асосан липолитик ферментлар вакилларининг рақамланиши (нумерацияси) келтирилган.

Липолитик ферментлар классификацияси улар гидролиз қиладиган “табiiй” ёки “физиологик фаол ёгли” субстратлари номларидан келиб чиқиб тузилган.

1-жадвал

Систематик рақам	Систематик номланиши	Тривиаль номланиши
3.1.1.3	Триацилглицерол-ацилгидролаза (глицериннинг эфирлари гидролазаси)	Липаза
3.1.1.13	Стероли эфирлар гидролазаси	Холестерол-эстераза
3.1.1.4	Фосфатид-2-ацил гидролаза  Фосфатид-1-ацилгидролаза	Фосфолипаза 2 (фосфолипаза A <sub>2</sub> )  Фосфолипаза 1 (фосфолипаза A <sub>1</sub> )
3.1.1.5	Лизолецитин-ацилгидролаза	Лизофосфолипаза
3.1.3.4	Фосфатид-фософгидролаза	Фосфатидатфосфатаза
3.1.4.3	Фосфатидилхолин-холинфософ- гидролаза	Фосфолипаза 3 (Фосфолипаза C)
3.1.4.-	Сфингомиелин-N- ацилсфингозингидролаза	Сфингомиелиназа
3.1.4.4	Фосфатидилхолин-фосфатидогидролаза	Фосфолипаза 4 (фосфолипаза D)
3.1.5. -	N-ацилсфингозин-ацилгидролаза	Церамидаза

1-жадвалда келтирилган ферментларнинг асосий ва муҳим вакилларидан бири глицерин эфирлари гидролазаларига (КФ 3.1.1.3) ҳақиқий “липазалар” сифатида қаралади. Чунки улар турли молекуляр массага ва ва ёғ кислоталари занжирлари полимерланиш даражаларига қараб,

триглицеридларни ацил кисмидан парчалаб, давомий таъсир қилувчи гидролазалардир. Улар таъсирида бирламчи эфирларга нисбатан спецификлик кузатилсада, ҳамма вақт ҳам бундай хусусият намоён бўлмайди. Одатда, бу ферментлар ди- ва моноглицеридларни глицерингача гидролизлай олади. Ушбу гуруҳнинг асосий намоёндаси бўлиб ошқозон ости беги ферменти, яъни панкреатик липаза ҳисобланади.

Холестерол-эстераза (КФ 3.1.1.13) функцияси моноглицерид липаза билан бир хил деб қаралмоқда. Лекин бу фикр ҳали тўлиқ исботланмаган.

Фосфолипаза 2 (КФ 3.1.1.4) лецитиназа ёки фосфолипаза А, кейинги вақтларда фосфолипаза А<sub>2</sub> деб номланган. Фосфолипаза 2 субстратга нисбатан қатъий спецификликка эга бўлган липолитик ферментларга мисол бўлади: ушбу гуруҳ ферментлари sn-3 фосфоглицеридлардаги ацилэфир боғини фақат глицериндаги иккинчи углерод билан боғланган ҳолатини гидролизлайди.

Фосфолипаза 1 (фосфолипаза А<sub>1</sub>) – систематик рақами фосфолипаза 2 сингари (КФ 3.1.1.4). Булар фосфоглицерид молекуласидаги эфир боғини биринчи углерод билан боғланган ҳолатини гидролизлайди.

Лизофосфолипазалар (КФ 3.1.1.5) – лизофосфолипидлардаги 1 ёки 2 ҳолатдаги эфир боғларни гидролизлайди.

Липолитик ферментларнинг кейинги намоёндалари фосфогидролазалардир: фосфатид-фосфогидролаза (КФ 3.1.3.4); фосфоглицеридлардаги 3 ҳолатда турган фосфоэфир боғини гидролизловчи фосфолипаза 3 (КФ 3.1.4.3); сфингомиелиназа (КФ 3.1.4.–) – сфингомиелиндаги боғларга таъсир қилувчи фермент. Фосфолипаза 4 (КФ 3.1.4.4) фосфоглицеридлардаги ва сфингомиелинлардаги гидрофил спиртни гидролизланишини катализлайди.

Фосфолипаза 3 1960 йилларгача адабиётларда фосфолипаза D ёки фосфолипаза C деб номланган. 1960 йилдан фосфолипаза 3 фосфолипаза C деб номлана бошланди. Фосфолипаза 4 ҳам фосфолипаза C ёки фосфолипаза D деб номланган. Ҳозирги кунда фосфолипаза D деб номланмоқда.

N-ацилсфингозин-ацилгидролаза (церамидаза) (КФ 3.1.5-) субстратлардаги ациламид боғни гидролизлайди.

### 1.1. Микроб липазалари ҳақида умумий маълумотлар

Микроорганизмларнинг турли ёғлар ва мойларни гидролизлаш хусусиятлари анча аввал маълум бўлсада, микроб липазаларига эътибор фақат уларнинг озиқ-овқат маҳсулотлари, айниқса, сут, мой маҳсулотлари бузилишидаги урни, таъсирлари билан боғлиқ булган [24]. Кейинроқ микроб липазарини ўрганиш фаннинг бошқа йўналишга қаратилди: турли табиий манбаларда энг фаол микроорганизмларни ажратиб олиш, турли фермент препаратларини олиш, ишлатиш мақсадида, микроорганизмларнинг липолитик фаолликларини ошириш омиллари ишлаб чиқиладиган бўшланди.

Липолитик ферментларни микроорганизмларнинг кўпгина систематик гуруҳлари, жумладан бактериялар, замбуруғлар, ачиткилар ҳосил қилади. Ҳозирга қадар турли манбалардан ажратиб олинган грамманфий ва грамусбат бактериялар, замбуруғлар, ачитки ва баъзан патоген микроорганизмларнинг юзларча штамлари ўрганилиб, текширилиб чиқилган ва улардан кўпчилиги липолитик фаолликни намоён қилиши аниқланган.

Липолитик фаол штамлар липтоспир, коренобактерия, пропион бактериялари, актиномицет ва хатто микоплазмалар орасида аниқланган. Бактерия авлодларидан *Pseudomonas*, *Stafilococcus*, *Lactobasillus* липазанинг фаол продуцентлари эканлиги маълум [37, 61].

(Alford et.al, 1967, Kosugi et al, 1971, Jonson, Shydy, 1976, Suhigara et. Al, 1977)

Япон олимлари *Pseudomonas metifica* культурасини ўрганиб, бу микроорганизм ҳам экзо- ҳам эндоферментларни ҳосил қилишини кўрсатдилар (Kosugi, Suzuki et al, 1971) [55].

Башкатова Н.А. 1980 йилда *Pseudomonas* авлодига мансуб 30 штамми ўрганиб чиқди ва улар ичида липазанинг энг фаол продуценти *Pseudomonas fluorescens* эканлигини аниқлади [5].

*Borgstrom* ва бошқалар хом сугир сутидан ажратиб олинган 80 га яқин анаэроб микроорганизмларни текширди, уларнинг 68 таси *Diplococcus* авлодига мансуб грамманфий бактерияларига тааллуқли эканлигини аниқлади. Улар 30-37°C да ўсиб, хужайра ички липазасини ҳосил қилади. Ушбу культура липазаси ажратиб олиниб, қисман тозаланган. Максимал фаоллик субстрат сифатида трибутирин ишлатилганда намоён бўлган [41].

Бир қатор олимлар томонидан тупроқдан олинган 900 га намунадан бактерияларнинг 100 штамми ажратиб олинган ва таркибида 2% зайтун мойи, 1% минерал тузлардан иборат бўлган агарли озиқа муҳитида ўстирилиб, культурал суюқликдаги липаза фаоллиги аниқланган. Шу йўл билан 14 та липаза ҳосил қилувчи штаммлар ажратиб олинди [42]. Булар орасида иккитаси энг юқори фаолликка эгаллиги билан ажралиб турган ва булар грамманфий бактерияларга мансуб аэроб эканлиги аниқланган. Бу штаммлар микробиологик текшириш натижасида *Alcaligenes* авлодига мансублиги аниқланган.

Фреер, Лоуренс ва бошқалар граммусбат коккларнинг 22 та грамманфий таёқчаларнинг 20 та штаммларини сут мойи ва трибутиринни парчалаш қобилятини ўрганиб чиқиб улардан *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stafilococcus* авлодлари микроорганизмлари энг фаол бўлиб чиқди. Муаллифлар *Micrococcus freudenreichii* дан липазани ажратиб олиб унинг хусусиятларини ўрганганлар. Спора ҳосил қилувчи *Bacillus coagulans* бактерияси ҳам липазанинг фаол продуценти эканлиги аниқланган [52].

Себальд ва Превод (1960) *Geotrichum* авлодига мансуб бактерияларнинг 86 та штаммини ўрганиб *Geotrichum sporogens* ва *Geotrichum hemolyticum* штаммлари энг фаол эканлиги аниқлаганлар. Патоген бактериялар липолитик фаоллигини аниқлаш натижасида Рикоза ва

Домарадский туляримни келтириб чиқарувчилар орасидан вирулент ва авирулент штаммларда, текширилган барча бруцеллалар ва куйдирги таёқчаси бактериялари штаммларида липолитик фаоллик борлигини аниқлаганлар [45].

Трибутинга нисбатан энг юқори фаолликни туляримия микроблари намоён қилади. Вабо бактериялари вакцина штаммлари ва псевдотуберкулёзни келтириб чиқарувчи вирулент штаммлар умуман липолитик фаолликка эга эмас экан. Штейн [35] микроорганизмларнинг турли систематик гуруҳларига мансуб (замбуруғ, бактерия, актиномицетлар) 383 штаммини текшириб чиқиб замбуруғларда нейтрал рН оптимумли липаза мавжудлигини аниқлади. Актиномицетлар орасида ишқорий липазани синтез қилувчи штаммлар аниқланган. Ишқорий липазани синтез қилиш хусусияти *Pseudomonas* авлоди бактерияларида аниқланган ва улар ичида энг фаоли *Pseudomonas aerogenis* бўлиб чиқди.

Ҳозирги кунда замбуруғлар ва ачитқилар липазаси анча чуқур ўрганилган ва амалиётда кенг қўлланилмоқда. Липолитик ферментларга бағишланган монографиялар каторида ачитқи ва замбуруғ липазаларига бағишланган рисоалар мавжуд.

Ўсимликларнинг мугуз қаватидан ва меваларидан микроорганизмларнинг липолитик фаол 57 та культураси ажратиб олиниб, улар орасида бактерия, ачитқи ва замбуруғлар мавжудлиги аниқланган. Энг юқори липаза фаоллиги замбуруғларнинг *Penicillium* авлодига мансуб 10 та штаммида аниқланди. *Penicillium ciolopium* тури ўсимлик мугуз таркибига кирувчи қаттиқ триглицеридлар ва мураккаб эфирларни гидролиз қила олиш хусусиятига эга эканлиги аниқланди. Бу культуранинг табиий яшаш жойига спецификлиги билан боғлиқ бўлиши мумкин. *Penicillium* авлодига мансуб микроскопик замбуруғларда юқори биосинтетик қобилият ҳам аниқланган (Казанская А.С. № 562271, Марченкова, 1980, Chander et.al., 1974).

1965 йилда Войнарская *Aspergillus* авлоди замбуруғларининг 10 та турини ўрганиб, бу турларнинг ҳаммаси липаза фаоллигига эга эканлигини

аниклаган. Улар ичидан энг юқори фаоллик *Aspergillus awamori* ва *Aspergillus terricola* бўлиб чиққан. *Aspergillus* авлоди замбуруғлари юқори лапаза фаоллигини намоён қилишини бошқа кўпчилик олимлар ҳам эътироф этганлар (Тройина, 1969, Арендс, 1971, Жанбаев ҳаммуаллифлари билан, 1977) [4, 27, 28].

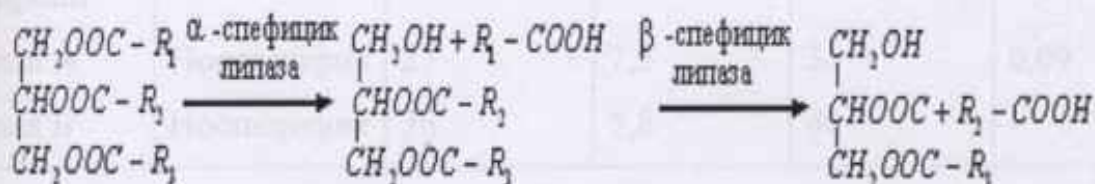
Липолитик ферментлар продуценти бўлиб *Alternaria* авлоди замбуруғлари ҳам хизмат қилади (Билай, 1974) [11]. *Mucor pusilus* липазаси анча мукамал ўрганилган (Somkiti, Babel, 1968) [59].

1992 йилда Ирина Мализевская *Penicillium citricum* замбуруғининг хужайрасидан ташқарига чиқариладиган липазани ажратиб олган [56]. Петровик ва бошқалар *Penicillium roqforti* замбуруғини ўстириш шароитини ўрганиб, липаза фаол ҳосил бўлиши учун зарур бўлган параметрларни аниклаганлар. 1990 Томас Жакобсон бошчилигида *Georticum candidum* дан липаза ажратиб олинган.

Шундай қилиб турли таксономик гуруҳ микроорганизмлари: мицелиал замбуруғлар, бактериялар (хам граммусбат ҳам грамманфий), ачиткилар липаза синтез қилиш хусусиятига эга эканлар. Актиномицетлар эса липаза продуцентлари сифатида таърифланмаган. Бактериал липазалар учун ишқорий муҳитда ишлаш хос бўлса, замбуруғ липазаларининг ўзига хос хусусияти уларнинг кўп шаклда мавжудлигидир [43, 53, 54].

## 1.2. Липазаларнинг глицеридлардаги боғларга таъсирга кўра гуруҳланиши

Глицеридлардаги боғларга таъсирга кўра липаза (КФ 3.1.1.3) специфик ва носпецифик липазаларга бўлинади. Специфик липазалар глицериддаги  $\alpha$ - ёки  $\beta$ -боғларни уза олади. Носпецифик липазалар эса глицеридлардаги ҳамма боғларни уза олади [9].



Куйида айрим микроорганизмлар липазаларининг тавсифи келтирилган.

2-жадвал

Продуцент номи	Спецификлиги	Молекуляр массаси, кДа	pH оптимуми	Ҳарорат оптимуми, °C	Спец. фаоллиги, бирлик/мл
<i>Chromobac. viscosum</i>	Носпецифик	30	6,5-7,0	70	22,75
<i>Pseudomonas sp.</i>	1,3 рёғио	32	7,8	47	7,80
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,3 рёғио	32	7,0	50-55	3,05
<i>Candida cylindracea</i>	Носпецифик	120	7,2	45	53,22
<i>Candida carvala</i>	18:1>16,0	195	5,0-8,0	60	4
<i>Candida deformans</i>	1,3 рёғио	207	7,0	80	19
<i>Aspergillus niger</i>	1,3 рёғио	38	5,6	25	9,02
<i>Geotrichum candidum</i>	цис-9-ёғ кислотаси	55	6,6	40	14,20
<i>Hemicola lanuginose</i>	Носпецифик	27,5	8,0	60	5,16
<i>Mucor miehei</i>	1,3 рёғио	-	8,0	40	3,25
<i>Penicillium cyclopium</i>					
Липаза А	Носпецифик	27	7,5	35	0,09
Липаза Б	Носпецифик	36	5,8	40	-

Rhizopus arrhizus	1,3 рёғио	43	8,0	-	16,08
Rhizopus delemar	1,3 рёғио	41,3	5,6	35	2,20
ЎзР ФА Микробиология институти «Ферментлар микроорганизмлари» маълумотлари [1-3, 12-14]					
Oospora lactis УзЛМ-2	Носпецифик	43	7,5	36	1000
Rhizopus microsporus УзЛТ-1	1,3 рёғио	66	6	40	1590
Mucor miehei УзЛТ-3	1,3 рёғио	43	8,7	55	2275
Penicillium melinii УзЛМ-4	Носпецифик	29	7,4	37	2000

### 1.3. Қаттиқ фазаларда замбуруғлар липазасининг стабиллигини ошириш (*Penicillium sp.* мисолида)

*Penicillium sp.* замбуруғи липазаси муҳит омилларига жуда ҳам таъсирчан ва юқори ҳароратларда инактивация бўлади. Инкубацион муҳитга қаттиқ адсорбентлар (ДЭАЦ, КМЦ, сорсилен)нинг кўшилиши юқори ҳароратлар ва этанолга липазанинг стабиллигини оширади. Бунда унинг сиртида адсорбент тури ва функционал гуруҳ табиати муҳим аҳамиятга эга. Қаттиқ фазалар системасида инактивация константаси микдорини 50-70 марта пасайтиришга эришилади.

Микроблардан ажратиб олинган липаза ёғ-мой саноати маҳсулотлари олишда кенг қўлланилади. Бироқ микроб липазаларининг стабиллиги пастлиги улардан кенг қўлланилишни чёғаралаб келмоқда. Ҳозирги кунда

ферментлар стабилизациясида турли усуллар қўлланилмоқда. Лекин ҳамма ҳолларда ҳам у липолитик ферментлар учун ижобий натижаларга олиб келмаяпти. Масалан, ковалент иммобилизацияланган липазанинг эримайдиган ташувчиларда стабиллиги сезиларли даражада оширилсада, липазаларнинг субстратлари сувда эрмаганлиги учун уларнинг фаоллик босқичлари кескин камайиши кузатилади. Эримайдиган субстрат иммобилизацияланган липаза фаоллигини кузатишдаги қийинчиликлар липазаларни полимер гелларга киритиш ёки макрокапсулалар усулларида ҳам кузатилган.

Оддий ва самарали усуллардан бири ферментлар стабилизациясини қаттиқ фазада (гетероген муҳит) ферментатив реакцияни ўтказиш ҳисобланади. Қаттиқ фазалар системасида ферментлар стабилизациясини ошириш кўпгина олимлар томонидан эътироф этилмоқда [51].

#### 1.4. Микроб липазалари биотехнологияда

Микроб липазаларининг субстрат спецификлиги кўпгина олимлар ишларида эътироф этилган. Фермент таъсирининг самарадорлиги ва реакция ўтказиладиган шароитга боғлиқлиги талай ишларда ўз аксини топган. Чунончи, биотехнологик жараёнларда носпецифик ва  $\alpha$ -специфик липазалар қўлланилмоқда.

Сўнгги йилларда турли ферментлар олишда микроорганизмлар кенг қўлланилиб келинмоқда.

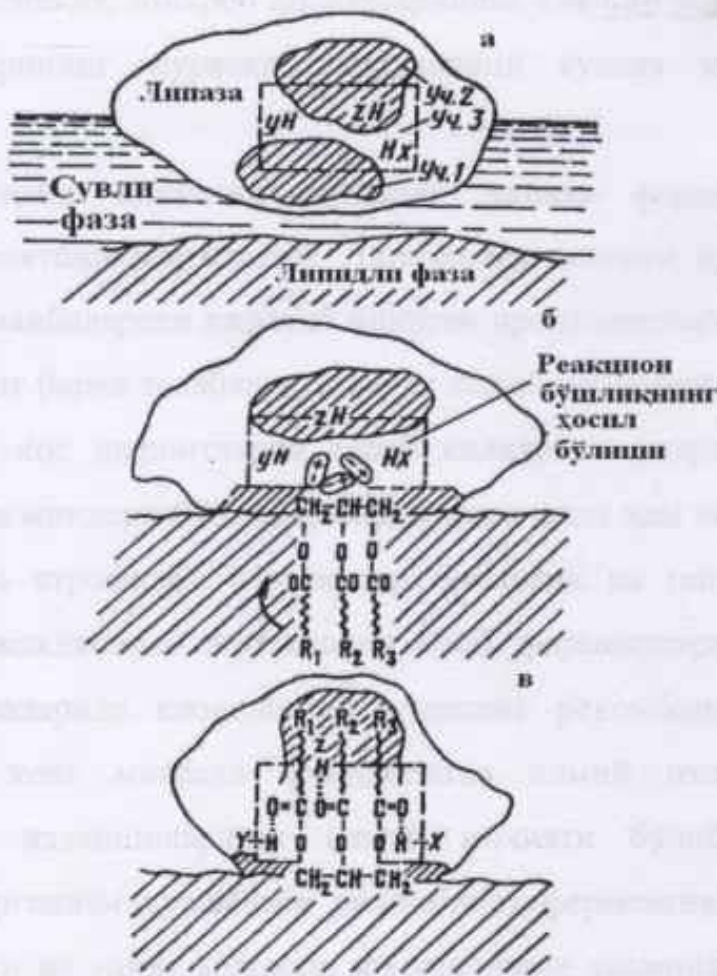
Липолитик ферментлар ишлаб чиқаришнинг турли тармоқларида (озик-овқат, енгил, кимёвий, фармацевтика ва тиббиётда) кенг қўлланиб келинмоқда. Фармацевтика ва тиббиётда липазалардан фойдаланишнинг янги йўналиши – улар ёрдамида турли терапевтик дори-дармонлар, сиртки суртмалар тайёрлаш бўлиб хизмат қилади. Бундан ташқари липазалар асосида инсонлар, ҳайвонлар, паррандалар ошқозон-ичак системасида истеъмол қилинган озуқани ҳазм қилиш, тери ва жарроҳлик яралари ҳамда чоклари касалликларини даволовчи препаратлар ишлаб чиқарилмоқда. У ёки бу даражада қўшимчалар сақловчи липазаларнинг комплекс препаратлари ёғ

ва мойларни гидролизлашда, маргарин ва мойнезлар ишлаб чиқаришда фойдаланилади. Бундан ташқари липазаларнинг комплекс препаратлари синтетик ювиш воситалари ишлаб чиқаришда, табиий шарбатларни тиндиришда, терини ошлашда кенг қўлланилмоқда [6].

### 1.5. Липолизда фаол марказнинг ҳосил бўлиши

Липидларнинг ферментатив гидролизи бошқа ферментатив реакциялардан тубдан фарқ қилади. Аксарият липазалар сувда эрувчан, уларнинг субстратлари бўлган липидлар сувда эримаслиги сабабли липидларнинг липаза таъсирида гидролизланиши гетероген жараёнга мисол бўлади. Бундан келиб чиқиб, фермент ва субстрат орасидаги ўзаро таъсир фазаларнинг ажралиш юзасида боради дёган хулосани чиқариш мумкин. Субстрат сувда қийин эриганлиги сабабли унинг ферментнинг фаол маркази билан таъсири қийин кечиши лозим. Бироқ тажрибаларнинг кўрсатишича липазалар фаоллиги сувда эрувчан субстратларга таъсир қилувчи бошқа гидролазалар фаоллигидан қолишмайди. Липидларнинг дисперслик даражаси қанча катта бўлса, липолиз шунча тез бориши аниқланган.

Бироқ ферментнинг адсорбцияси продуктив бўлиши учун ферментни субстрат молекуласининг устки қаватига киритиш лозим. Шундан кейингина ферментнинг фаол маркази субстрат молекуласи контактлашиши мумкин. Проф. Рахимов М.М. нинг фикрларича липазанинг фаол марказини бири-бирдан функционал фарқ қилувчи учта марказга бўлиш мумкин: 1) контактлашушчи, субстрат молекуласини сиртини танишга маъсул бўлган қисм; 2) гидрофоб боғловчи бўлим – субстратли фазадан битта субстрат молекуласини фермент глобуласига чиқариб олади; 3) мураккаб эфирли боғларни гидролизловчи каталитик бўлим. Ушбу фикрлар схематик равишда 1-расмда келтирилган [26, 29-31].



1-расм. Липолизда фаол марказларнинг ҳосил бўлиши (М.М.Рахимов бўйича)

## 1.6. Хужайра экзолипазасини клонлаш ва экспрессия қилишни тадқиқ қилиш

Ҳозирги вақтда микроорганизмлар липазалари (КФ 3.1.1.3 – триацил глицерол гидролаза) гетероген муҳитда гидролиз реакцияларини катализлаши билан бутун жаҳон олимларининг эътиборини жалб қилиб келмоқда. Чунки бу ферментлар халқ хўжалигининг турли тармоқларида, жумладан медицина, фармацевтика, озиқ-овқат (диетик майонезлар олиш, ёғ ва мойларни модификациялаш ва переэтерификациялаш, моно- ва диглицеридлар олиш), кимё (мураккаб эфирларни, рёгио ва стеро структурали эфирларни синтез қилиш, ювиш воситаларига ва детергентларга қўшиш ва биоёқилғи ишлаб чиқариш), енгил саноатда (терини ошлаш, ипак толасини ёғсизлантириш) ва оқава сувларни тозалашда (ёғли моддалардан

тозалаш) ишлатилмоқда. Микроб липазаларининг яна бир ноёб хусусияти бу — ёғ кислоталарининг мураккаб эфирларини сувсиз муҳитда синтез қилишидир.

Юқорида қайд қилинган фикрлар липаза ферментига бўлган эҳтиёжнинг аҳамиятини белгилайди. Липазанинг ҳозирги кунгача эътироф этилган, табиий манбалардан ажратиб олинган продуцентлари кўп миқдорда фермент олишнинг барча талабларига тўлиқ жавоб бермайди. Чунки ҳар бир продуцент ўзига хос шароитларни талаб қилади ва уларнинг культурал суяқлигида оксил миқдори бўйича ҳосилдорлиги жуда ҳам пастдир (умумий оксилнинг 0,1 % атрофида). Молекуляр биология ва ген муҳандислиги фанларининг ривожланиши натижасида ноёб ферментларни гетерологик хўжайин хужайраларида клонлаш ва уларнинг рекомбинат шаклларини яратиш устида кенг миқёсли фундаментал илмий изланишлар олиб борилмоқда. Бу изланишларнинг илмий моҳияти бўлиб, биринчидан, хўжайин микроорганизм хужайраси рекомбинат ферментни кўп миқдорда экспрессия қилади ва унинг миқдори юқорилигини таъминлайди (200 мг/л рекомбинат фермент ёки умумий оксилнинг 50 %-дан кўпи); иккинчидан, хўжайин микроорганизм хужайраси асосан рекомбинат ферментни синтез қилади; учинчидан, ферментнинг каталитик параметрларини (фаоллигини, юқори ҳароратда ва ҳар хил рН кўрсаткичларида стабиллигини, рёғио- ва стерииоспещификлигини) уни ишлатиш шароитига мослаб ўзгартириш мумкин, яъни фермент генида аҳамиятли аминокислоталарни ген муҳандислиги услублари ёрдамида алмаштириб мутация қилиш имконияти кенгдир. Кўриниб турибдики, рекомбинат ферментлар табиий продуцентдан ажратиб олинган ферментлардан кўп хусусиятлари билан аҳамиятлидир. Шунинг учун рекомбинат липаза ферментини яратиш ва уни ажратиб олиш ишланмаларини ишлаб чиқиш катта аҳамиятга эга [50,51].

## 1.7. Липолитик фермент продуцентларнинг экспериментал

### адаптацияси

Адаптация муаммоси ёки организмларнинг мослашиш ўзгарувчанлиги – замонавий биотехнологиянинг энг асосий муаммоларидан бири. Микроорганизмларнинг мослашиш ўзгарувчанлиги ўзига хос бўлиб, биология фани муҳим масалалари орасида алоҳида ўрин тутди.

Барча турга мансуб организмлар учун аниқ ифодаланган яшаш муҳитига мослашиш хусусиятлари хосдир. Бундай мослашувнинг келиб чиқиши ва сақланиб қолиши табиийлиги Чарльз Дарвин таълимотига мос келади.

Адаптация деб ташқи муҳит шароитлари ўзгаришида айнан шу шароитга мослашиш аҳамиятига эга бўлган организм ўзгариши ёки реакцияси тушинилади. Адаптация ҳодисасини ўрганишда организм реакциясининг икки типини белгилаш мумкин:

1. Ташқи муҳит ўзгарганда организм потенциал имкониятларини реализация қилиш. Адаптациянинг бу типи ташқи муҳит шароитлари ўзгаришига қараб организмга модда алмашинуви ёки генетик информацияни ўқишни ўзгартириш имконини берувчи алоҳида механизмлар мавжудлигига боғлиқ. Бунда адаптация генетик ахборотнинг миқдори ва сифати ўзгармасдан содир бўлади. Адаптациянинг бундай типига физиологик ёки морфологик адаптация дейилади.

2. Ташқи муҳит шароитлари ўзгаришига жавоб бериш хусусиятининг пайдо бўлиши. Адаптациянинг бу типи фақат генетик ахборот миқдори ва сифати ўзгариши билан содир бўлади. Табиийки, адаптациянинг биринчи типи иккинчиси мавжуд бўлмасдан туриб вужудга келмайди.

Физиологик адаптацияда организм реакцияси мураккаб системанинг физик-кимёвий қонуниятларига бўйсунган ҳолда ўзининг тутиши ва генотип ҳолатига боғлиқ.

Агар адаптация ирсий ўзгариш билан содир бўлса у қуйидаги хусусиятларга эга бўлади:

Адаптация – бу узок вақт давом этувчи, катор босқичли жараён бўлиб, фақат адаптация омили дозасига эмас, балки вақтга ҳам боғлиқ.

2. Адаптация жараёнида адаптация омили вектор ўзгаришига организмнинг мақсадга мувофиқ жавоб бера олиш имконини берадиган ўзгаришлар вужудга келади ва тўпланади.

3. Адаптация фақат маълум шароитда ва шу шароитнинг вақт давомида катъий бир хилда ўзгариши натижасида содир бўлади. Бу шароит ушлаб турилмаса адаптация сезилмайди ёки тезда тугайди. Яъни адаптация омилисиз организмда ўзгаришлар сезилмайди ёки умуман содир бўлмайди.

4. Адаптациянинг характерли хусусияти – бу вақт давомида адаптив ўзгаришларнинг турғунлашиши натижасида доимий ҳолатга ўтишидир. Буни кўпинча “кейин эришилган ўзгаришларнинг ирсийланиши” дейилади.

5. Агар адаптацияланган организмни узок вақт давомида адаптация омилисиз ўстирилса (культивацияланса), қайта таъсир бўлганда ҳам у худди шу реакцияни намоён қилиш хусусиятини сақлаб қолади.

Адаптация жараёнини характерловчи асосий катёгориялар. Микроорганизмлар адаптациясининг экспериментал ўрганиш баъзи методик усулларни қўллашни талаб қилади. Шундай усуллардан бири – бошқа омилларни иложи борича ўзгартирмасдан микроорганизмни қандайдир бир омилга адаптациясини ўрганишдир. Муаммони назарий жиҳатдан ўрганишда бу талабни бажарса бўлади, чунки экспериментал ўрганишнинг вазифаларидан бири адаптациядаги омилнинг ролини аниқлашдир. Лекин экспериментда адаптацияга кўп миқдордаги ўзгарувчан катталиклар таъсирини ҳисобга олиш қийин. Шунинг учун, бу усул орқали бирор амалий масалани ҳал қилишда организм фақат бир омил эмас, балки бутун комплекс шароитга мослашишини ҳисобга олиш зарур [20].

### 1.7.1. Микроорганизмларнинг янги озуқа муҳити манбаларига

#### адаптацияси

Бирон-бир бирикмани углерод манбаи сифатида ўзлаштира олиш қобилятининг йўқлиги метаболизм системаси бир ёки бир неча бўғинида шу

бирикманинг учрамаслиги билан боғлиқ. Таъкидлаш лозимки, бундай мухитда ўсиш ва кўпайишнинг содир бўлмаслиги бу бирикманинг хужайра алмашинувига ингибирловчи ёки бошқача таъсир қилиши билан боғлиқ эмас. Демак, маълум моддани ўзлаштира олиш қобилияти хужайрада мавжуд бўлмаган системаларнинг ривожланиши билан пайдо бўлиши мумкин. Бунда адаптациянинг бевосита сабаби ферментатив фаолликнинг ёки ферментнинг синтезланишидир.

Кўпчилик микроорганизмлар бир-бирдан конфигурацияси, молекуласидаги углерод атомлари, оксидланиш-қайтарилиш даражаси билан тубдан фарқ қиладиган турли бирикмаларни углерод, азот ва энергия манбаи сифатида ўзлаштира олади.

У ёки бу бирикмани ўзлаштира олиш қобилияти адаптация туфайли юзага келиши мумкин. Адаптация фақат табиий модаларгагина эмас, балки уларнинг синтетик аналоглари туфайли ҳам юзага келиши мумкин.

Сўнгги йилларда олиб борилган илмий ишлар бу йўналишларда катта муваффақиятларга эришиш имконини берди.

Микроорганизмларнинг метаболизми учун хужайрага зарур бўлган компонентлар биосинтези ҳамма вақт бир хилда содир бўлади ва ўзлаштирилаётган модда кимёвий хусусиятларига боғлиқ эмас. Бу эса метаболитлар биосинтези бир хил асосий бирикмалардан содир бўлишини кўрсатади. Демак, углерод, азот ва энергиянинг ягона манбаи бўлган модда кимёвий хусусиятлари қандай бўлишидан қатъий назар шу моддани конструктив ва энергетик метаболизмининг асосий бирикмасига айлантира олади. Бунда асосий бирикмалар хужайрадаги асосий метаболитик ўзгаришларни катализловчи ферментлар субстрати бўлиши мумкин. Улар пентозафосфат цикли, трикарбон кислоталр цикли, глиоксалат цикли ва бошқалардир.

Хужайра компонентларини кура оладиган ва бунинг учун керакли энергияни ажрата оладиган микроорганизмларда бирор органик моддадан келиб чиқиб ферментларни уч гуруҳга бўлиш мумкин. Биринчи гуруҳга

ферментлар ўзлаштириладиган моддани бирор бир асосий бирикмага айланиш реакциясини катализлайди. Улар тайёрловчи метаболизм ферментлари дейилади. Бу реакциялар кўп миқдордаги энергия сарфланиши билан боради.

Иккинчи гуруҳ ферментлари метаболизмнинг асосий реакциялари – ҳосил бўлган асосий бирикмалардан хужайра учун зарур бўлган метаболитларнинг синтези ва энергия ажралишида иштирок этадиган қатор бирламчи бирикмалар ҳосил бўлиш реакцияларини катализлайди. Бу ферментлар асосий метаболизм ферментлари дейилади.

Учинчи гуруҳ ферментлари турли кичик молекуляр бирикмалар ва биополимерлар биосинтези реакцияларини катализлайди. Бу реакциялар конструктив метаболизм реакциялари дейилади ва улар энергетик ресурслар сарфланиши билан боради.

Агар микроорганизм нормал ўса оладиган минерал озуқа муҳитидан углероднинг ягона манбаи бўлган моддани худди шу кимёвий гуруҳга мансуб модда билан алмаштирганда ўсиш ва кўпайиши тўхтаса, демак хужайра ундан бирон бир асосий бирикма синтез қила олмайди. Бунда адаптация тайёрловчи метаболизм даврида хужайра тузилиши ва ферментатив аппарат қайта қурилиши билан боғлиқ бўлади. Лекин ҳам одатдаги углерод манбаи ҳам унинг ўрнини боса оладиган муҳитда микроорганизмлар ўсмаса, демак, асосий углерод манбасининг ўрнини оловчи модда ёки ундан метаболизм туфайли ҳосил бўлган моддалар мазкур микроорганизм учун зарарли деган хулосани чиқариш мумкин.

Бундан ташқари, модданинг микроорганизм томонидан ўзлаштирилмаслиги унинг микроорганизм хужайрасидан кира олмаслиги сабабли содир бўлиши мумкин. Шунинг учун модданинг хужайрага ташилишини тайёрловчи метаболизм даврига киритиш мумкин.

Биосферанинг ифлосланиши туфайли микроорганизмларни углерод, азот ва энергиянинг ягона манбаи сифатида токсик моддаларга адаптацияси



## 2-бўлим

### 2.1. Материаллар ва усуллар

Ишда ЎзР ФА Микробиология институти “Микроорганизмлар ферментлари” лабораториясида ажратиб олинган *Oospora lactis* замбуруғи ишлатилди.

### 2.2. *Oospora lactis* замбуруғини ўстириш учун қаттиқ ва суюқ озуқа муҳитларини тайёрлаш

*Oospora lactis* культураси сусло-агар, соапсток ва ачитки автолизатили қаттиқ озуқа муҳитида 4-5°C ҳароратда сақланади.

Адаптация учун қуйидаги қаттиқ озуқа муҳитидан фойдаланилди: ачитки автолизати – 1 %; агар – 2 %; соапсток – 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %; муҳит рН-и 5,6-6,0.

*Oospora lactis* ни ўстириш учун суюқ озуқа муҳити қуйидагилардан иборат:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,3 %,  $\text{CaCl}_2$  – 0,1 %,  $\text{CaCO}_3$  – 0,1 %, ачитки автолизати – 0,7 %, пахта ёғи – 1,0 %, соапсток утилизациясини ўрганишда муҳитга пахта ёғи ўрнига турли концентрациялардаги соапсток қўшилди [17].

### 2.3. Липаза фаоллигини миқдорий аниқлаш

Реактивлар: буфер эритмалар тайёрлаш учун х.ч. ва ч.д.а. маркадаги реактивлар ишлатилди. Ҳамма эритмалар бидистиллят сувда тайёрланди.

Субстрат сифатида пахта ёғи ишлатилди. Субстрат 1 % ли поливинил спирти (ПВС) эритмасида эмульгирланди.

1 % ли ПВС нинг сувли эритмасини тайёрлаш: 10 г ПВС устига 800 мл дистилланган сув қуйиб 30 дақиқа давомида хона ҳароратида қолдирилади. Сўнг 0,5 мл 0,1 н ли  $\text{HCl}$  қўшиб, 90°C ли сув ҳаммомида 1 соат давомида эригунча қиздирилади. Совугандан сўнг эритма 0,1 н ли  $\text{NaOH}$  эритмаси билан 7,2 бўлгунча титрланади, сўнгга ҳажми бидистилланган сув билан 1 л гача етказилади.

40 % ли эмульсия тайёрлаш: турғун эмульсия тайёрлаш учун 150 мл 1 % ли ПВС эритмаси ва 100 мл пахта мойи гомогенизаторда 10 дақиқа давомида 10000 айлана/дақиқа тезликда аралаштирилади. Агар эмульсия бир соат давомида совутгичда ушлаб турилгандан сўнг мойнинг ажралиши кузатилса аралаштириш қайтадан амалга оширилади.

Липаза фаоллигини миқдорий аниқлашда Ота ва Ямада [58] (1966) усулидан фойдаланилди. Бу усул фермент таъсири натижасида ҳосил бўлган мой кислоталарини нейтраллаштиришга асосланган. Липаза фаоллиги бирлиги сифатидаа 2 % ли поливинил спирти эритмасидаги 40 % ли зайтун мойидан 1 мкМ (микромоль) олеин куислотаси ҳосил қилувчи фермент миқдори қабул қилинди.

Липаза фаоллиги қуйидаги формула билан аниқланди:

$$ЛФ = \frac{А \cdot 50 \cdot Р}{В \cdot К},$$

бу ерда:

А – назорат ва тажриба арашмаларини титрлашга сарфланган 0,05 н.ли КОН эритмаси ҳажмининг фарқи, мл;

50 – олеин кислотасини микромолга ўтказиш коэффиценти;

Р – фермент эритмасини суюлтириш коэффиценти;

В – культурал суяқлик ёки препарат эритмаси миқдори;

К – ишқор эритмаси титрини тўғирловчи коэффицент.

Липаза фаоллигини бир хил даражада ушлаб туриш учун мой кислоталарини боғлаш учун сарфланган ишқор миқдори А 0,8-1,5 мл оралигида бўлиши лозим. Фермент намунасини шу ўлчовдан келиб чиққан ҳолда суюлтириш лозим [25].

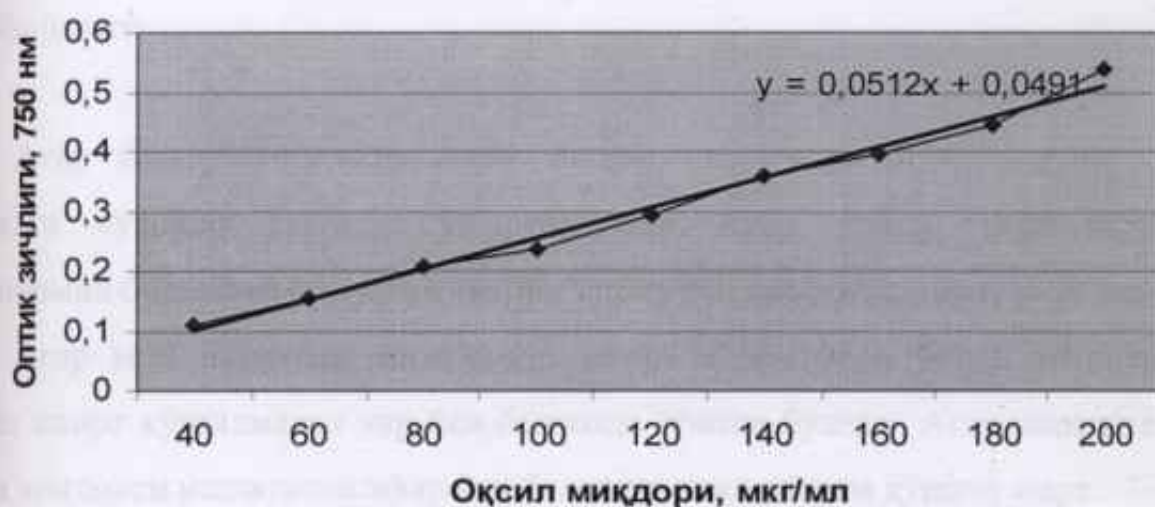
#### 2.4. Оқсил миқдори аниқлаш

Оқсил миқдорини Лоури (1951) усули бўйича ва ажратиб олинган тоза фермент миқдорини Кристиани-Варбург усулларида 280 нм тўлқин узунлигида СФ-46 спектрофотометрида оптик зичликка қараб аниқладик.

Оқсилни Лоури усулида аниқлаш учун керакли жиҳозлар ва реактивлар: Спектрофотометр (СФ-46), штатив, пробиркалар ва пипеткалар.

1. Уювчи натрийнинг  $\text{NaOH}$  0,1 н ли эритмаси; 2. А эритма – натрий карбонатнинг  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 н. ли натрий гидрооксидидаги  $\text{NaOH}$  2 % ли эритмаси. 3. В эритма. Мис сульфатнинг 1 % ли натрий тартратдаги 0,5 % ли эритмаси. Эритмани тайёрлаш учун 10 г натрий тартрат тузи 300 мл сувда эритилади. Кейин эритмага 5 г мис сульфат қўшилади ва ҳажми 1 л гача етказилади. 4. С эритма. Бу эритмани тайёрлаш учун А эритмадан 50 мл, В эритмадан 1 мл аралаштирилади. С эритма бевосита анализ қилишдан олдин тайёрланади. 5. Фолин реактиви. Бу эритмани тайёрлаш учун 1 литрли қолбага 100 г  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ва 25 г  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  тузлари солиниб 700 мл сувда эритилади. Сўнгра эритмага 50 мл 85 % ли ортофосфат кислотаси  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 100 мл концентранган хлорид кислотаси  $\text{HCl}$  қўшилади. Сўнгра қолбага қайтарувчи шиша совутгич уланиб 10 соат давомида қайнатилади. Қайнатиш тугагач 150 г литий сульфат  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 50 мл сув ва бир неча томчи бромли сув қўшилади. Ориқча бромни чиқариб юбориш учун 15 дақиқа давомида совутгичсиз қайнатилади. Аралашма хона ҳароратигача совутилгач фийлтрланади ва ҳажми 1 литргача етказилади. Ишлатилишидан олдин Фолин эритмаси 1:1 нисбатда сув билан суюлтирилади. 2-расмда 40-200 мкг/мл концентрацияда БСА оксили билан калибровка графиги келтирилган [25].

### Лоури бўйича оқсил миқдори (БСА)



2-расм. Оқсилни аниқлаш учун калибровка графиги

### 2.5. Кислота сонини аниқлаш

Кислота сони деб бир грамм мой таркибида бўлган эркин мой кислоталарини нейтраллаш учун сарфланган КОН нинг миллиграммлардаги миқдорига айтилади.

Реактивлар: калий гидроксидининг этил спиртидаги 0,1 н.ли эритмаси, этил спиртининг петролейн эфири билан 1: 1 нисбатдаги аралашмаси, фенолфталеиннинг этил спиртидаги 1 % ли эритмаси.

Кислота сонини фенолфталеин иштирокида титрлаш усули билан аниқланди. Титрлаш учун ишқорнинг спиртли ёки сувли эритмаси ишлатилди. Мойни эритувчи сифатида эфир ва спирт аралашмаси ёки бензол ишлатилди.

Кислота сони қуйидаги формула билан аниқланди:

$$K.c. = \frac{a \cdot 5,611}{e},$$

бу ерда,

K.c. – кислота сони;

a – титрлашга сарфланган 0,1 н. ли КОН эритмаси миллилитрлардаги миқдори;

$e$  – ўлчаб олинган мой намунаси миқдори, г.

5,611 – КОН эритмасининг 0,1 н. ли эканлигини ҳисобга олувчи коэффициент.

Агар бошқа концентрацияли ишқор ишлатилса коэффициент ҳам мақсадга мувофиқ равишда ўзгартирилади. Агар ишқор титри қатъий децинормал бўлмаса формулага титрни тузатувчи коэффициент киритилади.

Агар мой намунаси ишқорнинг спиртли эритмаси билан титрланса мойни спирт қўшилмаган эир ёки бензолда эритса бўлади. Агар ишқорнинг сувли эритмаси ишлатилса эфир ёки бензолга этил спирти қўшиш шарт.

Кислота сонини аниқлашда спиртнинг роли турлича. Биринчидан, спирт ишқорни реакцион муҳитда эрувчанлигини таъминлайди, реакция спирт иштирокисиз гетероген муҳитда боради, яъни реакциянинг фақат икки фаза чёғараларидагина бориши барча мой кислоталарини нейтраллаштиришни қийинлаштиради.

Иккинчидан нейтрализация натижасида ҳосил бўлган совун реакцион муҳитда эримай чўкмага тушади. Бу қаттиқ совун ўзидаги адсорбцион хусусиятлар туфайли нейтрализация якунини тўғри аниқлашни қийинлаштиради.

Учинчидан, ва бу энг асосийси ҳисобланади, спиртнинг реакцион муҳитда етишмаслиги ёки умуман бўлмаслиги натижасида титрлаш натижаларини бузувчи совун гидролизи содир бўлади [25].

## 2.6. Ферментларни гель-хроматография усулида ажратиш

Гель-хроматография – бу моддаларни молекуляр массасига кўра ажратишдир. У индивидуал оксилларни ажратиш ва концентрациялаштириш имконини беради.

Сефадекслар моддаларни молекуляр массаси бўйича гель фильтрация усули билан ажратишда кенг қўлланилмоқда. Гель фильтрациянинг моҳияти шундаки, оксилларнинг эритмалари бўктирилган сефадекс солинган

колонкадан ўтказилганда паст молекулали бирикмалар сефадекс заррачаси ғовакчаларига кириб, ушланиб қолади. Юқори молекулали бирикмалар эса колонкада ушланиб қолмасдан ўтиб кетади. Сефадекслар гранулаларини ўлчамига қараб танланса, кичик молекулали бирикмаларни ажратиш олиш ва яна оксилларни фракцияларга ажратиш мумкин.

Сефадекслар ўзларининг турли эритувчиларга муносабати билан фаркланади. G-типдаги Сефадекслар гидроксил гуруҳлари кўп бўлганлиги учун гидрофиллиги билан ажралиб туради. Уларнинг заррачалари сувда жуда яхши бўқади. LH типдаги сефадекслар: булар липофилл ва гидрофилл хусусиятларини ўзида намоён қилган алкилланган моддалардир. Шунинг учун LH сефадексларни заррачалари кўпчилик органик эритувчиларда ва сувда бўқади.

Сефадексларга асосланиб ион алмашувчи сорбентлар (ионитлар) ишлаб чиқилган. Улар юқори ҳажмда ютиш ва паст даражада нонспецифик адсорбицион хусусиятларига эга. Сефадекслар ёрдамида (кўп компонентли аралашмаларни ажратишдан ташқари) бирикмаларни молекуляр массасини аниқлаш мумкин. Бу оксилни турига элюацияланувчи эритувчи ҳажмини боғлиқлигига асосланган. Масалан, глобуляр оксиллар учун бу боғлиқлик тўғри чизикқа яқин. Бу усул экстрактларни тозаламасдан оксилларни молекуляр массасини аниқлашга имкон берувчи ягона усулдир.

Гель фильтрация ёрдамида сефадексларда макромолекуляр эритмаларини тусизлаш мумкин. Масалан, альбуминлардан NaCl ни ажратиш олиш, органик моддаларнинг эритмаларини тозалаш. Гель фильтрация, шунингдек моддаларни концентрациялаш учун ҳам ишлатилади.

Ишлатилаётган гелларда декстран микромолекулалари бир-бири билан бирлашиб, полисахаридларни уч қарра занжири ҳосил бўлади.

Қуйи молекулали ионлар сефадекс гранулаларини ичига осон ўтади ва у ерда ушланади, оксил молекулалари эса гранулларни четлаб элюат оқими билан колонкадан чиқиб кетади. Шу тариқа оксилларни тозалаш ва ажратишга эришилади.

Сефадекслар ва уларга ўхшаш геллар бир-биридан декстран молекулаларининг ўзаро боғланиш даражаси билан фарқланади. Бу эса уларнинг эритмадаги бўкишини ҳар хиллигига ва турли молекуляр массали моддаларни ушлаб қолиш имкониятини яратилишига олиб келади.

Реактив ва асбоблар: культурал сууюқлик, элюацияловчи эритма (0,09 М натрий хлорид эритмаси), сефадекс, хроматографик колонка, шиша таёқча, 2 л ли стакан, таъминловчи идиш (ёки перстальтик микронасос), пробиркалар билан штатив (ёки фракцияларни автоматик коллектори).

Бажариш техникаси: 2 литрли стаканга 27 г сефадекс солинади ва 1,5 л 0,09 м ли NaCl эритмаси қуйилади. Вақти-вақти билан шиша таёқча ёрдамида аралаштириб, сефадекс 3-12 соатга бўкиш учун қолдирилади.

Бўктирилган сефадекс доимий аралаштириб турилган ва элюацияловчи эритмани колонкадан эркин оқиб тушиши таъминланган ҳолда вертикал колонкага солинади. Бунда колонкани бўктирилган сефадекс билан бир хилда тўлдирилишига ва сефадексни юқори юзасини горизонтал бўлишига эришиш зарур. Бунинг учун фильтр қоғозни ишлатса ҳам бўлади (колонкани ички диаметрига мос равишда).

Колонка тўлдирилгандан сўнг 250-300 мл ҳисобида элюацияловчи эритма ўтказилади ва сефадексни устки қисмида 0,5-1 см қалинликда эритма қолдирилиб, пастки жумрак орқали тўкилади. Колонкадаги элюацияловчи эритмани сатхи пастки жумрак очиқ ҳолда сефадексни устки қисмига тенг бўлган вақтда капилляр учли пипетка ёрдамида ёки шприц билан тадқиқот қилинаётган оксил эритмаси сефадексни устки қисмига берилади.

Оксил эритмаси сефадексни юқориги қисмига етганда пипетка билан 10-20 мл элюацияловчи эритмадан берилади, сўнгра эритма билан таъминловчи идиш уланади ёки насос ишга туширилади.

Элюацияланган фракциялар алоҳида пробиркаларга ёки автоматик коллектор ёрдамида йиғиб олинади. Оксил миқдори спектрофотометрик усулда 280 нм тўлқин узунлигида аниқланади.

Ишни тугаши билан колонка 150-200 мл элюация эритмаси билан ювилади. Узоқ вақт сақланганда ювувчи эритмани охириги порцияларига антисептик (0,02 %ли натрий азид ёки хлороформ эритмаси ёки этил спиртининг 20 % х. ли эритмаси) кўшилади [25].

## 2.7. Ион-алмашиниш хроматографияси

Хроматографиянинг бу тури қарама-қарши зарядланган оксил ва ион алмашинувчи адсорбентнинг ўзаро боғланиш хусусиятига асосланган.

Ион алмашинувчи адсорбент турлари. Ион алмашинувчи адсорбентларнинг катион алмаштирувчи ва анион алмаштирувчи турлари мавжуд. Катион алмашинувчи адсорбент таркибидаги кислота гуруҳининг протолизи ҳисобига манфий зарядланади ва мусбат зарядли оксилларни бириктиради. Шунга кўра кислотали катионалмашинувчи адсорбент (катионит) деб номланади. Анион алмашинувчи адсорбент эса ишқорий гуруҳга протон бириктириш ҳисобига мусбат зарядланади ва манфий оксилларни бириктиради ҳамда ишқорий алмашинувчи адсорбент (анионит) деб номланади.

Аминокислота ва пептидларни тозалашда қўлланилувчи смолаларни оксиллар учун қўллаб бўлмайди. Чунки, биринчиан, оксиллар смола билан мустаҳкам боғ ҳосил қилади; иккинчидан, смоланинг ўлчами оксилга нисбатан кичик бўлганлиги сабабли оксилнинг йирик молекуласи унинг ичига кира олмайди; учинчидан, смоланинг гидрофоб матрицаси оксилнинг денатурациясига сабаб бўлади. Шунга кўра оксилнинг ион алмашинувчи хроматографияси учун целлюлоза асосли ион алмашинувчи адсорбентлар қўлланилади. Қуйидаги жадвалда энг кўп қўлланиладиган адсорбентлар ва уларнинг хусусиятлари келтирилган.

## Энг кўп қўлланиладиган адсорбентлар

Ион алмашинувчи адсорбент	Номи	Қискартирилган номи	рН	Элюация рН-и	Ион алмашинувчи хроматографиясида иштирок этувчи функционал гуруҳ	
					оксил	ионалмашинувчи
Анионит	Диэтиламиноэтил целлюлоза	ДЭАЭ-целлюлоза	8,0	8,0-5,0	-COOH	$-N^+-H(CH_2-CH_3)_2$
Катионит	Фосфоцеллюлоза	Ф-целлюлоза	6,7	4,0-7,0	$-NH_2$	$-PO_3^{-2}$
Катионит	Карбоксиметил целлюлоза	КМ-целлюлоза	4,0	4,5-8,5	$-NH_2$	$-COO^-$

**Усулнинг моҳияти.** Махсус ишлов бериб колонкага тўлдирилган ион алмашинувчи адсорбент ва оксил ўртасида ион алмашинувчи жараёни боради:

Натижада тўғишли оксил ионалмашинувчи адсорбент билан боғланиб комплекс ҳосил қилади. Бирикмаган оксиллар эса буфер эритма билан ювиш натижасида колонкадан чиқиб кетади. Адсорбент билан бириккан оксилни буфер эритманинг рН-ини ёки молекулярлигини ўзгартириш орқали ажратиш мумкин. Элюация қилинаётган буфер эритма рН миқдорининг ошиши ёки камайиши натижасида оксил ўз зарядини ўзгартиради ва ион алмашинувчи адсорбентдан ажралиб эритмага ўтади.

Буфер эритманинг ион кучини ошириш ҳисобига оксилни адсорбентдан ажратиш ион атомларининг оксил молекуласи рақобат қилиб уни сиқиб чиқишига асосланган. Шу йўл билан тўғишли оксил бошқа оксиллардан ажратиш олинади.

**Керакли асбоб ва реактивлар:** Хроматография колонкаси (1×60 см), диализатор, центрифуга, СФ-46 – спектрофотометр, перистальтик насос, «Увикорд», потенциометр, механик аралаштиргич, совитгич, фракциялар коллектори, 500 мл ва 1000 мл ҳажмдаги стаканлар, ўлчов колбалари,

пробиркалар, сифон, ДЭАЭ-целлюлоза, 96 %-ли этанол, 0,01 М фосфат буфери (рН 8,4), 0,3 М фосфат буфери (рН-4,2), 0,05 М трис-НСІ (рН-8,0).

**Ишнинг бажарилиши.** 1. ДЭАЭ-целлюлозага ишлов бериш. ДЭАЭЦ-нинг керакли миқдори 5 марта ортиқ ҳажмдаги 0,5 N-ли NaOH билан хона ҳароратида 15 дақиқа чайқатилади ва тиндирилади. Сувда сузиб юрган майда заррачалар тўкиб юборилади (декантация қилинади).

2. ДЭАЭ-целлюлоза бир неча марта муҳит рН-и 8-9 га келгунча дистилланган сув билан ювилади. Бу жараён центрифугалаш ёрдамида тезлаштирилиши мумкин.

3. Ювилган ДЭАЭ-целлюлоза 3 баробар ҳажмда 96 % ҳли этанол қўйиб чайқатилади. Тиндирилгач суюқлиги бошқа идишга ўтказилади.

4. 0,5 N NaOH билан ишлов бериш яна такрорланади (1-2 жараёнлар такрорланади).

5. Целлюлоза муҳит рН нейтрал бўлгунча дистилланган сув билан ювилади. Шу усулда ишлов берилган ДЭАЭ-целлюлозани сувли суспензия ҳолида 4°C ҳароратда сақлаш мумкин.

6. Агар НСІ ионлари тозаланаётган оқсилга зарар етказмаса ДЭАЭ-целлюлозанинг СІ<sup>-</sup> формаси афзал ҳисобланади. ДЭАЭ-целлюлозани ОН формасидан СІ<sup>-</sup> формага ўтказиш қуйидагича амалга оширилади: юқоридаги усулда ишлов берилган целлюлозага 3 ҳажм рН и 8 бўлган 0,05 М трис-НСІ қўшиб хона ҳароратида 15 дақиқа аралаштирилади. Декантациядан сўнг бу жараён яна 2 марта қайтарилади. Сўнгра ДЭАЭ-целлюлоза 0,01 М фосфат буфери билан рН-8,4 бўлгунча ювилади.

7. Колонкани тўлдириш. Дастлаб колонка штативга қатъий вертикал ҳолатда ўрнатилади. Колонканинг пастки қисмига озгина шиша пахта ва колонка диаметрига мос келувчи фильтр қоғоз қўйилади. Пастки крани бекитилиб, колонка узунлигининг 1/4 қисмига бошланғич буфер эритма (0,01 М фосфат буфери, рН-8,4) қўйилади. Пастки кранни очиб буфер эритманинг маълум қисмини чиқариб юбориш ҳисобига ҳаво сиқиб чиқарилади.

8. Пастки кранни ёпиб ДЭАЭ-целлюлозанинг чайқатилган куюк суспензияси эҳтиёткорлик билан шиша таёқчани колонканинг ички деворига тираган ҳолатда қуйилади, акс ҳолда ДЭАЭ-целлюлоза колонкада бир текис ўтирмайди. Натижада буфер эритманинг колонка бўйича бир текисда ҳаракатланиши ва оксил молекулаларининг ажралиши қийинлашади. Колонкада ДЭАЭ-целлюлозанинг керакли баландлигини ҳосил қилишда махсус шиша идишдан фойдаланиш мумкин. ДЭАЭ-целлюлоза тингач ажралиб қолган буфер қатлами гель устида 0,5 мм буфер эритма қолгунча жуда кичик тезликда чиқариб юборилади.

9. Колонкада ион алмашувчи адсорбентнинг керакли баландлиги ҳосил бўлгач, у бошланғич буфер эритма билан рН тенглашгунча ювилади.

10. Гель-филтрациядан ўтган фаол фракция колонкага солинади.

Адсорбент устидаги буфер эритма баландлиги 2-3 мм га етгунча қоғозга шимдириш йўли билан ёки пипетка ёрдамида оҳиста олиб ташланади. Шундан сўнг фаол фракция пипетка ёрдамида колонка девори бўйлаб айланма ҳаркат қилган ҳолда оҳиста қуйилади. Пастки най очилиб фракциянинг адсорбент ичига кириши таъминланади. Колонка девори ҳам 2 мл бошланғич буфер эритма билан ювилади ва адсорбентга шимдирилади.

Дастлаб колонкани 3-4 хажмига тенг бўлган бошланғич буфер эритма билан элюция қилинади. Элюция тезлиги 12,5 мл/с қилиб ўрнатилади. Элюция тезлиги колонка диаметри ва узунлигига боғлиқ. Кейин шу тезликни ўзгартирмаган ҳолатда градиентли эритма ёрдамида элюирланади.

Аралаштиргич сифатида 500 мл ҳажмли, резервуар сифатида эса 1000 мл ҳажмли идишлар қўлланилади. Аралаштиргич бошланғич буфер эритма билан (0,01 М фосфат буфери, рН-8,4), резервуар 0,3 М фосфат буфери рН-4,2 билан тўлдирилади. Иккала идиш тифлон ёки поливинилхлориддан тайёрлаган сифон орқали уланади.

Буфер эритманинг колонкадан ўтишини насос бошқариб туради. Колонкадан ўтган оксил фракциялари коллекторда тўпланади [25].

## 2.8. Электрофорез

Оқсилларни ажратиш ва уларнинг бир жинслилигини аниқлашда муҳим ўрин тутадиган услублардан бири электрофорездир. Электр зарядига эга бўлган моддаларнинг электр майдонида анод ёки катод томонига силжиши электрофорез дейилади.

Маълумки, мусбат зарядланган оқсил катодга, манфий зарядлангани эса анодга томон силжийди. Оқсилларнинг электр майдонида ҳаракатланишига уларнинг молекуляр оғирлиги ҳам таъсир кўрсатади. Кичик молекуляр оғирликдаги молекула илдамрок, каттаси вазминрок ҳаракатланади. Натижада бир хил зарядланиш даражасига эга бўлган оқсиллар молекуляр оғирлигига кўра ҳам ажратилади. Электрофорезнинг 2 хил тури мавжуд:

1. Эркин электрофорез;
2. Зонали ёки ташувчи муҳитдаги электрофорез.

**Эркин электрофорез** Тизелиус томонидан ишлаб чиқилган бўлиб, буфер билан тўлдирилган V-симон электрофоретик асбобда олиб борилади. Бу идишнинг бир учига «+», иккинчи учига «-» зарядланган электрод туширилади. Электр токи юборилганда эритмадаги оқсил молекулалари зарядларига кўра силжийди.

Ҳозирги кунда эркин электрофорез деярли қўлланилмайди, чунки унга нисбатан бир қатор ижобий хусусиятга эга бўлган, такомиллаштирилган усуллар кашф этилди. Шулардан бири **зонали электрофорез** бўлиб, бунда электрофорез қаттиқ муҳитда олиб борилади. Қаттиқ муҳит сифатида ПААГ, крахмал, агар ва филтър қоғозидан фойдаланиш мумкин.

Зонали электрофорез эркин электрофорездан куйидаги жиҳатлари билан фарқланади:

1. Зонали электрофорезни бажариш осон.
2. Кам миқдорда оқсил талаб этилади, масалан: қоғоздаги электрофорез учун 0,5-0,8 мг, ПААГ электрофорез учун 100-200 мкг оқсил керак бўлади.
3. Электрофорез жараёнида ҳосил бўлган оқсил фракцияларини

ташувчи мухитда бўяб (ажратилган оксилни) аниқ куритиш мумкин.

4. Ташувчи мухит ёки буфер эритмани ўзгартириш йўли билан оксил аралашмасини фракцияларга ажратиш мумкин. Масалан: қон зардобининг қоғоздаги электрофорезида борат буферини (рН-8,9) қўллаб 5 та фракция (альбумин, а-1, а-2, р, а-глобулин) олинса, трис-ЭДТА буферини (рН-8,9) қўллаш орқали 9 та фракцияга ажратиш мумкин.

5. Зонали электрофорезда оксилларни фракцияларга ажралиши тез боради (баъзи услуб бўяш билан биргаликда 1-2 соатда амалга оширилади).

6. Зонали электрофорез асбоби содда тузилган ва эркин электрофорез асбобига нисбатан арзонга тушади.

7. Ташувчи мухитнинг ўзида ажратилган оксил фракцияларига субстрат таъсир эттириб ферментлар активлигини аниқлаш мумкин.

Шу билан бирга электрофорезнинг бир қатор камчиликлари ҳам мавжуд.

1. Оксилларнинг силжиш тезлигини тўғридан-тўғри аниқлаб бўлмайди.

2. Аниқланаётган оксил ва ташувчи мухит ўртасида салбий боғланиш вужудга келиши мумкин. Бунда оксил ташувчига адсорбцияланиб қолиши кузатилади. Қоғоздаги электрофорезда адсорбцияланиш кучлироқ бўлиб ПААГ да бу ҳодиса деярли кузатилмайди.

## ЗОНАЛИ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗНИНГ ТУРЛАРИ

**Қоғоздаги электрофорез.** Қоғоздаги электрофорез кенг тарқалган усул бўлиб, у махсус фильтр қоғозда олиб борилади. Бу қоғоз юқори гигроскопик бўлиши, сувни шимиши натижасида унинг оғирлиги куруклигидаги оғирлигига нисбатан 180-200 маротаба ошиши шарт.

Электрофорез ўтказиладиган асбобнинг турига кўра электрофорез 4 соатдан 16 соатгача давом этади. Электрофорез қоғози бўялади ва оксилни ажралган фракциялари аниқ кўрилади. Бўялган фильтр қоғозни сақлаб қўйиш мумкин. Агар ажратилган оксил миқдорини аниқлаш лозим бўлса керакли

фракция кирқиб олиниб оксил эритмага ўтказилади ва фотометрик йўл билан ўлчанади.

**Крахмал гелидаги электрофорез.** Айрим услубий қийинчиликлар бу электрофорезнинг кенг тарқалишига монелик қилди. Бунга сабаб крахмал гелини тайёрлаш, уни гидролиз қилиш анча мураккаб жараён эканлигидадир. Лекин шунга қарамай крахмал гели оксилни ажратишда кенг қўлланилади, чунки бу услубга кўра оксиллар фақат зарядланиш даражасига кўрагина эмас, балки молекуляр оғирлигига кўра ҳам ажратилади. Бу эса фракциялар сонини кўпайтиради. Масалан: қон зардоби оксидан ушбу услуб бўйича 8-10 та фракция олиш мумкин. Крахмал гелидаги электрофорез оксил гомогенлигини билишда аниқ услуб ҳисобланади.

**Агар гелидаги электрофорез.** Зонали электрофорезни олиб боришда агар гели ташувчи муҳит ҳисобланади. 1-1,5% ли агар гелида оксил эркин электрофорездаги каби ҳаракатланади. Агар гелидаги электрофорезда қоғоздаги электрофорезга нисбатан оксиллар тез фракцияларга учрайди. Агар катламининг тиниқлиги оксил фракцияларини яхши бўяшни ва фотометрик услубда аниқлашни осонлаштиради. Шу билан бирга бундай шароитда оксил фракциялари «дум» ҳосил қилмай ажралади. Лекин агар гелини тайёрлашнинг мураккаблиги унинг кенг қўлланишини чёғаралайди. Агар таркибида агаропектиннинг бўлиши гелнинг сифатига салбий таъсир қилувчи факторлардан ҳисобланади, чунки нордон агаропектин липопроteidлар ва кучли ишқор оксиллар билан комплекс ҳосил қилиш хусусиятига эга. Агар манфий зарядланганлиги сабабли буфер катионлари ва сув молекуласи анодга силжийди. Электрофорезда бу оқим оксил фракцияларини ҳам ўзи билан бирга силжишига сабаб бўлиши мумкин. Бу ходисани текшириладиган оксил аралашмасини гелли пластинканинг ўртасига томизиш йўли билан бартараф этиш мумкин. Бундай ҳолат агарозада, ацетат-целлюлоза мембранасидаги, фильтр қоғоздаги электрофорезларда кузатилмайди.

### Ацетат-целлюлоза мембранасидаги электрофорез.

Ацетат-целлюлоза мембранаси жуда яхши ташувчи муҳит бўлиб, бир қатор ижобий хусусиятларга эга. Крахмал ва агар гелларини тайёрлаш мураккаб ва кўп вақт талаб этиладиган жараён бўлиб, ацетат-целлюлоза мембранасига ишлов бериш фильтр қоғозники сингари осон. Ундан фаркли ўлароқ бу электрофорезда оксил тез ва яхши ажралади. Бу электрофорезда фақат оддий оксилларгина эмас, балки гликопротеидлар ҳам яхши бўялади, шунга кўра уларни миқдорий жиҳатдан ҳам аниқлаш мумкин. Ацетат-целлюлоза мембранасидаги электрофорез ёрдамида қоғоздаги электрофорезга нисбатан кўпроқ, крахмал гелидагига нисбатан эса камроқ фракция олинади. Ушбу электрофорез ёрдамида жуда оз миқдордаги (0,1-10 мкл дистилланган сувда эритилган 5-1000 мкг) оксиллар аралашмасини фракцияларга ажратиш мумкин, шунга кўра ацетат-целлюлоза мембранасидаги электрофорез ажратиб олинган оксилнинг гомогенлигини аниқлашда қўл келади.

### Полиакриламид гелидаги электрофорез.

ПААГ электрофорез кенг қўлланиладиган усул ҳисобланади. Ташувчи муҳит сифатида акриламид ва метиленбисакриламид сополимерлари қўлланилади. Мономерларнинг узун полиакриламид занжири маълум жойларида метилен кўприги ёрдамида ўзаро бирикиши ҳисобига элаксимон тешиқлар ҳосил қилади. Бир-биридан бир хил узокликда жойлашган амид гуруҳлари бу структуранинг юқори гидрофиллигини таъминлайди. Акриламиднинг полимерланиши ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин) индикатори, персульфат катализатори ёрдамида ёки рибофлавин иштирокидаги фотокатализ ҳисобига боради. Ўзининг элаксимон структураси туфайли ПААГ молекуляр элак вазифасини ҳам ўтайди. Гелнинг қовушқоқлиги, чидамлилиги, эластиклиги ва тешиқларнинг ўлчами полиакриламиднинг полимерланиш даражасига, яъни N, N-бисакриламид сонига боғлиқ. Гелнинг ғоваклик даражасини полимерланиш вақтида эритмадаги акриламиднинг концентрациси белгилайди. Акриламид ва бириктирувчи мономер – N, N-метиленбисакриламиднинг нисбати 40:1 (огирлигига кўра) ни ташкил этади. Демак акриламиднинг тўғри келадиган

концентрациясини танлаб, керакли ўлчовдаги ғовакли гелни ҳосил қилиш мумкин.

Юқори молекулали оксилларни (100000 ва ундан ортиқ) ажратишда 7% ли акриламиддан фойдаланилади (ғовак диаметри 50 Å).

Кичик молекулали оксилларни ажратиш учун кичик ғовакли гел ишлатилади (15% ва 20% ли акриламид, ғовак диаметри 30 Å).

Синтетик ПААГ табиёларига (Масалан: крахмал, агар гелига) нисбатан бир қатор афзалликларга эга: кимёвий жиҳатдан инертлиги; механик жиҳатдан турғунлиги; рН ўзгаришларига чидамлилиги; ультрабинафша нурида тиниқлиги; кўпчилик эритувчиларда эримаслиги; адсорбция ва электроосмос содир бўлмаслиги билан аҳамиятлидир. Услуб юқори сезгирликка эга (аниқлаш учун 50-100 мкг оксил кифоя) бўлганлиги сабабли кам реактив талаб этади.

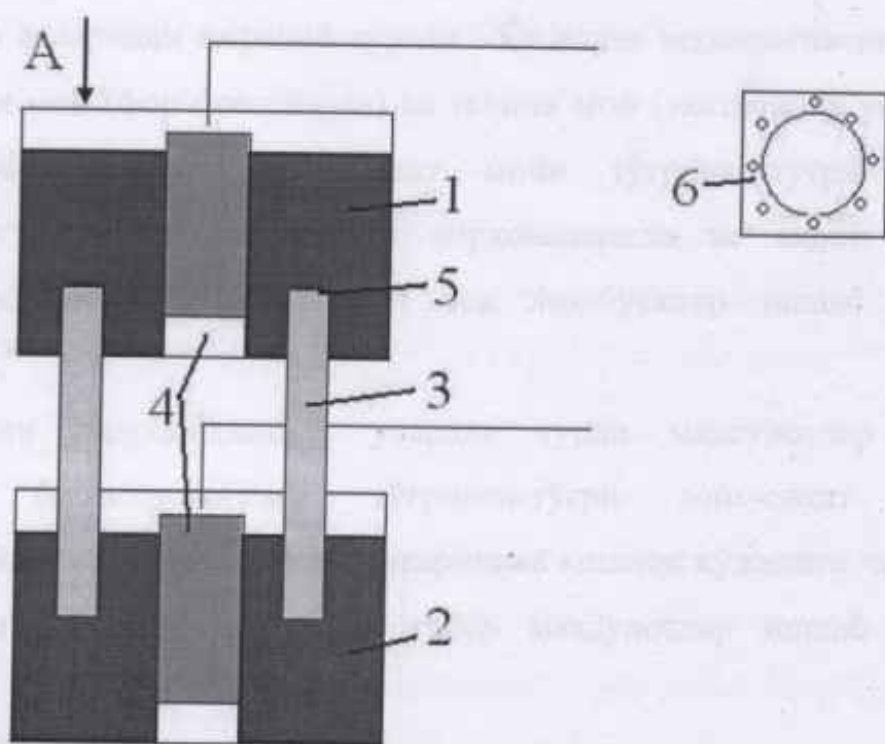
Бу усул бўйича оксилларни фракцияларга ажратиш бошқаларига кўра динча самарадорлигини, техник жиҳатдан оддийлигини, электрофорез тез содир бўлиши ҳисобига вақтнинг тежалишини ва аниқ натижалар олиш имкониятини беришини ҳисобга олган ҳолда диск-электрофорезнинг моҳияти ва ишни олиб бориш тартиби ҳақида батафсил тўхталиб ўтамиз.

**Диск-электрофорез.** Бу услубда оксилларнинг электр майдонида ҳаркатланиши ва фракцияларга ажралиши ПААГ билан тўлғазилган цилиндрсимон шиша найчаларда амалга оширилади. Колонкада оксил фракциялари диск кўринишида ажралади, шу сабабли диск-электрофорез деб номланган.

**Асбобнинг тузилиши.** Диск-электрофорез ўтказиладиган асбобнинг асосий қисми юқори (3-расм, 1) ва пастки идишдан (3-расм, 2), гел тўлдириладиган шиша найчалардан (3-расм, 3) иборат. Юқори ва пастки идишга платина симли ёки кўмир пластикали электрод (3-расм, 4) ўрнатилган. Иккала идиш ўртасида гел тўлдирилган шиша найчалар вертикал ҳолатда жойлашади. Юқориги идишнинг тубида бир хил узокликда жойлашган тешиқлар бўлиб, маҳкамловчи халқа (3-расм, 5) ёрдамида гелли

найча бириктирилади. Шиша найчанинг ички диаметри 5 мм, ташқи диаметри 7 мм, найча узунлиги 65-70 мм. Найчанинг ички юзаси бир текис бўлиши лозим, акс холда оксиллар аниқ фракцияларга ажралмайди ва гелни шишадан ажратиш қийинлашади.

Акриламид гелнинг яхши полимерланишига шиша найчанинг тозаллиги ҳам таъсир қилади, шунинг учун ишлатишдан аввал шиша найчаларни хром аралашмасида бир соат бўктириб қўйиб, сувда чайилади ва термостатда қуритилади. Ёғдан тозалаш учун ацетонга ботириб олиб, яна қуритилади [25].



3-расм. Диск-электрофорез ўтказиш учун мўлжалланган асбоб:

1-асбобнинг буфер тўлдирилган юқори қисми; 2-асбобнинг буфер тўлдирилган пастки қисми, 3-гелли шиша найча, 4-электродлар, 5-маҳкамловчи халқа, 6-шиша найча ўрнатиладиган тешик.

### Олинган натижалар ва уларнинг таҳлили

Ўзбекистон Республикаси аграр давлат бўлиб, асосан, экин майдонларида йилига 3,5 млн тонна пахта етиштиради. Маълумки, пахта толасидан ташқари унинг уруғи, яъни чигитининг миқдори йилига 2-2,5 млн тоннани ташкил қилади. Пахта чигити ўзининг кимевий тузилиши ва компонент таркиби буйича ноёб булиб, қарийб чигит мағзи ёғлардан иборатдир. Республикада аҳолининг ёғга бўлган эhtiёжи пахта ёғи билан қопланади ва узининг ноёб хусусияти ва туйимлилиқ даражаси билан бошқа ўсимлиқлар ёғларидан ажралиб туради. Ёғ олиш технологиясига мувофиқ, чигитлардан мой (фор-прессларда) ва техник мой (экстракция усули билан) олинади. Филтрланган озиқ-овқат мойи тўғридан-тўғри озиқ-овқат саноатининг умумий овқатланиш корхоналарида ва аҳоли томонидан истеъмол қилинади. Техник мой эса лок-бўёқлар ишлаб чиқаришга сарфланади.

Ёғларни гидролизлаш, улардан турли маҳсулотлар олишнинг замонавий биотехнологияси тўғридан-тўғри озиқ-овқат саноатида ишлатилмайдиган, кўпроқ ишлаб чиқариш ва кишлок хўжалиги чиқиндилари таркибидаги ёғларни парчалаб, тайёр маҳсулотлар ишлаб чиқаришга асосланган.

Юқоридаги икки фикрни назарда тутган ҳолда липазани пахта чигитидан мой ишлаб чиқаришда ҳосил бўладиган соапсток ёрдамида олшни лозим топдик. Шу билан ҳам озиқ-овқат ҳам техник мойлар ўрнига соапстокдан субстрат сифатида ишлатиш мумкинлигини ўрганишни лозим топдик.

### 3.1. *Oospora lactis* замбуруғи тоза культурасини соапстокли қаттиқ озуқа мухитига мослаштириш (адаптациялаш)

Индуцибел, яъни субстрат табиатига мос синтезланадиган ферментлар олиш учун фаол микроб продуцентлари гидролизга учратиши лозим бўлган моддаларнинг юқори концентрацияларига мослаштирилиди, натижада уларнинг биосинтетик қобилиятлари ошиб, озуқа мухитига солинган субстратни парчалашга моил оксилларни синтезлайдилар. Одатда бундай тажрибалар қаттиқ озуқа мухитида олиб борилади ва продуцент монокультураси колонияси атрофида ҳосил булган гидролиз зоналари ва уларнинг хажмларига қараб, культуранинг қобилияти сифат жиҳатдан баҳоланади. Липолитик фаолликни аниқлаш учун дастлаб соапстокдан субстрат сифатида фойдаланилди ва *Oospora lactis* замбуруғи қаттиқ агарли мухитдаги споралари, озуқа мухитига ягона углерод манбаъи сифатида солинган соапсток-агарли қаттиқ озуқа мухитига стерил шароитларда экилиб, бир неча бор ва ҳар 15 кунда қайта экиш йўли билан мослаштирилди. Соапсток-агарли қотирилган озуқа мухитига 1 % миқдорда ачитки автолизати азот манбаъи сифатида қўшилди.

Мослаштириш жараёни бир неча босқичда, соапсток концентрациясини 0,5 % дан 1,5 % гача кўтариб бориш йўли билан амалга оширдик. Соапсток концентрациясини ҳар бир марта ўзгантирганда ушбу мухитга бир неча марта қайта экишлар олиб борилди. Мослашган культурани доимий (12-15 ой) фаол ҳолатда сақлаб туриш учун сақлаш мухитига ҳам танланган миқдордаги соапсток концентрацияси қушилиб, 4 С ҳароратда сақлаш учун олиб куйилди.

Табиийки, дастлабки кунлари агар-соапстокли мухитда колониянинг ўсиши оптимал танланган оддий озуқа мухитига (пахта, мол ёғи ёғи-1,0 - %-3,0 % %, азот, калий, фосфор натрий тузлари солинган) нисбатан секинлашди. Агар оддий мухитда 1-2 кеча-кундуздан сўнг оқ, момиқ, маркази бир оз бўртган, диаметри 1,5-2,0 см бўлган колония ҳосил бўлиб, 5-6 кундан сўнг бутун мухит юзасини қоплади. Соапстокли мухитда эса аввал

кичик-кичик нуқталар ҳосил бўлиб, 5-6 кундан сўнг худди оддий муҳитда 1-2 кеча-кундуздан сўнг ҳосил бўлган колония сингари ок колония ўсиб чиқди.

Соапстокли муҳитда ўсган колония кўриниши оддий муҳитда ўстирилган замбуруғ колониясидан фарқ қилишини аниқладик. У момик эмас, анча текис, озуқа муҳитини рангсиз парда билан қоплайди. Ўстиришнинг 3-4 кеча-кундузида колония бир оз бўртиб чиқиб, кейинчалик яна текис ҳолатга келди.

Агар оддий озуқа муҳитида 3 кеча-кундуздан сўнг спора ва мицелийнинг алоҳида-алоҳида шохларга, иплар бўғинларга бўлиниб оидиядар ҳосил қилса, соапстокли муҳитда бу ҳолат 7-8 кундан сунг кузатилди.

4-5 марта қайта экишдан сўнг замбуруғ ўсиши сезиларли даражада тезлашди ва спора ҳосил бўлиши 4-5 кеча-кундуздан бошланди.

Замбуруғ колонияларини соапстокнинг 1,5 % концентрация солинган озуқа муҳитида беш мартаба қайта экишдан сўнг, айнан ушбу культуранинг ўзини соапстокнинг юкори (3,0-5,0 %) концентрацияси солинган бошқа муҳитига экдик, ҳамда қайта экишларни давом эттирдик. Сунгра эса тадқиқотларимиз учун мулжалланган мослашагн культурани синтетик Чапек озуқа муҳити тузлари ва соапсток кушилган каттик агарли муҳитда, стерил пробиркаларга экиб, 15 кундан сунг эса асосий культурани совутгичда 4 С хароратда сақлаш учун куйдик.

### 3.2. Адаптацияланган *Oospora lactis* замбуруғи культурал суюқлигида

#### липаза фаоллигининг динамик узгариши

Агар-соапстокли каттик озуқа муҳитида қайта экишлар ёрдамида адаптацияланган культуранинг липаза ҳосил қобилиятини текшириш учун микробиологиянинг анаънавий услублардан бири, яъни оптималлаштирилган суюқ озуқа муҳитларида *Oospora lactis* замбуруғининг ўсиш, ривожланиш ва фаол фермент ҳосил қилиш динамикасини соапстокли

мухитда, унинг таркибидаги ёғларни гидролизлаш хусусиятига қараб ургандик. Суюқ мухитда чайкатиб ўстириш усулида ҳам мослашган *Oospora lactis* замбуруғини углероднинг ягона манбаи сифатида солинган, яъни соапсток асосида тайерланган озуқа мухитида яхши ўсиб, ривожланишини, яъни биомасса туплашини кузатдик. Ушбу мухитда *Oospora lactis* замбуруғи куюқ ва қовушқоқ мицелий ҳосил қилди. Культурал суюқликдаги япон олимлари Ота ва Ямада таклиф этган усулда аниқланган липаза фаоллиги юқори курсаткичга эга бўлди. Ўстириш давомида соапстокнинг ёғсимон қавати секин-аста камайиб бориб, дастлаб кунгир-жигар рангга эга бўлган озуқа мухити кейинчалик ўз рангини йўқотди. Лекин *Oospora lactis* замбуруғининг ўсиш вақти ва хужайра ташқи липазасини ҳосил қилиш тезлиги одатдаги пахта ёғи солинган озуқа мухитга нисбатан анча қийинроқ, содир бўлди. Агар пахта ёғи солинган озуқа мухитда хужайра ташқи липазасининг фаоллиги максимал қийматга ўстиришнинг 22-26 соатида кузатилса (1,9 ед/мл), соапстокли мухитда эса бу курсаткич 30-32 соатгача (1,85 ед/мл) чузилди (4-расм).



4-расм. *Oospora lactis* замбуруғи культурал суюқликда липаза фаоллигининг ўзгариш динамикаси

Пахта ёғли озука мухитида фаоллик ўстиришнинг 20-чи соатидан бошланса, соапстокли мухитда 24 соатдан сўнг бошланиб, фаол фермент синтези иккала озука мухити ўртасида 4-соатга фарк қилди.

### 3.3. Липолитик фаол оксилларни ажратиш олиш ва тозалаш

Хужайрадан ташқарига чиқарилувчи оксилларнинг липолитик фаоллиги суст булиб, замбуруғ мицелийси ичидаги фаоллик юкори эканлиги кайд килинди. Шунинг учун липаза ферментини олиш ва урганиш учун кейинги ишларимизда замбуруғнинг мицелийсидан фойдаландик. Бунинг учун суюк озука мухитида ўстирилган мицелий дастлаб филтрдан утказилди, филтр когози юзасида колган мицелий такророй равишда дистилланган сувда тозалаб ювилди. Олинган мицелий массаси улчаниб, фарфор идишга солинди, устидан - 120С совукликдаги суюк азот солиниб, музлатили, кварц куми солиниб, болгача (пестик) ердамида механик ишлов берилди. Бундай ишловдан сунг *Oospora lactis* замбуруғининг мицелий ичи липазаси ўз фаоллигини тўла сақлаб қолади [15]. Таъкидлаш лозимки, *Oospora lactis* замбуруғи мицелийсининг автолизи натижасида липаза ўз фаоллигини тўла йўқотади. Шунинг учун мицелий ичидаги липазани ажратишда хужайранинг автолиз бўлишига йўл қўймаслик лозим. Ишлов берилган мицелий таркибидаги липаза хужайра ичи суюклиги билан ташқарига чиқади ва унга натрий-фосфат буфери солиниб, яна механик ишлов берилиб, олинган гомогенат филтрдан утказилди, центрифуга ердамида кум булакчалари ва ерилган хужайра таначаларидан ажратилди.

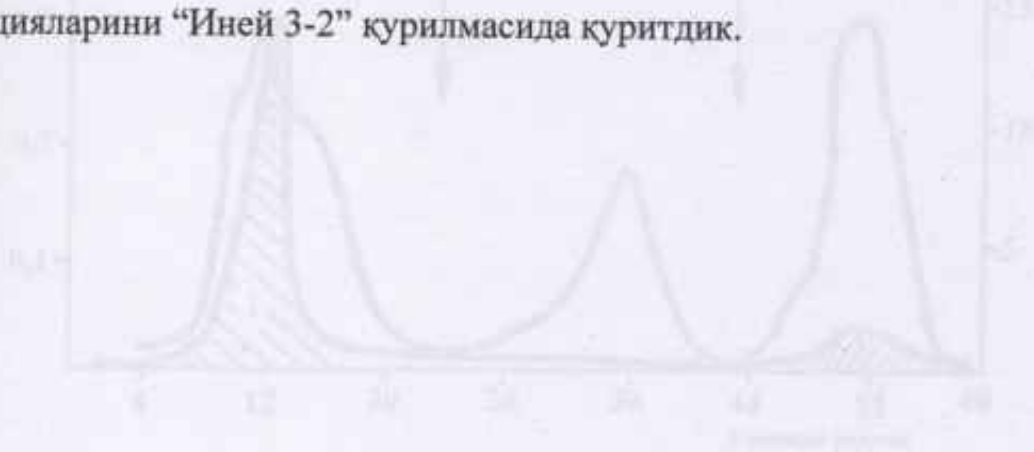
Олинган супернатан кейинги ишларимизда липаза ферментини тозалаш учун манба булиб хизмат килди ва классик биокиме услублари, яъни дастлаб, гель-филтрация усулида мицелий гомогенати таркибидаги липолитик фаол оксиллар фракцияларга ажратилди (5-расм). Колонкага солинган гомогенат оксили 0,1 М фосфат буфери ердамида коллекторда пробиркаларга 3 мл хажмда йигилди. Келтирилган расмдан куришиб турибдики, гомогенат таркибидаги барча оксиллар G-100 сефадексида гель-филтрациялаш натижасида липаза фаоллигига эга учта оксил фракцияси

мавжуд экан. Улар орасида энг юкори липаза фаоллиги буфер билан ювилган 24-28 фракцияларда мавжудлигини аниқланди. Ушбу фаол фракцияларни бирлаштириб, дастлаб КМ-целлюлозада (6-расм), сунгра эса ДЭАЭ-целлюлозада (7-расм) ионалмашиниш хроматографияси усули билан тозаладик. КМ-целлюлозада тозалашда липаза фаоллигига эга оксил фракцияси 0,02 М ли буферда элюция, яъни ювилишини аниқладик. Озрок микдордаги липаза 1 М ли буферда элюция бўлар экан.

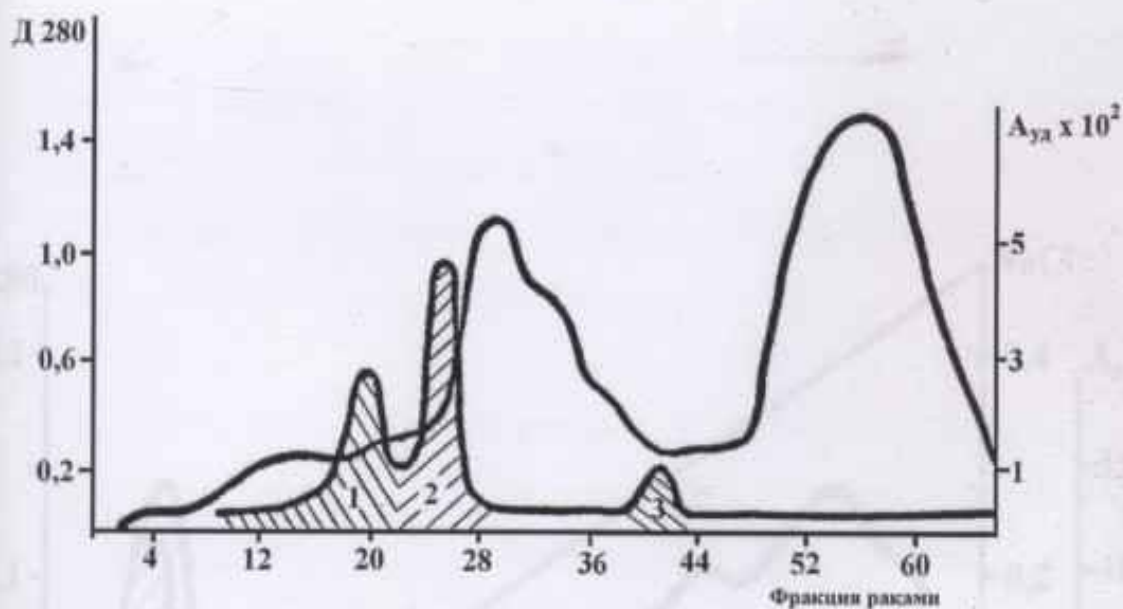
Олинган липаза фаоллигига эга фракцияни ДЭАЭ-целлюлозада тозаладик. Бунда липаза сорбентдан осонлик билан ювилиб чиқиб кетади. Балласт оксиллар эса ДЭАЭ-целлюлозада яхши адсорбцияланади ва натрий хлоридининг концентрацияси градиентида элюцияланади.

4-жадвалда мицеллий ичидаги липазани тозалаш босқичлари ва олинган натижалар умумлаштириб келтирилган.

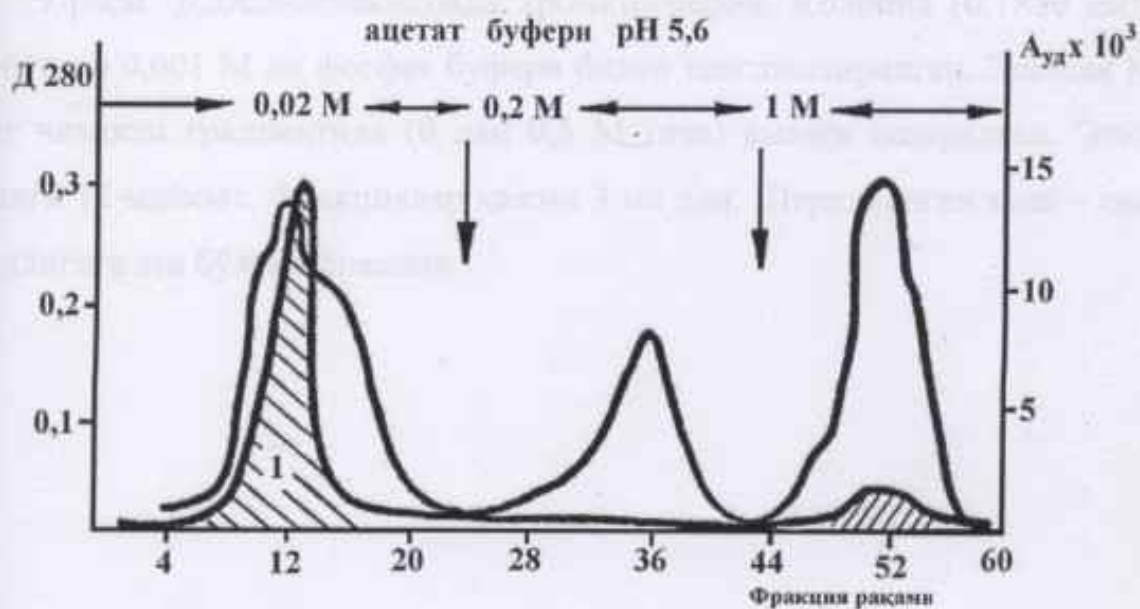
Бир гуруҳ олимларнинг таъкидлаши бўйича (Рахимов М.М., Давронов Қ.Д.) [16] тозаланган липаза барқарор бўлмай, эритмада ўз фаоллигини тезда йўқотади. Бу ҳолат липазани тозалашда унинг фаоллигини стабиллаштирувчи структура фрагментларининг бартараф этилиши билан тушунтирилиши мумкин. Юқоридагиларни назарда тутиб, тозаланган липаза фракцияларини “Иней 3-2” курилмасида курутдик.



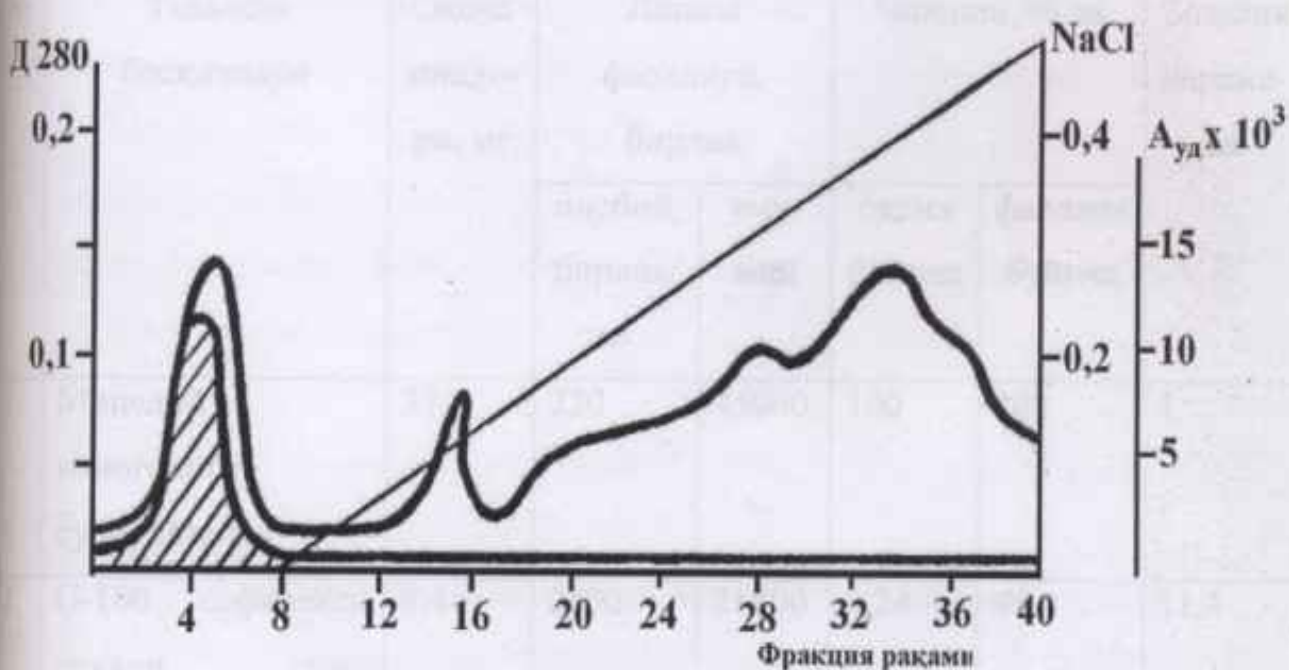
Расм 7. Сорбентсиз С-100 даги ўтказилиш тартиби 3-2 курилмасидаги КМ-целлюлозасидаги ювилмаган хроматографияси билан тозаланган липазани 0,02 М ли буферда элюция қилишдаги натижалар. Фракциялар миқдори 3 мл дан. Элюция тизими 12 мл/дан кутилган элюция — липаза фаоллигига эга бўлган фракция.



5-расм. *Oospora lactis* замбуруғи липазасини гел-хроматографияси (Сефадекс G-100, штрихланган зона – липаза фаоллигига эга фракция, колонна ўлчами –  $1,8 \times 80$  см; фракциялар миқдори – 3 мл дан, элюация тезлиги – 12 мл/соат. Элюация 0,1 М ли фосфат буфери билан амалга оширилган, рН 7,5.).



6-расм. Сефадекс G-100 дан ўтказиш орқали олинган 24-28 фракцияларнинг КМ-целлюлозадаги ион алмашиши хроматографияси. Колонна ўлчами  $1,0 \times 10$  см. рН 5,6 бўлган фосфат буферининг босқичли градиенти. Фракциялар миқдори 3 мл дан. Элюация тезлиги 12 мл/соат. Штрихланган зона – липаза фаоллигига эга бўлган фракция.



7-расм. ДЭАЭ-целлюлозада хроматография. Колонна ( $0,1 \times 10$  см) рН 7,5 бўлган 0,001 М ли фосфат буфери билан тенглаштирилган. Элюция NaClнинг чизикли градиентида (0 дан 0,5 М гача) амалга оширилган. Элюция тезлиги 12 мл/соат. Фракциялар ҳажми 3 мл дан. Штрихланган зона – липаза фаоллигига эга бўлган фракция.

*Oospora lactis* замбуруғи липазасининг фаол препаратларини ажратиш ва тозалаш боскичлари

№	Тозалаш боскичлари	Оқсил миқдори, мг	Липаза фаоллиги, бирлик		Чиқиши, % да		Тозалик даражаси
			нисбий, бирлик/мг	умумий	оқсил бўйича	фаоллик бўйича	
1.	Мицелий гомогенати супернатанти	375	220	45000	100	100	1
2.	G-100 сефадекси орқали гел-филтрация (0,1 М ли фосфат буфери, рН 7,5)	8,4	2500	21000	3,24	46	11,4
3.	КМ-целлюлозада хроматография (0,01 дан 1,0 М гача фосфатли буфер градиенти)	1,3	15000	20000	0,34	45	68,1
4.	ДЭАЭ-целлюлозада хроматография (NaCl нинг чизикли градиентида (0 дан 0,5 М гача) элюация)	0,8	18500	15000	0,21	34	85

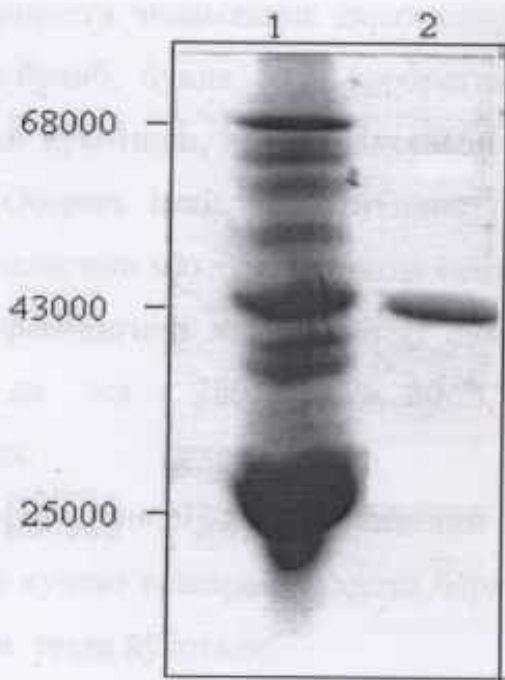
Шундай қилиб, соапстокли озука мухитида ўстирилган липолитик фаол замбуруғ ўстириш шароитлари ва соапсток миқдорига қараб, турли фаоллик ва тезликда липаза ферментини ҳосил қилар экан. Гель хроматографи усулида липолитик фаол 3-та оқсил синтезланишини, энг кейинги босқич тозалашларда мажор ва минор кичик формалардан иборат экан. Энг сўнгги тозалаш босқичи учун олинган ушбу мажор форма уз навбатида факат битта оқсил фракциясидан иборат були, юкори фаолликни курсатди. Натижада 18,500 ед/мг (оқсилга нисбатан) фаолликга эга булган ва 85 маротаба тозаланган липаза ферментининг электрофоретик гомоген формасини олдик.

Кейинги босқич тажрибаларимизни лиофилизациялаш усулида куришиб олинган ушба форма устида олиб бордик.

#### **3.4. Тозаланган *Oospora lactis* липазанинг физик-кимёвий ва каталитик хусусиятларини ўрганиш**

Юкоридаги тажрибаларимизда курсатилганидек, *Oospora lactis* замбуруғи ердамида олинган гомоген липазанинг молекуляр массаси ультрацентрифугалаш ёрдамида аникланиб, унинг огирлиги 43 кДа эканлигини курсатилди.

Бундан ташқари, ушбу тоза препаратнинг липолитик фаолликга эга булган гомоген, яъни битта оқсил чизигидан иборатлиги 7,5 %-ли ПААГ-да электрофоретик услубда ҳам тасдикланиб, унинг молекуляр массаси 42 кДа эканлигини кўрсатди (8-расм).



8-расм. *Oospora lactis* замбуруғини ажратиб олинган липазасининг электрофоретик тахлили.

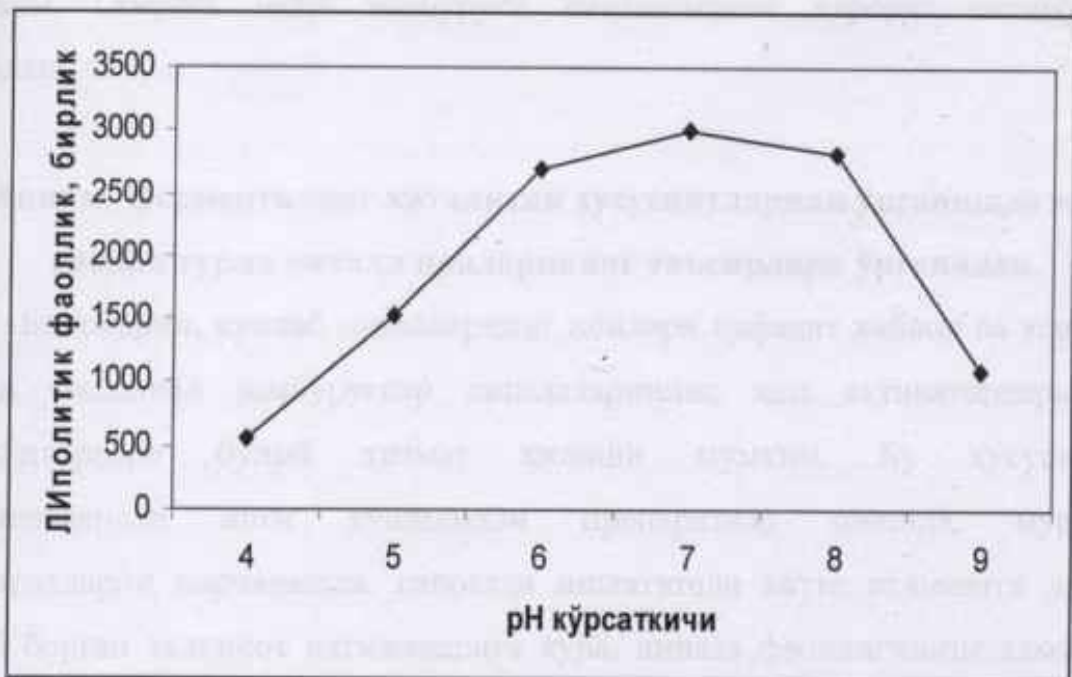
Фермент фаоллигининг реакция мухит рН даражасига боғликлигини урганиш, *Oospora lactis* замбуруғининг липазаси ўз фаоллигини нейтрал мухитларда рН-7,0 қилиб, фаолликнинг бошланиши 6,0 дан, пасайиши 8,0 курсаткичдан сунг намоён қилди. Яъни мазкур липаза нейтрал липазалар каторига киришини курсатди (9-расм.)

Маълумки, ҳароратнинг турли даражалари, айниқса юкори курсаткичлар нафакат фермент фаоллиги, балки унинг структуравий тузилишига бевосита таъсир этади. *Oospora lactis* замбуруғи мезофил микроорганизмлар гуруҳига кирганлиги сабабли, реакция тезлигига ҳароратнинг таъсирини 20 С- 60 С оралигида аниқладик. Бунда фермент фаоллиги 15 С да бошланиб, ҳароратнинг 45 °С ида энг юкори курсаткични курсатди. Яъни максимал гидролизлаш фаоллиги 35-39 °С ҳароратда кузатилди (10-расм).

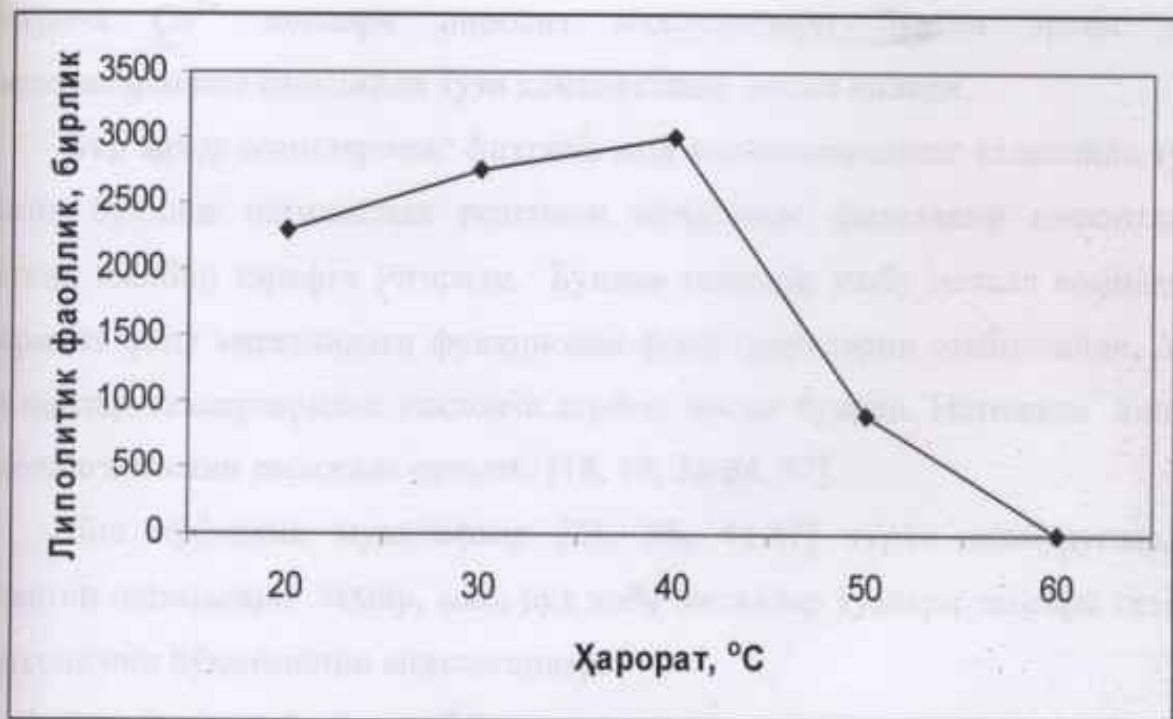
Демак *Oospora lactis* замбуруғи липазаси ҳароратга барқарорлиги бўйича ҳайвон, ўсимлик ва бактерия липазаларидан ортда қолар экан. Айнан ушбу хусусият замбуруғнинг мезофил табиатидан келиб чиқадиган ҳолати ва хусусиятига боғликлигини яна бир бор тасдиқлади.

Ферментнинг ҳароратга чидамлилиқ даражасини аниқлаш натижалари 10-расмда келтирилган бўлиб, бунда 60 °С ҳароратда 15 дақиқа ичида липаза ўз фаоллигини батамом йўқотиши, яъни инактивацияга учраши аниқланди. Таъкидлаш лозимки, *Oospora lactis* замбуруғининг липазаси ҳароратнинг пастроқ қийматида фаоллигини маълум муддатда сақлаб туради. Масалан, 50 °С ҳароратда липаза фаоллигини ярми (50 %) йўқотилиши 85 дақикани ташкил қилса, 40 °С да эса – 280 дақиқа, 30 °С да эса 6 соатда ҳам инактивацияга учрамади.

Фаоллик барқарорлиқнинг рН-га боғлиқлигини аниқлаш натижаларига қура, липаза нейтрал ва кучсиз ишқорий муҳитда барқарор бўлиб, кислотали муҳитда уз фаоллигини тезда йўқотади.



9-расм. *Oospora lactis* замбуруғи липазасининг рН оптимумини аниқлаш



10-расм. *Oospora lactis* замбуруғи липазасининг ҳарорат оптимумини аниқлаш

**Липаза ферментининг каталитик хусусиятларини ўрганишда энг аввало турли металл ионларининг таъсирлари ўрганилди.**

Биобарин, куплаб металлларнинг ионлари нафақат хайвон ва усимлик, балки мицелиал замбуруғлар липазаларининг ҳам активаторлари ҳам ингибиторлари бўлиб хизмат қилиши мумкин. Бу хусусиятлар ферментлардан янги кушилмали препаратлар олишда, мураккаб субстратларни парчалашда, саноатда ишлатишда катта аҳамиятга эгадир. Олиб борган тадқиқот натижаларига кура, липаза фаоллигининг камайиши кумуш, олтин, кўрғошин, мис ва темир тузлари мавжудлигида кузатилган [60, 62]. Адабиетлар маълумотларига кура кийин узлаштирилувчи ва токсик хусусиятга эга булган оғир металллар тузларининг *Aspergillus awamori* липазаси фаоллигини ингибирлаш даражалари қуйидаги камайиб боровчи каторда жойлаштирилган., яъни:

Zn, Hg, Pb, Cu, Sn, Fe<sup>2+</sup>, Co, Al [43, 48, 49, 50].

Аксинча, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> Mn<sup>2+</sup> тузларининг ионлари замбуруғлар липазасига фаоллаштирувчи таъсир этади. [32, 33, 38]. Муаллифларнинг

фикрича  $\text{Ca}^{2+}$  ионлари липолиз маҳсулотлари бўлган эркин мой кислоталарининг кальцийли тузи комплексини ҳосил қилади.

Бир қатор олимларнинг фикрича мой кислоталарининг кальцийли тузи ҳосил бўлиши натижасида реакция муҳитнинг физикавий шароитлари кескин ижлбий тарафга ўзгаради. Бундан ташқари ушбу металл комплекси фермент фаол марказидаги функционал фаол гуруҳларни стабиллайди, сув ва ионлар таъсирларидан сакловчи агрегат ҳосил булади. Натижада липаза фаоллиги кескин даражада ортади. [18, 19, 22-24, 57].

Яна кўпчилик муаллифлар [21, 36, 44-47] турли замбуруғлардан олинган липазалари темир, мис, рух каби металллар тузлари таъсири остида фаоллигини йўқотишини аниқлаганлар.

Биз *Oospora lactis* замбуруғи липазасининг турли металл ионлари таъсирида фаоллигининг ўзгаришини ўргандик ва олинган ушбу натижалар 5-жадвалда келтирилган.

5-жадвалда келтирилган маълумотлардан кўришиб турибдики, *Oospora lactis* замбуруғи липазаси фаоллиги металл ионларига бевосита боғлиқ бўлган фермент экан. Масалан,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$  каби тузларнинг таъсирида липаза фаоллигининг камайиши кузатилди. Бу ҳолат фермент молекуласидаги реакция гуруҳлар жойлашуви ва уларга нисбатан туз-оқсил молекуласига электростатик таъсири унинг каталитик фаол маркази конформациясининг бузилиши билан тушунтирилади.

Утказилган тажрибалар асосида металл-ингибиторлар ёки металл-активаторларни реакция муҳитга киритиш нафақат концентрациялари, балки уларни кушиш ва реакция жараеннининг кечиш вақти ҳам муҳим аҳамиятга эгаллиги аниқланди. Масалан,  $\text{CaCl}_2$  ва  $\text{MgCl}_2$  тузларининг активаторлик таъсири реакция муҳитга реакция бошлангандан сўнг 30 дақиқадан сўнг киритилганда кузатилади.  $\text{CuCl}_2$  ва  $\text{CoCl}_2$  тузларини эса реакция бошлангандан сўнг киритилганда липаза фаоллигини ингибрлайди.

Металларни аниқловчи реагентлар - II-хлормеркурибензоат, ЭДТА ва  $\text{NaCl}$  липолитик фаолликка таъсир қилмаслиги, кучли диссоцирловчи агент-

мочевинанинг концентрацияси 6 М бўлганда эса липолитик фаоллик камайиши аниқланди.

5-жадвал

**Турли бирикмаларнинг *Oospora lactis* замбуруғи липазасига таъсири**

Бирикмалар	Фаоллик, % да <sup>1</sup>		
	$1 \times 10^{-5}$ М	$1 \times 10^{-4}$ М	$1 \times 10^{-3}$ М
II-хлормеркурибензоат	97	95	95
ЭДТА	98	97	95
NaCl	107	110	110
AgNO <sub>3</sub>	85	78	57
CaCl <sub>2</sub>	109	112	112
MgCl <sub>2</sub>	107	105	103
ZnCl <sub>2</sub>	29	17	5
CdCl <sub>2</sub>	27	15	7
CoCl <sub>2</sub>	57	59	45
FeSO <sub>4</sub>	90	68	52
Мочевина 1 М	110	110	
2 М	130	130	
3 М	117	117	
6 М	69	69	

**Назорат сифатида бирламчи 100 % ли фаоллик қабул қилинган**

Юкорида курсатилган хусусиятлар, айниқса ингибитор ва активатор сифатида таъсир киладиган тузлар, ҳамда мочевинанинг маълум даражада фаолликни ошириши уни инсон организмда куллаш ва стабиллаш учун асос яратади.

Ўт кислоталари тузларининг *Oospora lactis* замбуруғи липазасига таъсири

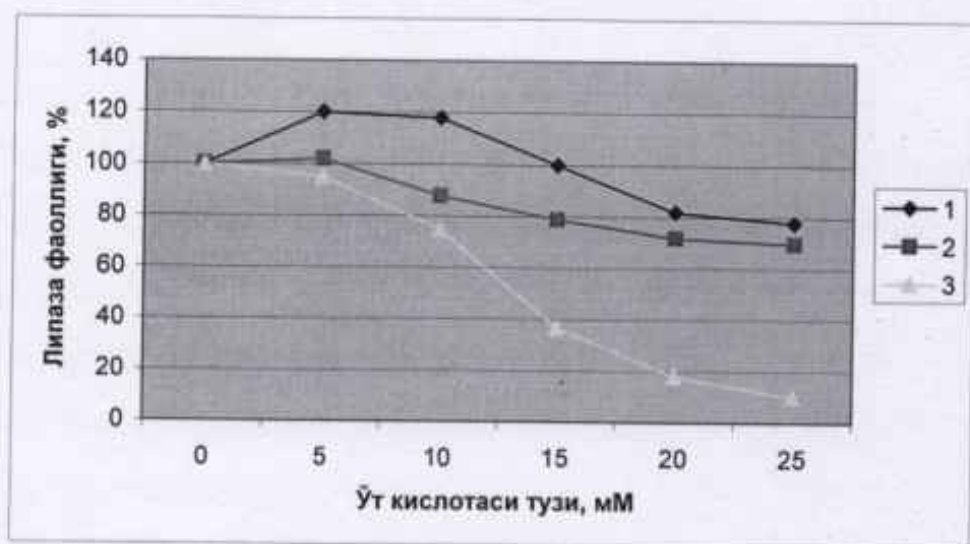
Ошқозон ости беши ферментлари, яъни протеаза, амилаза, липаза

фаолликларига улар билан бирга ажралиб чиқадиган ут кислоталари,

ошқозоннинг кислоталик даражаси, истеъмол қилинган овқатларнинг

турларига, таркибларига узвий богликдир. Липаза ферменти иштирокисиз ҳам ут кислоталари тузлари мойларни парчалаш хусусиятига эгаллиги маълум бўлиб, ушбу жараённинг таъсир механизмини тушунтирувчи кўплаб гипотезалар маълум. Улар орасидаги асосий гипотеза Боргштрем томонидан эълон қилинган бўлиб, у ўт кислоталарининг тузлари гидролиз маҳсулотлари бўлган мой кислоталри ва моноглицеридлар билан аралаш мицеллаларни ҳосил қилишини аниқлаган [7, 10]. Ўз навбатида ўт кислоталарининг тузлари кучсиз кислотали муҳитда фаолроқ эканлиги аниқланган. Чунки кучсиз кислотали муҳитда мой кислоталари диссоциацияланмаган ҳолатда ва шаклда бўладилар.

Қуйидаги расмда ўт кислотаси айрим тузларининг триолеин субстратини гидролизлаш тезлиги келтирилган.



11-расм. Ўт кислотаси тузларининг оливка мойини липаза билан гидролизланиши (липолиз шароитлари: рН 7,8 бўлган фосфат буфери, 37°C):

1 – таурохолат; 2 – холат; 3 – дезоксихолат

Расмдан кўриниб турибдики, ўт кислотаси тузларининг оптимал фаоллаштириш ёки ингибirlаш концентрацияси турлича экан. Масалан, таурохолат кислотаси учун 5-10 мМ микдор фаолликни 20 % оширса, холат ва дезоксихолат кислотаси 5 мМ учун сезилмайди, 10 мМ ва ундан ортик микдорда фаолликни ингибirlаш хусусиятини курсатди. Дезоксихолат кислотасининг ингибirlаш хусусияти холат ва таурохолат кислотасининг



## Хулосалар

1. Арзон ва кулай, ҳамда носиб объект-микроорганизмлар, яъни замбуруғлардан липаза ферментини олишнинг арзон ва кулай объекти аникланди, ҳамда озуқа муҳити таркибига киритилган соапстокда ўстириш динамикасини аниклаш орқали фаол липаза суюқлиги олинди. Бунда ўстиришнинг 32 соатида культурал суюқликдаги липаза фаоллиги 1,7 бирлик/мл га тенг бўлиши аникланди.

2. *Oospora lactis* замбуруғи липазасини хужайра мицелийсидан ажратиб, тозалаб олишнинг янги усули яратилди. Соапстокли муҳитда 3-та липаза ферменти молекуляр формаси мавжудлиги аникланиб, энг юкори фаоллик ва оксил таркибига эга 2-формадан классик услублар (гельфилтрация, ион-алмашинув хроматографияси, ва электорофоретик ердамида фаол липаза ферменти ажратиб олинди, ажратиб олинган липазанин молекуляр массаси 42 кДа эканлиги аникланди.

3. Тоза фермент препаратининг рН, харорат –оптимуми ва стабиллиги, аникланиб, олинган липаза нейтрал гуруҳга киради. Хароратнинг 40 ва ундан ортиши батамом фермент фаоллигини пасайтиради, еки йукотади.

4. *Oospora lactis* замбуруғи липазаси металл ионалрига богликлиги, жумладан  $ZnCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $CdCl_2$   $CoCl_2$  каби тузлар таъсирида унинг фаоллиги пасайиши (инактивацияга учраши),  $CaCl_2$  ва  $MgCl_2$  тузлари эса, аксинча активатор вазифасини бажариб, уларнинг активаторлик таъсири реакцион муҳитга реакция бошланишининг сўнг 30 дақиқасидан сўнг киритилганда юкори курсаткичга эга булиши аникланди.

5. Ут кислоталарининг (5,0-25 мМ) баъзи тузлари липаза фаоллигига таъсири турлича булиб, таурхолатнинг натрийли тузи фермент фаоллигини 20 % ортдириши, холат тузи 5 мМ стабил, ундан ортик концентрацияларда ингибирлаш, дезоксихолат эса умуман фаолликни инактивацияга учратиши аникланди.

### Фойдаланилган адабиётлар рўйхати

1. Ахмедова З.Р., Давранов К.Д. Субъединичная структура ингибитора липазы гриба *Rhizopus microsporus*. – Химия природных соединений, 1983, № 5.
2. Ахмедова З.Р. Природный ингибитор липазы гриба *Rhizopus microsporus*. // Автореф. дис. канд. биол. наук. Институт Биохимии АН УзССР, 1984. – С.19.
3. Ахмедова З.Р., Давранов К.Д. К методу фракционирования липазы из гриба *Rhizopus microsporus* / Узбекский биологический журнал, Ташкент, 1981, №3. – С. 8-10.
4. Арендс И.М. Биосинтез липолитических ферментов культурой *Aspergillus awamori*. // Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: МТИП, 1972. – С.21.
5. Башкатова Н.А. Липазы некоторых грамотрицательных бактерий. // Автореф. дис. канд. биол. наук. Институт Микробиологии АН СССР, 1980. – С.23.
6. Безбородов А.М., Астапович Н.И. Секреция ферментов у микроорганизмов. – М.: Наука, 1984. – С.71.
7. Безбородов А.М., Смирнова Л.М., Великанова Т.С., Биосинтез липазы *Actinomyces aurefaciens*. // Микробиологическая промышленность, 1970. – С.45-50.
8. Безбородов А.М. Биосинтез микроорганизмами ингибиторов белковой природы. // Прикладная биохимия и микробиология, 1978, т.14, № 1. – С. 5-9.
9. Беккер З.Э. Физиология грибов и их практическое использование. – М.: МГУ, 1963. – 239 с.
10. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. – М.: Мир, 1978. – 398 с.
11. Билай Т.И. Термофильные грибы и их ферментативные свойства. – Киев: Наукова Думка, 1985. – 171 с.

12. Давронов К.Д. Липазы грибов *Rhizopus microsporus* и *Oospora lactis*. Биологические аспекты. // Автореф.дис.док.биолог.наук. Ташкент, Институт Биохимии АН УзССР, 1984. – 378 с.
13. Давронов К.Д. Седьмой Всесоюзный симпозиум «Инженерная энзимология», МГУ, 1991. – С.10-15.
14. Давранов К.Д. О липазе гриба *Oospora lactis*, УзЛТ-2. – В кн. Тезисы докладов II Всесоюзного совещания по ферментам микроорганизмов. – Минск: 1978, часть 2. – С. 174.
15. Давранов К., Дияров Ж., Ризаева М. Изучение внеклеточных липаз гриба *Rhizopus microsporus*, УзЛТ-1. // Прикладная биохимия и микробиология, 1978, т.14, в.3. – С. 389-397.
16. Давранов К.Д., Рахимов М.М. Природа множественности форм липазы гриба *Rhizopus microsporus*. / Тезисы докл. И сообщений международного симпозиума ФЕМО. Рёгуляция микробного метаболизма факторами внешней среды. Пущино, 1983. – С. 134.
17. Ёгоров Н.С. Практикум по микробиологии. М.: Изд-во МГУ. 186 с.
18. Ефимова Т.П., Саати Л.Д., Аравина Л.А. Некоторые особенности биосинтеза экзоферментов микроорганизмами. Химии. Технология производства и медикобиологические исследования ферментных препаратов медицинского назначения. Ленинград: 1983. – С.17-24.
19. Звягинцева И.С., Мелиховский В.А. Липолитическая активность микроорганизмов из восковых налетов растений. // Микробиология, 1982. – Т.51, № 5. – С. 756-760.
20. Карасевич Ю.Н. Экспериментальная адаптация микроорганизмов. – М.: МГУ, 1975.
21. Ксандуполо Г.Б., Рубан Е.Л. Некоторые свойства липазы *Geotrichum asteroids*. Изд-во АН СССР, сер.биолог., 1979, № 2. – С.307-310.
22. Лобырева Л.Б., Марченкова А.И. Выделение и некоторые свойства липаз *Penicillium roqueforty*. // Микробиология, 1980. Т.49, № 6. – С. 924-930.

23. Марченкова А.И. Липазы *Penicillium roqueforty* 141, расщепляющие твердые жиры. // Автореф. дис. канд. биолог. наук. М.: 1980. – С.24.
24. Мухамеджанова Т.Г. Разработка условий биосинтеза липазы грибом *Rhizopus oryzae* 1414. // Автореф. дис. канд. биолог. наук. М., 1981. – С.23.
25. Польшалина Г.В., Чердниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 375 с.
26. Рахимов М.М. Изучение липолитических ферментов и некоторых закономерностей гетерогенного ферментативного катализа. // Автореф. дис. док. биолог. наук. Ташкент, 1981. – С.41.
27. Рахимов М.М., Джанбаев Н.Р. Роль гидрофобных взаимодействий в проявлении каталитической активности липолитических ферментов. – Биохимия, 1977. – Т.42. И.6. – С. 737-742.
28. Рахимов М.М., Джанбаев Н.Р. Липолитические ферменты. – Успехи современной биологии, 1977, Т.38, в.3, № 6. – С. 323-336.
29. Рахимов М.М., Латышев Н.А., Имбс А.Б., Касьянов С.П. Способ получения сорбента для иммобилизации липолитических ферментов // А.с. №1510859 от 1989 г.
30. Рахимов М.М., Хасанов Х.Т., Якубов И.Т., Латышев Н.А., Акулин В.Н., Эпштейн Л.М., Касьянов С.П. Способ получения сорбента для иммобилизации липолитических ферментов. Авторское свидетельство: N 1510859; 1989.
31. Рахимов М.М., Хасанов Х.Т., Якубов И.Т., Эпштейн Л.М., Акулин В.Н., Латышев В.Н., Давранов К., Касьянов С.П. Исследование различных липаз для получения продуктов, обогащенных полиеновыми кислотами при гидролизе рыбьих жиров // Прикладн. биохим. и микробиология. 1991. Т. 27, № 4. С. 554-557.
32. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы. – М.: Наука, 1977. – 216 с.

33. Рубан Е.Л., Ксандопуло Г.Б., Мурзина Л.П. Условия биосинтеза экзOLIПАЗЫ грибом *Oospora fragrans*. – Прикладная биохимия и микробиология, 1978, т.47, в.6. – С. 849-857.
34. Северина Л.О., Башкатова Н.А. Липазы грамотрицательных бактерий. // Прикладная биохимия и микробиология, 1981, №2, Т.17. – С. 181-196.
35. Штеин И.В., Арендс И.М., Горенкова Е.В., Дорохов В.В. Биосинтез бактериальной щелочной липазы. // Тезисы докл. IV Всесоюзной конференции, Ташкент, 1989. – С. 282-293.
36. Якубов И.Т., Латышев Н.А., Касьянов С.П. Ферментативный гидролиз рыбьего жира микробными липазами. // Тез.докл. IV Всесоюзной конференции, Ташкент, 1989. – С. 171-172.
37. Alford J.A., Elliot L.E., Horsten J., Crowe P.F. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. 2. Fatty acids released as determined by gas chromatography // J. Food Sci. – 1961. V.26. №3. – P. 234-238.
38. Akio Sugihara, Yuji Shimada and Yoshio Tominaga. Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. // J. Biochemist., - 1990. № 7. – P. 426-430.
39. Alhir S., Markakis P., and Chandan R.C. Lipase of *Penicillium caseicolum* // J. Agric. Food Chem. – 1990. N 38. – P. 598-601.
40. Bcel E., Hüge-Jensen B., Chistensen M., Thim L., Fill N. Rhizomucor miehel triglyceride lipase is synthesized as a precursor // Lipids – 1988. – V. 23, N7. – P.701-706.
41. Borgsrom B., Brockham H.L. Amsterdam: Elsevier. – 1984. P. 525.
42. Baillargeon M.W., Bistline R.G., Sonnet P.E. Polyethylene glycol modification of *Candida rugosa* lipase // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1989. – N 30. – P.92-96.

43. Cristen G.L., Ren T.J., Frank J.F. Characterization of lipase *Pseudomonas fluorescens* 27 based on fatty acid profiles. // *J. Dairy Sci.*, 1988. V. 71. – N 6. – P.1432-1438.
44. Chander H., Klostermeyer H. Production on lipase by *Penicillium funiculosum* under various growth conditions. // *Arch.Lebensmittelhud.*, 1982. – V 33. N 2. – P. 42-44.
45. Chopra A.K., Chander H., Singh L. Lipolytic activity of *Syncephalastrum rasemosum*. // *J. Dairy Sci.*, 1982. V 65, N10. – P. 1890-1894.
46. Desnuelle P., Savary P.P. La lipase paboreactigue de poro: isolation and properties. // *J. Lipid Res.* – 1963. V 4. P.369.
47. Engham E., Holland K.T., Gowland G., Cunliffe W.S. Purification and characterization lipases from propionobacterianes. // *J. Gen.Microbiol.* – 1981. – V. 124. N 2. – P. 393-410.
48. Espinosa E., Sanchez S., Poch M. Lipase production by *Rhizopus delemar*: fermentation behavior. // *J. Biotechnol. Lett.*, 1990. – V.10. – P. 741-744.
49. Fassatiova O. *Progress in Industrial Microbiology.* / Elsevier. – 1986. – N 2. – P. 19-32.
50. Florin M., Stotz E.H. eds., *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 12, Elsevier, Amsterdam, 1965.
51. Fisher K., Messner K. *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*, Kinghorn, J.R. and urney G., eds., Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK. – 1990. – P. 75-81.
52. Fryer T.F., Reiter B., Lawrence E.C. Lipolytic activity of lactis acide bacteria. // *J. Dairy Sci.* – 1967. – V 50, N.3. – P.388-389.
53. Helena Sztajer, Heinrich Lundorf, Helmut Erdham, Ulrich Menge and Rolf Schmid. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissium*. // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1992. V. 1124. – P.253-261.

54. Isobe K., Akiba T., Yamaguchi S. Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. // *Agric. Biol. Chem.* – 1988. N 52. – P. 41-47.
55. Isobe K., Nokihara K., Yamaguchi S., Mase T., Schmid Rolf. D. Crystallization and characterization of monoacylglycerol and diacylglycerol lipase from *Penicillium camamberti*. // *J. Biochem.* – 1992. – P. 233-237.
56. Maliszewska I., Mastalerz Pr. Production and some properties of lipase from *Penicillium citricum*. // *Enzyme Microb. Technol.* – 1992. V 14. – P. 342.
57. Okumura S., Iwai M., Tsujisaka Y. Purification and properties of partial glyceride hydrolase of *Penicillium cyclopium* M.1. // *J. Biochem.* – 1980. – N 7. – P.205-211.
58. Ota Y., Yamada K. Lipase from *C. parapolitytica* Part-III. Further studies on the activation of the enzyme system with bile-ore calcium salts. // *Agr. Biol.Chem.* – 1967. – V 31. B. 7. – P. 809-815.
59. Somkuti G.A., Babel F.J, Lipase activity of *Mucor pusillus*. // *Appl. Microbial.* – 1968. – V 16., N 4. – P. 617-619.
60. Sztajer H., H., Malizewska I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. // *Biotechnol.*, - 1989. V. 11. – P. 895-898.
61. Sugihara A., Shimada Y., Tominaga Y., Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. // *J. Biochem.* – 1990. – V. 107, B. 3. – P. 426-430.
62. Wang D.I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill, Humphrey A.E., Lilly M.D. Fermentation and enzymes technology. // New York – 1977. – P. 173.