

OQSIL VA FERMENTLARNI TOZALASHDA XROMATOGRAFIYA USULLARINING AHAMIYATI

Raimova Charos Baxrom qizi

Guliston davlat universiteti, Ishlab
chiqarish texnologiyalari fakulteti "Oziq-
ovqat texnologiyalari" kafedrası o'qituvchisi
E-mail: baxromjonovna1195@gmail.com

Annotatsiya. Oqsillarning va fermentlarni tozalash, ularni bir-biridan ajratish maqsadida maxsus adsorbentlar, turli ion almashuvchilar, polisaxaridlar asosida tayyorlangan sefadekslar va ularning hosilalari, selluloza va ulapning hosilalari, anionlar va kationit ko'rishdagi, ba'zida kalsiy fosfat, alyuminiy gidroksid gellari va ba'zi bir fermentlar uchun affinli adsorbentlar tayyorlangan va ulardan ishlab chiqarishda hamda laboratoriya tadqiqotlarida samarali foydalanishmoqda. Fermentlarni tozalash va oqsillarni ajratish texnologiyasi qanday usulda bo'lishiga qaramay quyidagilarga asoslanadi: ferment mahsulotini o'z tarkibiga olgan oqsillar aralashmasi ma'qul bo'lgan buferda eritiladi va shu erituvchi bilan muvozanatlangan kolonkaga yuboriladi. Keyin shu kolonkadan ma'lum tarkibga ega bo'lgan bufer H^+ yoki konsentratsiyasi o'sib boruvchi gradiyent yuvish eritmasi, yoki bo'lmasa ferment uchun maxsus bo'lgan bog'lovchi (ligand) yordamida kerakli oqsil (ferment) bosqichma-bosqich yuvib olinadi. Kolonkadan yuvib olingan ferment preparatlari fraksiyalar to'plamida yig'iladi va fermentning toza preparatini olish uchun boshlang'ich material bo'lib xizmat qiladi.

Kalit so'zlar: ferment, sintez, organik erituvchi, gidroliz, produsent, kraxmal, amilaza, ion almashinuv xromatografiyasi, affin xromatografiyasi, ligand, matritsa.

Аннотация. Для очистки и разделения белков и ферментов разработаны и эффективно используются в производстве и лабораторных исследованиях специальные адсорбенты, различные ионообменники, сефадексы на основе полисахаридов и их производные, производные целлюлозы и улапа, адсорбенты на основе анионов и катионитов, иногда гели фосфата кальция, гидроксида алюминия, некоторые фермент-аффинные адсорбенты. Независимо от используемого метода технология очистки ферментов и разделения белков основана на следующем: смесь белков, содержащую ферментный продукт, растворяют в подходящем буфере и направляют в колонку, уравновешенную этим растворителем. Затем нужный белок (фермент) постепенно элюируется из этой колонки с использованием буфера H^+ определенного состава или градиентного промывочного раствора возрастающей концентрации, или, в качестве альтернативы, связывающего вещества (лиганда), специфичного для фермента. Вымываемые из колонки ферментные препараты собираются в набор фракций и служат исходным материалом для получения чистого ферментного препарата.

Ключевые слова: фермент, синтез, органический растворитель, гидролиз, продуцент, крахмал, амилаза, ионообменная хроматография, аффинная хроматография, лиганд, матрица.

Annotation. In order to purify and separate proteins and enzymes, special adsorbents, various ion exchangers, Sephadex and their derivatives based on polysaccharides, cellulose and ulap derivatives,

anions and cationite, sometimes calcium phosphate, aluminum hydroxide gels, and affinity adsorbents for some enzymes have been prepared and are effectively used in production and laboratory research. Regardless of the method, the technology of purifying enzymes and separating proteins is based on the following: a mixture of proteins containing the enzyme product is dissolved in a suitable buffer and sent to a column equilibrated with this solvent. Then, the desired protein (enzyme) is gradually eluted from this column using a buffer H^+ of a certain composition or a gradient washing solution of increasing concentration, or a binder (ligand) specific for the enzyme. The enzyme preparations washed from the column are collected in a set of fractions and serve as the starting material for obtaining a pure enzyme preparation.

Key words: *enzyme, synthesis, organic solvent, hydrolysis, producer, starch, amylase, ion exchange chromatography, affinity chromatography, ligand, matrix.*

Ion almashuv xromatografiya usuli. Bu usulda oqsillar elektrostatik kuch yordamida bog‘lanadi, ya‘ni bu hodisa zaryadlangan oqsil sirtlari va zaryadlangan ionalmashuv birikma guruhlarining zich qatlami o‘rtasida yuzaga keladi. Tipik ionalmashuvchi sifatida bo‘ktirilgan dietilaminoetil (DEAE) yoki karboksimetil (KM) sellulozani ko‘rsatish mumkin. Ular bo‘ktirilgan holatda zaryadli guruhlarining 0,5 M konsentratsiyasiga ega bo‘ladi. Bu zaryadlar kolonkada qarama-qarshi bo‘lgan ionlarni (metall ionlari, xlor ionlari, bufer va h.k.) neytrallaydi. Odatda, oqsilning umumiy zaryad belgisi ion almashuvchiga o‘tirgan ion belgisi bilan bir xil bo‘ladi va kolonkadan o‘tish jarayonida aynan uni siqib chiqaradi. Shuning uchun ham, bu jarayon xususiyatiga qarab «ion almashuv» jumlasini qo‘llaniladi. Kolonkada adsorbsiyalangan kerakli oqsilni yuvish uchun affin usulidan tashqari ikki usuldan foydalaniladi.

Birinchi usul — buferning pH ko‘rsatkichini ma‘lum darajaga o‘zgartirish bilan ion kuchini oshirib, adsorbent va oqsil o‘rtasidagi elektrostatik o‘zaro ta‘sirni kamaytirish. Bu usul, umuman yaxshi natija bermaydi, chunki bufer hajmining kichik bo‘lganligi uchun pH ko‘rsatkichini birdaniga o‘zgartirish oqsil aralashmalariga va boshqa birikmalarning yomon ajralishiga sabab bo‘ladi. 1981-yilda bu usul L.L.Slyuyterman va boshqalar tomonidan xromatofokus usuliga o‘tkazish yo‘li bilan takomillashirilgan. Bunda fermentlarni adsorbentdan yuvib olish jarayonida amfolit tipidagi bufer hajmi yuqori bo‘lgan buferlardan foydalanilgan.

Ikkinchi usul — keng miqyosda foydalanilayotgan kaliy yoki natriy xlorid tuzlari yordamida gradiyent tuzishga asoslangan. Tuz ionlari ishtirokida mustaqil oqsil va adsorbentlar orasidagi o‘zaro tortish kuchi kamayadi. Tuz ionlari konsentratsiyasining oshishi bilan adsorbentga bog‘langan oqsillar o‘z o‘rinlarini ularga bo‘shatadilar va o‘zlari kolonkadan yuvilib chiqa boshlaydilar. Shu bilan birga, tuz ionlari ta‘sirida adsorbentlar o‘zaro yaqinlashib oqsil harakati uchun tor yo‘lkalar hosil qiladi va bu hodisa fermentlarni kolonkadan chiqishida fraksiyalarga ajratib olish imkonini beradi. Ion

almashuvchiga bog‘langan fermentni affinli yuvish yordamida ajratish mumkin. Buning uchun kolonkaga oqsil bilan bog‘lanadigan maxsus ligand yuboriladi. Bunda oqsil ligand bilan birgalikda tezda kolonkadan yuvib chiqariladi. Lekin, kerakli oqsilni taniydigan va uni sorbentdan ajratib oladigan ligandni topish juda mushkul vazifadir. Shu bilan birga, ligandni qanday zaryadlanganligi va konsentratsiyasiga alohida e‘tibor berish kerak. Agar shunday qilinsa ligandni o‘zi ionalmashuvchiga bog‘lanib qolishi mumkin.

Affinli xromatografiya usuli. Bu usul oqsil va fermentlarni tozalash va ajratishning adsorbsiya hodisasiga asoslangan usullari orasida alohida o‘rinni egallaydi. Ko‘pincha uni affinli xroma–tografiya yoki bioaffinli yoki bo‘lmasa, biospesifik xromatografiya deyiladi. Ma‘lumki, barcha biologik faol birikmalar, xususan, fermentlar ham ligandlar yoki affinli ligandlar deb nomlanadigan birikmalarga maxsus bog‘lanish xususiyatlariga egadir. Agarda shunday ligandlarni inert matritsaga kovalent bog‘lasa faqat kerakli fermentni ushlovchi va qolgan oqsil va moddalarni o‘tkazib yuboruvchi maxsus adsorbentni olish mumkin.

Maxsus yuvuvchilardan yoki jarayon sharoitlarining farqi asosida, ligandni fermentga bo‘lgan xususiyatini o‘zgartirish yo‘li bilan oqsilni desorbsiyaga uchratib, tozalash natijasida yuqori tozalikka ega bo‘lgan fermentni ajratib olish mumkin bo‘ladi. Lekin ligand va uni ushlab turuvchini tanlash juda qiyin vazifadir. Ko‘pchilik hollarda affinli adsorbentlarni sintez qilishda tozalanayotgan fermentning xususiyatlarini e‘tiborga olish kerak. Affinli xromatografiya uchun bar xil turdagi erimaydigan sorbentlardan foydalaniladi, lekin eng ko‘p tarqalgani ko‘ndalangiga ulangan agaroz donachalaridir. Ular yuqori bosimda o‘z shaklini saqlaydi va buferlarni hamda erituvchilarni almashtirishga bardoshli bo‘ladi. Ligandlar esa matritsaga shunday bog‘langan bo‘lishi kerakki, oqsillar hech qiyinchiliksiz ularga kelib bog‘lanishi mumkin bo‘lsin, buning uchun esa, matritsa bilan ligand o‘rtasida ko‘prikcha bo‘lishi kerak. Bulardan tashqari, ligand boshqa birikmalar bilan o‘zaro bog‘lanmasligi, faqat matritsaga bog‘langan va yuvish, regeneratsiya jarayonlariga chidamli bo‘lishi shartdir.

Amilolitik ferment preparatlari yaxshi o‘rganilganiga qaramasdan, ularning to‘liq katalizlash mexanizmida ba‘zi bir savollar tushunarsizligicha qolib ketmoqda, ularning ta‘sirini hech qanday konsepsiya bilan izohlab yoki boyitib bo‘lmaydi. Fermentlarning mexanizmi aniq tushunarli bo‘lsada, lekin ularning spesifikligini kengligini tushunish biroz mushkul. Hidrolitik fermentlardan glyukoamilaza fermentini olsak, uning pH muhitini va harorat fermentlar faolligiga o‘z ta‘sirini ko‘rsatadi va fermentlar faolligini past haroratda pasaytiradi. Glyukoamilaza kislotaga ta‘siriga chidamli, chunki glyukoamilazalar pH muhiti 2.0 dan 8.5 gacha oraliqlarda o‘z ta‘sirini ko‘rsata oladi. Shuning uchun sanoatda kislotaga chidamli preparatlar ham keng miqyosda ishlatiladi.

Fermentlarning asosiy xususiyati ularning izoelektrik nuqtasi bilan bog'liq bo'lib, o'rtacha pH 4.0 – 6.5ni tashkil qiladi. Ba'zi bir fermentlar shunday xususiyatga egaki, ular pH muhitini o'zlari regulyatsiya qiladi. Reaksiya tezligining ferment miqdoriga bog'liqligigrafiik shaklida to'g'ri chiziq ko'rinishida ifodalanadi. Agar biror bir ferment miqdori kam bo'lsa (sintez buzilsa), unda u katalizlaydigan reaksiyalar tezligini unga bog'liq biokimyoviy jarayonlar yo'li chegaralaydi. Tabiiy stimulyatsiya yo'li bilan yoki preparatlar yordamida ferment molekulasining sonini oshirilishi buzilgan reaksiya tezligini qayta tiklash yoki hayot faoliyatining yangi sharoitlariga zaruriy biokimyoviy reaksiyalarni moslashtirish imkonini beradi.

Odatda, glyukoamilaza fermentlarini sintezlovchi mikroorganizmlar uchun eksponensial o'sish fazasida hujayralarning tezkor tarzda o'sishi va hujayra ichida fermentlarning sintezlanishi faol amalga oshishi xos xususiyat bo'lib, o'sishning statsionar fazasida sintez jarayoni sekinlashadi va hujayra ichidagi shakllarning to'planishi tezligi ortadi. Hujayra tashqarisiga ajratiluvchi gidrolitik fermentlarning sintezlanishi jarayoni haqida ma'lumotlar sanoat miqyosida foydalanish maqsadlarida ferment preparatlarini ishlab chiqarishda muhim ahamiyatga ega hisoblanadi.

Amilolitik fermentlardan foydalaniluvchi bir qator sanoat miqyosidagi ishlab chiqarishlarda foydalaniluvchi texnologik jarayonlarning o'ziga xos xususiyatlari harorat oshirilishi ta'siriga nisbatan chidamli bo'lgan ferment preparatlari komplekslaridan foydalanish zaruriyatini yuzaga keltiradi. Yuqori haroratda amalga oshiriluvchi jarayonning afzalliklari–kraxmalning kleysterizatsiyalanishi va uning fermentativ gidrolizlanishi jarayonining birgalikda amalga oshishi, foydalaniluvchi fermentlar doza qiymatini kamaytirishga erishish, kraxmalning konversiyalanishi davomiyligini qisqartirishga erishish, yakuniy maxsulotning xosil bo'lishi qiymatini oshirish, jarayonning amalga oshirilishi umumiy tannarxini kamaytirish imkonini yuzaga kelishi bilan belgilanadi.

Ko'pincha holatlarda bitta turdagi organizm tarkibidan ajratib olingan fermentni tozalash uchun bir nechta uslublardan foydalaniladi. Bu holat shu bilan tushintiriladiki, ya'ni foydalaniuvchi uslub ko'p bosqichli seleksiya natijasida tanlab olingan, eng avvalo mutant yoki shtammlarning qandaydir bitta aniq turiga nisbatan tanlab olinadi, o'z navbatida bu ko'rinishdagi kulturani o'stirishda ma'lum bir aniq turdagi oqsillar yig'indisi shakllanadi. O'z navbatida, tozalash usullari va texnologik uslublar yakka tartibda tanlab olinadi va bu uslublar turning boshqa vakillari va hatto, boshqa turlar uchun ham foydalanilishi mumkin. Mikroorganizmlardan ajratib olinuvchi fermentlarni, jumladan amilaza fermentini tozalash tozalash samaradorligi sezilarli darajada ajratib olinuvchi fermentning solishtirma miqdori, shuningdek boshlang'ich preparat tarkibidagi

yoʻldosh tavsifidagi oqsillar yigʻindisiga bogʻliq hisoblanadi. Odatda, hujayra tashqarisiga ajraluvchi fermentlarni ajratib olish va tozalashning birinchi bosqichi ularni kalsiy asetat yordamida ferment eritmasi tarkibida choʻktirishdan tashkil topadi va bunda aralashma hajmida choʻkmaning hajmi 2–10% gachani tashkil qiladi, bunda bir vaqtning oʻzida yoki ketma–ketlikda tarkibga organik erituvchi (izopropil spirt, aseton) erituvchining eritmaga nisbatan hajmi 0,6–1:1 qiymatda qoʻshiladi. Aynan, ushbu koʻrinishda glyukoamilaza choʻkmasi xosil qilinadi.

Shkumatov va uning hammualliflari tomonidan tarkibiga ammoniy sulfat bilan fraksiyalash, ion xromatografiyasi, gidrofob oʻzaro taʼsirlashishlar xromatografiyasi va gel–filtratsiya usullarini oʻz ichiga qamrab oluvchi, kultura suyuqligi tarkibidan α –amilazani bir jinsli (gomogen) koʻrinishda olish sxemasi ishlab chiqilgan. Garchi, koʻpgina amilazalarning fizik–kimyoviy xossalari yaxshi oʻrganilgan boʻlsada, ularning kataliz mexanizmi koʻpgina tomonlari noaniqligicha qolmoqda: jumladan, ularning taʼsiri boʻyicha umumlashtiruvchi hech qanday konsepsiyalar ishlab chiqilmagan. Amilazalarning funktsiya bajarish mexanizmlari haqida aniq tasavvurlar mavjud emasligi ularning taʼsirining oʻziga xos jihatlarini tavsiflashda yuzaga keluvchi asosiy qiyinchiliklarni belgilab beradi. Bundan tashqari, amilaza fermentlari asosan bitta tarkibiy qismga ega boʻlgan, nisbatan quyi molekulyar (50–100 kDa atrofida) fermentlar hisoblanadi, ularning molekulasi bir oʻlchamli subbirliklardan tashkil topgan boʻlib, ularning koʻpchiligi hujayradan tashqariga sintezlanuvchi fermentlar hisoblanadi, bu holat ularni muhit tarkibidan osonlik bilan ajratib olish va tozalash imkonini beradi.

Foydalanilgan adabiyotlar roʻyxati:

1. Жеребцов Н.А., Корнеева О.С., Тертычная Т.Н. О механизме каталитического действия карбогидраз // Прикл. биохимия и микробиология. Москва, 1999. - № 2 (35). – С.123-132.
2. Жеребцов Н.А., Руадзе И.Д., Яковлев А.Н. О механизме кислотного и ферментативного гидролиза крахмала // Прикл. биохимия и микробиология. Москва, 1995. - № 6 (31). - С. 599-603.
3. Ключникова Л.В., Блинкова И.Ю. Ферментные технологии-будущее масложировой промышленности // Масло-жировая промышленность, 2006. - №4. - С. 30-31.
4. Павлова И.Н., Кичакова Н.А., Захарова И.Я. // Методы получения, анализа и применения ферментов. Всесоюз. конф.: Тез. докл. -Рига, 1990. - С. 34.
5. Hamidullaevna, Y. S., Esenovna, B. O., Turgunboevna, Y. N., & O'Gli, P. J. S. (2018). Study of the adhesive properties of Candida strains in an in vitro test using erythrocytes as target cells. European science review, (9-10-2), 219-222.

6. Рахимов М.М., Хасанов Х.Т. Очистка кислых протеиназ биоспецифической хроматографией // Биотехнология. - Москва, 1989, - № 2 (5). - С. 189-193.
7. Фролова Г.М., Сильченко А.С., Пивкин М.В., В.В.Михалков // Прикл. биохимия и микробиология. - Москва, 2002. - № 2 (38). - С. 155-160.
8. Шкуматов В.М., Рудой А.Л., Овсянко С.Л., Фролова Н.С., Царенков В.М., Петров П.Т., Босенко А.М. Химические проблемы создания новых материалов и технологий // Сборник статей к 20-летию НИИФХП БГУ / НИИ физико-химические проблемы. - Минск. 1998. – С. 56-59.
9. Marc J.E.C. van der Maarel a,b,d,* , Bart van der Veen a,d,, Joost C.M. Uitdehaag c,d, Hans Leemhuis a,a, L. Dilkhuisen a,d . Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. J. Biotechnol., 2002, v. 94, p. 137-155.
10. Masayuki Kagawa, Zui Fujimoto, Mitsuru Momma, Kenji Takase, and Hiroshi Mizuno*. Crystal Structure of Bacillus subtilis α -Amylase in Complex with Acarbose. Journal of Bacteriology, Dec. 2003, p. 6981–6984 Vol. 185, No. 23.
11. Бекжанова, О., & Юсупалиходжаева, С. (2018). Этиологическая структура кандидоза полости рта в республике Узбекистан. Стоматология, 1(3 (72)), 13-17.
12. Юсупалиходжаева, С., & Бекжанова, О. (2018). Изучение биомаркеров протеолиза–антипротеолиза в развитии кандидозного стоматита полости рта. Журнал проблемы биологии и медицины, (3 (102)), 114-117.
13. Шукурова, У. А., Садикова, И. Э., & Бахадиров, Р. Г. (2019). Современные методы лечения клиновидных дефектов твердых тканей зубов. In Актуальные проблемы стоматологии детского возраста и ортодонтии (pp. 212-216).
14. Shukurova, U. A., & Gaffarova, S. S. (2022). Indicators Of Free Radical Oxidation Of Oral Fluid In Patients With Lichen Plus Of The Mucosus Cavity Of The Mouth. Journal of Pharmaceutical Negative Results, 862-865.
15. Sunnatulloevna, G. S., Abdurasulovna, S. U., Amrulloevich, G. S., & Feruza Saidkarimovna, M. Comparative Evaluation of Adhesive Microbial Colonization of the Oral Cavity to Various Filling Materials. International Journal on Integrated Education, 4(6), 235-241.
16. Khamidova, M. A., & Orifkhonova, N. O. (2024). The importance of micro and macroelements in microclonal propagation of potatoes. Современное Образование И Исследования, 1(1), 195-197.
17. Rajabova, S. A., & Normurodova, Q. T. (2024). Orol bo'yi xududlarining sho'rlangan va qurg'oqchil tuproqlarini qayta tiklashda biopreparatlardan foydalanish. Tanqidiy nazar, tahliliy tafakkur va innovatsion g'oyalar, 1(1), 114-116.