

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ СОҒЛИҚНИ САҚЛАШ ВАЗИРЛИГИ

Тошкент Фармацевтика Инститuti

Қўлёзма ҳуқуқида

Усарова Дилдора Курбановна



**Карамдан олинган фосфолипаза Д нинг барқарорлигини  
ошириш.**

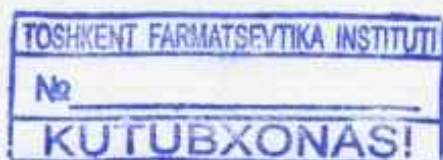
Хитисослик: 5A522902 Иммунобиологик ва микробиологик препаратлар  
технологияси мутахассислиги

Магистрлик даражасини олиш учун

## ДИССЕРТАЦИЯ

Илмий раҳбар: т.ф.д. ,проф. М. Худойбердиев

Оппонент: катта илмий ходим, т.ф.н. Г. Сотимов



ТОШКЕНТ-2012

“ТАСДИҚЛАЙМАН”

Кафедра мудир

“ — ” — 2012 й

МАГИСТРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИНИ ЁЗИШ  
БЎЙИЧА ТОПШИРИҚЛАР

Тошкент Фармацевтика институти ректорининг 2011 й “19” февраль 22-сон буйруғи билан тасдиқланган

Биотехнология кафедраси бўйича  
Боралдин олимтай фурсолимова Янниқ Бартарович

магистрлик диссертациясининг номи  
“Ички регуляция”

мавзудаги магистрлик диссертацияси

Илмий раҳбар Т.ф.д. проф. М. Қудайбергидев бошчилигид

Илмий раҳбарнинг исми-фамилияси, лавозими, илмий даражаси ва илмий унвони)  
Усарова Анжора Бурбақовна томонидан

(тингловчининг исми-фамилияси)  
туғалланган ҳолда 2012 й “14” июни

да Биотехнология кафедрасига дастлабки ҳимоя учун тақдим этилади.

Тадиқот ишида Мобиле риг қон тизими манбақлардан  
интернет ресурслари, асбоб ускуналар: РН-исеар,  
интерфас, микрометр, микрометр, микрометр  
электрооқиметр, фойдаланила

ди Фармацевтика соҳаси, тиббиёт соҳаси бўйича чоп этилган адабиётлардан, замонавий усул ва услублардан ва ҳ.к.)

Ишда Ферментларни тек бар ривожини  
Боралдин олимтай фурсолимова Янниқ  
Бартарович берилиши

кўзда тутилади  
Ишда қуйидаги масалалар баён этилади:

Адабийналар шарти

(НОМИ)

Ташрибе висеи

(НОМИ)

Минибиланнаи ва зикри фазолини зе

А фармоишарини кассаарини таъноси

(сана, ой, йил)

Илмий  
сахбар м.ф.з. крор М. Қудойбердиев

(исми, фамилияси, илмий даражаси ва унвони)

Магистрант 2011й "19" февралда топшириқни қабул қилди

## Мундарижа:

Кариш	3
1-боб. Адабиётлар шархи.	8
Фосфолипазалар характеристикаси	25
1. Фосфолипидлар гидролизини катализлаиди;	26
Фосфолипаза Д нинг характеристикаси	27
Фосфолипаза Д нинг баъзи хоссалари	28
Фосфолипаза Д нинг турли формалари хоссалари.	36
2-Боб. Тажриба қисми	37
2.1 Тайёр маҳсулот таснифи	41
2.2 Фосфолипаза Д фаоллигини ўлчаш	43
3-боб Иммобилланган ва эркин <sup>1</sup> фосфолипаза Д формаларининг хоссаларини таққослаш.	68
Хулоса	72
Адабиётлар рўйхати	75

## Кириш

Мавзунинг долзарблиги. Ферментлар мухандислиги ген мухандислиги ва хужайра мухандислиги билан бир қаторда замонавий биотехнологиянинг тез ривожланаётган истиқболли йўналишларидан бири ҳисобланади. Биотехнологияда ферментларнинг қўлланилиши ва уларнинг фаоллиги ва турғунлиги билан боғлиқ. Биологик катализаторлар ҳисобланувчи ферментлар иккинчи ноёб хусусиятга эга бўлиб, улар ферментларнинг каталитик реакцияларга кимёвий аналогларига нисбатан юзлаб марта ортиқ самарали бериши ва нихоятда юқори селективлигидир. Ферментларнинг бу хусусияти хом ашёлардан керакли маҳсулотни олишда уларга қўшимча ишлов бермасдан олиш имкониятини беради. Яъни маҳсулот олиш технологияси сезиларли содалашади. Бу жараёнларнинг яна бир ижобий жиҳати шундаки, унда хом ашёнинг бошқа компонентлари мутлақо ўзгаришсиз қоллади. Бу эса ўз навбатида реакцион муҳитдан керакли маҳсулотни ажратиш жараёнини енгиллаштиради.

Аммо деярли барча ферментлар ташқи таъсир натижасида ўз ижобий хусусиятини тезда йўқотувчан бўлиб, уларнинг турғунлиги нихоятда паст даражада. Технологик жараёнларда улардан самарали фойдаланиш учун ферментларнинг барқарорлигини ошириш зарур.

Илмий тадқиқотларда, фармацевтика ва озиқ-овқат саноатида ва табиётда кенг қўлланилиши мумкин бўлган липолитик ферментлардан бири, бу фосфолипаза Д бўлиб, уни табиий хом ашёлардан ажратиш ва барқарорлаштириш усулини ишлаб чиқиш муҳим ҳисобланади.

Тадқиқот мақсади. Карамдан фосфолипаза Д ферментини ажратиш технологиясини ва олинган ферментни барқарорлаштириш усулини ишлаб чиқиш ҳисобланади.

Илмий янгилиги. Биринчи марта қсимлик хом ашёларидан (карамдан) фосфолипаза Д ферментини ажратиш ва уни силикагельга иммобиллаш билан барқарорлаштириш усули ишлаб чиқилди.

### Амалий аҳамияти. Барқарорлаштирилган фосфолипаза Д ферменти

қатор технологик жараёнларда, шу жумладан гидролитик, турли гуруҳларнинг синтези ва бошқа қатор жараёнларда қўлланилиши мумкин.

Мавзунинг долзарблиги. Ферментлар муҳандислиги ген муҳандислиги ва тузайра муҳандислиги билан бир қаторда замонавий биотехнологиянинг тез ривожланаётган истиқболли йўналишларидан бири ҳисобланади. Биотехнологияда ферментларнинг қўлланилиши ва уларнинг фаоллиги ва турғунлиги билан боғлиқ. Биологик катализаторлар ҳисобланувчи ферментларнинг янги ноёб хусусиятга эга бўлиб, улар ферментларнинг каталитик реакцияларга кимёвий аналогларига нисбатан юзлаб марта ортиқ тезлик билан ишлайди ва нихоятда юқори селективлигидир. Ферментларнинг бу кейинги хусусияти ҳам ашёлардан керакли маҳсулотни олишда уларга қўшимча ишлов бермасдан олиш имкониятини беради. Яъни маҳсулот олиш технологияси янги усулларли содалашади. Бу жараёнларнинг яна бир ижобий томони шундаки, уларда ҳам ашёнинг бошқа компонентлари мутлақо ўзгаришсиз қолади. Бу эса ўз навбатида реакцион муҳитдан керакли маҳсулотни ажратиш жараёнини осонлаштиради.

Аммо деярли барча ферментлар ташқи таъсир натижасида ўз ижобий хусусиятини тезда йўқотувчан бўлиб, уларнинг турғунлиги нихоятда паст даражада. Технологик жараёнларда улардан самарали фойдаланиш учун ферментларнинг барқарорлигини ошириш зарур.

Илмий тадқиқотларда, фармацевтика ва озиқ-овқат саноатида ва табиётда кенг қўлланилиши мумкин бўлган липолитик ферментлардан бири, бу фосфолипаза Д бўлиб, уни табиий ҳам ашёлардан ажратиш ва барқарорлаштириш усулини ишлаб чиқиш муҳим ҳисобланади.

Тадқиқот мақсади. Карамдан фосфолипаза Д ферментини ажратиш технологиясини ва олинган ферментни барқарорлаштириш усулини ишлаб чиқиш ҳисобланади.

Илмий янгилиги. Биринчи марта ўсимлик хом ашёларидан (карамдан)

фосфолипаза D ферментини ажратиш ва уни силикагельга иммобиллаш билан барқарорлаштириш усули ишлаб чиқилди.

Амалий ахамияти. Барқарорлаштирилган фосфолипаза D ферменти бир қатор технологик жараёнларда, шу жумладан гидролитик, турли гуруҳ ферментларнинг синтези ва бошқа қатор жараёнларда қўлланилиши мумкин.

Биологик катализаторлар ҳисобланувчи ферментларнинг асосий хоссиётлари, уларнинг юқори фаоллиги ва мутлақо селективлигидир. Улар организмда барча кимёвий реакцияларда қатнашади.

Ферментларнинг юқори каталитик хоссаларидан турли технологик жараёнларда ҳам қўлланиб келинмоқда. Маълум сабабларга кўра ферментларни амалиётда қўллаш чекланган. Бу чекланишлар кўплаб омиллар билан боғлиқ бўлиб, уларнинг асосийлари деб қуйидагиларни ҳисоблаш мумкин:

1. Реакция муҳитидан ферментларни ажратиш имкони йўқ;

2. Ферментларнинг турли ташқи таъсирга, шу жумладан ҳароратга чидамсизлиги;

3. Турли усулларда олинган ферментларнинг тозалаш технологиясининг кўп басқичли ва мураккаблиги.

Бу чекланишларни бартараф қилишнинг энг самарали усулларидадан бири ферментларни иммобиллаш ҳисобланади. Иммобилланган ферментлар ферментларнинг асосий ижобий хоссаларини сақлаган ҳолда гетероген катализаторлар афзалликларига ҳам эга бўлади.

Иммобилланган ферментларни технологик жараёнлардан сўнг оддий филтрлар ёрдамида реакция аралашмасидан (реакцион муҳитдан) ва субстратдан ажратиш мумкин.

Иммобилланган ферментлар оддий ферментларга нисбатан турли ташқи таъсирларига, шу жумладан температурага нисбатан юқори чидамликга эга. Бундай ферментлар ўз фаоллигини узоқ вақт сақлаб олади ва уларни жараёнда

марталаб қўллаш мумкин. Шу билан бирга таъкидлаш лозимки, иммобилланган ферментларнинг абсалют фаоллиги эркин фермент фаоллигидан нисбатан пастроқ бўлади. Яъни иммобиллаш жараёни ферментнинг фаоллигини қисман пасайтиради.

Ферментларни кимёвий иммобиллаш жараёнида уларни хроматографик усулда ажратиш ва тозалаш мумкин.

Гидролазалар гуруҳига кирувчи протеолитик фермент – пепсин фармацевтика озиқ-овқат саноатида кенг қўлланилади. Бу ферментни мезон ости безининг шиллиқ қаватидан олиш ва унинг барқарорлигини кимёвий иммобиллаш орқали ошириш технологиясини ишлаб чиқиш муҳим бўлиб, у бизнинг диссертация ишимизнинг асосий мақсади қилиб олинди.

Диссертация ишимизда биринчи марта биоспецифик хроматография усулини қўллаган ҳолда пепсиннинг иммобилланган шаклини олиш учун олиб берилган тажрибалар натижалари келтирилган.

Липидлар биотрансформацияси – ҳозирги замон биотехнологиясининг тез ўзгариш билан ривожланаётган соҳаларидан биридир. Ҳозиргача липидлар фақат табиий йўллар – ўсимлик, хайвон ва микроорганизмлардан олиниб келинмоқда. Ҳар хил корхоналар бу усуллар билан танланиб ёғлар, суюқ майлар ҳамда баъзи шифобахш липид ва фосфалипидларни ишлаб чиқармоқдалар. Лекин ноёб липидларни бу усуллар билан кўп миқдорда ажратиш қийин. Баъзан эса умуман ажратиш имкони йўқ. Шунинг учун ҳам ҳозирги пайтда липидларни биотехнологик йўл билан микроорганизм ва ферментлар ёрдамида ажратиш олиш йўлларни қидирилмоқда. Буинг муҳим вақти шундаки, ноёб липидларни арзон кўп топиладиган липидлардан олиш имконияти туғилади.

Бундай биотрансформацияни амалга оширишда липолитик ферментлар муҳим рол тутади. Охириги изланишлар шуни кўрсатадики, липаза ва фосфалипазалар фақатгина гидролитик хоссага эга эмас экан. Улар яна эстеридлар синтезида, липидларни ациллашда ва алкиллашда, трансалкиллаш

трансациллаш, этерификация ва транстерификация реакцияларини ҳам катализлар экан. [1]

Бу планда фосфалипизалар ҳақида кўпгина маълумотлар тўпланган. Ферментнинг ичида бизни кўпроқ фосфалипаза Д (кўпчилик ФпД) ферменти қизиқтиради. Бу ферментнинг трансферазалик хоссалари кўпдан бери маълум. Бу хоссага биотехнологик назардан жуда катта қизиқтириш билан қоралади. Чунки бу хосса билан тиббиёт, фармацевтика, илмий соҳалар, қолаверса озиқ-овқат учун ҳар хил ноёб, доривор моддалар олиш имкони тузилади.

Ушбу Магистрлик диссертациямизда қарам баргидан фосфолипаза Д экстракцияси ҳамда унинг олиш технологик схемаси кўрсатилди. Ферментнинг олиш ҳолини ажралиб чиқиши бўйича аниқланди.

## 1-боб. Адабиётлар шархи.

1.1. Ҷисмлик хом ашёсини экстракцияси.

Экстракциялаш мураккаб физик-кимёвий жараён бўлиб, эриш, диффузия, осмос, диализ, масса алмашиниш каби ходисалар юз беради. Буларнинг механизмини битта назария билан тушунтириши қийин. Бу соҳани назарий жihatдан бойитишда И.А.Муравьев, В.Д.Пономарёв, Ю.Г.Писоков каби атоқлиқлар ўз хоссаларини қўшганлар. Экстракциялашни назарий жihatдан кўришда молекуляр ва конвектив диффузия ҳамда масса алмашиниш жараёнлари асосий омиллар ҳисобланади.

Молекуляр диффузия

Бу молекулаларнинг тартибсиз жарохати натижасида бир-бирининг ичига таъминловчи жараёндир. Диффузиянинг тезлиги молекулаларнинг кинетик энергиясига боғлиқ. Диффузион жараёнининг харакатлантирувчи кучи бир-бирига тегиб турган қатламлардаги эриган моддалар концентрациялари фарқидаир. Бу жараён бир қатор омилларга боғлиқ бўлиб, ФИК тенгламаси билан ифодаланади.

$$S = D \cdot F \frac{C - c}{X} t,$$

Бу ерда:

$S$  – диффузия натижасида ажралиб чиққан модда миқдори, кг.

$D$  – диффузия коэффиценти (қатлам қалинлиги  $1\text{ м}$ , юзаси  $1\text{ м}^2$  ва концентрациялар фарқи  $1\text{ кг/м}^3$  бўлганда  $1$  сония ичида ажралиб чиққан модданинг кг да ифодаланган миқдори).

$F$  – диффузия кечадиган юза,  $\text{м}^2$ ,

$C - c$  – концентрациялар фарқи  $1\text{ кг/м}^3$ ,

$X$  – қатлам қалинлиги,  $\text{м}$ ,

$t$  – диффузия вақти,  $\text{с}$ .

Тенгламадан ажратма олиш жараёнига ижобий ва салбий таъсир этувчи факторларни билиб олиш мумкин ва ажратма олиш усулларини танлашда бу факторлардан фойдаланиш лозим.

Диффузия коэффициентининг математик ифодаси куйидагича:

$$D = \frac{R \cdot T}{N_0 6 \pi r \eta^0}$$

бу ерда:

- R - газ доимийлиги, 8,32 Ж/град. моль;
- T - абсолют харорат;
- $N_0$  - Авагадро сони,  $6,06 \cdot 10^{23}$ ;
- $r^0$  - қовушқоқлик;
- R - диффузияга учраган заррачалар радиуси.

### Конвектив диффузия

- аралаштириш ёки аралаштиришга сабаб бўладиган, харорат ўзгариши ва бошқа сабаблар туфайли вужудга келадиган жараён конвектив диффузия туфайли моддалар эриган холда бир қатламдан бошқа қатламга ўтади. Ўтаётган қатлам ичида молекуляр диффузия ҳам содир бўлади. Конвектив диффузия куйидагича ифодаланади:

$$S = \beta (C - c) F \cdot t,$$

бу ерда:

- $\beta$  - конвектив диффузия коэффициенти, кг/с;
- F - диффузия кетадиган юза, м<sup>2</sup>
- C - c - концентрациялар фарқи, кг/м<sup>3</sup>;
- t - диффузия варки, сек.

Демак ажралиб чиққан модда миқдори конвектив диффузия коэффициенти, қатлам юзаси, концентрациялар фарқи ва жараён давом этган вақтга тўғри мутаносиб экан. "Ички" диффузия хом ашё хужайраларидаги моддаларни ташқарига олиб чиқиш билан боғлиқ бўлган жараёнларни қамраб олади. Бунда харакатлантувчи кун молекуляр диффузиянинг "ички" коэффициентиدير.

Ажратма олиш жараёни 3 босқичдан иборат:

1. Хом ашё тўқималари ва уларнинг ташқи юзаси ўртасидаги молекуляр диффузия (ички диффузия)
2. Диффузия кечадиган юзалар оралиғидан моддаларнинг ўтиши. Бунда асосий омил диффузия коэффициентидир.
3. Харакатдаги ажратувчи окимда моддаларни олиб ўтиш. Бунда асосий омил конвектив диффузия коэффициентидир.

Умумий ажралиб чиққан модда миқдори масса алмашилиш деб аталади ва у куйидагича ифодаланади.

$$M = F(C-c)t,$$

бу ерда:

$S$  - қатламдан бошқа қатламга ўтган модда миқдори, кг.

$k$  - масса алмашилиши коэффициентидир;

$F$  - бир-бири билан чегараланиб турган юза,  $m^2$ ;

$C-c$  - концентрациялар фарқи,  $kg/m^3$ ;

$t$  - диффузия вақти, сек

Масса алмашилиш коэффициенти ( $k$ )  $1m^2$  юзадаги концентрациялар фарқи  $1kg/m^3$  бўлганда 1 соғияда ажралиб чиққан модда миқдорини ифодалайди. Вақт бирлигида бир фазадан иккинчисига ўтган модда миқдори масса алмашилиш коэффициенти, қатлам юзаси, жараён давом этган вақт ва концентрациялар фарқига тўғри мутаносибдир.

Демак диффузия жараёнини асосий омили концентрациялар фарқи бўлиб, қатламларда ишлаб чиқариш жараёнини ташкил қилиш, асбоб ускуналарни танлаш шунга асосланади.

### Ажратувчилар (экстрагент)

Саноат миқёсида ўсимликларни экстракциялашда ажратувчиларни танлаб олиш муҳим аҳамиятга эга.

Ажратувчиларга куйидаги талаблар қўйилади.

- таъсир этувчи моддани яхши ажратиш олиш (диффузион қобилияти юқори бўлиши);

- таъсир этувчи моддага ва асбоб-ускуналарга салбий таъсир этмаслиги:
- Захарли ва осон алангаланувчан бўлмаслиги, хидсиз, рангсиз, мазасиз ва арзон бўлиши;
- Нисбатан паст хароратда осон учувчан, лекин турғун бўлиши керак.

Қорхона шароитида ажратма олиш учун хом ашё таркибида қайси гуруҳ таъсир этувчи моддалар борлиги ишлатиладиган асбоб-ускуналар ва бошқа жиҳатлар ҳисобга олинган ҳолда ажратувчи танланади. [2]

## 1.2. Ферментлар ва уларнинг тиббиётда қўлланилиши.

Энзимология (ферментлар ёки энзимлар ҳақидаги таълимот)нинг аввал боши ачиткилар сабаб бўладиган спиртли бижғиш, крахмалли хом ашёни шакарга бойитиш учун унган арпа донлари (солд) дан фойдаланиш, нон ёпишда хамиртуруш ишлатиш сингари инсон томонидан маданият энди пайдо бўлиб келаётган даврда қўлланилган технологик процессларга бориб тақалади. Фермент сўзи латинча fermentum- хамиртуруш сўзидан олинган; ферментларнинг энзимлар деган иккинчи бир номи юнонча σν ζυμε яъни ачиткиларда, деган сўздан олинган.

Петербург Фанлар Академиясининг аъзоси К.С.Кирхгоф 1814 йили солддан тайёрланган экстракт крахмалнинг бирмунча оддий қандларга айланishiга сабаб бўлишини топди. Бошқача айтганда, дастлаб фермент препарати тирик хужайралар таркибида олинмасдан, балки эритма ҳўринишида олинди. 1897 йили Э.Бухнер деган номли олим янчилган ачиткиларни преселаш йўли билан уларнинг ширасини олди., бу шира ҳам гарчи хужайралари бўлмаса-да, спиртли бижғишга сабаб бўла олар эди. Мана шу хилдаги тажрибалар тирик хужайраларда муайян реакцияларни катализлайдиган моддалар бўлади ва бу моддаларни хужайралардан ажратиб, олиб, химия методлари билан ўрганиб чиқиш мумкин, деган тасаввурни тасдиқлаб берди. XX асрнинг 30-йилларида баъзи ферментлар юксак даражада тозаланган. Кристаллик ҳолда олинди. Кимёвий табиатига ҳўра бу кристаллар оксил моддалари бўлиб, чиқди ва шу нарса ферментлар оксиллардан иборат эканлиги исбот этувчи дастлабки ишончли далил бўлди.

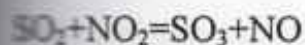
Ферментларни ўрганиш тарихи умуман катализни ўрганиш тарихи билан чамбарчас чирмашиб кетади. Катализ, деб жуда кам, ностехиоетрик миқдордаги маълум моддаларни-катализаторни қўшиш натижасида кимёвий реакциянинг тезлашувига айтилишини эслатиб ўтамиз. Масалан, платина водород пероксиднинг кислород билан сувга парчаланишини тезлаштиради, кислоталар, оксилларнинг аминокислоталарга, крахмалнинг глюкозага, жочивинанинг  $\text{CO}_2$  ва  $\text{NH}_3$  га парчаланишини тезлаштиради, кислоталар, ва окказо. Реакция паёнига етганидан кейин катализатор қандай миқдорда қўшилган бўлса, худди шундай миқдорда аралашмада топилаверади. Швед эмиги Я.Берцеллус 1835 йили бир асарини эълон қилиб, унда, бир томондан, бижғиш, солоднинг крахмалга таъсири, меъда ширасининг ҳазм қилувчи таъсирини ва иккинчи томондан, кислоталар таъсири остида крахмалнинг парчаланиши, водород пероксиднинг платина билан парчаланиши ва бошқаларни солиштириб чиқди. У мана шу жарёнларни бирлаштириб турган муштарак қондани: катализатор реакциясида востехиоетрик миқдорларда иштирок этади, деган умумий қондани қайд қилиб ўтди; Бундай қараганда катализатор реакциясида умуман иштирок этмайдиган, балки ўзининг борлиги билангина унга таъсир ўтказиб бордигандек бўлиб кўринади. “Катализ деган термин ҳозирги маъносида айнан шу Берцелиуснинг ўзи ишлатди ( авваллари бу термин “парчаланиш” терминининг синоними тариқасида қўлланилар эди).

Равшанки, катализатор реакцияни ўзининг шунчаки борлиги билан тезлаштирмай, балки реакцияга киришаётган моддага таъсир ўтказиш йўли билан тезлаштиради. Мана бундай бир масалани кўриб чиқайлик. Олтингугурт (II)- оксиди (сульфид ангидрид) кислород билан (ўзаро таъсир қилганида оксидланиб, олтингугурт (III)-оксиди (сульфат ангидрид)га айланади.



Реакцияга киришадиган ана шу арашмага азот диоксили қўшладиган бўлса, у холда хоси бўлиши тезлашади. Сабаби шуки азот диоксили

иштирокида яна битта реакция бошланиб, у ҳам хосил бўлиши га олиб  
етади.



Хосил бўладиган азот оксиди ўз навбатида кислород билан оксидланиб,  
диоксидга айланиши мумкин.



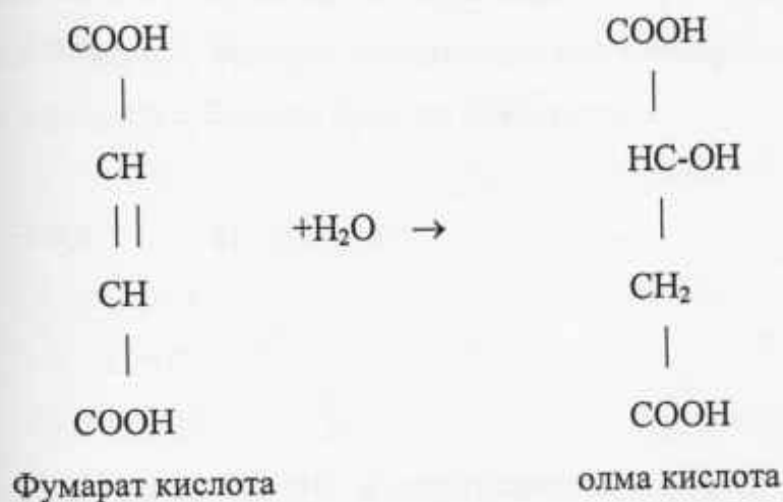
Ферментлар оксиллардир ва ҳамма оксиллар сингари улар маълум  
моддаларни-лигандларни танлаб, саралаб селектив равишда бириктириб  
олиши мумкин. Бироқ бошқа оксиллардан фарқ қилиб, фермент лиганднинг  
кимёвий ўзгаришини таъминлайди. Кимёвий ўзгаришга учрайдиган лиганд  
фермент субстрати, деб аталади, реакция маҳсулотлари эритмага ажралиб  
сикади. Ферментлар тўғрисидаги таълимот анъанага кўра биохимияда  
этакчи ўринни эгаллаб туради, ферментлар эса оксилларнинг ҳаммадан кўра  
кўпроқ ўрганилган синфи бўлиб ҳисобланади. Бунинг сабаби  
ферментларнинг муҳим роль ўйнашига боғлиқ организмда ҳар қандай  
моддаларнинг кимёвий ўзгаришлари шу ферментлар иштироки билан юзага  
чиқади. Бироқ ферментларга алоҳида эътибор берилишининг буларнинг  
биологик ролига алоқадор бўлмаган бошқа сабаби ҳам бор. Гап шундаги,  
ферментларни кўпчилик бошқа оксиллардан фарқ қилиб, топиб олиш ва  
ўзлари катализлайдиган реакцияга қараб миқдорини ўлчаш бирмунча осон.

Ферментларни бошқа катализаторлардан ажратиб турадиган энг  
характерли хусусияти улар таъсирининг ниҳоят даражада ўзига хос,  
специфик бўлишидир. Худди бошқа оксиллар сингари ферментларнинг  
актив маркази ҳам пептид занжиридаги аминокислоталар тасдиқларининг ён  
группаларидан хосил бўлган. Турли реакцияларни катализлайдиган  
ферментлар актив марказларининг тузилиши турличадир. Фермент актив  
марказининг структурлаш субстратнинг сруктурасида комплиментардир,  
шунга кўра, фермент тирик хужайрада мавжуд бўлган кўпдан-кўп моддалар  
орасидан фақат субстратини бириктириб олади. Мана шу хусусиятни  
ферментнинг субстрат спецификлиги дейилади. Масалан, гистидаза

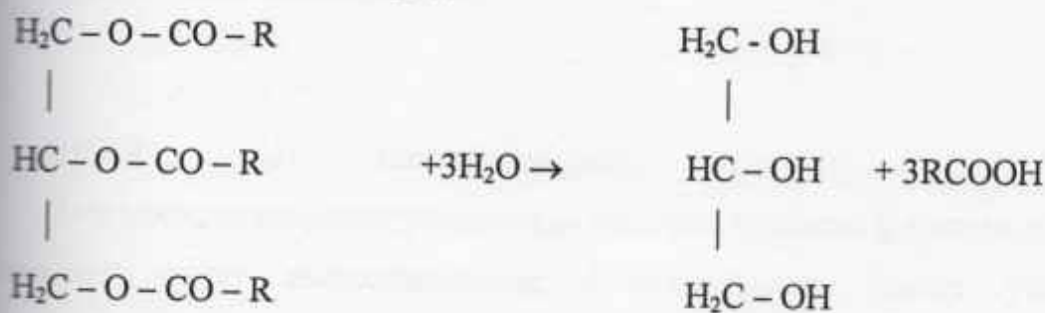
ферменти актив марказининг структураси гистидин аминокислотаси структурасига комплементардир, шунинг учун гистидаза-гистидин фермент субстрат комплекси ҳосил бўлиши мумкин; бошқа моддалар, жумладан, аминокислоталар гистидаза билан бирикмайди.

Бундан ташқари, ферментлар актив маркази функционал группаларнинг бир қисми шундай тузилиши ва реакция лаёқатга эгаки, субстратнинг кимёвий ўзгаришига учраб, янги моддаларга – ферментатив реакция маҳсулотларига айланиши таъминланади. Хар бир фермент субстратда юзага чиқа оладиган кимёвий ўзгаришлардан хар бирини эмас, балки қандай бўлмасин бирортасини катализлайди холос. Мана шу хоссанинг ўзгариш йўлининг спецификлиги деб атайлик. Масалан, гистидаза билан гистидиндекарбоксилаза бир хилдаги субстрат спецификликка эга, лекин гистидиннинг турли ўзгаришларга учрашини катализлайди. Гистидаза таъсирида аминогруппа ( $\text{NH}_2$  шаклида) гистидиндекарбоксилаза таъсирига эга карбоксил группа ( $\text{CO}_2$ ) шаклида ажралиб чиқади;

Ферментларнинг абсолют ва группа спецификлиги фарқ қилади. Абсолют спецификликка эга фермент қандай бўлмасин битта субстратнинг ўзгаришини катализлайди. Масалан, фумараза фумарат кислота билан сув ўртасидаги реакцияни катализлайди холос

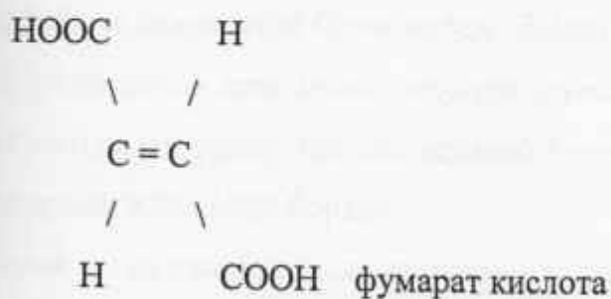


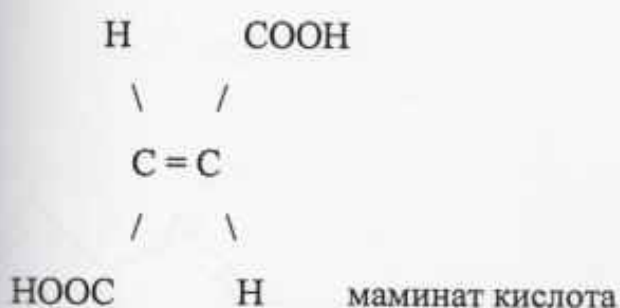
Группа специфлигига эга ферментлар ўхшаш тузилишдаги моддаларнинг бир типдаги ўзгаришларини катализлайди. Масалан, липаза ёғлар (триацилглицеринлар)нинг глицерин билан ёғ кислоталарига гидролизланишини тезлаштиради:



Ёғлар айрим вакиллари ёғ кислота қолдиқлари (R радикаллари)нинг табиати жихатдан бир-биридан фарқ қиладиган бирикмалар группасидир. Липаза ҳар хил кислота қолдиқларини ўз ичига оладиган ёғларни парчалайди. Группа специфлигига яна бир мисол пептидлар билан ассилларни гидролизловчи ферментлар таъсирidir: одатда бу ферментлар турли аминокислоталардан ҳосил бўлган пептид боғларни парчалайди.

Моддалар стереоизомерларнинг фазовий структураси ҳар хил бўлади, шу муносабат билан битта стереоизомерга комплементар бўлган фермент актив маркази бошқа стереоизомерларга ҳам комплементар бўлавериши шарт эмас. Ана шунинг учун ҳам кўпгина ферментлар стереоизомерлардан фақат биттасини ўзгаришини катализлайди, - стереоспецификлик деб шунини айтилади. Масалан, фумарат кислотанинг цис-изомерлари бўлиши неминат кислота фумараза субстрати бўлиши мумкин эмас:



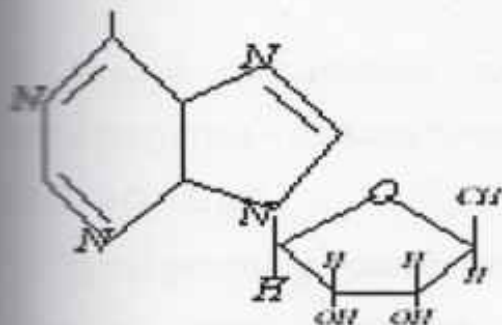


Аминокислоталарнинг ўзгаришида иштирок этадиган ферментларнинг фақат аминокислоталар L-изомерларига таъсир ўтказса, углеводдорларнинг ўзгаришини катализлайдиган ферментлар углеводларнинг – D – изомерларига таъсир қилади, холос.

Ферментлар ҳам худди бошқа катализаторлар сингари мувозанат ҳолатини ўзгартирмасдан, балки шу ҳолатга етиш вақтини тезлаштиради. Масалан, фумарат кислота эритмасига фермент тушириладиган бўлса, у ҳолда фумарат-малат реакциясини қайд қилиш мумкин; бордию шу ферментнинг ўзини олма кислота (малат) эритмасига солинадиган бўлса, у ҳолда малат→фумарат реакциясини кузатса бўлади. у ҳолда ҳам, бу ҳолда ҳам (фумарат) / (малат) нисбатан 1:4 бўладиган мувозанат ҳолати қарор топади. Кимёвий реакциясини системада Гибсс энергияси камайишига алоқадор томонга қараб ўз-ўзидан давом этиб боришини эслатиб ўтамиз (экзергоникреакциялар) мувозанат ҳолатида Гибсс энергияси ҳаммадан кам, минимал миқдорда бўлади. Гибсс энергияси ортиб боришига алоқадор реакциялар (андергоник реакциялар) термодинамик жихатдан тежамли эмас, улар ўз-ўзидан давом этиб беролмайди. Лекин ташқи энергия манбаи бўлса, шундай реакциялар ҳам юзага чиқиши мумкин; аynи вақтда андергоник реакция системаси билан энергия етказиб берадиган системасининг умумий Гибсс энергияси камайиб боради.

Тирик хужайрада андергоник реакциялар учун кўпинча аденозинтрифосфат кислота (АТФ) гидролизининг экзергоник реакцияси

энергия манбаи бўлиб, хизмат қилади. АТФ аденин, рибоза ва фосфат кислотаси унумлидир.



### Ферментлар классификацияси ва номенклатураси

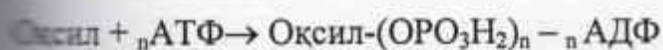
Ферментлар классификацияси улар таъсирининг ўзига хос, яъни специфик бўлишига асослангандир. Барча ферментлар ўзларининг катализлайдиган реакцияларининг типига қараб олтига асосий синфга бўлинади. Ҳар бир синфи кенжа синфларга ва яна худди шу принципга мувофиқ, яъни реакцияларнинг типига қараб кичик кенжа синфларга ажратилади.

Оксидоредуктазалар. Оксидоредуктазалар синфи ҳар хил типдаги оксидланиш-қайтарилиши реакцияларини катализловчи ферментларни ўз ичига олади. Жумладан, бу синфга юқорида кўздан кечириб чиқилган НАДга карам ва флавинли дегидрогеназалар киради.

Оксидоредуктазаларнинг бошқа бир типи оксидазалардир. Бу ферментлар кислород бириктириш йўли билан субстратларнинг оксидланишини катализлайди. Чунончи, аминоксидазалар аминларни оксидаб, альдегидлар билан аммиак ҳосил қилади. Масалан, гистаминнинг оксидланиш реакцияси:



кислота қолдиклари пептид занжирининг серин ёки треанин гидроксил группаларига бирикади.



Барча киназалар максимал активлигини номоён қилиш учун  $\text{Mg}^{2+}$  ёки  $\text{Mn}^{2+}$  ионларига мухтож бўлади.

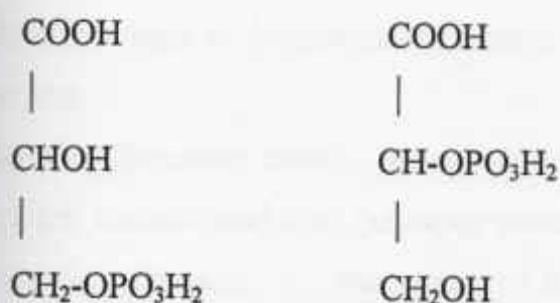
Гидролазалар. Бу ферментлар турли туман боғларнинг парчаланиши ва шу парчаланган жойга сув бириктириш реакцияларни катализлайди:



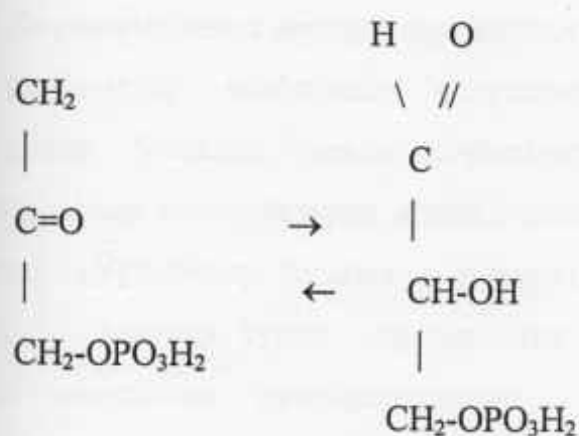
Гидролазалар синфига мураккаб эфир боғларини парчалайдиган эстеразалар масалан липаза, холин эстераза); пептидазалар ёки пептид гидролазалар (пепсин, трипсин, карбоксилентидаза ва бошқалар): гликозид боғлари гидролизлайдиган гликозидазалар киреди ва хоказо.

Лиазалар. Лиазалар жумласига органик килоталардан корбаксил группасини ажратиб оладиган декарбоксилазалар, масалан, юқорида тилга келиб ўтилган гистидин-декарбоксилаза; углерод-углерод боғини парчалаб, альдегидлар ҳосил бўлишига олиб келадиган альдозазалар; қўшбоғ бўйлаб сув бириктирадиган гидратазалар (масалан, фумаразалар); бирикмалардан сув молекуласини ажратиб олиб, қўшбоғ ҳосил келадиган дегидратазалар масубдир.

Изомеразалар. Хайвонларнинг организмида икки типдаги изомерланиш реакциялари группалари молекула ичида олиб ўтиши ва молекула ичидаги оксидланиш қайтарилиш реакциялари ҳаммадан кўп учрайди. Биринчи типдаги реакцияларни молекулалар ичи трансферазалари деб аталадиган изомеразалар катализлайди. Масалан, фосфоглицеромутаза 3-фосфоглицерат кислотани 2-фосфоглицерат кислотага айлантиради.



Иккинчи типдаги изомерланиш реакцияларини молекулалар ичи гидроредуктазалари катализлайди. Мана шундай реакциялар жумласига изомерлар билан метозларнинг бир-бирига айланиши киради. Масалан, триозофосфатизомераза диоксиацетанфосфат билан глицеральдегидфосфатнинг бир-бирига айланишини катализлайди.



Лигаза (синтетазалар). Бу синф ферментлари катализлайдигин реакцияларнинг ўзига хос хзусусияти энергия манбаи сифатида АТФ дан фойдаланишдир.

Ферментлар номенклатураси.

Ферментларнинг тарихан юзага келган (тривиал) номлари кўпинча субстрат номидан олиниб, суффиксни-аза га ўзгартириш йўли билан тuzилади. (Фумараза, гистидаза, аргиноза ва хоказо). Халқаро биохимия иттифоқининг ферментлар бўйича комиссияси ферментлар рационал номенклатураси қоидаларини ишлаб чиқади. Шу қоидаларга мувофиқ фермент номидан

нинг субстратлари ва фермент қайси синфга мансуб бўлса, шу асосий синф кўрсатилади.

Хар бир фермент синф , кенжа синф, кичик кенжа синф номерини маънада кичик кенжа синфдош фермент номерини кўрсатилган махсус шифр билан белгиланади. Масалан, 2.6.1.2- аланин оксиглутарат-аминотрансфераза: 4.3.1.3-глатидин-алемиак-лиаза (гистидаза): 1.1.1.2.8-лактат: НАД-оксидоредуктаза (лактобдегидрогеназа) . Рационал номлари қисқичча изоҳлар бермасдан туриб мазкур фермент катализлайдиган реакцияни тасаввур қилишга имкон туғдиради. Бироқ улар аксари анча узун бўлади, шу муносабат билан бу номлар билан бир қаторда тривиал номлардан ҳам фойдаланилади.

Ферментларнинг тиббиётда қўлланилиши.

### 1. Ферментларнинг дорилар тариқасида қўлланилиши.

Баъзи ферментлар шифобахш воситалар тариқасида қўлланиладиган бўлиб қолди. Масалан, меъда ширасидаги пепсин миқдори камайиб қетадиган меъда касалликларда иштаха очиш учун пепсин препаратларни буюрилади. (Ўринбосар терапия ) Жарахатларни биринчи бор тозалаб , шуволлаш вақтида турли протеолитик ферментлар қўлланилади. Бу фермент емирилган хужайраларнинг оқсилларни гидролизлаб, жарахатнинг тозаланишига ва яллиғланиш ходимларининг камайишига ёрдам беради. Нуклеазалардан баъзи вирусли касалликларга даво қилишда фойдаланилади. Масалан, вирусли , конъюнктивитга даво қилишда таркибида ДНК аза бўладиган томчи дорилар кўзга мувоффақият билан шиклатилади. Фермент вирусдаги ДНК ни парчалайди ва шу билан дардга даво бўлади. Қон томирларининг қон лахталари билан тикилиб қолиши, қонни тромбозларга йўл қўймаслик ёки буларга даво қилиш учун баъзи протеолитик ферментлар айниқса кенг қўлланилади.

Аспарогеноза лейкозлар (оқ қон раки ) нинг баъзи формаларига даво қилиш учун қўлланилади. Бу даво шунга асослангани , лейкозга учраган хужайраларда аспараген(оқсиллар синтези учун зарур аминокислоталарнинг

бири) синтезланмайди ва хужайралар бу аминокислоталарнинг қон плазмасидан олади. Бемор қонига аспарогеноза юбориладиган бўлса, у вақтида қон плазмасидаги аспорагин парчаланиб кетади ва лейкозга учраган хужайраларда оқсиллар синтези тўхтайтиди хужайралар халок бўлиб кетади. Хавфли қисмларга даво қилиш учун ярайдиган ва худди шундай механизм билан таъсир кўрсатадиган бошқа ферментлар ҳам маълум улар қисми тўқимасининг ўсиб бориши учун зарур бўлган қандай бўлмасин бирор моддани парчалайди.

2. Ферментларнинг аналитик реактивлар тарзида қўлланилиши. Ферментларнинг субстратга нисбатан юқори даражада специфик бўлиши уларнинг ниҳоятда ўзига хос аналитик реактивлар қилиб қўяди. фермент ёрдамида таркибида бир талай бошқа моддалар бўлган аралашмадаги субстратни аниқлаб олса бўлади. Қон ва бошқа организмнинг бошқа сувоқликлардаги метоболитлар концентрацияларини ферментлар ёрдамида аниқлаш методлари клиник лаборатория анализи амалиётда тобора кенроқ қисм бўлиб бормоқда. Глюкоза мочевина, урат кислота (сийдик кислота) сут кислота, креатинин, холестерин, треацилглицеринлар ва бошқа моддалар шикдори ана шу методлар билан ўлчаб аниқлаб олинади. (3)

1.3 Фосфолипаза Д ферменти ва унинг тарқалиши.

Тажрибада йўл қўйилган хатолик туфайли кашф этилган. Фосфолипидларни гидролизилаб фйосфотид кислота ва сувда эрийдиган қисслар ҳосил қилишга қодир ферментлардан бири ФлД дир. Бу ферментни биринчи бўлиб таърифлаган Хокан (4) 1947 йил реакцияни тугатиш учун жараёнини тўхтатишга лаёқатли деб ҳисобланган органик эритувчи –диэтил эфир ишлатди. Диэтил эфир ва баъзи бир эритувчилар ферментнинг гидролизи ва трансфераза фаолликларини рағбатлантиради.

Биринчи бўлиб Бенсон ходимлари билан фосфолипаза Д га эга хужайравий экстрактларнинг сувда эрийдиган спирт мавжудлигида фосфолипидларнинг фосфатид кислота қолдиғини топишга қодир эканлигини аниқладилар.

Фосфолипаза Д мисолида биз етарли муҳим ходисага дуч келамиз.

Биринчидан: ферментда реакция типига аниқ намоён этиладиган махсуллик эканлиги у фосфатид кислота билан азот асоси ўртасидаги боғни танлаб гидролизлайди.

Иккинчидан ферментнинг барча субстратлари-фосфолипидлар, субстрат молекуласи ацил қисмининг тузилишидаги ўзига хослик тўғриси гидрофобликка эга.

Учинчидан: барча субстратлар ичида лецитин ва лизолецитин нисбатан субстратнинггайнан физикавий ёки тўғриси физикавий кимёвий ҳолати реакциянинг кечиш тезлиги ўз аксини топади.

Фосфолипаза Д фосфолипидларнинг сувда эримайдиган субстратларнинг каталитик ўзгаришда иштирок этади. Улар физик-кимёвий хоссалари ва ўзига хослиги билан фарқ қилади.

Фосфолипаза Д фосфолипазаларнинг вакилларидан биридир. Бу фермент фосфолипидлар молекулалардаги фосфодиэфир боғни парчалаш қусурисига эга. У мембраналар фосфолипид таркибининг ва уларга боғлиқ бўлган липид-боғ функцияларининг тартибга солинишида муҳим рол ўйнайди. Сабзи илдиз меваси ва қарам барглари экстрактида қандайдир. "Лецитиноза" бўлиб у тухум лецитинини гидролизланганда холинни ажратиш хассасига эга эканлигини аниқланган.

Кейинчалик яна кўп тажрибалар ўтказиб бу фермент ўсимликларда айниқса қарам баргларида (5) ерғоқда, чигитда (6) кофеда, трупда (7) ва доказоларда кўп миқдорда бўлиши аниқланган.

ФлДнинг икки тури эрувчан ва мембранан билан боғланган тури фарқ қилинади. 1954 йилда Keyts ўсимликлар экстрактида лецитинни гидролизловчи фермент пластида фракциялари билан ҳамбарчас боғлиқ бўлиб, цитоплазматик фракцияларда умуман бўлмадлиги аниқланган.

Бирмунча кейинроқ чигитнинг ёғсизлантириш қукунида фосфолипаза Днинг сувда эрувчан формаси ажратиб олинган (8) Кейинчалик аниқланишича, ўсимликларда фосфолипазанинг сувда эрувчан формаси билан бирга ферментнинг бир қисми боғланган ҳолда ҳам учраб экан. Бундан ташқари,

нинг бир шаклдан (митохондриялар билан боғланган) иккинчи шаклга эрувчан ФлД га ) ўтиш имконияти мавжудлиги маълум бўлган. Буни кофеин таркибидаги фосфолипаза Д ни ўрганишда аниўланган.

Бу фосфолипазанинг айрим хоссалари ва молекуляр вазни кичиклиги билан фарқ қилинадиган бошқа тур хили ҳам топилган. У микроорганизмда бўлар экан. Олинган маълумотлар шундан далолат берадики фермент, бу объектларда ҳам қисман мембрана билан боғланган ва сувда эрувчан формаларда бўлар экан, масалан, қизил сув ўтлардан олинган Фл Д мушайра зарралари билан чамбарчас боғланган бўлиб хатто ультратовуш тасир эттирилганда ҳам салюбилизирланмайди. Наеморkilus ravaenfluenrae hachijonsis дан олинган ФлД эса эрувчан формада олинган. Бир қатор микроорганизмларнинг ФлД фақат мембраналарда тўпланган бўлиб, салюбилизирлана олмайди. Микробли бир қанча объектлардан ФлД нинг молекуляр оғирлиги 16000 бўлган сувда эрувчан шаклли ажратиб олинган. Хайвонлар тўқималарида ҳам ФлД бўлиши анча кейинроқ аниқланган. Текит билан Конфер бу ферментни жигар микросалаларидан топган. Дастлабки олиб борилган ишларда бу фермент қайси шаклда бўлиши воаниқ бўлган чунки нишонланган фосфолипидлар билан олиб борилган in vivo текширувлардагина бу хақида хулоса чиқарилган. Сенто текрибаларида фосфолипаза активлиги мембрана фракцияларида тўпланганлиги ва фермент мембраналар фосфолипидлар билан мустахам боғланганлиги аниқланган. ФлД фосфолипидларни гидролизлашдан ташқари лизофосфидлар молекулаларидаги боғларни ҳам парчалаш хоссасига эга.

Хайвонларнинг хар хил тўқималарида ҳам ФлД борлиги кейинроқ маълум бўлди. Каламушнинг тўқималари текширилганда мияси, жигари, юраги, ўпкаси, қаротолоғи (9.10) фермент борлиги аниқланган. Мембрана ва ўпкалар микросома мембрана учун ФлД нинг солиштирма активлигини нинг юқори бўлганлигини аниқланган.

Адабиётлардан бу маълумотларга асосланиб, шундай хулосага келиши мумкин, яъни ФлД узоқ вақтгача айтилгандан фақат ўсимликларга эмас балки хайвон объектларида ва микроорганизмларда ҳам кенг тарқалган. Бу фермент мембрана билан боғланган фосфолипазадир.

Ферментнинг ўсимликлардаги эрувчан, формаси мембрана фосфолипаза Д сининг салюбилизирлашган шаклидир. Микроорганизмларда ферментнинг ҳар 2 ла шаклини мембрана билан боғланган ва секретланувчи шакли бўлади. Шу билан бирга хоссалари ўсимлик ва хайвонлар ФлД сининг хоссаларидан фарқ қилади.

### **Фосфолипазалар харақтеристикаси**

Фосфолипазадар сувда эримаидиган субстратларни- фосфоли-пидларнинг гидролизини катализ қилувчи ферментлар бўлиб, липо-литик ферментлар қаторида ўзига хос ўрнига эга..

Субстратларнинг мураккаб эфир боғларининг қайсиниси гидро-лизланишига қараб, фосфолипазаларни тўртта тигига бўлиш мумкин:

#### Фосфолипаза А

1. Фосфолипаза А1

2. Фосфолипаза А2

3. Фосфолипаза В

4. Фосфолипаза С

5. Фосфолипаза Д

Фосфолипазалар 2 хил реакцияни катализ қилиши мумкин.

#### **1. Фосфолипидлар гидролизини катализлаиди;**

1. Фосфолипидлар ва спиртлар транс-перэтерификациясини катализлаиди;

2. Қанда лецитин мисолида фосфолипазаларниг ўзаро фарқи схематик равишда кўрсатилган:

3. Фосфолипидларнинг ўзаро фарқи схематик кўриниши.

Фосфолипаза A1  $\beta$  ҳолатидаги гидролизи фосфолипаза, А билан катализ қилади. (Фосфатидилхолин ацилгидролаза КФ 3,1,1,4). Фосфолипаза А каталитик қилган реакция натижасида ёғ кислота ва тегишли лизофосфолипидлар ҳосил бўлади. (1960 йил, Катез). Фосфолипаза А кўпроқ ҳайвонот ва микроорганизмларда учрайдиган фермент. Фосфолипаза А фосфолипиддаги ацил қосимчаларининг парчаланиш ҳолатига қараб, иккига бўлинади:

Фосфолипаза A1 L- ҳолатидаги эфир боғи гидролизи учун спецификлик намоён қилади.

Фосфолипаза A2  $\beta$  - ҳолатидаги ёғ кислотали қосимчаларини парчалайди. Кўпроқ спецификликка фосфолипаза В эга. (КФ 3,1,4,5). Бу фермент моноацил фосфоглицеридларни 1 ациллайди. Фосфолипаза В фосфолипаза А каби ҳайвонот оламида ва микроорганизмларда аниқланган. Бу фосфолипазалар адабиётларда бошқа номларда ҳам учрайдиган. Бу фермент лизолецитиназа, лизофосфолипаза, фосфатигидролаза ва бошқалар.

Фосфолипаза С (фосфатидилхолин- фосфохолингидролаза, КФ 3,1,4) фосфолипидлар ва лизофосфолипидлар гидролизини катализ қилади. Фосфолипаза С глицерид қисм ва фосфор асослар оралиғи-1 даги ацилнинг гидролизини катализлайди. Фосфолипаза С ҳозирча I қатор микроорганизмлардан ажратиб олинган. Бу фермент 1д - оС - фосфатид кислота ва азот асослари орасидаги боғни узади. Бу фермент фосфолипидларни диглицерид ва церамидгача парчалаб, тахминан 80 - 90 % қолдориқка эга.

Фосфолипаза A2 (фосфатил-ацилгидролаза, КФ 3,1,1,4) аса-лари, ари, илон ширларида, шунингдек баъзи ҳайвонлар тўқима-ларида ҳам топилган. Бу фермент бактерия ва ўсимликларда ҳам топилган. У мембрана фосфолипидларининг тахминан 80-90 % гача парчалайди. [1]

## Фосфолипаза Д нинг характеристикаси

Фосфолипаза Д (фосфатидилхолин-фосфатидогидрохолинни холин ва фосфатид кислотагача парчалаиди. Бунда липидларда 70% гача парчаланиш мумкин бўлади. . Фосфолипаза Б 2 реакцияни катализлаиди: [ 4 ]

1. Фосфолипидларнинг гидролизини катализлаш схематик кўрилади. Бу реакция натижасида фосфатидил кислота ва тегишли спирт ҳосил бўлади.

2. Фосфолипидлар ва спиртлар транс-перезтерификация реакциясини катализлаиди.

Бу реакция натижасида янги фосфолипид келиб чиқади. Фосфолипаза Д юқори температураларда аниқланган бўлиб, турли қисмлардан ажратиб олинган. Шунингдек бу фермент тубан ўсимликлар ва микроорганизмларда ҳам аниқланган. Фосфолипаза Д авваллари хайвон тўқималарида учраши аниқланмаган эди.

Ўтган йилларда фосфолипаза Д ҳам япон олимлари томонидан хайвон тўқимларида ҳам борлиги аниқланган. 1973 йили Таки Yamamoto текширишларида бу фермент жигар микросомаларида топилади. Шу йил Sai to Kanfer мия хужайралари микросомаларида ҳам бу ферментни аниқлади. Фосфолипаза Д тубан ўсимликлар ва микроорганизмларда эриган ва хужайра бўлакчаларца боғланган ҳолда топилади.

Ўсимликлар фосфолипаза Д си 2 та формада бўлади. [ 3 ]

1. Термолабиль- фосфолипаза Дл

2. Термостабиль- фосфолипаза Дс

Бу икки формалар бир-биридан бир қанча хоссалари билан фарқланади.

Бу икки оптимуми, температура оптимуми, ионлар активацияси, активаторлар таъсири, кинетик параметрлари бўйича фарқлари кузатилган. Бу икки форма ажратиш ҳолда бўлиб, уларнинг миқдорлари ҳар хил факторларга хос равишда

Фосфолипидларнинг ўзгариб туради. Бу факторларга ўсимликлар ниғиб олинган вақти, эрозия бериш даражаси, ўсимлик тури, ўсимлик ҳолати ва бошқалар.

Фосфолипаза Д<sub>1</sub> лецитин ва ефалинни гидролиз қила олади, яъни катализ қила олади. Лецитин гидролизини катализлаш учун Са<sup>2+</sup> ионлари бўлиши керак. Ефалин гидролизида Са<sup>2+</sup> ионлари бўлиши шарт эмас. Фосфолипаза Д<sub>2</sub> ефалинни гидролизини катализлаиди. Лецитин гидролизини катализлаш учун Са<sup>2+</sup> ионларининг юкори концентрацияси талаб қилинади. [ 1,3 ]

Фосфолипаза Д<sub>1</sub> лар қандаи ўсимликдан олинганлигига қараб ҳам бўлинади. Карам барги, чигит, турп, сабзи, мош, фасоль фосфолипаза Д турлари. [ 9 ]

Чигитдан ( карам баргидан ) ажратиб олинган фосфолипаза Д<sub>1</sub> ва фосфолипаза Д<sub>2</sub> хоссларидаги фарқлар

Жадвал N 1

	Фосфолипаза Д <sub>1</sub>	1 Фосфолипаза Д <sub>2</sub>
Катталиклар		
pH оптимуми	5,0-6,0(5,2-6,2)	6,4-7,5 (тенг)
Хлорат оптимуми	30	45
50 да ярим активлигини		
Ўқотиш вақти, мин	35	300
Инактивация консентрацияси		
pH 7,0 да	5,5*10 <sup>3</sup> 3.5*10 <sup>3</sup>	1*10 <sup>3</sup>
pH 5,6 да		2.2*10 <sup>3</sup>

Активаторлар	БВ-Ша	DS-Na
	Диэтил эфир	
	Бензол	Бензол
	Нитробензол	—
	Силикагель	Силикагель
30 да активлик	1	
Силикагель	0.86 (1.1)	1.1(0.5)
Бензол	20 (0.8)	1.5 (0.2)
Диэтилэфир	1.8 (0.5)	1
Этилацетат	0.5 (0.6)	0.4 2.9 (0.6)
БЗ - №	3.6 (1.1)	
Ме ионларининг оптимал концентрацияси		
CaCl	40.(20)	1 50 (70)
BaCl	50 (60)	1 (70)
5ГCl	100 (60)	Неактивирует

## Фосфолипаза Д нинг баъзи хоссалари

Фосфолипаза Д ни барқарорлигини ошириш учун ва умуман фермент хақида тўлиқ тасаввур олиш учун унинг хоссалари билан шиб чиқиш зарур.

Фосфолипаза Д нинг хоссаларини кўриб чиқишда М.М. Рахимов- чигитдан олинган Фосфолипаза Д хоссаларини модель қилиб ола- [2]

Фосфолипаза Д нинг активлигини оширув инициаторларга ди- этилэфир ва Ша гина кириб қолмай, баъзи органик эритувчилар ҳам кальции иони тароқида активаторларга ккради. Органик эри- тувчилар бошқа металл лари иштироқида ҳам активатор бўлиши мумкин. Тахминларга кўра ферментактивацияси барқарор микрогетероген система ҳосил бўлгандагина га ошади. Бу система эриган фермент-фосфолипид сувсиз фаза масидир. Фосфолипаза Д сувда эримайдиган субстратларнинг гидролизини катализловчи гетероген фазада таъсир доирасига эга ферментлар сисига, киради. Гидролиз реакциясини кетишида фазалар оралиғи юзасида фермент адсорбцияси муҳим стадия бўлиб ҳисобланади. Гидролиз реакцияси лиғи фазалар оралиғи юзаси майдонига тўғри пропорционалдир. Субстрат маси майдони кенгайиши дисперсияловчи агетлар ёрдамида амалга ширади. Фосфолипаза Дни ўрганишда одатда DS-Na ёки диэтилэфир шанилади. DS-Na концентрациясига фосфолипаза Д активлигининг килиғи чигитдан ва бошқа манбааларда олинган ферментлар орасида фарк

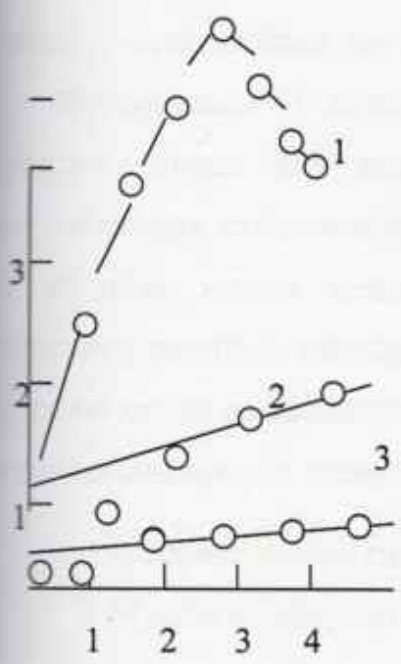
Фосфолипаза Дни инициатор сифатида қўлланганда максимум нуктага эга бўлган график бўлади. Бунда эфир ва сув фазалар орасида ҳажмий нисбат 0.1 га тенг. Диэтил эфирни қўллаш давом эттирилса, сув ва эфир нисбати 1.0 гача фосфолипаза Дл активлиги бирмунча пасаяди. Гидролиз реакцияни тезлиги килиши интенсивлигига кучли боғлиқ бўлади. Реакция тезлиги бошқа органик эритувчилар қўлланилганда ҳам ўзгаради. Бензол кучлироқ промоторлаш таъсирини кўрсатади, иексан эса нисбатан пастроқ промоторлаш

рига эга. Сувда эрувчи ацетон ва метаноллар қўлланилганда фермент  
лиги жуда сезиларсиз ўзгаради. Органик эритувчилар сув билан  
майдиган фаза ҳосил қилган ҳолларда фосфолипаза активлиги ва  
аётган агент миқдори боғлиқлик характери билан бир хил. Фосфолипаза  
лигининг максимум нукталаридаги эритувчи ва сув фазалар нисбатларида  
лиги активлиги чақатиш, аралаштириш интенсивлиги билан боғлиқлиги  
Шу шароитларда рассолланмас барқарор система ҳосил бўлади.  
органик эритувчининг концентрациясини ошиши уч кават систе-  
экстракцияланган субстрат билан органик эритувчи аралашмаси,  
субстрат ва оқсил, сув қатламларини ҳосил қилади.  
мал шароитларда фермент активлиги ва унинг концентрацияси, фермент  
лиги ва субстрат концентрациялар орасидаги боғлиқларни кўриб ўтамиз.  
фермент концентрациясини ошириб борсак холин ажралиши бир хилда бўлиб  
лиги. [ расм 1 ]

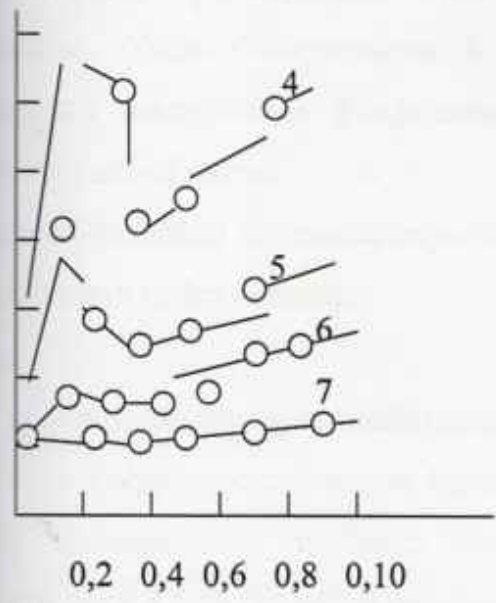
субстрат концентрацияси ўзгартирилмади.

олганда олинган натижалар ва адабиётлардаги натияса-  
билан солиштирсак, турли манбаалардан олинган фосфолипаза Д  
табиати бир хил ва баъзи чекланишлар эксперементал характер  
этади,

гидролизини DS-Na ва диэтилэфир қўшилганда кўрсак, БЗ-М  
иштирокида Фосфолипаза Д лецитинни тезроқ ва тўлиқроқ гидролиз  
ини аниқлаимиз. Бунда БЗ-М иштирокида рН 7.0 атро-фида максимум  
лигга эга бўлса, диэтил эфир иштирокида 5.5 атрофида максимум  
лигга эга бўлади. Фермент активлиги ва детергентлар - DS-Na тритон  
центрациялари орасидаги боғлиқлик ва фермент концентрацияси ва органик  
увичилар ораби-даги боғлиқлик орқали фермент активлигини оширувчи ёки  
увирувчи инициаторларни билишимиз мумкин. [ расм 2 ]



Детергент концентрацияси, мМ



Органик эритувчилар концентрацияси, мМ



шардаги текширишларда ферментнинг яхши тозаланмаганлиги сабаб бўлган.

М.У. Бобоев; Р. Ахмаджонов, М.М. Раҳимовларнинг турпдан ажратиб олинган Фосфолипаза Б лари гидролаза ва трансалкиаза функцияларини кўриб ўтамиз. [ 11 ] Турп

(ДарПапиз зануиз) Фосфолипаза Б ; ферменти фосфатиди-лэтаноламин билан ковалент боғланган модификацияланган полиамид ёрдамида адсорбцион хроматография иўли билан тозаланлади. 0.5-г ацетон порошок" биоспецифик адсорбентли колонкага (180\*10ммў

сакланади. Колонка 0,05 М ацетат буфер (рН 5.6) билан мўтадиллаштирилади. Ацетат буфер 30 мМ СаС1 ва 1 М ЦС1 саклаиди. Чизикли градиент рН 5.6 дан 9.5 гача бўлган шароитда фермент элюация қилинади. 0.05 М Ша ацетат рН 5.6 ва 0.05 М трис-НС1 рН 9.5 бу-ферларнинг 150 мл дан аралашмаси билан рН 5.6 дан 9.5 гача шароит яратилади.

Фосфолипаза Д ўсимликларда 3 та формада бўлади, яъни 3 хил гидролаза активлигига эга. рН оптимумлар хар хил. 1 формада кислотали шароитларда, 3 форма эса паст ишқорли шароитларда актив бўлиб, 2 формаси оралик шароитларда активлигини намоён қилади. Ажратиб олинган фермент формалари бир канча хоссалари билан бир- биридан фарк қилади.

Турли формалар хоссаларидаги фарқларини жадвал кўринишида кўриб берамиз: [ 4 ]

1	Фермент		формалари	
	I	II	III	IV
Тозалаш даражаси	340	290	370	
	7.0	6.5	6.0	
Активлиги бр лк/мт	28.6	123.5	34.9	
Гидролиз	54.5	48.8	58.8	
50 да ярим активланиш вақти	45 мин	-----	10	
Оптимал концентрацияси				
Синтез мМ	20	20	80	
Гидролиз мМ	20	20	80	
Ag/At нисбат	1.9	0.38	1.7	
Изоэлектрик нуқта	4.6	-----	4.52	
Молекуляр масса	110000		110000	

**Фосфолипаза 0 нинг турли формалари хоссалари.**

Жадвалдаги натижалардан III ва I форма фосфолипаза Бл ва Бс сирга тугри келишини кўришицрз мумкин. [4]

Текширишларда I ва III формалар паст трансалкиллаш функцияга, II форма эса трансалкиллолчи функцияга эгаллиги аниқланди. Трансалкиллолчи функцияга эгаллиги Фосфолипаза Днинг II формаси учун хослиги аниқланди.

Фосфолипаза Д ажратиш олиш методлари

Фосфолипаза Д ферментини текшириш, ишлатиш ва бошқа мақсадлар учун ажратиш олишда турли методлар билан ажратиш олинади. Бу методлар барчасида бир хил умумий процесслар ётади. Бунда экстракция, хроматография процессларидир. Ажратиш олишни тасавур қилиш учун қишлоқдан ажратиш олишда кўриб чиқамиз. [ 5 ]

Фосфолипаза Д билан ажратиш олиш учун 3 соат давомида 4 С да ва рН 8,9 шароитда 10 минута кўп микдор 0.01 М трис-НС1 буфер бия'н экстракция қилинади. Экстракция давомида экстракт аралаштирилиб турилади. Олинган суспензия 15 минут давомида 6000 г тезликда центрифуга қилинади. Ёғ қатлами ва чўкмаси олиб ташланади. Экстрактга 2 хажм ацетон қўшилади. (Ацетон Т=-20 С). Чўкма "Сорбент ДЭАЭ" нация иули билан ажратилади, 5 минут 2000 об/мин да центрифуга қилинади. Центрифугат Бюхнер воронкасига ўтказилади ва; ацетон билан экстракт ранги иўқолгунча ювилади. Олинган ацетонли порошок хавода қуритилади. Бу препарат барча тажрибаларда хом ашё бўлиб, тозарок Фосфолипаза Д олиш ва турли кўринишдаги, формалдаги фермент олишда қўлланилади.

Ацетонли порошок навесқаси 0.01 М трис-НС1 - буфер билан. рН 7.4 да суспендирилади ва 30 минут 18000 об/мин тезликда центрифугаланadi. 10 г сакданган экстрактда ион алмашилиш хроматографияси ўтказилади. Сорбент ДЭАЭ - целлюлоза, актив фракциялар қўшилиб, 100 хажм сувда анализ қилинади ва лиофиликуритилади. Қуритилган порошок 4 С да сақдаланишгача сакланади. Активлиги йил давомида ўзгармади. Карам қишлоқдан эса Фосфолипаза Д Дэвидсон ва Лонг методлари билан олинади.

Технологик жараёни амалга ошириш учун қатъий қоидаларга амал қилиш керак. Бу қоидалардан энг биринчиси-жараён иложи борича паст хароратда ( $0^{\circ}\text{C}$  га яқин) бориши керак. Барча идиш асбоб ускуналар, реактивлар паст хароратгаач совутилган бўлиши шарт. бу хулосага хом ашёни турп таркиби яхшилаб ўрганилгандан сўнг келинди. Турп таркибида протеазалар ҳам мавжудлиги аниқланган. Хом ашёни майдалаш, экстракциялаш пайтида протеазалар ишга тўлиб барча оқсилларни парчалаб ташлаши мумкин. Бизга маълумки ферментлар ҳам оқсилдир. Паст хароратда ферментлар активлиги сусаяди. Бунда биз керакли ферментни протеазалар таъсиридан саклаб қолишимиз мумкин.

Асбоб ускуналар ва реактивлар:

- 1.ўлчамли колбалар
- 2.центрафуга ЦПН-1
- 3.Копрон фильтр
- 4.РН метр
- 5.ФЭК-56 ёки СФ-16
6. Қирғич
- 7.Бура- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  19.068 гр
- 8.борат кислота  $\text{H}_3\text{BO}_4$  12.37 гр
- 9.Чўктирувчи реагент - $10^{\circ}\text{C}$  гача совутилган ацетон
- 10.Бидистилланган сув -1 литргача.

Иш жараёни.

1.Карам баргидан ФлД ажратиб олиш мақсадида экстракция учун эритма тайёрлаш.

Ишнинг бориши ФлД ни хом ашёдан экстракция қилиш учун биз 0.05 М бура эритмаси ва 0.2 М бор кислотасидан иборат, РН8.2 бўлган борат буфери тайёрлашимиз керак.

$$0.05\text{M } \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O} = 0.05 \cdot 381.37 = 19.068 \text{ гр}$$

1 литр тозаланган сувга

$$0.2\text{M H}_2\text{BO}_3 = 0.2 \cdot 61.83 = 12.37 \text{ гр}$$

1 литр тозаланган сувга

1 литр борат буферини тайёрлаш учун 350 мл 0.05M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  ва 650 мл 0.2 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$  эритмаси керак бўлади. Тайёр борат буфери бор кислота ёрдамида  $\text{pH} 8.2$  гача етказилади.

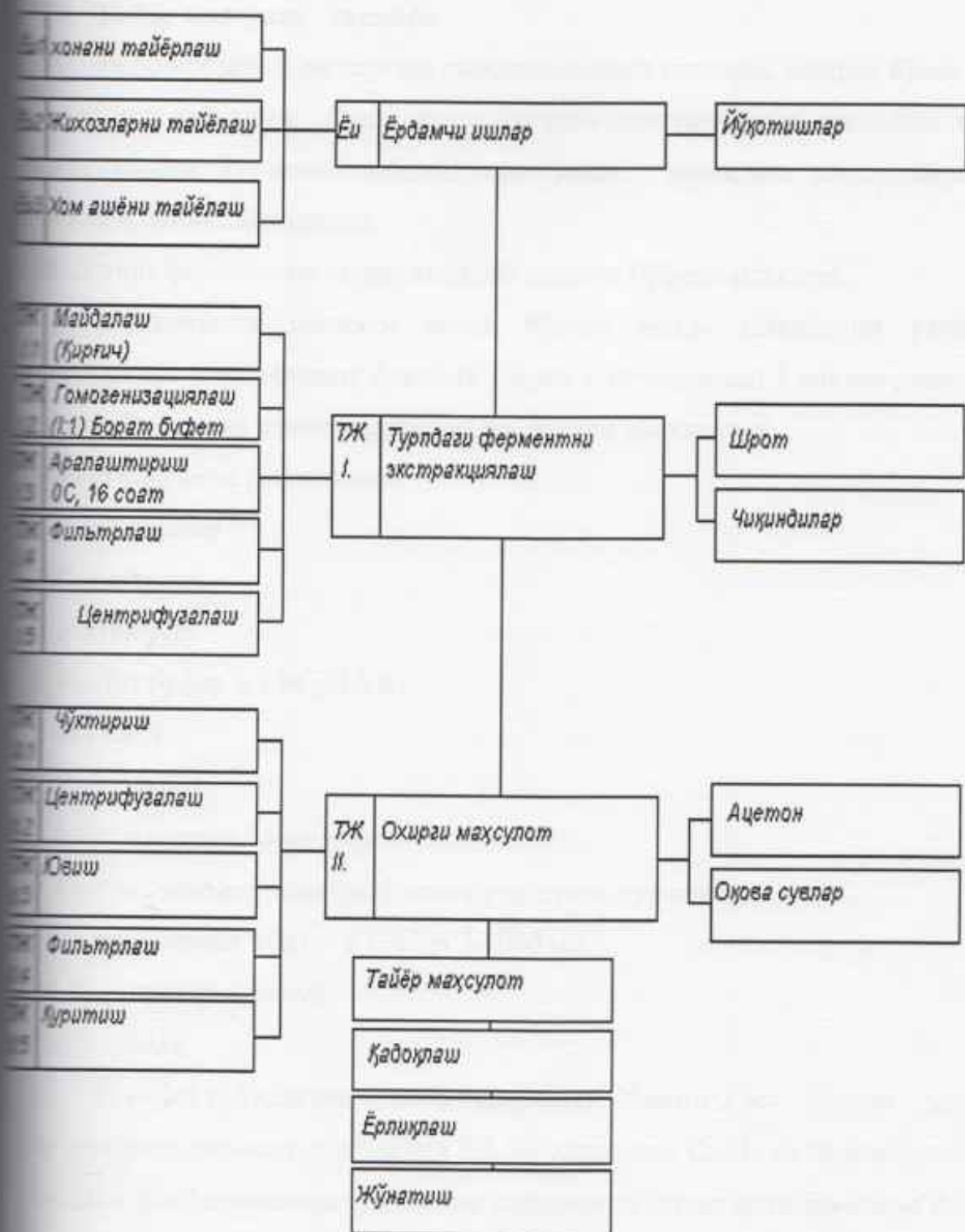
2. Карам баргидан фосфолипаза Д ферментини ажратиш олиш учун экстракциялаш.

Ишнинг бориши. 100 гр турпни қирғичдан ўтказиб  $\text{pH} 8.2$  (1:1) 0.1 M борат буфери қўшилади. 10 дақиқа гомогенизацияланади. Экстрактни аралаштириб турган ҳолда 1 кечага совуткичда қолдириш лозим.

Экстракт капрон орқали филтрланади ва  $0^\circ\text{C}$ да 10 дақиқа гомогенизацияланади. Экстрактни аралаштириб турган ҳолда 1 кечага совуткичда қолдириш лозим.

Экстракт капрон орқали филтрланади ва  $0^\circ\text{C}$ да 10 дақиқа 5000 айл/мин центрифугаланади. Супернатантга 2 қарра кўп карам  $-10^\circ\text{C}$  гача совутилган ацетон қўшилади ва  $-10^\circ\text{C}$ да музхона камерасига 1 соат қолдирилади. 1 соатдан кейин кўп миқдордаги ацетон декантация усули билан йўқотилади. Чўкма  $0^\circ\text{C}$ да 10 дақиқа центрифугаланади. Чўкма қуритилади, олинган куруқ фермент қуқуни манфий ҳароратда сақлашга қолдирилади. (13).

### 2.3. Фосфалипаза Д ферментини олиш технологик схемаси



## 2.1 Тайёр махсулот таснифи

Фосфолипаза Д оқ сарғиш порошок холида олинади. Камроқ бўлса ҳам ўзига хос хидга эга. Сувда яхши, органик эритувчиларда эримади. ФлДнинг асосий кўрсаткичларидан бири унинг активлиги холин ажратиб чиқиши бўйича аниқланди.

ФлДнинг фаоллигини холин ажратиб чиқиши бўйича аниқлаш.

Аниқлаш мохияти хосил бўлган модда миқдорини ўлчашга асосланган. Ферментнинг фаоллик у сули 1 мг оксилдан 1 дақиқа давомида ажратиб кирувчи халин микросомалар орқали аниқланади.

Асбоб ускуна ва реактивлар.

1.Пробиркалар

2.Пипеткалар

3.центрафуга

4.Ацетат буфер 0.1 М рН 5.6

5.1М СаСl

6.Хлороформ

7.0.005 н натрий тиосульфат

8.40мг/мл концентрали фосфолипидлар сувли суспензияси.

9.Йодли реагент 100 гр KI+15гр I-1000 мл

10 .Бидистерланган сув

Иш жараёни.

Реакция қуйидагича амалга оширилади. Хажми 2 мл бўлган ацетон буферидаги фермент эритмасига 0.5 мл хажмдаги СаСl ва бидистерланган сувдаги фосфолипидлар суммасини сақловчи субстрат аралашмаси ва 0.1 мл диэтил эфири қўшилади.

30 мин қўл билан чайқатилади. Кейин 5 мин тинч қўйилади. Аралашма 2 қатламга ажратилади. Сувли қатламдан 2 мл олиб бошқа пробиркага солинади ва устига 1 мл йодли реагент қўшилади. Аралашма музда

совутилади. Кресталли чўкма центрафугаёрдамида ажратилади.(5000 мл/мин) 2 марта совуқ сув билан ювилади ва 2 мл хлороформ билан эритилади. Холин 0.005 М натрий тиосульфат эритмаси билан титрлаш орқали аниқланади. 1 мл титрантда 0,55 мг мол холин бўлади [13].

Фаоллик улуши 1 дақиқада 1 мг оксилга тўғри келадиган холиннинг мл моллари бўйича белгиланади ва қуйидаги формула орқали аниқланади.

$$A = \frac{V \cdot 1000 \cdot 0,55}{t \cdot n}$$

Бу ерда:

t - реакция вақти, мин;

n - оксил миқдори; мг/мл;

V - титрант, мл.

$$A = \frac{23 \cdot 1000 \cdot 0,55}{10 \cdot 0,5} \approx 2500 \frac{\text{мл} \cdot \text{моль}}{\text{оксил} \cdot \text{мин} \cdot \text{мг}}$$

#### Фосфодипазаларни ўрганиш

Солинги йилларда липолитик ферментларни ўрганишга, аиникса фосфолипазларни ўрганишга тобора қизиқиш ортиб бормоқда. Бунинг ўзига асос сабаблари бор:

Биринчидан, фосфолипазлар простагландинлар биосинтезини катализ қилади.

Экинчидан, бу ферментлар субстратларни фазалар оралиғи чегарасида ҳам катализ қилади ва шу сабабдан гетероген ферментларнинг қонуниятларини ўрганишда модель бўла олади.

Учинчидан, фосфолипазлар ўзига каталитикларини - спецификлигини ва каталитик активлигини ўзгартира олади. Бу ўзгаришларга субстрат фазасига боғлиқлигини саиаб қилиш мумкин. Шунинг билан фосфолипазларни ўрганиш муҳим ўрин тутиб, ферментларни ўрганиш соҳасида маълум аҳдмият касб этади.

Маъ аше:

Барам барги

Сабоблар:

Баргич, гомогенизатор, кастрюлка, центрифуга.

Активлар:

Бура - , метилоранж. M=381.37

Борат кислотаси -

### Фосфолипаза Д фаоллигини ўлчаш

Субстратнинг парчаланиш тезлиги ёки реакция маҳсулотининг миқдори ўлчаниши, албатта маълум бир вақт бирлигидаги ферментнинг активлиги деб аталанади. Фермент активлигини ўлчаш учун албат-та стандарт шароитларга эриштирилиши керак. Оптимал рН муҳити ва субстрат концентрациясининг таъиниририлганлиги, кабиларга алоҳидда эътибор билан қараш лозим. Активликни туғри аниқлаш учун ре-акцияни бошланғич тезлигини билиш керак. [Аниқлаш калориметрик,

спектрофотометрик, флуориметрик, полиграфик ва бошқа методлар.

Бу амалга оширилади. Халқаро фермент активлиги бирлиги қи-

яс, стандарт шароитларда 1 мин давомида 1 мк моль субстратни

ўзгаришини таъминловчи фермент миқдори қабул қилинган.

Халқаро фермент миқдори бирлиги Е еки В ҳарфлари билан белги-

ланади. НИСБИИ активлик бу 1 мин да 1 мкмоль субстратни ўзга-

ришга учратувчи фермент массасига (миллграммларда) айтилади

Каталитик активлик 1 моль субстратни 1 с давомида ўзгаришга уч-

рашга олувчи фермент миқдорига айтилади. П-6 ]

Активликни аниқлашни чигит фосфолипаза Д си активлигишта аниқлаш

исолида кўриб чиқамиз. [ 5 ]

Фосфолипаза Д инициаторлар иштирокисиз ўз активлигири кўрсатмаиди.

Лецитинни гидролизловчи ферментни промоторлашда бу тажрибада БЗ-Ма еки

метиль эфиридан фоидаланилади. Фермент активлиги аниқланадиган муҳитда



иши ёрдамида ҳам олиш мумкин. [7].

Фосфолипаза Д 108-Ф сортли пахта чигитидан ДЭАЭ -, целлю-лоза сорбенти билан ион алмашилиш хроматографияси методи билан ажратиб олинди. Активаторлар БЗ-Ма ва эфир билан фермент активлиги Даусон ва Хеминтон методи бўйича аниқланди. Каламуш жигар митохондрияларига фосфолипазалар таъсирини  $\text{NaOH}$  - оксидаза активлиги ўзгариши бўйича аниқланди. Фосфолипаза Д активаторлар сиз лецитин гидролизини катализламаиди. Эфир иштирилиши билан ре аюдогкетати ва солиштирма активлик 700 бр лк тенг.

БЗ-Ма эффектлик активатор бўлиб, унинг иштирокида солиштирма активлик эфир активаторлигига караганда 5.3 марта ошадид. Силикагель ҳам эфирга нисбатан яхши активатор бўлиб, унинг иштирокидаги солиштирма активлик қўшилган силикагель микдорига таълиқ бўлади. 200 мг силикагель қўшилса, солиштирма активлик 200 брлк га тенг бўлади. Фосфолипаза Д қўлланилган активаторларга боғлиқ равишда турли рН оптимумга ва металл ионлари билан турли даражада активланади. БЗ-Ка иштирокида гидролиз реакция максимал тезлиги 45 С да, силикагель иштирокида эса 30 С да таълиқга оширилади. Фосфолипаза Д-нинг эфир билан активацияси икки валентли ионлар иштирокидагина мумкин. [ 7 ].

Фосфолипаза Д катализ килувчи, лецитин гидролизи реакцияси параметрлари.

Ионлари иштирокида фермент активлиги чанган. Бунда  $\text{Ca}$  ва иштирокидаги фермент активлиги ба иштирокидаги фермент активлигиди икки баробар кўп. Силикагель иштирокида фермент  $\text{Mg}$  ионларисиз ҳам юқори активликка эга. Лекин  $\text{Co}$ . ионлари қўшилса, активлик 1.5 баробар ошади. Активатор қулланганда ферментлар фарқига рН оптимуми ҳам таълиқлади. Эфир активлигида фосфолипаза Д рН 5.6 да юқори активликка эга-булади. Силикагель иштирокида эса рН оптимуми яна ҳам таълиқлади, аммо рН 5.6 да активлик юқори бўлиб 1800 брлкка тенг бўлади.

Баридаги натижаларга қараб, фосфолипаза Д нинг асосии эиг биологик кўрсаткичлари активаторларга боғлиқ равишда ҳар хил бўлади. Бундан ташқари реакцияни бориш тартиби ҳам ҳар хил. Бунингдек фосфолипаза Д катализлаидиган реакциянинг кинетикасидаги ўзгаришлар фақат активаторнинг химиявии табиатигагина боғлиқ бўлиб қолмай, ферментнинг ҳолатига ҳам боғлиқдир. Ацар фосфолипаза Д нинг эфир активаторлигидаги активлиги ферментнинг концентрациясига боғлиқ бўлмаса, БЗ-Ма қўлланилганда ферментнинг фаъолияти реакцияни ингибирлади, силикагель қўлланилганда боғлиқлик мураккаб кўринишга эга бўлади.

Берилган активаторларнинг энг яхшиси силикагель. Чунки активаторлар иштирокисиз олинган натижаларга силикагель иштирокидаги яқинроқ.

Фосфолипаза Д нинг барқарорлигини ошириш методлари

Турли денатурацияга учратувчи агентлёрга барқарорликни ошириш амалии ва назарии аҳамият касб этади. Барқарорликни назарии тасвирлаш бир томондан биоорганик катализаторларни кенг қўллаш мумкинмасини ҳал этса, бошқа томондан биологик макромолекула функциялари ва структуралар орасида ўзаро боғлиқликни чуқурроқ тушушфга имконият беради.

Солинган йилларда ферментларни барқарорлаштириш бўйича яхши натижаларга эришилапти.

Фермент барқарорлигининг миқдории х&ракатеристикаш.

Фермент барқарорлиги берилган шароитларда ўзининг каталитик активлигини аниқлаш хусусияти бўлиб, биологик макромолекуласгарш объектив физик-химик характеристикаси ҳисобланади ва полимер гели шаклида ёки ташувчи. юзасида, эритмадаги ўр&б турган қисмлари ўзаро таъсир табиатисифатида ва фермент структураси сифатида аниқланади.

Барқарорликни миқдории характеристикаси бўлиб турли кат&иш&гёр таъсир олинганда. Кўпчилик ишларда фермент барқарорлиги Кин фермент

Инактивацияси тезлик константаси сифатгёда характерланади. Бирок фермент инактивацияси биринчи даражаси эмас. Чунки текширилаётган ферментлар гетероген ва хар хил Кин эга бир канча францияларга эга паралел тартибли стадияларга эга бўлган фермент инактивацияси орақаблишдадир. Шунинг учун турли эмпирик параметрлар қўллан^лк- [8]

Маълум инактивацияси тезлиги константаси.

Фермент активлигининг 2 марта камаиш вақти.

Маълум температура еки денатурацияловчи агаг билан инкубация қилингандаги маълум вақт ўтгач ўлчанган фермент қолдиқ активлиги.

Ферментнинг барқарорлигини миқдории характеристикаси бўлиб, маълум шартлардаги (температура, рН ва муҳит таркиби) инактивация тезлик константаси ҳисобланади. Инактивация механизмига боғли равишда. Биринчи, иккинчи ёки аралаш тартиблигини га эга бўлиш мимкин. Инактивация тезлиги константаси температурага боғлиқлиги учун, температураларнинг кенг интервалида Кин ўлчаш фермент барқарорлигини характеристикаси тўлиқроқ бўлади.

Маълум қўлланиладиган ферментатив преиаратлар учун уларнинг характеристикаларда қўллашдаги ва аниқлашдаги барқарорлиги кўрсатилади. Биз ферментларнинг температура, рН, сирт актив моддалар в; баъзи химиявий агентларга бўлган барқарорлигини кўриб ўтамыз.

Фермент барқарорлигини миқдории раҳолаш. Фермент барқарорлигини ошириш -бу фермент инактивацияси тезлиги константасини ка-майтирадиган фермент физик-химиявий хоссаларини мақсадли тартиришдир. Барқарорликнинг эффеқтини баҳолаш учун маълум температурд; даги модификация қилинган ва олдинги фермент  $K_{0.5}$  сифатида текшиштирилади. Хар қандаи фермент К температурага боғлиқ ва полимер шартларга киритиш, иммобилизация, эритма тартибини ўзгартириш, химиявий

модификация ва ҳар қандаи ферментга таъсирлар катта ёки кичик даражада  $K$  ва температуралар боғлиқлигига таъсир этади.

Шунинг учун барқарорлик миқдори эффе́кти температура ўзгариши билан ўзгаради. Кий катталиги инактивация процесси активация-си эркин энергияси билан аниқланади: [8] катталиги қанча катта бўлса, фермент барқарорлиги шунча катта бўлади:

Катталиги термоинактивация процесси активация энергияси  $E_a$  ўлчаш орқали аниқланади Фермент барқарорлигини миқдори баҳолаш. Фермент барқарорлигини ошириш -бу фермент инактивацияси тезлиги константасини ўзгариштирадиган фермент физик-химиявий хоссаларини мақсадли ўзгариштиришидир. Барқарорликнинг эффе́ктини баҳолаш учун маълум температурадаги модификация қилинган ва олдинги фермент  $K$  си солиштирилади. Ҳар қандаи фермент  $K^{\text{температура}}$ га боғлиқ ва полимер гелга ўзгариштириш, иммобилизация, эритма тартибини ўзгариштириш, химия-

модификация ва ҳар қандаи ферментга таъсирлар катта ёки кичик даражада  $K$  ва температуралар боғлиқлигига таъсир этади. Шунинг учун барқарорлик миқдори эффе́кти температура ўзгариши билан ўзгаради.  $K_{\text{ин}}$  катталиги инактивация процесси активацияси эркин энергияси билан аниқланади: [8] катталиги қанча катта бўлса, фермент барқарорлиги шунча катта бўлади:

Катталиги термоинактивация процесси активация энергияси  $E_a$  ўлчаш орқали аниқланади:

Ферментнинг ҳақиқий ва тахминий барқарорлиги.

Иммобилиланган ферментларнинг барқарорлиги ҳар доим ҳам ҳақиқий барқарорлик булавермаиди. Бундай тахминий барқарор ферментлар амалиётда фермент препаратлари одишда фоидалидир. Фермент тахминий барқарорлигининг тахминий ҳолларини кўриб чиқамиз.

Фермент - гетероген препарат бўлиб. Ҳар хил барқарорликка эга бир қанча фракциялар сақлаган ҳол. Бу ҳолда иммобилизация процессида барқарорлиги юқори фракциялар инантивацияга учраи-ди. Иммобилланган фермент эса барқарорлиги юқори фракцияларни сақлайди.

Ташувчининг юқори концентрацияларида фермент иммобилизацияси.

Агар фермент солиштирма концентрацияси жуда юқори бўлган ташувчиларни қўласак, субстрат фермент билан тўлиқ тўйинади.

Иммобилланган ферментларнинг барқарорлиги ва активлигини таъминлашда диффузион хатоликлар.

Иммобилланган ферментнинг катталиги специфик ёки специфик билан ферментнинг активлигини аниқлашга биғлиқ равишда турлича бўлади. Микроковсулалар ёки ташувчилардаги фермент

юқори концентрациясида ва диффузион қийинчиликлар мавжудлигида специфик субстратларни қўллаш термоинактивация процессида активлигини ўзгаришида ва ферментнинг активлигини ўлчашда ёмон натижалар кўриниши мумкин. Иммобилланган ферментнинг барқарорлигига ички ва ташқи диффузиянинг таъсирини назарий анализида ташқи диффузия қийинчиликлари биоанализатор ишлаш вақтини узоклигига ижобий таъсир этишини аниқлади. Диффузион қийинчиликлар қанчалик катта бўлса, барқарордак эффекти шунча катта бўлади.

Иммобилланган ферментнинг қайтувчи денатурацияси.

Денатурация процессидаги фермент инактивацияси тезлигининг камайиши денатурацияланган ва ўзгаришга учрамаган оксиллар ора-сидаги тенглик қийинчилиги билан боғлиқ бўлиши мумкин. Тенг-ликка эришилиши билан инактивация реакцияси тезлиги камаяди.

Ферментлар инактивация механизлари.

Ферментлар инактивациясини асословчи турли процессларни таъсир келтириш каттагина гуруҳга бўлиш мумкин:

1. Физикавий ёки физика-химиявий инактивация процесслари.

1.1. Инактивацияга олиб келувчи химиявий! процесслар.

1.1.1. Иончи гуруҳга қунидаги процесслар қиради:

1.1.1.1. Сирт актив моддалар, органик эритувчилар, тузларнинг юқори концентрацияси, рН, - температуралар таъсирида конформацион ички молекуляр ўзгаришлар бўлиб, улар оксил гиобуласининг алоҳида фрагментларини ажратиб олишнинг қатъийлигини ўзгариши ва актив марказнинг структурасини бузилишига олиб келади.

1.1.1.2. Алоҳида ферментлар диссоциация-процесси; бўлиб, улар комплекс ферментларни ҳам диссоциация процессига учратади. Бу гуруҳга активлиги иўқ диссоциациялар ҳосил қилувчи фермент асоодия процесси ҳам қиради.

1.1.1.3. Ферментларнинг ионлар, паст ва юқори молекуляр бирикмалар билан комплексларни ҳосил қилиб, актив марказ структурасини бузади.

1.1.2. Ферментни химиявий инактивацияси.

1.1.2.1. Ферментлар молекулалараро ўзаро таъсир процесслари каби бўлади. Автолиз, автокатализга ферментнинг функционал гуруҳлари учради.

1.1.2.2. Ферментлар барқарорлиги механизлари.

1.1.2.2.1. Фермент барқарорлиги берилган шароитларда фермент структу. рақисининг муҳим физика-хидак характеристикаш бўлиб, фермент барқарорлиги фермент структурасининг ёки уни ўраб турган микромуҳитни иуналтирилган ўзгариши бўлиб, инактивация процессининг активация баръерини ошишга олиб келади.

1.1.2.2.2. Фермент структураси турли барқарорлик ва каталитик хосса- ларга эга алоҳида конформацион нисбий кнцентрациялари функ. ционаллари ҳисобланади. Ферментни ўраб турган микромуҳит, фермент модификацияси ўзгариши фермент конформерлари нисбий концентра-

ларини ўзгартиради. Натижада фермент барқарорлиги ва структураси ўзгаради.

Фермент полипептид занжирининг конформацион ҳаракатчалгини чеклаш бу барқарорлаштиришнинг умумии принципларидан бири бўлиб, кенг қўлланилади. Ички молекуляр тикиш, ташувчи билан ковалент бўлмаган тикиш, концентрланган гелга киритиш ферментни барқарорлашга олиб келади.

Молекуланинг умумии ёки локаль электростатик энергиясини ўзгартириш.

Фермент актив гуруҳларини химиявий моификациялаш, полиэ-лектролитлари билан ферментлар комплексини ҳосил қилиш, ташув-чиларга иммобиллаш усули амалга ошади ва Монизацион ҳолатини ўзгартириб, фермент мобуласини ҳаракатини чеклайди.

Керак бўлмаган диссоциация ва ассоциация ў процессларини тўхтатиш актив изомерлар ёки актив ассоциатларда ички молекуляр конформацион ўзгаришлар орқали, ҳамда ферментни кофактор билан ковалент тикиш орқали амалга оширилади. Ковалент иммобилизация керак бўлмаган ассоциация процессларини тўхтатади. Диссоциация процессига ташувчиларнинг таъсири тархил бўлиб, кўп ҳолларда иммобилизациядан сўнг актив ассоциатларнинг диссоциация тезлиги ўзгармади. Бироқ диссоциацияланган молекулалар бири-биридан узоклашмади, шунинг учун ассоциация эффеktiv тезлиги ўсади.

Денатурацияга учратувчи агентлардан ферментларни химоялаш турли иўллар билан амалга оширилади. Бундай агентларга рН, органик эритувчилар, металл ионлар, кислород, ташувчи гуруҳларнинг акс таъсири киради.

Ферментларни химоялашнинг 2 та асосии принципларини ажратиш мумкин:

- а) Денатурацияловчи агент ва ферментни бир-биридан ажратиш
- б) Денатурацияловчи агентнинг таъсиридан ферментни модификация бўли билан химоялаш

системаларда имобиллашда ва модификациялашда фермент барқарорлигига кўрсатилган механизмлардан биригина жаъсир эт- бир қанча механизмлар таъсир этади. Одатда ферментга унинг барқарорлигини белгиловчи бир қанча факторлар таъсир этади. Ҳар бири факторни топиш, факторларнинг ҳар бирини ролини тушунти- осон масала эмас ва уни ечиш қийин. Адабиётларда конкрет ферментнинг барқарорлик механизми келтирилмаган.

### Бивалент ўзаро таъсирларда ферментлар барқарорлиги

Неорганик ионларнинг таъсири. икки валентли металл ионлари ферментларни барқарорлаштиришда кенг қўдланилади. Кальцийнинг барқарорлаштирувчи эффекти энтальпиянинг ошиши билан эмас, балки активация

энтропиясининг камайиши билан изоҳланади. Термофилъ микроорганизмлар плазмаларини барқарорлигини ионлари иштирокида ошади. ионлари пероксидаза структурасини барқарорлаштиради. Олимлар фикрича ионлари анионлар билан икки молекуляр комплекслар ҳосил қилиб, ферментни барқарорроқ кон-формацияга ўтказилади. Шишага имобилланган трипсиннинг денатурацияси ионлари иштирокида камайиб ва ренатурация тезлиги ошади.

Металл катионлари билан ферментни барқарорлаштириш специффик методдир. Масалан: Текширилган  $Mg$  ионларидан  $Co$  иони-гина  $oC$  — лактозидази барқарорлаштиради. Ферментнинг паст молекуляр специфик конформациялари билан барқарорлаштириш рқскл структурасини барқарорлаштириш методларидан биридир.

Барқарорликни ўзгартириш сабабларидаи бири ферментнинг ле-ганЭлар билан комплекс ҳосил қилишидир.

Катионларнинг барқарорликка таъсири фермент ўраб турган сув структурасини ўзгартириши, зарядланган оксил Глобуласи фрагментлари орасида электростатик таъсирларва уларнит сув эритмасидан оксизл глобуласига тортилиши билан

сунтирилади. Тузларнинг концент раланган эритмаларининг таъсирида гидрофоб боғларнинг куча-ишига , бу эса оксил глобуласининг барқарор шиформаиясига олиб келади. Булар ферментлар барқарорлашувига сабаб бўлади.

Ингибиторлар, субстратлар ва коферментлар билан комплекс ҳосил қилиши коферментлар апоферментлар билан комплекс ҳосил қилиб фермент барқарорлигини оширади. НАД нинг барқарорлаштириш хос-саси азогольдегидрогеназага эритилган ҳолда ҳам, сефар.озда иммобилланган ҳолда ҳам кўринади. Етмак аппопероксидазасиниг, простетик гуруҳ-гемин билан комплекс ҳосил қилиши оксил барқарорлигини 30 мартаба оширади.

Рибонуклеаза А нинг специфик ингибиторлар-нуклеотидлари билан боғланиши изотермик барқарорликни оширади. Турли фермент-лар фаълиятида кофакторлар, ингибиторлир ва субстратлар билақ боғланишлар денатурацияловчи таъсирларга барқарорликни оширади.

#### Органик бирикмаларнинг таъсири

Самеоллар (глицерин, этиленгликоль), углеводлар (сахароза) органик ферментни . барқарорлаштиришда кенг кўлланилади. Барқадорлик эффекти оксиллар спецефик комплекслари ва органик моддалар комплекслари ҳосил бўлиши, водород боғлар ҳосил бўлиши ва фермент ўраб турган сувнинг структураси бузилиши билан тузунтирилади. Мочевина таъсирида азанинг қайтмас инактивацияси диметилсульфоксид иштирокиДа секинлашади. Эндор диметилсульфоксад иштирокида бафқарорлик кўп эффектаи бўлади.

КарбоксшШтидазанинг термоинактивацияси 40-80 % глицерин ва қандлар фаълиши билан тўхтатилади. Мочевина, акриламид химот-рипсинни қайтувчи денатурацияланган фбрмага ўтказиб, қайтмас термоинактивациядан сакланди.

Оксиллар, полиэлектрولитлар ва бошқа эритилган полимерлар таъсири

Бу ҳолларда альбумин, поливинилпирролидон ва бошқа поли-винил полимерлар, полисахаридлар, полиэтиленамин, липосамалар каби табиини ва синтетики полимерлар эффектив барқарорлаштирувчи бўлади. Полиэлектрولит ва оксиллар билан ферментларни барқарорлаштириш механизми бир қанча сабаблар билан тушунтирилади. Фермент-полиэлектрولит комплекси ҳосил қилиши ферментнинг яқиндаги рН ва фермент барқарорлиги рН ни ўзгартиради. Бошқа томондан фермент-полиэлектрولит комплексида денатурацияловчи агентларнинг локал концентрацияси камийиши мумкин.

Ферментнинг барқарорлиги эффекти полимерлар билан комплекс-ҳосил қилишда ҳар доим ҳам полимер химоя таъсири ва микромуҳит ўзгариши билан тушунтирилмади. Кузатилаётган эффект юқорида кўрсатилган механизмларни қўллашда кутиладиган натижа бермади. Фермент ва полимер комплекси ҳосил қилиниши фермент структурасининг ковалент бўлмаган боғлар ҳосил қилиниши билан барқарорлиги оширилади. Полиэлектрولитлар ва оксиллар билан барқарорлаштириш асосий сабаби полимер билан ўзаро таъсир натижасида фермент структурасининг ўзгаришидир.

Оксилли мембрана ва эримайдиган полимер гелга киритиш

Ферментни барқарорлаштириш механизмлари ферментларни эримайдиган полимер гелга киритганда ҳам яхши натижа беради. Бунд силикагель, целлюлоза, ион алмашувчи смолалар-ва бошқа органи ва неорганик моддаларга фермент адсорбция қилинади.

Химотрипсин ва трипсинни полиакриламид гелга (ПААГ) киритилса, гел қўлдорлиги 40% га, етмагунча фермент термостабиллиги ўзгармади. ПААГ 57% бўлса,  $K_{0.5}$  катталиги икки даражага камайди. ПААГ концентрацияси ошиши билан фермент молекуласи ҳаракати чекланади ва натижада термостабиллиги ошишади.

Хори концентрацияли гелъ ячеикаларидаги ферментни ўраб турган микромухит таркиби ва хоссалари ўзгаради ва сувли эрит-мадагидан фарк килади. Бу ферментни микро ўраб турган мухит билан ўзаро таъсирининг термоустабиллигининг ўзгаришига олиб келади. Цолимер гелъ ферментни микроорганизмлар таъсиридан ҳам сақлайди. Бу ҳам биокатализатор умрини узатиради.

Амино-ацил-Т-РНК-синтетазалар барқарорлигини ошириш учун сақлаш шартларида сефдекс ва биогельга киритилади ва препаратлар фосфор (V) оксидида куритилади. Куритилган гелларда фермент активлиги бир неча оилар давомида ўзгармаидю Бунда барқарорлик сефадекс -ОН группалари ва фермент шартларидаги водород боғлар ҳосил бўлиши натижасида ҳосил буган.

С=25 сефадексдан С=5 сефадекс кўчлироқ барқарорлик ҳосил килади.

Ферментни оксил мембраналарига киритиш унинг барқарорлиги ва кучли таъсир килади. Масалан: аспартатаминотрансферазанк мембранасига киритилса, 5 ои давомида 4 С хароратда активланганда унинг активлиги ўзгармаиди. Эритмасида эса бу фермент 15 кун давомида 25 % активлигини йўқотади.

Ферментлар адсорбцияси.

Ферментларни органик ва неорганик тўшувчиларга адсорбция

қилинганда оксиллар ва ферментлар структураси, активлиги ва барқарорлигига сезиларли таъсир кўрсатади. Аминоглиуколидаза термоустабиллиги ферментни кислота таъсирида активланган молекулар элакка ва алюминий оксидига адсорбция қилинганда ошади. Инвертазининг адсорбция иули билан конқавалин -А-сефарозда ва микрокристаллик целлюлозада имобиллангандё, ДЕАЕ- ва КМ- сефат шартларида электростатик ўзаро таъсирлар иули билан имобилланган. Адсорбцияланган, фермент термоустабиллиги 8 марта ошади, ДЕАЕ ва КМ-сефадексга имобилланган фермент эса эритмадаги; а нисбатан камроқ термоустабилликка эга бўлган.

Ковалент боғлар ҳосил қилиб ферментларни барқарорлаштириш

Индиган ва эримаидиган ташувчилар билан ковалент боғлар ҳосил бўлган фермент барқарорлигига бир қанча факторлар таъсир қилади:

1. Оксил группаларининг химиявий модификацияси. Ташувчи билан ферментнинг полифункционал кўп нуқтали . ўзаро таъсирлари.
2. Фермент микромуҳитининг ўзгариши.

Бу факторлар бир вақтда ва ҳар хил иўллар билан таъсир қилади.

Химиявий модификация

Бу метод табиатда ферментлар термостабиллигини ҳосил қилишда қўлланилади. Бирламчи мутациялар, аминокислоталар таркибининг ўзгариши термостабилликни ўзгаришига олиб келади. Туцли микроорганизмлар штаммаларининг амилаза ва протеазалари термостабиллиги аминокислотатаркибини солиштирилса, термостабилликка таъсир этувчи бузи структурали факторларни аниқлашда ердан беради. Полаармас колдик ва  $\alpha$ -спирал участкалари. ҳосил бўлишига сабабчи қолдиклар фойзи ўсиши термостабилликни

қўллади. 5Н- группаларнинг эркинлигини камайтириш ҳам фермент термостабиллигини кўпайтиради.

Ферментларнинг химиявий модификацияси - ковалент иммобилизация учун муҳим этапдир.

Биофункционал агентлар ёрдамида химиявий модификация

Биофункционал агентлар ички молекуляр тикилган мономер ферментлар ҳосил қилишда қўлланилади. Глюкозооксидазанинг глутар аль-дегид билан модификацияси ички молекуляр тикилган фермент ҳосил қилади. Ушбу модификациядан (рН 7.0) инактивацияга барқарорроқ ко-фермент молекуласини инактивация билан узади ва додещильсульфат натрийнинг денатурациялаш таъсирини барқарорроқдир.

Функционал агентлар билан ишлашда фермент барқарорлик эффекти уларнинг молекула узунлиги ва ферментлар функционал гуруҳлари орасидаги масофага боғлиқ.

Оксиллар, полисахаридлар ва бошқа эрувчи полимерлар билан ферментнинг ҳосил қилган конъюгатлари

Бунда эрийдиган оксиллар ва полимерлар билан ферментларнинг модафикациялари барқарорлаштирилган эрувчи фермент олишда қўлланилади. Бундаи фермент ва юқори молекуляр бирикмала модиявий модификацияси бир қанча ҳолларда матрицанинг акс таъсирларидан сақлаиди. Бундаи барқарорлаштирувчи оксил сифатида тез альбумин қўлланилади. Пероксидаза-альбумин олигомер шартмалари 10-100 марта яхшироқ барқарорликка эга.

Иммобилизация қилинган оксил ва полимер гелга ферментларни

ковалент киритиш Оксиллар ва полимер гелга ферментларни ковалент киритиш билан комплементар юзали ташувчи ҳосия қилинади. Бундаи фермент киритиш билан ташувчи ва оксил кўп нуқтали ўзаро таъсир таъминланади. Оксидоредуктазалар, трансферазалар, изомеразалар, лиозалар, гидролазалар имобиллангандан сунг 30-80 % активлиги-ни сақлаиди, бунда имобилизациянинг термостабиллиги тезда ошади.

Иммобилизация эффектени 2 та асосии сабаб белгилаиди:

1. Оксил структурасининг мустаҳкамланиши.
2. Стабилизатор-оксилнинг юқори лока концентрацияси.

Органик ва неорганик ташувчиларда ковалент имобилизация

Ташувчининг юза микроструктураси, адсорбция хоссаси, диффузион тартибчиликлар каби специфик хоссалаи имобилланган фермент хоссаларини экспериментал аниқлашга ва барқарорликка сезиларли таъсир кўрсатади.

Полимер матрица билан оксилнинг физик ўзаро таъсири иммо- билланган ферментларнинг барқарорлигини аниқловчи муҳим фактор- лардан биридир.

Оксил-типи ва полимер матрица табиатига боғлиқ равишда ферментларни иммобилизацияси унинг барқарорлигини ошириши билан бирга тушириб юбориши ҳам мумкин. Фермент ва матрицанинг ўзаро таъсири иммобилизацияда ферментнинг конформациясига кучли таъсир қилади. Кўпчилик иммобилланган ферментлар учун термостабил- ликни юқори бўлиши характерлидир. Бунга сабаб ташувчи ва фер- мент орасида кўп нуқтали ўзаро таъсирларнинг вужудга келиши билан тушунтирилади. Бироқ бир қанча ҳолларда ферментлар ва си- стемалар ҳосил қилган иммобилланган фермент дестабилизацияга учрашиб келади.

Солинган йилларда ферментларнинг [ 12 ] барқарорлигини ташувчиларни қўлламасдан ошириш масаласи муҳимлиги кўрилмоқда. Масаланинг бундай қўйилишининг бир қанча сабаблари бор.

Биринчидан, ферментатив процессларда макромолекуляр айланишлар ва қўлламайдиган субстратлар қўллашда полимер ташувчини қўллаш актив марказнинг боғловчи ва реакцион ҳодисасини тушира- ди.

Экинчидан, ферментларни терапевтик агентлар сифатида қўллашда ташувчининг борлиги макромолекуляр субстратлар ва хужайра мембраналари рецепторлари билан ўзаро таъсирида ўз таъсирини кўрсатади.

Полимер ташувчиларни қўлламасдан фермент барқарорлигини ошириш методларининг ичида биофункционал реагентлар ёрдамида; оксил глобуласига таъсир қилувчи молекуляр тикиш киритиш методи бир қанча афзалликларга эга. Бундай агентлар полипептид занжиринин алоҳида қисмларини бириктириб, фермент конформациясининг бузилишига иўл қўймайди.

Бундан иўл табиатдаги жуда кўп олигомер ферментларининг барқарорлигини оширишда перспектив иўл бўлиб, конформацион

активациянинг биринчи стадияси полипептид занжирининг алоҳида қисмларининг айланишига боғлиқ.

Ўсимлик фосфолипаза Д сини силикагель ёрдамида активлаш.

Фосфолипаза Д ўсимликларда кенг тарқалган бўлиб, шунингдек чигитдан олинган фосфолипаза Д ҳам кенг тарқалган ва ўрганилган. Ўсимлик фосфолипазалари тозаланган фосфолипидларни яъни гидролизлаиди. Тухум-сариғи, азолектин, леліштин ва бошқалар то-заланмаган фосфолипидларга ҳисол бўла олади. Аммо тозаланган, фосфолипидларнинг гидролизини катализ қила олмайди. Тозаланган фосфолипаза Д нинг силикагель иштирокида тозаланган фосфолипид-ларни гидролизини катализ қила олишини қуйидаги ҳисолда кўриў' чиқамиз. 9 ] Силикагель билан активлаик-ташувчига сорбцион имлобиллашга асосланган. Бошқа манбаалардан олинган фосфолипа-залар учун ҳам бу эффект мавжуд бўлиб, силикагель инициаторлиМ қилини бажарадиган шароитлар бошқа ўсимликлар фосфолипазалари учун ҳам ишлаб чиқилган. [ 9 ]

Текшириш методлари:

Маидаланган ўсимлиюхом ашёсини 10 Қисм 0.01 М трис-НС1 буферида суспендрланади. рН 8.5 шароитда РТ-1 тўкима маидалагичда гомогенланади. Гомогенизация^ 5 минут' ИдадиЛ Ч 3 соат давомида 5 С хароратда аралаштирилади. Сўнг 15 минут давомида 6000 об/мин да центрафугаланади. Супернатантга 2 қисм, ацетон кўшилади. Чўкма олдин деконтация қилиб, сўнг 15 минут 2000 об/доин тезликда центрафуга қилиб ажратиб олинади. Олинган фракцияга совутилган ацетон кўшилиб, Бюхнёр воронкасида қурит, . тилган ацетон билан ювилади ваҳавода қуритилади. Фосфолипаза Д " ацетонли порошокни" 0.01 М трис-НС1 буферда рН 7.5 шароитда, 5 С да 15 минут давомида экстракция қилиб олинади ва, 8000 об/мин тезликда 15 минут давомида центрафуга қилинади. Фермент активлиги 30 С да қуйидагича аниқланади: .

абстракт аралашма 12.5 мкмоль тухум лешдани сақлаиди 125 мкмоль CaCl<sub>2</sub> ни 15 мл ҳажмда сақлаиди. Бу аралашманиси ликагель навескага кўйилади, сўнг 5.6 бўлган 1,8 мл 0.1 н натрий ацетат буфери кўшилади. Реакцион муҳитга 12 мл фермент, 1 эритмаси кўшилиб гидролиз қилинади. 30 минут ўтгач 2.5 мл 10<sup>-4</sup> роформ кўшиш билан гидролиз тўхтатилади. 5000 об/мин тезликда 10 минут центрифуга қилинади. Контроль тажрибаларда силикагель-сиз реакцион муҳитга 0.3 мл диэтилэфир кўшилади. Бу ҳолда диэ-у тилэфир активатор шини бажаради. 1мг оқеил ҳисобида 1 минут" давомида ажратилган лецитиннинг нмоли солиштирма активлик аниқланади. Хроматографик тоза лецитин Сингилтон методи бўйица тухум саригидан олинади. Тозалик даражасини ЮКХ силикагель С да хлороформ-металл-сув (65:25:4) системасида бошқарилади. Очилти рувчи бўлиб иод буғлари ёки Драгендорф реактиви ҳисобланади! Тозаланган лецитин хлороформда -12 С да сақланади.

#### Натижалар ва уларнинг тахлили

Фосфолипаза Д<sub>1п</sub> ушга шароитларида активаторларсиз фермент активлигини намоён қилмайдиган ферментлар сарасига киради: Чигит фосфолипаза Д ферментининг активатори сифатида силика-гель ишлатилади. Силикагель ёрдамида эришилган солиштирма активлик гранулалар ва адсорбентлар размерларига ҳам боғлиқ.

Фосфолипаза Д солиштирма активлигининг силикагель миқдори-га боғлиқлиги қуйидагича: [ 9 ] .

Силикагел	Гранулалар улчами	Активлиги
йук	—	5* .
50	60 дан кичик	150
50	60-100	50
50	100-160	15,0

100	160 дан кичик	300
200		540
300		720
400		500

Вақтида гранулалар қўлланилса ўлчанаётган активлик юқори д катта гранулалар қўлланилса муҳитдаги силикагель миқдори оширилиши шарт.

Силикагель иштирокидаги фосфолипаза Д активланиши адсорбция натижасидир. Адсорбцияланган ферментдан активлигидан-ташқари бошқа ферментатив характеристикалари билан ҳам фарқланади. Силикагель активатор сифатида бошқа активаторларга нисбатан биридан устунликка эга. Диэтил эфир активаторлиги учувчанлиги хил хил юзига унинг юқори ва нормал ҳароратларда текширилишини кийин-киин иштиради. Додecilсyльфат-Ма субстратнинг физик ҳолатига таъсири кичик, унинг фермент билан ўзаро таъсирига ҳам таъсир этади. Ба-ҳарилган кўпгина текширишлар натижасида силикагелнинг чигит фосфолипаза Д сидан ташқари бошқа ўсимликлар фосфолипажа Д син-сим активлаши маълум бўлди.

Бурли ўсимликлар фосфолипажа Д лари активлиги [ 9 ]

Силикагель активатор сифатида диэтил эфирга нисбатан фермент активлигини ўзгариш юзига чиқаради.

Фосфолипаза Д нинг силикагель иштирокида активлигини аниқ-лашда муҳитдаги оптимал системани кўрсатиш мумкин.

30 С да 6 соат давомида ишлов берилган КСК силикагель 300 мг миқдорда олиниб пробиркага жоилактирилади. Силикагель гранулалари размери 100-160 мкм бўлади. Унга 0,5 мл лецитининин Л 0,1 М натрий-ацетат буферидеги суспензияни қўйилади. Сўнг рН<sup>н</sup> 5.6 ва 0.025 мл бўлган фермент эритмаси қўшилиб, умумий ҳажм 2,5 мл га ўша буфер билан етказилади. Прсыюркани 30 С да аралаштириб. 30 минут давомида инкубация қилилади. Реакцияни-2,5 мл спиророформ қўшиш билан тўхтатилади ва холин- аниқланади.

Қида турли адсорбентлар иштирокида фосфолипаза Д нуюид  
ИСБИИ активлиги ўлчанган натижаларни жаДвал кўринишида келти-  
шимиз мумкин.

#### Тигит фосфолипазаси

Турдан ажратиб олинган фосфолипаза Д нинг хоссалари

(АрПапиз заиуиз)

Фосфолипаза Д ни турдан ажратиб олишда юкоридаги метод-  
лардан фоидаланамиз. [ 5,11 ]

Олинган ацетонли порошок лиофиль кўритилади ва фоидаланишгача 4 С да  
сукуланади.

Фосфолипаза Д нинг нисбии активлиги Фухум сариғининг фосу фоллипидлари  
массасини гидролизини катализлаш мисолида аниқлана-ди. Бунда тухум  
сариғининг рангини иуқолиш вақтини аниқлаш ор-қали фермент активлиги  
ўлчанади. Ферментнинг нисбии активлит бу 1 минут давомида 1 мк моль  
субстратни ўзгартиришга учратувчи фермент массасига айтилади.[ 6 ]

Фосфолипаза Д ферментини кам миқдорда,яъни 0,1мг миқдорда оламиз ва 1  
дона тухумнинг сариғини ажратиб оламиз, 0,1мг ферментни тухум сариғига  
қўшамизва 0,5 мин-давомида яхшилаб аралаштирамиз.Сўнг тухум сариғини  
рангининг ўчишини кутамиз.Ре акция шароитлари куидагича:1.рн8. 2.харорат  
25 с. -Бу шароит-О ларда тухум сариғининг ранги 24 соат давомида ҳам  
ўзгаради.Бун-дан биз олдинги текширишларда олинган натижаларни  
таботлаимиз.

Фосфолипаза. Д реакция иницматорларисиз ўз активлигини  
ўзгариш-қилмаиди [5]. 0,1мг ферментни 1дона тухум ёриғи ва 125 мк моль  
субстратига қўшамиз ва 30 сек даёмида аралаштириб,  
реакцияни кузатамиз, тухум сариғи 4 миндан 1сал кўпрок вақтда" ўз  
рангини иуқотади.Фосфолипаза Д тозаланмаг&n фосфолипидларнинг  
гидролизини осонлик билан катализлаиди. Лекин лецитин ва кефа-  
тинларнинг гидролизини қила олмаиди. Лецитин ва нефалин каби  
фосфоллипидлар гидролизини катализлаш учун реакция инициаторла-

керак. Инициатор сифатида ДЗ-Иа ёки этил эфир ишлатиш яхши натижа беради.

Максимумлар. Агарда рН мухитларда ДЗ-№ активаторлигида фермент активлиги текширилганда ва рН ва активлик боғлиқлик графиги чизилса, 2 та максимум ҳосил бўлади. Булар рН 7,4 ва 7,8 нукталарга мос келади. рН нинг бу мухитларида лецитиндан холин ажратиш тезлиги энг юқори бўлади, Кефалиннинг гидролизидан этаноламин ҳосил бўлиш тезлиги ҳам шу мухитда юқори бўлади. рН мухитга каталитик активликнинг боғлиқлик графигидаги иккита гах мухитда фосфолипаза Д иккита формад бўлиши билан тушунтирилади.

Юқори рН мухитда фосфолипаза Дс актив, бўлиб, лецитинни гидролизидан холин ажратиш тезлигини яхши намоян қилади. Пастроқ рН ларда фосфолипаза Дл кефалин гидролизидан активлиги юқорироқ бўлади. Шунга ўхшаш натижалар лецитиндан холин ажратиш тезлиги активатор сифатида қўллаганда ҳам

кўрилади. Агар этил эфир активатор сифатида қўлланса, рН ва каталитик активлик боғлиқлик графигида биргина максимумга эга бўламиз. Кефалиннинг гидролизидан холин ажратиш тезлиги фосфолипаза Д лари турли формалар учун лецитиндан холин ажратиш тезлиги 4,5-6,8 интервалда, кефалиндан этаноламин ҳосил бўлиш тезлиги 0,4-0,9 интервалда бўлади. Чигит фосфолипаза Дси учун 1,4-2,5 кефалин учун 0,5-1, интервалда бўлади. Бу натижалар лецитиндан холин ажратиш тезлиги кефалиннинг нисбатан лецитин учун юқорироқ.

Фосфолипаза Днинг каталитик активлигининг рН мухитга боғлиқлиги графиглари бор бўлиб, улар орасидегиларни кўриб ўтдик, [расм N13] (а, б, в, д, е)

Фермент активлигига кальций ионларининг таъсири.

Са<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ионларининг реакцион мухитда бўлиши усилликлар фосфолипаза Д ларининг каталитик эффектини намоян қилди-ради, субстрат ҳолатига боғлиқ равишда ферментни-активлаш учун етарли бўлган бу ионлар концентрацияси ўзгариб кетади. Турли фосфолипаза Дси учун ҳам бу ионлар бўлиши унинг активлигини оширади. Бу ионларга талаб маълум

даражада инициатор турига боғлиқ. Диэтил эфир инициаторлигида Са ионлари бўлиши шарт бўлса, силикагель иштирокида Са ионлари бўлиши шарт эмас. ДЗ-Иа иштирокида ҳам Са ионларисиз лецитин гидролизини кузатиш мумкин. Юмм Са қўшиш билан реакция тезлиги етарли даражада ошади. Силикагель активаторлигида Са ионлари бўлиши шарт эмас, лекин ионлари иштирокида реакция тезлашади. Кефалин гидролизини ҳам Са ионлари активатор бўлади. Бирок барча инициаторлар учун Са ионлари бўлиши шарт эмас. Албатда Са<sup>2+</sup>-ионлари реакцияни тезлаштиради. Лекин кефалин гидролизини барча инициаторларнинг ҳар қайси иштирокида мент катализ олади.

Олинган натижалардан фосфолипаза Д Са ионларисиз ҳам ишлади, лекин ферментатив парчаланish кефалин молекуласи учунгина содир бўлади, лецитин парчаланish учун эса Са ионлари концентрацияси керак бўлади деган хулоса чиқаришимиз мумкин. Демак ферментнинг кальций ионларига эҳтиёжи субстрат турига боғлиқ. Фермент тури формалари турли спецификликка эга бўлиб, Са ионлари билан турли даражада активланади.

Фосфолипаза Д нинг трансактиллаш хоссаси.

Фосфолипаза Д фосфолипидларнинг трансактиллаш реакциясини ҳам каталислаши маълум. Турли олимларнинг ферментни бу функциясини текшириш натижалари турлича. Бу натижаларга рН оптимум ва кальций ионларининг каталиктик активликка таъсири киради. Алмашиниш реакцияси учун рН оптимум 8,0 га тенг бўлиб, гидролитик реакцияси учун рН оптимум 5,6 га тенг [11].

Синтез ва трансактиллаш реакциялари учун кальций ионлар оптимал концентрациялари турлича. Чигит фосфолипаза Д учун бундай фарқлар аниқланмаган. [2] Силикагель активаторлигида эса синтез ва алмашиниш реакциялари кальций ионларисиз ҳам кетади. Лекин кальций ионлари қўшилса реакция тезлашади.

турп фосфолипаза Д хоссалари хақидаги натижалардан биз бу фермент хоссаларининг умуман олганда чигит фосфолипаза Д си хоссаларига ўхшашган хулосага келамиз.[9].

Фосфолипазанинг ўсимлик манбаларидан олинганининг хоссалари умумий ажратилган ва микроорганизм, хайвонлардан олинган фосфолипаза Д ферментдагина баъзи хоссалари билан фарқланади. Бундан 5 жадвалдан ҳам кўриб, ишонч ҳосил қилишимиз мумкин.

Турпдан Фосфолипаза Д Ферменти бизнинг тажрибаларда 3% миқдорда чиқди. 15 кг турпдан 17 Фосфолипаза 1 ажратиб олин

Силикагелга иммобилланган фосфолипаза Д хоссалари.

Фосфолипаза Д ферменти юқоридаги методлар билан турпдан ажратиб олинади. Чўктирувчи сифатида со этилан ацетонишлатилади. Чўкма деконтация 6000 об/мин тезликда центрифугаланади ва бидистилланган сувда эритилади. Олинган экстрактни икки хажм -10/- да совутилган ацетонда чўктирилади. Чўкма  $36000$  об/минда 15 мин давомида центрифуга қилинади. Сўнг минимал миқдор бидистилланган сув билан эритилади,  $18000$  об/мин да  $15^3$  мин центрифуга қилинади ва лиофиль қурилади. Қурилган порошок фоидаланишга 60 С да сақланади. Фосфолипаза Д нинг каталитик нисбий активлиги турхум сариғидан субтрат сифатида фоидаланиб аниқланади. Бунда лецитиндан холин ва кефалиндан этаноламин ҳосил бўлиш миқдори аниқлаб активлик аниқланади. Фосфолипидлар аралашмаси гидролизидида  $1$  мг. оксилга турри келган  $1$  мин давомида ажратилган маҳсулот мкмолларда активлик ифодаланади.

Фосфолипаза Д нинг иммобилланиши учун  $100-160$  м<sup>2</sup> катталиқдаги КСК маркали силикагель керак бўлади. Силикагель  $6$  соат давомида  $180$  С да қиздирилганда ишлатишга тайёр бўлади. Фермент адсорбцияси тувидагича: силикагель навес кабига  $2.5$  мл фермент эритмаси қўшилади ва  $30$  С да  $15$  мин давомида аралаштирилади. Сўнг аралашма адсорбцияланмаган

фермент қисмларини ажратиш учун 5000 обрмин тезликда 5 мин давомида центрифуга қилинади, фермент активлиги 2.5 мл инкубацион муҳитда ўлчанади. Бу муҳит, 12.5 мкмоль лецитин, 125 мкмоль CaCl<sub>2</sub> 0.1 мл фермент эритмаси сақланади. Реакция 0.3 мл диэтил эфир қўшиб 30 мин давомида ёки ДЗ-1 нинг 1% ли эритмасидан 0.1 мл қўшиб 30 мин давомида олиб қилинади. Реакция 30 С да олиб қилинади. Керакли рН 0.1 М! натрий ацетат буфер билан (рН 4.0-6.0) ёки 0.1 М трисацетат буфер билан (рН 6.5-9.0) ҳосил қилинади.

pH оптимумлар. Имобилланган фосфолипаза Д иккита рН оптимумга эга. РН 5.6 ва 7.5 муҳитларда энг юқори активликка эга бўлади. РН 5.6 даги оптимумни имобилланмаган фермент ҳосил қилиши мумкин эмас. Чунки силикагелга киритган центрифуга қилиб имобилланмаган фермент ажратиб ташланган. РН муҳитга боғлиқ равишда активликнинг бундай тарқорланишига сабаб унинг иккита формада бўлишидир.

Ca ионларининг таъсири.

Силикагелга имобилланган фермент Ca ионларисиз ҳам фосфолипидларни парчалайди. Имобилланмаган фермент тозалангансиз ва икки валентли металл ионларисиз парчалай олмайди. Имобилланган фермент эса бу ионларсиз ҳам реакцияни амалга оширади. Албатта Ca еки бошқа икки валентли металл ионлари қўшилса фермент активлигини ошириб, уларни активатор сифатида қўллаш мумкин.

Трансаккиллаш хоссаси.

Имобилланган фермент ҳам трансаккиллаш реакциясини катализлайди. Бу реакция метанол қўшиш билан олиб қилинади. Метанол концентрацияси 3 ММ бўлганда фосфолипидлар гидролизи субстрат тури қандай бўлмасин энг юқори нуктага етади.

Ҳарорат оптимуми. Имобилланган фермент 30 С ҳароратда эса юқори активликка эга. Эркин фосфолипаза Д эса 40 С ҳароратда юқори активликка эга

бўлади. Бу эса энергияни маълум даражада тежашга имкон беради. Ҳароратга барқарорлик иммобилланган фермент учун пастроқ бўлиб, эркин фосфолипаза учун юқорироқдир. Шунинг учун ферментни сақлаш ва ишлатишда эҳтиётлик талаб этади. Фосфолипаза Д нинг ишлатилишида ва текширилишида аксарият ҳолларда 30 С ҳароратда ёки нормал ҳароратда (25 Оолиб борилиши) иммобилланган фермент учун афзаллик яратади. Чунки иммобилланган фермент аинан 30 С ҳароратда юқори активликка эга. Ҳарорат 50 С да бўлганда фердоентнинг ҳароратга барқарорлигини текширилганда иммобилланган формасининг ҳароратга барқарорлиги пастроқ бўлади. Бу эса сақлашда анча афзалчиликлар юзага келтиради.

Фосфолипаза Д нинг субстрат ион концентрациясига боғлиқлиги.

Натижаларга кўра фосфолипаза Д Са ионларисиз ҳам функциясини бажариши мумкин, лекин бунда ферментатив парчаланишга учраб, лецитин гидролизи эса Са га боғлиқлиги сабабли кетмаиди. Бунинг икки сабаби бор. Бири кальций ионларига Х талаб сабстрат турига боғлиқ деса, иккинчиси текшириляётган субстратларга ферментнинг турли формалари турлича спецификлик намоён бўлади ва кальций ионлари билан турлича активланади. Субстрат концентрациясига каталитик активликнинг боғлиқлик графигидан иккинчи қулоса туғрилигига амин бўламиз. [РасмN4].

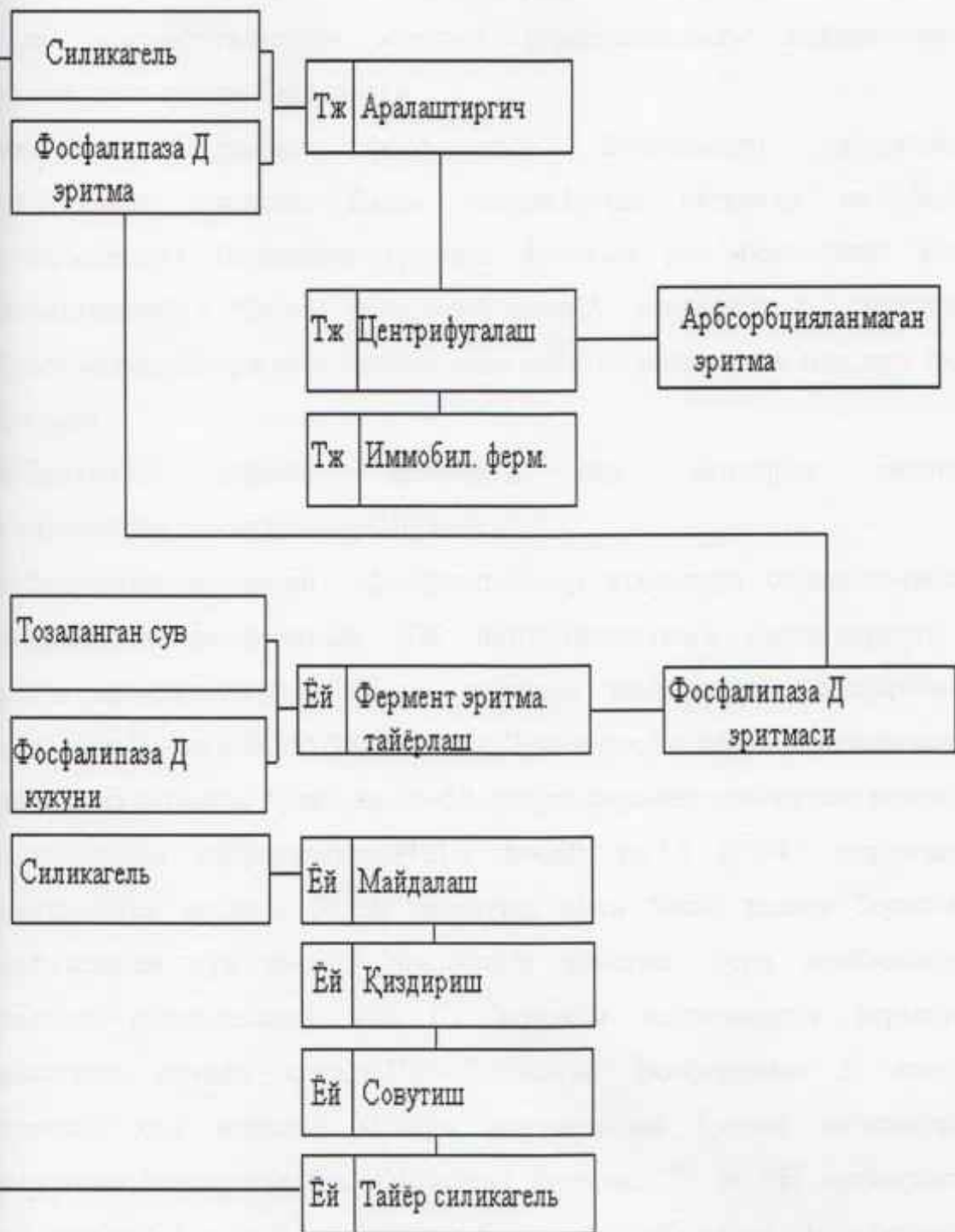
## ИММОБИЛЛАНГАН ВА ЭРКИН ФОСФОЛИПАЗА Д ФОРМАЛАРИНИНГ ХОССАЛАРИНИ ТАҚҚОСЛАШ.

Иммобилизацияда фосфолипаза Д эриган ва хужайра қисмларига боғланган ҳолда учради. Эриган эркин фосфолипаза Д рН 5.6 шароитда юқори активликка эга бўлиб, катализлаш хоссаси намоён бўлиши учун икки валентли ионларнинг юқори концентрациялари бўлиши керак. Шунингдек фермент активлигига эфир, бензол, гексан, ДЗ-М ва би органик эритувчилар реакция инициаторлари сифатида таъсир қилади. Бироқ хужайрада фермент функцияси учун бундай активаторлар бўлиши қийин. Иммобилланган фосфолипаза Д юқорида сана тилган агентларсиз ҳам шартларида лецитин гидролизини амалга оширади. Эркин ва силикагельга адсорбцияланган фосфолипаза Д ҳар хоссаларини таққослашимиз.

Фосфолипаза Д ни иммобиллаш учун КСК<sup>1</sup> силикагель қўлланилади. Гранулалари размери 100-160 мк га тенг. Фермент қунидагича адсорбция қилинади. Силикагель- навескасига 2.5 мл фермент эритмасы қўшилиб, 30 С да 15 мин давомида аралаштирилади. Сўнг ара- лашмани 5 мин давомида 5000 айл/мин тезликда адсорбцияланмаган фермент қисмидан ажратиш учун центрифуга қилинади. Активлик инкубацион муҳитда ўлчанади. [10].

Инкубацион муҳит- 12.5 мкмоль лецитини, 125 мкмоль СаС<sup>1</sup> ва 0.1 мл фермент эритмасы сақлаиди. Реакцияни 0.3 мл диэтил эфир, ёки 0.1 мл 1% ДЗ-М эритмасы қўшиш билан 30 мин давомида эфир ёки 15 мин давомида ф3-М инициаторлигида доимеини аралаштириб турган ҳолда 30 С да бошлаимиз. Тажрибаларда адобилланган ферментга 2.5 мл активатор сақламаган субстрат аралашма қўшилади". РН муҳити 0.1 М натрий ацетат буфери (pH 4.0-6.0) ёки О.

## Фосфалипаза Д ферментини иммобиллаш схемаси



ис ацетат буфери (рнб.5-9.0) билан яратилган, солиштирма активлик 1 кг ок; силдан 1 мин ичида ажралган нмоль холин ҳисобида ўрсатилади.

Ферментни ташувчига боғланиш даражаси эфир иштирокида рн 6 да центрафугалашдан кейинги супернатантдаги қолдиқ активлигини аниқлаш орқали баҳоланади.

Силикагелга боғланган фосфолипаза Д<sup>3</sup> активлиги ташувчининг даражаси тўлиш даражаси билан боғлиқ. Бунда активлик ва фермент концентрациясига боғлиқлик графиги формаси рн муҳитининг қаери-га ўлчанганлигига боғлиқ эмас. Фосфолипаза А активлиги ва тўйиниш даражаси катталиклари иммобилизацияга олинган силикагель миқдари билан аниқланади.

Иммобилланган фермент активлиги кам<sup>1</sup> миқдорда силикагель билан адсорбцияланганда юқори бўлган.

Иммобилланган ва эркин фосфолипазалар хоссалари сўлиштирилганда иммобилланган фосфолипаза ДЖ нин температурага барқарорлиги камлиги аниқланди. Бунга боғлиқ равишда температурдў, оптимуми ҳам амайди, у рн 7.5 ва рнб.бда 30 С га теги. Эркин фосфолипаза Д металл ионлари иштирокисиз активмас бўлиб, иммобилланган фермент эса- металл ионларисиз ҳам лецитинни гидролизилади. Рнб.6 А=660, рн7.5 А=317 шароитларида концентранган кислота билан қайнатиш иўли билан ишлов берилган ва диетилланган сув металл ионларини иўқотиш учун ювиб-ташланган силикагель қўлланилганда ҳам Са ионлари иштирокисиз фермент ўз активлигини намоён қилади. Иммобилланган фосфолипаза Д нинг Са ионларисиз ҳам ишлаши маълум шароитларда бундан активаторларга эҳтиياجлигини билдиради. Иммобилланган фермент 2<sup>С</sup> та РН оптимумга эга бўлиб улар рн 5.6 ва рн 7.5 нуқталарда бўиади. Адсорбциядан озган фермент рн 5.6 нуқтада биргина рн оптимумга эга. Рн 5.6 даги оптимумни иммобилланмаган фермент б Зиини билан тушунтириб бўлмаиди, чунки иммобилланмаган фермент эфир ёки ДЗ-Иа сиз активлигини намоён қилмаиди. Рн муҳитига

тивлик боғликлигини 2 та ҳар хил нуктаси. Чигит фосфолипаза Д си 2 та турли формада мавжудлиги билан тушунтирилади. Бунга сабаб фосфолипаза Д нинг бир формаси адсорбциядан сўнг рн оптимуми ўзгармаиди, иккинчи формаси эса рн оптимуми ўзгаради. Имобилланган фосфолипаза Д нинг активаторларсиз гидролиз реакциясини катализ қилиши хоссасидан келиб чиқиб, фосфолипаза Д ни турли активаторлар билан активланишини турлича изоҳлаш мумкин. Масалан этил эфири ДЗ-М нинг Са ионлари ҳамкорлигида қўллаш микрогетероген системасида фазалар оралиғи фазасида фермент имобилизацияси учун шароит яратади деб ҳисоблаш мумкин. Бунда субстрат-активатор эквивалентли ишлар ферментнинг сувли эритмаси системаси ҳосил бўлади. Бундан тахминнинг асосланганлиги камида иккита факт келтириш мумкин. Биринчи факт фосфолипазалар сақлаган сувли дисперсион муҳитда Са ионларининг субстрат структурасини ҳосил қилишда ўзига хос хоссалари бўлиши. Иккинчи факт ферментнинг силикагелга адсорбциясидан кейин рн оптимуми ўзгариши ДЗ-М иштирокида ҳам кам даражада бўлса ҳам изоҳланилади. Бу тахминлар тўғри бўлса, фосфолипаза Д ни имобилланган муҳитдаги ишлайдиган ферментларга киритиш мумкин. Продуктив адсорбция учун юза субстратлар ўзи билан ҳам амалга оширилиши мумкин. Яъни продуктив адсорбция учун юза қатламни субстратлар ҳам ҳосил қилиши мумкинлигини ҳам эсда сақлаш зарур.

## Хулоса

Кейинги йилларда ўсимлик ва хайвон туқималарининг , шунингдек микроорганизмлардан олинган ферментларни ўрганиш ва яқинлашда яхши тажрибалар тўпланди. Турли хил денатурацияловчиларга ферментларнинг барқарорлигини ошириш юқори амалий ва назарий аҳамият касб этади. Барқарорликнинг назарий асосланиши бир томондан ферментнинг кенг миқёсда анализ, технологияда ишлатишга имкон берса, бошқа томондан биологик макромолекула-лар функциялари ва структуралари орасидаги ўзаро боғлиқликни чуқурроқ тушунишга олиб келади.

Ферментни барқарорлигини куйидаги таъсирларда ошириш керак. Шундан таъсирларга ва асосан организм факторларига барқарорлигини ошириш учун фосфолипаза Д ни силикагельга адсорбция, олиб эришилди. Ташқи таъсирларга барқарорлик бевосита эришилади, яъни ишлатиш, текшириш, сақлаш пайтида агентлар , активаторлар кўшиш ва ишлатиш пайтида маълум шароитлар яратиш лозим. Ҳароратга барқарорлик иммобилланган ферментга Б5- Иа кўшиш билан, ташиш пайтида эҳтиёткорлик билан эришилади. Ташқи таъсирлар барқарорликни камайишига сабаб бўлади. Шунинг учун юқоридаги шароитларни яратишда Фермент хоссаларини ўрганиб чиқиш керак. бўлади. Фосфолипаза Д нинг турли хоссаларини ўрганишга кўпроқ эҳтибор берилгани шундан. Фосфолипаза Д паст ҳароратда сақла-ниши унинг барқарорлигини оширади. Фермент эркин ҳолда 40 42 °С температурада, иммобиллангани 30 °С да юқори активликка эга. рН ўз-гариши ҳам ферментнинг таъсири ва функцияларга таъсир этади. Иммобилланган ва эркин фосфолипаза Д лар рН 5.5 ва рН 7.6. Ҳароратда юқори активликка эга.. рН муҳитни эса натрий ацетат. буфе-

и билан ёки триацетат буфер билан рН 5.5 ёки рН 7.6 шароитга элтириш мумкин.

организмдаги факторлар таъсирига барқарорликни эса иммобиллаш йўли билан оширилди.

озирги вақтда медицинада ишлатиладиган ферментларни 7 та асосий гурuhlарга бўлиб, модификациялаш мумкин:

- 1) Ташувчи юзасига адсорбциялаш;
- 2) Паст молекуляр реагентлар ёрдамида модификациялаш
- 3) Хужайралар ёки полимер ташувчиларга ковалент боғлаш
- 4) Гель структураларига киритиш
- 5) Инкапсулланган ферментлар
- 6) Липосомаларга микрокапсулалаш

|Фосфолипаза Д нинг организм факторларига барқарорлиги силикагельга адсорбциялаш билан оширилади. Бу методнинг афзаллиги унинг оддийлигидир. Ташувчи ва фермент хоссаларига боғлиқ ҳолда адсорбция электростатик ёки гидростатик ўзаро боғланишлар ҳисобига бўлиши мумкин. Ташувда эримайдиган ташувчи ферментни адсорбцияси иммобилизациянинг ёрдадор усулларидан биридир. Камчилиги ион кучлар, организм суюқликлари биологик компонентлари билан ўзаро таъсирлар натижасида фермент адсорбциясига олиб келиши мумкин. рН нинг кескин ўзгариши ҳам фермент адсорбциясига олиб келади. Адсорбцияланган ферментнинг каталитик фаоллиги эркин ферментнукиан пастроқ. Аммо термостабиллиги ва гидролитик Ферментларга барқарорлиги юқоридир. Эркин фермент гидроградирловчи факторларга барқарорлиги паст бўлиб, улар турли иммун реакцияларни инициаторлари адсорбцияланган фосфолипаза Д ошқозон парбатининг инактивациялашига барқарорлиги юқоридир.

булоса қилиб айтганда силикагелга адсорбцияланган фосфолипаза Д медицинада ишлатишда афзаллиги кўп бўлиб, организм факторлари таъсирига

барқарорлиги юқоридир. Харорат таъсирига ёки диэтил эфир кўшиш билан, рН хитга керакли буферларга кўшиш билан барқарорлиги оширилди.

1. Сидиков Ш.А. ...  
2. ...  
3. ...  
4. ...  
5. ...  
6. ...  
7. ...  
8. ...  
9. ...  
10. ...  
11. ...  
12. ...  
13. ...  
14. ...  
15. ...  
16. ...  
17. ...  
18. ...  
19. ...  
20. ...  
21. ...  
22. ...  
23. ...  
24. ...  
25. ...  
26. ...  
27. ...  
28. ...  
29. ...  
30. ...  
31. ...  
32. ...  
33. ...  
34. ...  
35. ...  
36. ...  
37. ...  
38. ...  
39. ...  
40. ...  
41. ...  
42. ...  
43. ...  
44. ...  
45. ...  
46. ...  
47. ...  
48. ...  
49. ...  
50. ...  
51. ...  
52. ...  
53. ...  
54. ...  
55. ...  
56. ...  
57. ...  
58. ...  
59. ...  
60. ...  
61. ...  
62. ...  
63. ...  
64. ...  
65. ...  
66. ...  
67. ...  
68. ...  
69. ...  
70. ...  
71. ...  
72. ...  
73. ...  
74. ...  
75. ...

## Адабиётлар рўйхати

1. Сагатов Ф.А. Автореферат Ферментативный синтез фосфалипидов (Фосфатидилглицерин) Т:1995 3б.
2. Миралимова М.М. Фармацевтик технология асослари Т:Абу Али ибн Сино. 2001 303-308 бет
3. Николаев А.Я. Биологик кимё Т: Ибн Сино 58-100 б.
4. Hanaban D.T. Chaikoff D (1947) Biol Chem 168,233-238 б.
5. Dawson R.M.C. Heimington N (1967) Biochem T:69 458-466
6. Рахимов М.М, Ахмеджонова Р, Бабаева М.У., КХОнЭ В Мадьяров Ш.Р./ Биохимия 1981 Т 46 240-248 б.
7. Рахимов М.М., Мадьяров Ш.Р. Абдумаликов А.Х.// Биохимия 1976 Т:41 452-457-б.
8. Мадьяров Ш.Р. Автореферат. Изучения Фосфолипазы Д на границе раздела фаз Т 1977г.
9. Waite M, Sisson P // Biochemistry 1971 veo P.2372-2383.
10. Waite M, Sisson P // Biochim et biophys. acta. 1976. V450 P 300-310.
11. Собиров Р., Холматов Х. Хоразм вохасининг доривор ўсимликлари. Т:1972-85-86 б.
- 12.Каримов В., А.Шомахмудов. Халқ таботати ва замонавий илми тибда қўлланиладиган шифобахш ўсимликлар Т: 1993 273-238.
13. Комилов Х.М. Қаххоров А. Методическое пособие по технологии фосфалипазы ДТ, Знание
14. Рахимов М.М., Ахмедажонов Р., Мадьяров Ш.Р., Тошмухамедов Б.А. //Биохимия 1982 Т. 47 1454-1465.
15. Юсупбеков Н.Р. ва бош. Технологик жараёнларни бошқариш системалари.
16. Реут Е.Н. Рахимов М.М. // Прин. Биол. и микробиол. 2003 Т.39 413-418.
17. [www.smu.psn.ru](http://www.smu.psn.ru).
18. [www.химик.ru/biologhim/168 htm/](http://www.химик.ru/biologhim/168 htm/)

19. [www.library.biophys.msm.ru](http://www.library.biophys.msm.ru)
20. [www.pathologu.emory.edu/Lambeth/Phosd](http://www.pathologu.emory.edu/Lambeth/Phosd) page.
21. Thompson G.A. (1970) *Compt. Biochem* 18 157-167.
22. Haye B., Champion S., Jasquenrin Y.(1973) *FEBS letters* 30. 253-256.
23. Himman J.W (1972) *Ann Rev Biochem* 41, 161-170.
24. Verger R., Mieras M.CE De Hass G.H. (1973) *J.Biol chem* 248 4023-4035.
25. Brockerhoff H (1973) *Chem Phus Lipids* 10. 215-224.
26. Рахимов М.М., Алматов К.Т. (1978) *Биохимия* 43 1390-1403.
27. Мирсолихова Н.М., Рахимов М.М. (1977) *Доки АНССР*. 233, 981-984.
28. Zwaal R., Roelofsen B., Colley C.M. (1973) *Biochem et biophys. acta* 300, 159-182
29. Roughan R., Slack. C.R. (1976) *Biochim.et biophys acta* 431, 86-92.
30. Tookey H., Balls A.K. (1957) *J.Biol Chem.* 218, 213-223
31. Davidson F.M. Long C. (1958) *Biochem J* 69. 458-466
32. Heller M., Aladjem E., Shapiro B.(1968) *Bull. Soc.Chim. biol* 50, 1395-1408
33. Yang S.F., Freers., Benson A.A. (1967) *J.Biol.Chem.* 242, 477-481.
34. Einset E., Clarc W.L. (1958) *J.Biol. Chem.* 213. 703-715
35. Nolte O., Ackers L. (1975) *Z.lebensmittel – Untersuchand und Forsch* 159.225-223.
36. Talwalker R.T., Gard N.K., Krishma – Murti C.R. (1968) *Indian J. Biochem* 6, 228-230
37. Condren E., Jabian A., De Vries A. (1964) *Experiantia* 20, 557-558
38. Basu M.K., Chosh S, Schweppe J.S. (1979) *Proc. Soc. Expte Biol. And Med.* 160. 324-327.
39. Imamura Sh., Heriuti 4 (1979) *J Biochem* 85, 79-85
40. Taki T., Mat sumoto M (1973) *Japan J Exptemed* 43 219-226.
41. Saito M., Konfer J. (1973) *Biochem and biophys. Res. Communs* 53 391-395.

Тошкент Фармацевтика институтининг Биотехнология кафедраси  
магистри Усарова Дилдора Курбановнанинг иммунобиологик ва  
микробиологик препаратлар технологияси магистри илмий даражасини  
олиш учун бажарилган “Карамдан олинган фосфолипаза Д нинг  
барқарорлигини ошириш” мавзусидаги ёзилган диссертациясига

## ТАҚРИЗ

Магистр Усарова Дилдоранинг диссертацияси карамдан фосфолипаза Д ферменттини ажратиш технологиясини ва олинган ферментни барқарорлаштириш усулини ишлаб чиқишга бағишланади. Адабиётлардан маълумки, Ферментларнинг юқори каталитик хоссаларидан турли технологик жараёнларда ҳам қўлланиб келинмоқда. Маълум сабабларга кўра ферментларни амалиётда қўллаш чекланган. Бу чекланишлар кўплаб омиллар билан боғлиқ бўлиб, уларнинг асосийлари деб қуйидагиларни ҳисоблаш мумкин: а) Реакция муҳитидан ферментларни ажратиш олиш имкони йўқ; б) ферментларнинг турли ташки таъсирига, шу жумладан хароратга чидамсизлиги в) турли усулларда олинган ферментларнинг тозалаш технологиясининг кўп босқичли ва мураккаблиги. Бу чекланишларни бартараф қилишнинг энг самарали усулларидан бири ферментларни иммобиллаш ҳисобланади. Иммобилланган ферментлар ферментларнинг асосий ижобий хоссаларини сақлаган ҳолда гетероген катализаторлар афзалликларига ҳам эга бўлади.

Иммобилланган ферментларни технологик жараёнлардан сўнг оддий филтрлар ёрдамида реакция аралашмасидан (реакцион муҳитдан) ва субстратдан ажратиш мумкин.

Иммобилланган ферментлар оддий ферментларга нисбатан турли ташки таъсирларига, шу жумладан температурага нисбатан юқори чидамликга эга. Бундай ферментлар ўз фаоллигини узоқ вақт сақлаб олади ва уларни жараёнда кўп марталаб қўллаш мумкин. Шу билан бирга таъкидлаш лозимки, иммобилланган ферментларнинг абсолют фаоллиги эркин фермент фаоллигидан нисбатан пастроқ бўлади. Яъни иммобиллаш жараёни ферментнинг фаоллигини қисман пасайтиради.

Юқоридагиларни инобатга олган ҳолда, магистр Усарова Дилдора табиий хом ашёлардан олинган фосфолипидлар унумидан биотехнологик усулда Карамдан фосфолипаза Д ферменттини ажратиш технологиясини ва олинган ферментни барқарорлаштириш усулини ишлаб чиқишни ўз олдига мақсад қилиб қўйган.

Усарова Дилдоранинг магистрлик диссертация иши 77 бет бўлиб, компьютерда терилган ва у кириш, адабиётлар шарҳи, қўлланилган методик услублар, тажриби қисми, хулоса ва адабиётлар рўйхатидан ташкил топган. Муаллиф диссертация ёзишда интернет материалларидан кенг фойдаланган.

Диссертацияни кириш қисмида муаллиф илмий ишнинг актуал тематга бағишланганлигини, унинг илмий янгилиги ва амалий аҳамиятини, ушбу

ишни бажаришда ўз олдига қўйган максadini ва химоя учун кўтариб чиққан муаммоларни тўлақонли даражада асослаб берган.

Муаллиф адабиётлар шарҳида ферментлар ўта бекарор ва активлигини осон йўқотувчи бирикмалар, уларнинг қўлланилишини муҳим соҳалари тўғрисида тўхтаб ўтади. Ферментлар ўта бекарор ва активлигини сон йўқотувчи бирикмалар ҳисобланади, шунинг учун уларни ажратиб олишда ва тозалашда махсус усуллар қўлланилади. Ҳар бир ферментни ажратиб олиш учун қайси танлашда унинг ўзига хос хусусиятларини ҳисобга олиш керак. ферментларни тозалашда танлаб адсорбция қилиш усули ҳам қўлланилади. Мазкур усулда адсорбент ферментли эритмага қўшилади. Ферментнинг тозалигига қараб унинг активлиги ортиб боради ва гомоген фермент учун хос бўлган маълум ўзгармас максимал қийматга эга бўлади.

Диссертация ишининг якуний қисмида хулоса қисмидан иборат бўлиб, фосфолипаза олиш шароитлари ишлаб чиқилди. Олиб борилган тажрибалр асосида фосфолипаза Д ни иммобиллаш технологияси ишлаб чиқилди.

Диссертация иши билан танишилганда баъзи савол ва ноаниқликлар қайд этилди:

- диссертация ишида айрим орфографик ва статистик хатолар ҳам учрайди.

Магистрант Усарова Дилдоранинг илмий ишида келтирилган маълумотлар ҳам назарий, ҳам амалий аҳамиятга эга бўлиб, у магистрлар олдига қўйилган барча талабларга жавоб беради. Усарова Дилдора ҳар томонлама етук, уддаброн, ўтказилган тажрибаларни мустақил бажара оладиган магистр даражасини олишга лойиқ деб ҳисоблайман.

**Оппонент: Техника фанлар номзоди,**

**Катта илмий ходим:**

**Сотимов Ғ.**

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ  
Отдел \_\_\_\_\_

Қатнашдилар: Каф. мудирлари проф. Комилов Х.М., кафедра ходимлари: доц. Зоирова Х.Т., Доц Адилбекова Д.Ю., доц. Пулатова Ф.О., ассис. Махмудов С.Д., ассис. Неъматова Г.А., ассис. Абдужалилова Х.Д., ассис. Исаева Б.Т., Рахимов.М.М.

Кун тартиби : Саноат Фармация факультетининг 5А522902-ва микробиологик препаратлар мутахассислиги магистранти Усарова Дилдоранинг “Карамдан олинган фосфолипаза Д нинг барқарорлигини ошириш ” мавзусидаги Магистрлик диссертацияси муҳокамаси.

Эшитилди: Саноат Фармация факультетининг 5А522902-иммунобиологик ва микробиологик препаратлар мутахассислиги магистранти Усарова Дилдоранинг “Карамдан олинган фосфолипаза Д нинг барқарорлигини ошириш ” мавзусидаги Магистрлик диссертацияси тингланди. Кафедра ходимлари доц. Зоирова Х.Т., доц. Пулатова Ф.О. томонидан берилган саволларга тўлиқ жавоб берди. Музокарадан сўнг магистрант Усарова Д.химояга тайёр деб топилди.

Қарор қилинди: Саноат Фармация факультетининг 5А522902 иммунобиологик ва микробиологик препаратлар мутахассислиги магистранти Усарова Дилдоранинг “Карамдан олинган фосфолипаза Д нинг барқарорлигини ошириш ” мавзусидаги Магистрлик диссертацияси химояга тавсия этилсин

Мажлис раиси, проф.



Комилов Х.М.

Мажлис котиби, доц

Зоирова Х.Т.