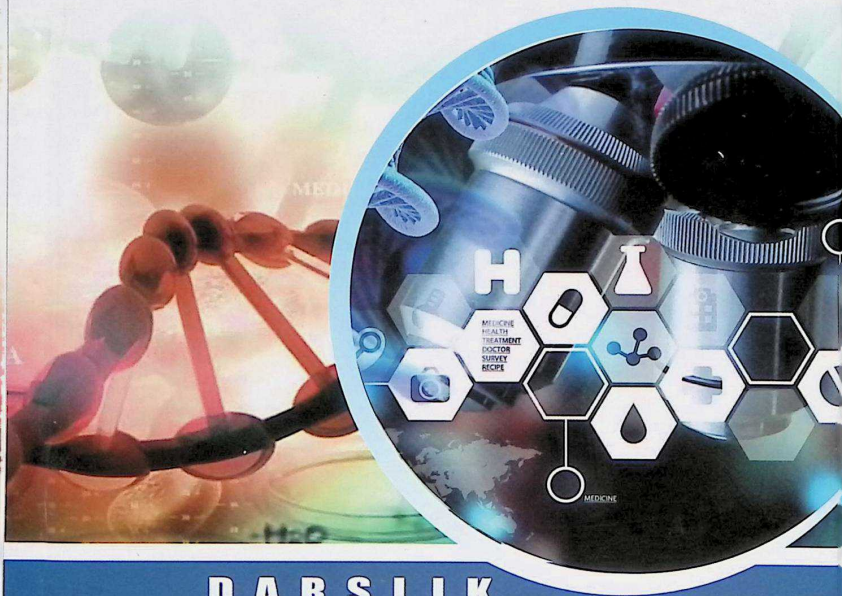


Sh.S. Tashmuxamedova  
Z.A. Kadirova

# BIOTEKNOLOGIYA



DARSLIK

**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI  
OLIV TA‘LIM, FAN VA INNOVATSIYALAR  
VAZIRLIGI**

**MIRZO ULUG‘BEK NOMIDAGI  
O‘ZBEKISTON MILLIV UNIVERSITETI**

**SH.S. TASHMUXAMEDOVA, Z.A. KADIROVA**

# **BIOTEXNOLOGIYA**

**DARSLIK**

60510100 – Biologiya (turlari bo‘yicha)

**Toshkent**

**«Mehr-nuri nashriyoti»**

**2024**

UO'K 60(075.8)  
KBK 30.16ya73  
T 29

574,6  
T 29

**Tashmuxamedova, Sh.S.**

**Biotexnologiya [Matn]:** darslik / Sh.S. Tashmuxamedova,  
Z.A. Kadirova. – Toshkent: «Mehr-nuri nashriyoti», 2024. –  
272 b.

Darslik “Biotexnologiya” fani dasturiga muvofiq yozilgan bo‘lib, unda ushbu fanning maqsadi va vazifalari, tadqiqot usullari va uning asosiy yo‘nalishlari yoritilgan. Shuningdek, fanning boshqa turli sohalardagi muammolarni yechishda tutgan o‘rni, turli sohalarda ishlatiladigan fermentlarning o‘ziga xos xususiyatlari, o‘simlik va hayvon organlaridan fermentlar ajratib olish usullari, biospetsifik sorbentlar haqida tushuncha va ular asosida yaratilgan texnologik jarayonlar, organizm (in vivo) gen injenerligi, genlar tuzilishi va ekspressiyaning boshqarilishi, rekombinant DNK olish texnologiyasi, o‘simlik va hayvon gen muhandisligi haqidagi ma’lumotlardan iborat.

**Mas’ul muharrir:**

**Eshova X.** – biologiya fanlari doktori, professor

**Taqrizchilar:**

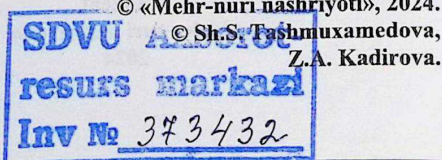
**Kuchkarova L.S.** – biologiya fanlari doktori, professor

**Yakubov M.D.** – biologiya fanlari nomzodi

UO'K 60(075.8)  
KBK 30.16ya73

ISBN 978-9910-8801-6-2

© «Mehr-nuri nashriyoti», 2024.



## BIOTEKNOLOGIYA (DARSLIK)

“Biotexnologiya” nomli darslik biologiya (Ta’lim yo‘nalishi – 5140100 Biologiya) va biotexnologiya yo‘nalishi (Ta’lim mutaxassisligi – 70510103 Biotexnologiya) bo‘yicha tahsil olayotgan bakalavrlar, magistrlar va shuningdek, ushbu sohada faoliyat ko‘rsatayotgan ilmiy tadqiqotchilar uchun mo‘ljallangan. Ushbu darslik biotexnologiya fanining maqsadi va vazifalari, fanning tadqiqot usullari, asosiy obyektlari, shuningdek, fermentlarning o‘ziga xos xususiyatlari, biospetsifik sorbentlar, organizm (*in vivo*) gen injenerligi, o‘simlik va hayvon gen muhandisligi haqidagi ma’lumotlardan iborat.

Учебник «Биотехнология» предназначен для бакалавров, магистрантов и научных исследователей, обучающихся в области биологии биология (Направление -5140100 Биология) и биотехнологии йўналиши (Образовательная специальность – 70510103 Биотехнология). В данном учебнике описаны цели и задачи биотехнологической науки, методы исследования, основные объекты науки, а также специфические свойства ферментов, биоспецифические сорбенты, генная инженерия организма (*in vivo*), генная инженерия растений и животных.

The "Biotechnology" (Field of study-5140100 Biology) is intended for bachelors, masters and scientific researchers studying in the field of biology and biotechnology (Educational specialty – 70510103 Biotechnology). This textbook describes the goals and objectives of biotechnological science, research methods, the main objects of science, the role of science in solving problems in other areas and its main directions, as well as the specific properties of enzymes, biospecific sorbents, genetic engineering of an organism (*in vivo*), genetic engineering of plants and animals.

## I BOB. KIRISH. BIOTEXNOLOGIYANING ASOSIY VAZIFALARI VA DOLZARB MUAMMOLARI. FERMENTLAR MUHANDISLIGI

Biotexnologiya fanining yo'nalishlaridan biri bu – fermentlar muhandisligi bo'lib, ushbu yo'nalish turli sohalarda rivojlanishida muhim rol o'ynamoqda. Fermentlarni, ya'ni enzimlarni kimyoviy reaksiyalardagi ko'plab yangi xususiyatlarining ochilishi, ularni biotexnologik yo'l bilan barqaror formalarining yaratilishi, bir necha yo'nalishlarning paydo bo'lishiga va taraqqiy etishiga imkon yaratdi. Enzimologiya muhandisligi sohasini jadal tusda rivojlanishi asosida enzimologiyada fundamental tadqiqotlar bilan birga, natijalarni amaliy tatbiqi birgalikda olib borildi. Biologik faol moddalarni ma'lum manbalardan ajratish, tozalash va amaliyotda qo'llash sohasidagi yutuqlar yuqori darajada katta ahamiyat kasb etdi. Biokatalizatorlarning noyob xususiyatlari, ya'ni ularning spetsifikligi va yuqori katalitik faolligi hamda ferment molekulari strukturasi tutuvchi bog'larning xususiyatlari haqidagi ma'lumotlar, bir qator ilmiy masalalarni hal etishga qaratilgan tadqiqotlarda muhim natijalar olishda, asos sifatida katta rol o'ynadi.

Hozirgi kunda immobillangan oqsillar va turli biologik faol moddalar (BFM) bilan birgalikdagi polimer sistemalar biotexnologiya va tibbiyotning turli sohalarida keng qo'llanilib kelinmoqda. Yuqori fermentativ faollik, mukammal substrat spetsifiklik kabi fermentlarning noyob xususiyatlari, ulardan amaliy foydalanish imkoniyatlarini aniqlab berdi. Tibbiyotda va sanoatda turli fermentlardan foydalanishning samarasi yuqoriligiga qaramay, turli biologik faol moddalarning o'zgaruvchanligini va boshqa xususiyatlarini hisobga olish zarur.

Nativ holatdagi, ya'ni bog'lanmagan holatdagi fermentlar ma'lum muddat saqlanganda o'z fermentativ faolligini yo'qotishi va shu bilan birga, fermentlar biologik sistemalarda barqaror bo'lmasligi to'g'risidagi ma'lumotlar ko'plab ilmiy adabiyotlarda keltirilgan. Shuning uchun ham fermentlarni turli sohalarda keng qo'llanilishi birmuncha chegaralangan. Ushbu kamchiliklarni

bartaraf etish, ko'p yillardan beri dolzarb muammolardan biri bo'lib kelmoqda. Bugungi kunda ushbu muammolarni fanda, amaliyotda fermentlar bilan birga, turli tabiiy va sintetik tashuvchilar vositasida immobillash orqali bartaraf etish usullari hozirda ishlab chiqilib, amaliyotga tatbiq etilmoqda.

Enzimologiyaning jadal rivojlanishi uni tibbiyot va farmatsevtika sohaslariga tez sur'atlarda kirishiga muhim asos bo'ldi. Faol moddalarni yangi xususiyatga ega bo'lishini modifikatsiyalash orqali hal etilishi, nazariy va amaliy masalalarni uzil-kesil yechishga olib keldi. Biroq, bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, barqaror biologik sistemalarni, shuningdek, faol moddalarni ishlab chiqarishda, oziq-ovqat sohasida, tibbiyotda, farmatsevtikada, diagnostikada va boshqa turli sohalarda qo'llash, bog'langan biologik faol moddalarni o'ziga xos sharoitlarda o'rganishni taqozo etadi.

### **1.1. Fermentlar muhandisligi.**

#### **Fermentlar va ularning xossalari**

Fermentlar (lotincha fermentum—bijg'imoq, achitqi) barcha tirik hujayralarda mavjud bo'lgan va biologik katalizator vazifasini bajaruvchi spetsifik oqsillardir. Ular yordamida genetik axborot aniqlanadi va tirik organizmlarda moddalar va energiya almashinuvi jarayoni amalga oshiriladi. Fermentlar sodda va murakkab ko'rinishdagi oqsillar bo'lib, ularning tarkibi oqsilli komponent (apoferment) va oqsil bo'lmagan qism kofermentlardan tashkil topgan. Fermentlarning ta'sir samaradorligi oraliq ferment-substrat kompleksining hosil bo'lishi natijasidagi katalizlanish energiyasining kamayishi bilan aniqlanadi. Substratlarning bog'lanishi faqatgina ma'lum substratlar bilangina faol markazlarda sodir bo'ladi. Fermentlarning xususiyatlaridan biri yo'naltirilgan va boshqariladigan ta'sirga egaligidir. Shu sababli, barcha turdagi moddalar almashinuvi, faol moddalar sintezi, fermentlar ishtirokida boradigan boshqa turli jarayonlar muvofiqlik asosida amalga oshadi va nazorat qilinadi.

Yana shuni qayd etish lozimki, fermentlar molekulari strukturasi fazoviy tuzilishi ham muhim ahamiyatga ega bo'lib, buning asosida uning faolligi xarakterlanadi. Ushbu holat fermentlarning ta'sir tezligi o'zgarishi bilan aniqlanadi va substrat hamda kofaktorlar konsentratsiyasi, muhit pH, haroratga shuningdek, aktivatorlar va ingibitorlarning (masalan, adenil nukleotidlari, karbonil, sulfogidril birikmalar) ishtirokiga bog'liq bo'ladi. Ba'zi fermentlar faol markazlardan tashqari, allosterik boshqaruvchi markazlarga ham ega bo'ladi. Fermentlar biosintez genlar nazorati ostida bo'ladi. Hujayra tarkibida doimiy uchraydigan konstitutiv fermentlar va biosintezga muvofiq substratlar orqali aktivlanuvchi induksion fermentlar ajratiladi. Bir-biri bilan o'zaro funksional bog'langan fermentlar hujayrada strukturaviy tuzilmalar poliferment komplekslarni hosil qiladi. Ko'pchilik fermentlar yoki ferment komplekslari hujayra membranasi yoki organoidlari (mitoxondriya, lizosoma, mikrosoma) bilan mustahkam bog'langan bo'ladi va moddalarning membrana orqali aktiv transportida ishtirok etadi.

Hozirgi kunda 20000 dan ortiq fermentlar ma'lum bo'lib, ularning ko'pchiligi tirik hujayralardan ajratib olingan. Birinchi kristall ferment (ureaza) amerikalik biokimyogar D.Samner tomonidan 1926-yilda kristall holatda olingan. Fermentlarning aminokislotalar ketma-ketligi o'rganilgan va uch o'lchamli fazoda polipeptid zanjirlarning joylashishi tushuntirib berilgan. Laboratoriya sharoitida ribonukleaza fermentining sun'iy kimyoviy sintezi amalga oshirilgan. Fermentlar preparatlaridan turli jarayonlarda jumladan, faol moddalarni olish va miqdorini aniqlashda, gen muhandisligi usullarida nuklein kislotalar molekularidan nusxa ko'chirish, o'zgartirishda, turli yuqumli va autoimmun kasalliklar diagnostikasida va ularni davolashda, shuningdek, bir qator yengil sanoat, oziq-ovqat va farmatsevtika sanoatida, texnologik jarayonlarda keng foydalaniladi. Shu bilan birga biokatalizatorlar ularning oqsil tabiatidan kelib chiquvchi qator spetsifik sifatlar bilan ta'riflanadi. Bu sifatlar fermentlarni oddiy tipdagi katalizatorlardan ajratib turadi. Bunga fermentlarning barqarorligi (harorat ta'sirida o'zgarishi), ularning

muhit pH qiymatiga bog'liqligi, spetsifikligi va aktivatorlar hamda ingibitorlar ta'sirida faolliklarining o'zgarishi kiradi.

Fermentlarning termolabiligi haroratning bir tarafdan fermentning oqsil qismiga ta'sir etishi va juda yuqori haroratda ularni denaturatsiyaga uchratishi va katalitik funksiyasining pasayishi bilan, boshqa tarafdan esa, ferment-substrat kompleksining hosil bo'lishi tezligiga ta'siri va kataliz jarayonining tezlashuviga olib kelishi bilan tushuntiriladi. Fermentlar katalitik faolligining haroratga bog'liqligi tipik egri chiziqalar orqali ta'riflanadi. Haroratning ma'lum qiymatigacha (o'rtacha  $50^{\circ}\text{C}$  gacha) katalitik faollik oshadi, shundan har  $10^{\circ}\text{C}$  oshganda substratning parchalanish tezligi 2 marta ortadi. Shu vaqtda sekinlik bilan qayta faollashgan ferment miqdori uning oqsil qismining denaturatsiyasi hisobiga ortadi.  $50^{\circ}\text{C}$  dan yuqori haroratda fermentli oqsil denaturatsiyasi birdaniga tezlashadi va substratning qayta hosil bo'lish reaksiya tezligi oshsa-da, ferment faolligi pasayadi.

So'nggi yillarda harorat oshishi bilan ferment faolligi ortishi haqidagi batafsil tadqiqotlar shuni ko'rsatadiki, bu bog'liqlik yuqorida qayd etilgandek murakkab xarakterga ega. Birinchidan, ko'p holatlarda harorat har  $10^{\circ}\text{C}$  ga ko'tarilganda fermentning faolligi ikki marta ortish qoidasi, ferment molekulasining konformatsion o'zgarishlarini ortishi bilan bog'liq emas. Fermentning o'z faolligini maksimal namoyish etish harorati uning optimum harorati deb yuritilib, ferment molekulasining faolligi ortishi uning harorat ta'sirida ferment molekulasining harakati kuchayishi bilan xarakterlanadi. Fermentning optimum harorati uning qanday manbadan ajratib olinganiga qarab, turlicha bo'lishi mumkin.

Umumiy holda hayvon organizmidan ajratib olingan fermentlar uchun haroroat ko'rsatgichi  $40$  va  $50^{\circ}\text{C}$ , o'simliklar uchun esa  $50$  va  $60^{\circ}\text{C}$  oralig'ida yotadi. Lekin, ancha yuqori harorat optimumiga ega fermentlar ham mavjud, masalan, papainning (o'simliklardan ajratilgan olingan, oqsil gidrolizini tezlashtiruvchi ferment) optimumi  $80^{\circ}\text{C}$  ni tashkil etadi. Katalaza fermentining ( $\text{H}_2\text{O}_2$  ning  $\text{H}_2\text{O}$  va  $\text{O}_2$  ga parchalanishini

tezlashtiruvchi ferment) optimal harorati esa 0 va 10<sup>0</sup> C oralig'ida, yuqori haroratlarda esa fermentning energetik oksidlanishi va uning inaktivatsiyasi kechadi.

Fermentlar faolligi muhit pH ga bog'liq bo'lib, ushbu faktorning ta'siri ustida ko'pgina olimlar tadqiqot ishlarini olib borganlar. Olib borilgan ilmiy izlanishlar asosida shu narsa ma'lum bo'ldiki, har bir ferment uchun uning maksimal faolligini ko'rsatuvchi muhitning pH qiymati mavjud ekan. Bir qancha fermentlar uchun pH muhitda uning maksimal faolligi, neytral nuqta yaqinida namoyon bo'lar ekan. Kuchli kislotali yoki kuchli ishqoriy muhitda esa faqatgina ba'zi fermentlar yaxshi ishlar ekan.

Vodorod ionlarining yuqori yoki past (optimal bilan solishtirganda) konsentratsiyaga o'tishi, ferment aktivligining bir tekis pasayishi bilan bog'liqdir.

Vodorod ionlari konsentratsiyasining ferment katalitik faolligiga ta'siri, uning faol markazga ta'sirida ko'rinadi. Turli reaksiyalar pH muhitda, muhit kuchli yoki kuchsiz ionlashgan bo'lishi mumkin. Bundan tashqari, muhitning pH – substratning ionlanish darajasiga, ferment-substrat kompleksi va reaksiya mahsulotlariga ham ta'sir ko'rsatadi. Shuningdek, fermentning holatiga undagi kation va anion markazlar mutanosibligi ham katta ta'sir ko'rsatishi mumkin.

Fermentlarning substratlar bilan o'zaro ta'siri, ya'ni spetsifiklik – fermentlarning eng asosiy xususiyatlaridan biridir. Ularning bu xususiyati o'tgan yuz yillikda, ya'ni strukturasi jihatidan yaqin moddalar – fazoviy izomerlarida (a- va b-metilglyukozidlar) efir bog'larini uzilishi, ikkita biologik faol moddalar yordamida amalga oshirishi aniqlangandan so'ng ma'lum bo'lgan. Fermentlar spetsifikligi haqidagi ma'lumotlar ayniqsa, fermentlar bir-biridan sezilarsiz farqlarga ega kimyoviy birikmalarni ham, masalan, metilglyukozid molekulalaridagi 1-uglerod atomidagi vodorod atomini va metoksil radikalining fazoviy joylashuvini ajratishi mumkinligi ma'lum bo'lgandan so'ng yanada mustahkamlandi.

Ilmiy adabiyotlarda ko'rsatilishicha, ferment substrat bilan xuddi "Kalit-qulf" prinsipi asosida bog'lanar ekan. Ushbu nazariya 1894-yilda E.Fisher tomonidan ta'riflangan. Shundan kelib chiqqan holda, fermentning ta'sir spetsifikligi, qat'iy ravishda substrat va ferment faol markazining geometrik strukturasi mosligi asosida amalga oshar ekan.

Biroq ushbu prinsip o'tgan asrning o'rtalarida D.Koshlandning substrat va fermentning indutsirlangan mosligi qonuniyati bilan almashtirildi. Uning mohiyati, substrat va ferment faol markazining fazoviy mosligi, ularning bir-biri bilan xuddi "qo'lqop-qo'l" prinsipi asosida bog'lanishi orqali amalga oshishi bilan tushuntirilib berildi. Ushbu jarayonga aniqlik kiritiladigan bo'lsa, substratda ba'zi bog'larning o'zgarishi, ferment molekulasida esa konformatsion qayta tartiblanish sodir bo'lishi yuz beradi. Ferment faol markazining o'zgaruvchanligi, Koshland nazariyasi bo'yicha, fermentlarning faollanish va ingibirlanish ta'siri hamda ular faolligini turli faktorlar ta'sirida boshqarilishi ushbu qonuniyat yordamida qoniqarli darajada asoslab berildi. Xususan, ferment faolligi o'zgarish jarayonida undagi konformatsion qayta tartiblanishlarni Koshland o'rgimchakning o'ljasi (substrat) tushgan paytdagi tebranishi bilan taqqoslagan.

Hozirgi kunda Koshland gipotezasining o'rnini sekinlik bilan topokimyoviy muvofiqlik gipotezasi egallamoqda. Topokimyoviy muvofiqlikka ko'ra, substrat va fermentning bir-birini indutsirlovchi asosiy holatlarini saqlagan holatda, fermentning ta'sir spetsifikligi, birinchi navbatda substratning kataliz jarayonidagi o'zgarmay qoladigan qismlarini tanishi orqali borishi tushuntiriladi. Bu holatda substratning o'zgarmas qismi va fermentning substrat markazi orasida ko'p sonli gidrofob bog'lanishlar va vodorod bog'lar paydo bo'lishi bilan xarakterlanadi.

### Nazorat savollari

1. Fermentlar xususiyati haqida ma'lumot bering.
2. Ferment bilan substrat qaysi prinsip bo'yicha ta'sirlashadi?
3. Ovqat hazm qilish jarayonida ishtirok etadigan fermentlar haqida ma'lumot bering.
4. Fermentativ kataliz qanday prinsip asosida amalga oshadi?

### Test savollari

1. Ferment bilan substrat qaysi prinsip bo'yicha ta'sirlashadi?
  - A) Komplementarlik
  - B) Substansiya kvartirant
  - C) Qulf-kalit
  - D) Barmoq qo'lqop
2. Fermentlar qanday haroratda va qanday muhitda samarali ishlaydi?
  - A) Suvli muhitda,  $37^{\circ}\text{C}$  haroratda
  - B) Suvli muhitda,  $50^{\circ}\text{C}$  haroratda
  - C) Kislotali muhitda
  - D)  $37^{\circ}\text{C}$  haroratda
3. Qaysi ferment pishloq ishlab chiqarishda qo'llaniladi?
  - A) Renin, fosfataza
  - B) Amilaza, fosfalipaza
  - C) Ximozin, pepsin
  - D) Protreaza, lipaza

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Fermentlarning xalq xo'jaligidagi ahamiyati.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

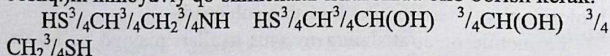
## II BOB. FERMENTLARNI AJRATISH, TOZALASH TEXNOLOGIYALARI

Uzoq yillar davomida barcha fermentlar oqsil tabiatli moddalar deb sanalib kelingan. 80-yillarga kelib, quyi molekulyar ribonuklein kislotalarni turli holatlarga o'tish reaksiyalarini tezlashtirishda fermentlarning roli mavjudligi ma'lum bo'ldi. Bu esa ribozimlar deb ataluvchi poliribonukleotid tabiatiga ega ba'zi fermentlar haqidagi qarashlarning paydo bo'lishiga olib keldi va bir qator fermentlar, jumladan ribonukleazalar, lizotsim, ferredoksin kabi sitoxrom S kabi fermentlarni laboratoriya sharoitidagi sintezi amalga oshirildi. Sintetik fermentlarning olinishi murakkab va qimmat bo'lganligi sababli, hozirgi kunda fermentlarni olishning eng samarali yagona real usuli, bu ularni biologik obyektlardan ajratib olish hisoblanadi.

Fermentlarni ajratishning maxsus usullari mavjud bo'lsa-da, fermentlarni boshqa oqsillar singari klassik yoki biospetsifik usullar yordamida ajratish samarali hisoblanadi. Lekin, fermentlarni nativ xususiyatlarini tozalash jarayonida yaxshi saqlanuvchi usullardan biri, bu glitserin bilan ekstraksiya qilish, shuningdek,  $10^0$  C dan yuqori bo'lmagan haroratda tez suvsizlantirish va asetonli kukunlar yordamida ajratish kabi metodlarni aytib o'tish mumkin. Ushbu usullar qatoriga fermentlarni adsorbentga adsorbsiyalash yo'li bilan olinishini ham kiritish mumkin. Adsorbsion metod fermentlar kimyosiga A.Ya.Danilevskiy tomonidan kiritilgan bo'lib, fermentologiya yo'nalishining rivojlanishida muhim turtki bo'ldi. Hozirda fermentlarni ajratish va tozalashning adsorbsion metodi batafsil o'rganilgan. Shular qatorida ionalmashinuvli xromatografiya, elektroforez va asosan izoelektrofokushlash kabi metodlar ham keng qo'llanilmoqda. Adsorbsion metodning modifikatsiya qilingan usullaridan biri affin xromatografiya metodi hisoblanib, bunda adsorbent fermentga xos ravishda tanlanadi yoki sintez qilinadi. Natijada, xromatografiya jarayonida faqat ushbu fermentgina kolonkada ushlab qolinadi, qolgan moddalar esa kolonkadan chiqib ketadi. Ushbu metod asosida faqatgina bir

qavatli (affin sorbsiya-elyusiyani)ni qo'llagan holda, ferment molekulasini bir necha ming marotabagacha tozalash mumkin.

Hujayradan, subhujayraviy strukturalar: lizosomalar, mitoxondriyalar, yadro tarkibidan va boshqa individual strukturalardan fermentlarni muvaffaqiyatli ajratib olish uchun hujayrani va yuqorida qayd etilgan komponentlarni juda ham maydalash kerak bo'ladi. Fermentlarni ajratib olishda barcha jarayonlar uchun eng muhimi, bu oqsil denaturatsiyasi jarayoni hisoblanadi. Sababi, fermentlarni ajratish jarayonida ferment o'z fermentativ faolligini yo'qotmasligi lozim. Shuning uchun, ferment molekulasini ajratishda -HS- guruhni tutuvchi birikmalar (sistein, glutation, merkaptolanol, sisteamin, ditiotreitol va boshq.)ni himoyaviy qo'shimchalar ishtirokida olib borish kerak.



#### Sisteamin Ditiotreitol

Fermentlarni ajratib olishning barcha bosqichlarida past haroratni ushlab turish kerak, chunki ular oqsil tabiatli bo'lganligi sababli, ular harorat yuqori bo'lsa o'z faolliklarini yo'qotishlari mumkin.

Ferment preparatining tozalik darajasini, ya'ni gomogenligini baholash uchun oqsil kimyosida mavjud metodlarga tayaniladi. Yuqori tozalikka ega, gomogen ferment preparatlarni olish usullarining takomillashishida, birinchi marta 1906-yilda A.D.Rozenfeldning fermentlar ustida olib borgan tadqiqotlari muhim rol o'ynadi. Olim tomonidan aniqlangan fermentni kristall (turpdan oksidaza fermentini ajratib, kristallar ko'rinishida taqdim etgan edi) holatda bo'lishi mumkinligini ko'rsatilishi, fanda, fermentologiyada keskin burilishga sabab bo'ldi. Shundan so'ng, boshqa enzimolog olimlar tomonidan katta tadqiqot ishlari olib borildi va ular bir qator fermentlarni kristall holatda ajratib olishga muvaffaq bo'ldilar.

Ferment preparatining tozalik darajasi uning biologik faolligi bilan xarakterlanadi. Agar uning faolligi tozalash jarayonining keyingi bosqichida ortmasa, preparat o'zining maksimal faolligiga erishgan deb, hisoblash mumkin. Bu o'rinda shuni qayd

etish lozimki, bugungi kundi fermentologiyada fermentlar ro'yxatiga kiritilgan 2000 dan ziyod fermentdan 1500 tasi turli usullar yordamida ajratib olingan bo'lib, ular turli darajada tozalangandir. Ulardan ba'zilar kristall holatda olingan.

Fermentlar va boshqa oqsil moddalari har xil erimaydigan birikmalarga adsorbsiyalanishi (so'rilish) mumkin. Bu xususiyat oqsil aralashmalarini ajratishda va ayniqsa, fermentlarni laboratoriya sharoitida tozalashda hamda gomogen bo'lgan ferment preparatlarini olishda muhim rol o'ynaydi. Adsorbsiya usuli, shu bilan birga kolonkali xromatografiya usullari fermentlarni yuqori darajada toza va ko'p miqdorda olish imkonini beradi.

Oqsillarning muhim adsorbentlari bo'lib, har xil ionalmashuvchilar, ya'ni kalsiy fosfat, aluminiy gidroksid gellari va ma'lum tipdagi fermentlar uchun maxsus bo'lgan har xil affin adsorbent moddalar hisoblanadi. Fermentlarni tozalash va oqsillarni ajratish texnologiyasi quyidagicha amalga oshiriladi. Bunda ferment preparatining oqsil aralashmasi fermentga xos va mos bo'lgan erituvchida (buferda) eritiladi va shu erituvchi bilan muvozanatlangan kolonkaga yuboriladi. Keyin esa shu kolonkadan bufer yoki konsentratsiyasi ortib boruvchi gradientli yuvish eritmasi, yoki bo'lmasa ushbu ferment uchun maxsus bo'lgan bog'lovchi (ligand) yordamida oqsil bosqichma-bosqich yuviladi. Kolonkadan yuvish natijasida olingan ferment preparatlari fraksiyalarga ajratilgan holda yig'iladi va fermentning toza preparatini olish uchun boshlang'ich material bo'lib xizmat qiladi.

### **Nazorat savollari**

1. Fermentlarning o'ziga xos xususiyatlaridan qaysi biri biotexnologiyada muhim rol o'ynaydi?
2. Fermentlar muhandisligi yo'nalishi o'z oldiga qanday maqsad qo'ygan?

### Test savollari

1. Fermentlarni eng ko'p miqdorda ajratish mumkin bo'lgan manbani aniqlang.
  - A) Miroorganizmlar
  - B) Viruslar
  - C) Hayvon organlari
  - D) O'simliklar
2. Saxarozani qanday ferment ta'sirida parchalash mumkin?
  - A) Invertaza
  - B) Esteraza
  - C) Amilaza
  - D) Glukooksidaza
3. Qaysi ferment reaksiya tezligini 1014 marta tezlashtirish xususiyatiga ega?
  - A) Ureaza
  - B) Katalaza
  - C) Lipaza
  - D) Liaza
4. Qaysi fermentlar o'simlik hujayra qobig'ini lizis qilishi mumkin?
  - A) Selluloza, pektinaza, proteinaza
  - B) Selluloza, fenoloksidaza, amilaza
  - C) Amilaza, proteinaza, pektinaza
  - D) Pektinaza, invertaza, esteraza
5. Quyidagi fermentlarga xos xususiyatlardan qaysi biri biotexnologiyada muhim rol o'ynaydi?
  - A) barqarorligi
  - B) aktiv markazning tuzilishi
  - C) muhitning ta'siri
  - D) denaturatsiyaga moyilligi

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Fermentlarning xalq xo'jaligidagi ahamiyati.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

## 2.1. Ionalmashinuv xromatografiya usuli

Ionalmashinuv xromatografiya usulida oqsillar elektrostatik kuch yordamida bog'lanadilar, ya'ni ushbu jarayon zaryadlangan oqsil guruhlari va zaryadlangan ionalmashuv birikma guruhlarning zich qatlami asosida yuzaga keladi.

Tipik ion almashuvchi sifatida bo'ktirilgan dietilaminoetilni (DEAE-) yoki karboksimetil (KM-) sellulozani ko'rsatish mumkin. Ular bo'ktirilgan holatda zaryadli guruhlarning 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" deb yuritiladi.

Kolonkada adsorbsiyalangan kerakli oqsilni yuvish uchun affin xromatografiya usulidan tashqari yana ikki usuldan foydalaniladi.

Birinchi usul – buferning pH ko'rsatkichini ma'lum darajada o'zgartirish bilan ion kuchini oshirib, adsorbent va oqsil o'rtasidagi elektrostatik o'zaro ta'sirni kamaytirishdir. Bu usul umuman yaxshi natija bermaydi. Chunki, bufer pH ko'rsatkichini birdaniga o'zgartirish oqsil aralashmalari va boshqa birikmalarning yomon ajralishiga sabab bo'ladi.

Keyingi yillarda bu usul xromatofokus usuliga o'tkazish yo'li bilan takomillashtirilmoqda. Bunda yuvish jarayonida *amfolit* tipidagi buferlardan foydalaniladi.

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

Ion almashuvchiga bog‘langan fermentni esa ushbu jarayonda affinli yuvish yordamida ajratish mumkin. Buning uchun kolonkaga oqsil bilan bog‘lanadigan maxsus ligand yuboriladi. Bunda oqsil ligand bilan birgalikda tezda kolonkadan yuvilib chiqadi. Lekin, kerakli oqsilni taniydigan va uni sorbentdan ajratib oladigan ligandni topish juda mushkul vazifadir. Shu bilan birga ligandning qanday zaryadlanganligi va konsentratsiyasiga alohida e‘tibor berish kerak. Aks holda qarama-qarshi holatda ligand o‘zi ionalmashuvchiga bog‘lanib qolishi mumkin.

### Nazorat savollari

1. Xromatografik usullar nima maqsadda ishlatiladi?
2. Ion almashuv xromatografiya usullarini tushuntiring.

### Test savollari

**1. Fermentlarni kimyoviy immobillashda tikuvchi sifatida qanday moddalarni ishlatish mumkin?**

- A) Glutar aldegidi, gossipol, karbodiimid
- B) Gossipol, gidrolaza, EDTA,
- C) Karbodiimid, gossipol, etilen
- D) Etilen, gossipol, lizin

### Mustaqil ta‘lim mavzulari

1. Ionalmashuv xromatografiya usulida fermentlarni tozalash.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

### 2.2. Affinli (biospetsifik) xromatografiya usuli

Affinli (biospetsifik) xromatografiya usuli oqsil va fermentlarni tozalash hamda ajratishning adsorbsiya hodisasiga asoslangan usullari ichida alohida o‘rin egallaydi. Ko‘pincha ushbu usul, affin xromatografiya yoki bioaffin, yoki biospetsifik xromatografiya deb yuritiladi.

Ma‘lumki, barcha biologik faol birikmalar, xususan fermentlar ham *ligandlar* yoki *affinli ligandlar* deb nomlanadigan birikmalarga maxsus bog‘lanish xususiyatlariga egadir. Agarda

shunday ligandlar inert matritsaga kovalent bog'lansa, faqat kerakli fermentni bog'lovchi va qolgan oqsil moddalarni o'tkazib yuboruvchi maxsus adsorbentni hosil qilish mumkin.

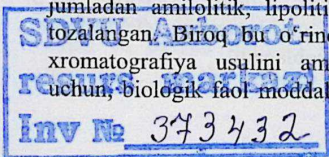
Maxsus yuvuvchi buferlar yordamida yoki jarayon optimal sharoitlarini yaratish asosida, ligandning fermentga bo'lgan xususiyatini o'zgartirish va desorbsiyalash yo'li bilan bitta yuqori tozalikka ega bo'lgan ferment preparatini olish mumkindir. Biroq, ligandni va matritsani, ya'ni sorbentni tanlash juda qiyin vazifadir. Ko'pchilik hollarda affin adsorbentlarni sintez qilishda tozalanayotgan fermentning xususiyatlarini e'tiborga olish kerak.

Sorbent yuqori spetsifiklikka ega bo'lmashligi, boshqa fermentlarni, turli moddalarni ham ushlab qolishi natijasida fermentni bu murakkab kompleksdan ajratib olishni qiyinlashtirishi ham mumkin.

Affin xromatografiyada turli xildagi erimaydigan sorbentlardan foydalaniladi. Xromatografiya jarayonida ko'p qo'llaniladigan sorbentlardan biri, bu agaroz donachalaridir. Ular yuqori bosimda o'z shaklini saqlaydi va buferlarda, shuningdek ba'zi erituvchilarda o'z xususiyatlarini barqaror saqlaydi.

Xromatografiyada ishlatiladigan ligandlarga juda katta talablar qo'yiladi. Jumladan, ular matritsaga shunday bog'langan bo'lishi kerakki, oqsillar moddalar hech qiyinchiliksiz ularga kelib bog'lanishi va buning uchun esa matritsa bilan ligand o'rtasida hech qanday qo'shimcha komponent ko'prikcha vazifasini o'tashi kerak bo'lmashligi lozim. Bundan tashqari, ligand xromatografiya jarayonida boshqa birikmalar bilan o'zaro bog'lanmasligi, sorbaentni yuvishda va regeneratsiya jarayonlarida o'z xususiyatlarini o'zgartirmasligi zarur.

Sorbentlarga qo'yilgan ushbu shartlardan ko'rinib turibdiki, affin xromatografiya jarayoni murakkab va o'ziga xos jarayon bo'lib, amaliyotchidan katta bilim talab etadi. Shunga qaramay ushbu usul amaliyotda keng qo'llanilib, ko'plab fermentlar, jumladan amilolitik, lipolitik fermentlar ana shu usul asosida tozalangan. Biroq bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, affin xromatografiya usulini amaliyotda yanada kengroq qo'llash uchun, biologik faol moddalarga xos va ularga spetsifik bo'lgan



yangi ligandlarni topish, shuningdek, suvli eritmalarda erimaydigan, bo'lmaydigan va boshqa ijobiy xususiyatlarga ega bo'lgan, sorbentlarni sintez qilish kerak bo'ladi.

### Nazorat savollari

1. Affinli xromatografiya deganda qanday usulni tushunasiz?
2. Affinli xromatografiyada qanday sorbentlar ishlatiladi?

### Test savoli

1. Fermetlarni immobilizatsiya qilish usullarini aniqlang.  
A) kimyoviy va fizikaviy yo'llari bilan  
B) modifikatsiya va rektifikatsiya yo'li bilan  
C) izotop moddalar asosida ishlov berish asosida  
D) affinli xromatografiya usulida

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Affinli xromatografiya usulida fermentlarni tozalash.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

### 2.3. Gel xromatografiya usuli

Amaliy enzimologiyada yuqori haroratga chidamli bo'lmagan fermentlarni va boshqa biologik faol moddalarni past haroratda o'ziga xos sharoitda ajratish, tozalash ishlari amalga oshiriladi. Enzimlarni biror manbadan ajratib, tozalash jarayoni davomida ular uzoq muddat eritma tarkibida bo'lib o'z faolliklarini bir muncha yo'qotishlari mumkin. Shu sababli, bunday sharoitda ferment preparatlarini turli usullar asosida tezda fraksiyalarga ajratish ishlari amalga oshirish talab etiladi. Sababi, ferment preparati tarkibidagi boshqa birikmalar, asosiy ferment preparati faolligiga salbiy ta'sir ko'rsatishi mumkin. Natijada tozalanayotgan asosiy ferment preparatining fermentativ faolligi ancha pasayadi.

Ferment preparatini tozalash usullari orasida ko'p qo'llaniladigan usullardan biri gelfiltratsiya, elektroforez, izoelektrik fokuslash kabi usullar hisoblanadi.

Ferment preparatlarini tozalash usullari orasida amaliy ahamiyatga ega bo'lgan usullardan biri – gelfiltratsiyadir. Gelfiltratsiya usulini amalga oshirish uchun, ko'p hollarda dekstran ishlatilib, ushbu jarayonda gelning o'lchami muhim rol o'ynaydi. Sababi, gel o'lchamiga qarab, eritma tarkibidagi modda makromolekulalarini ajratish amalga oshiriladi.

Gelfiltratsiya jarayonida ishlatiladigan gel, kolonkalarini oson to'ldirish uchun yumaloq donachalar (granula) ko'rinishida bo'ladi. Donachalarda mayda teshikchalar mavjud bo'lib, ularga faqat juda kichik molekulari birikmalar kiradi, yirik molekular esa kirmaydi va natijada kirmay qolgan molekular gel yuzasidan tezda yuvilib, kolonkadan fraksiyalarga ajralib chiqa boshlaydi. Gelfiltratsiya jarayoni esa shu sababdan ham, moddalarni molekulyar og'irliklari asosida fraksiyalarga ajralishiga asoslangan.

Fermentlarni tozalash va ajratish nafaqat laboratoriya sharoitida, balki sanoat miqyosida ham amalga oshiriladi. Gelfiltratsiya uchun yuqorida qayd etilganidek, dekstran (sefadekslar va sefakrillar) gellaridan, poliakrilamid (biogellar), akrilamid, agaroz gellaridan (ultragellar) va boshqa qattiq *CL*-sefaroza va *S*-sefakril kabi gellardan foydalaniladi. Kolonkada ferment eritmasining bir qismi gel donachalar orasida va bir qismi esa donachalarning teshikchalari ichida joylashadi.

Gelfiltratsiya – jarayoni eritilgan moddalar eritmaning yuzasida joylashgan harakatchan va ichki tomonida joylashgan kam harakatli qismlarida amalga oshadi. Kolonkada eritilgan moddaning ushlab qolinish darajasi, uning gel teshikchalariga kira olish qobiliyatiga bog'liqdir. Shuningdek, gelfiltratsiya jarayonida kolonkadan avval yuqori molekulari moddalar va keyin esa kichik molekularlari birin-ketin chiqa boshlaydi, bunda gel molekulyar to'r vazifasini bajaradi. Bu jarayon mukammal ravishda olib borilishi uchun, gel tayyorlangan komponent, erigan birikmalar ta'siriga juda ham inert bo'lishi kerak.

Afsuski, bugungi kunda ishlatilayotgan barcha gellar inert emas va ba'zan ma'lum pH ko'rsatkichida, salbiy jihatlarni namoyon qilishi mumkin. Masalan, shunday gellarga

sefaakrillarni kiritish mumkin. Biroq, ba'zi jarayon davomida uchraydigan kamchilik, qiyinchiliklarga qaramasdan gelfiltratsiya usuli ajratish mushkul bo'lgan, turli xil moddalarni mayda gel donachalarida yuqori bosim ostida ajratish imkonini beradi. Yuqori bosim ostida amalga oshirish mumkin bo'lgan ushbu suyuq xromatografiya uslubi qisqa vaqt ichida ko'p komponentli moddalarni ajratish mumkinligi bilan ajralib turadi va shu bilan birga ushbu usul biologik faol moddalarni tozalashning so'nggi bosqichlarida qo'llanilsa ham juda samarali hisoblanadi.

### **Nazorat savollari**

1. Gel xromatografiya usulida qanday sorbentlar ishlatiladi?
2. Fraksiyalarga ajratish bosqichlarini tushuntiring.

### **Test savoli**

**1. Oqsil tabiiatli biologik faol moddalar qanday organik moddalar yordamida cho'ktiriladi?**

- A) Etanol, atseton
- B) Atseton, antronil
- C) Xloroform, atseton
- D) Ekdisteron, atsenonitril

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Affinli xromatografiya usulida fermentlarni tozalash.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

### **2.4. Biologik faol moddalarni organik erituvchilar yordamida cho'ktirish**

Biologik faol moddalarni, jumladan fermentlarni organik erituvchilar yordamida cho'ktirish uchun ishlatiladigan organik erituvchi suv bilan to'liq aralasha oladigan bo'lishi zarur. Asosan bu jarayon uchun etil spirti, aseton va izopropil spirti keng qo'llaniladi. Metanol, n-propanol, dioksan, 2-metoksietanol va boshqa spirtlar, shu bilan birga ketonlar, efirlar va ularning aralashmalari kamroq ishlatiladi. Erituvchilarni tanlashda ularning toksikligiga, portlash xavfidan xolisligiga va regeneratsiya bo'la

olish xususiyatiga e'tibor berish kerak. Ishlab chiqarishda fermentlarni cho'ktirish uchun etil spirti va izopropanol ko'p qo'llaniladi. Aseton esa biroz kamroq ishlatiladi.

Yuqorida qayd etilgan erituvchilar yordamida ferment preparatlarini komplekslarga ajratish yoki fraksiyalar holida cho'ktirib olish mumkin.

Ferment preparatlarini cho'ktirish uchun nafaqat erituvchining tabiati va konsentratsiyasi balki, elektrolitlar ishtiroki, cho'ktirish vaqtidagi harorati, muhit pH ko'rsatkichi, quruq moddalarning tarkibi va miqdori kabi bir qancha omillarga e'tibor berish kerak.

Cho'ktirish vaqtida eritmadagi ba'zi ionlar ferment mo'tadilligiga ta'sir qilishi mumkin. Masalan,  $\text{Ca}^{+2}$  ionlari  $\alpha$ -amilaza, proteinaza, glyukoamilaza fermentlari faolligiga ijobiy ta'sir qilsa, magniy, marganes, kobalt kabi metall ionlari ferment faol markazini himoyalash vazifasini bajaradi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, ba'zi metallarning ( $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Hg}^{+}$  va h.k.) ionlari ferment molekulasiga salbiy ta'sir ko'rsatadi. Shuning uchun ham ularning eritmada bo'lishi maqsadga muvofiq emasdir. Eritmada elektrolitlarning bo'lishi erituvchi sarfini kamaytirishga va cho'kma strukturasi yaxshilashga xizmat qiladi.

Ferment eritmasi va erituvchining harorati fermentni cho'ktirish jarayonida past bo'lishi kerak. Sababi, etanol va fermentning suvli eritmasi aralashtirilganda issiqlik ajralib chiqadi va aralashma harorati  $5-10^{\circ}\text{C}$  ga ko'tariladi. Agarda organik erituvchi (etanol) oldindan sovutilgan bo'lmasa, fermentlarning inaktivatsiyasini kuzatish mumkin. Ushbu holat nafaqat termoinaktivlanishga, hattoki ferment molekulasini denaturatsiyalanishiga olib keladi.

Ferment preparatlarini cho'ktirishda muhit pH ko'rsatkichi juda katta ahamiyatga ega. Ba'zi ferment eritmalarida har xil muhit pH ko'rsatkichi ta'sirida bir-biridan cho'kma miqdori va ferment faolligi bilan farq qiluvchi preparatlar olish mumkin. Ma'lumki, fermentlar o'zlarining izoelektrik nuqtalarida oqsil agregatlarini hosil qilib, to'liq cho'kmaga tushadilar. Oqsillarni

izoelektrik nuqtalarida cho'ktiruvchi reagentlar ishlatmay, cho'ktirish jarayoni izoelektirik cho'ktirish deyiladi.

Organik cho'ktiruvchilar yordamida ferment preparatlarini izoelektrik nuqtasida cho'ktirish, erituvchini kam miqdorda sarflanishiga yordam beradi. Bordiyu, cho'ktirish jarayonida muhit pH ko'rsatkichi izoelektrik nuqta bilan bir xil bo'lmasa, cho'kma miqdori va ferment faolligi 30–50% gacha kamayishini kuzatish mumkin.

Organik cho'ktiruvchilar yordamida faol ferment preparatini olish uchun eritmada 10–12% atrofida quruq modda bo'lishi kerak. Ko'p tadqiqotlardan ma'lumki, fermentlarni cho'ktirishda, ayniqsa proteolitik fermentlar, quruq moddaning eng mo'tadil miqdori 10% bo'lishi kerak.

Yuqorida qayd qilingan omillar bilan bir qatorda ferment eritmalarining erituvchi bilan ta'sir etish muddati ham katta ahamiyatga ega. Ishlab chiqarish sanoatida ferment preparatlarini uzluksiz ishlab chiqarish jarayoni optimallashtirilib, yuqorida qayd etilgan salbiy ta'sir etuvchi omillarni chetlab o'tuvchi usullari ishlab chiqilgan.

Organik erituvchilar bilan cho'ktirishda uning samaradorligi ushbu jarayonda ishlatiladigan asbob-uskunaga ham uzviy bog'liqdir. Bunday asbob-uskunalar asosan ferment eritmaları solinadigan kolonka, to'xtovsiz aralashtirgich, ferment eritmasi va erituvchini to'xtovsiz ravishda uzatuvchi konturlar, separator va avtomatizatsiya tizimlaridan iborat bo'ladi. Silindr shaklidagi aralashtirgichdan ferment eritmasi va erituvchi murakkab harakat yo'nalishi bo'ylab qisqa vaqt ichida aralashib o'tadi va natijada hosil bo'lgan aralashma separator qismiga uzatiladi.

Separatorada cho'kмага tushgan oqsil moddalar ajratib olinadi. Bunday qurilmada ferment bilan erituvchining o'zaro ta'sir muddati o'n marotabagacha qisqartiriladi va fermentning cho'kмага tushish unumi 15–20% gacha ortadi. Separatorada ajratilgan cho'kma har xil usullar bilan mo'tadil sharoitda quritib olinadi. Cho'kma tepasida qolgan suyuqlik tarkibida 50–75% gacha erituvchi modda bo'lib, u rektifikatsiya bo'limida regeneratsiya qilinadi.

Organik erituvchilar bilan cho'ktirish samaradorligi, produsent o'stirilgan oziqa muhiti tarkibiga va ferment preparatining quyushtirilganlik darajasiga ham bog'liqdir.

### Nazorat savollari

1. Biologik faol moddalarni biotexnologiya usullari yordamida olish qanday texnologik jarayonlardan iborat?
2. Biologik faol moddalar olishda ishlatiladigan qanday eritmalarni bilasiz?

### Test savollari

**1. Oziq-ovqat sanoatida ishlatiladigan faol moddalarni cho'ktirish qanday moddalar asosida amalga oshiriladi?**

- A) Etanol, natriy xlor
- B) Natriy xlor, ammoniy sulfat
- C) Atseton, etanol
- D) Metanol, organik kislotalar

**2. Oqsil tabiatli biotik faol moddalar qanday organik moddalar yordamida cho'ktiriladi?**

- A) Etanol, atseton
- B) Atseton, antropiya
- C) Xloroform, atseton
- D) Ekdisteron, atsetonitril

**3. Zamon talabiga javob beruvchi biologik faol moddalar qanday usulda olinadi?**

- A) Gen muhandisligi yordamida
- B) Mikrobiologik usul bilan
- C) Kimyoviy sintez qilish bilan
- D) Biotexnologiya asosida

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Organik erituvchilar yordamida fermentlarni tozalash.
2. Fermentlarni ajratib olishning zamonaviy usullari.

### III BOB. FERMENTLARNI IMMOBILLASH USULLARI VA IMMOBILLASHGA TA'SIR ETUVCHI FAKTORLAR

#### 3.1. Fermentlarni immobillashda (barqarorlashda) ishlatiladigan tashuvchilar

Immobilizatsiya qilish usullarida avvalo "tashuvchilar" (sorbentlar)ning tabiati va fizik-kimyoviy xususiyatiga e'tibor berish talab etiladi. Ma'lumki, sorbentlar tabiatan 2 ta guruhga ajratiladi: masalan, organik va noorganik tashuvchilarga.

Immobilizatsiya jarayonida "tashuvchi" sifatida ishlatiladigan sorbentlarga quyidagi talablar qo'yiladi:

- kimyoviy va biologik mo'tadillik;
- mexanik nuqtayi nazardan mustahkamlik;
- ferment va uni substrati uchun o'tkazuvchanlik;
- texnologik jarayonlar uchun zarur bo'lgan shaklda olish mumkinligi;
- faol guruhlar yuzasida mavjudligi (granula, membrana, kukun va boshqa holatlarda yuzasida guruhlar bo'lishi);
- reaksiyon muhitda o'zgarmasligi;
- yuqori gidrofilligi (immobilizatsiya jarayonini suvli muhitga o'tkazish uchun);
- arzonligi.

Tabiiyki, bu talablarni barchasiga javob bera oladigan tashuvchilar yo'q. Shu sababli, immobilizatsiyani amalga oshirish jarayonida obyekt uchun mos va o'ziga xos bo'lgan tashuvchilardan foydalanish zarur.

Organik polimerli tashuvchilarni ikki sinfga bo'lish mumkin: tabiiy polimerlar va sun'iy polimerlarga. O'z navbatida tabiiy polimerlarni ham biokimyoviy xossalriga qarab guruhlarga bo'lish mumkin; polisaxaridlar; oqsil, lipid tabiatli tashuvchilar. Sun'iy, ya'ni sintez yo'li bilan olingan polimerlar ham guruhlarga bo'linadi, masalan, makromolekularni asosiy zanjirni kimyoviy tuzilishiga qarab, polimetilen, poliamid, poliefir tashuvchilar va h.k.

Immobilizatsiya qilish usulini amalga oshirish jarayonida, fermentni xususiyati va ishlatilishiga qarab, "tashuvchi"larga bir

qator qo‘shimcha talablar qo‘yiladi: masalan, kovalent immobilizatsiya qilinganda “tashuvchi” fermentning faolligini ta‘minlovchi markaz qismi bilan bog‘lanmasligi lozim; (fermentning faol markazi o‘zgarmasligi va jarayon davomida blokirlanmasligi kerak), ferment faolligini kamaytiradigan xususiyatlari bo‘lmasligi shart.

Immobilizatsiya qilish jarayonida bir qator omillarga e‘tibor berish kerak bo‘ladi. Masalan: “Tashuvchi” va ferment har xil zaryadlarga ega bo‘lsa, immobilizatsiya jarayoni tez va mustahkam kechadi, aksincha bir xil zaryadga ega bo‘lsalar jarayon qiyin kechadi; “tashuvchi” granulari qancha kichik bo‘lsa, sorbsiya qilish xususiyati shuncha katta bo‘ladi. Immobilizatsiya jarayonida ko‘proq polimetilen tipidagi “tashuvchi”lar boshqalarga nisbatan kengroq ishlatiladi.

**Noorganik tashuvchilar** sifatida kremnezem, alumin, titan va boshqa elementlar oksidlari, alumosilikatlar (loylar), shisha, sopol, faollashtirilgan ko‘mir va boshqalar keng ishlatiladi.

**Organik tashuvchilar** orasida keng tarqalganlariga har xil polisaxaridlarni, polimerli ionalmashuv smolalarni, kollagen, tovuq suyaklari asosidagi tashuvchilarni va boshqa turdagi tashuvchilarni kiritish mumkin. Tashuvchilar turli ko‘rinishda, kukun, kichik sharchalar, granular, membrana, ipsimon shakllarda ishlatishi mumkin. Ba‘zi hollarda tashuvchilar gidrodinamik qarshilikni pasaytirish maqsadida, tor parallel kanallar saqllovchi monolitlar sifatida ham chiqariladi. Tashuvchilarning eng asosiy xususiyati sorbsiya qilish qobiliyati hisoblanib, bunda ular teshikchalarining o‘lchami, mexanik va kimyoviy barqarorligi eng muhim parametrlardan hisoblanadi. Ferment va "tashuvchi" orasidagi adsorbsion o‘zaro ta’sirning tabiati "tashuvchi" yuzasiga adsorbsiya bo‘lgan ferment molekulalari har xil kuchlar hisobiga, masalan, nospesifik Vander-Vaals, elektrostatik, o‘zaro ta’sirlar, vodorod bog‘lari va gidrofob bog‘lar orqali amalga oshiriladi. Sanab o‘tilgan bog‘larni nisbiy ishtiroki, ferment molekulasidagi faol guruhlarga yoki "tashuvchi"ning kimyoviy tabiatiga bog‘liq bo‘ladi. Ko‘pchilik

hollarda adsorbsion bog‘lanish elektrostatik o‘zaro ta‘sir va vodorod bog‘lar yordamida amalga oshadi.

Ba‘zi vaqtlarda o‘zaro ta‘sir kuchi natijasida "tashuvchi"ning tuzilishida o‘zgarish sodir bo‘lishi mumkin. Masalan, ba‘zi o‘simlik hujayralarini sitodeks granulariga adsorbsiya qilinganda hujayra devori deformatsiyaga uchrangani kuzatilgan.

### Nazorat savollari

1. Fermentlarni barqarorlashning afzallik jihatlari?
2. Fermentlarni barqarorlashda qanday tashuvchilar ishlatiladi?
3. Anorganik tashuvchilar qanday maqsadlarda ishlatiladi?
4. Organik tashuvchilar qanday maqsadlarda foydalaniladi?

### Test savollari

**1. Fermentlarni kimyoviy immobillashda tikuvchi sifatida qanday moddalarni ishlatish mumkin?**

- A) Glutar aldegi, gossipol, karbodimid
- B) Gossipol, gidrozala, EDTA
- C) Karbodimid, gossipol, etilen
- D) Etilen, gossipol, lizin

**2. Imobillangan fermentlarni mikroanalizda qo‘llashda necha xil ferment ishlatiladi?**

- A) 2 xil
- B) 3 xil
- C) 4 xil
- D) A va B

### Mustaqil ta‘lim mavzulari

1. Imobillangan fermentlarning sanoatda ishlatilishi.
2. Imobillangan fermentlarning tibbiyotdagi ahamiyati.

### 3.2. Fermentlarni fizikaviy usulda immobillash

Tashuvchilar bilan bog‘langan "imobillangan fermentlar" deb nomlanuvchi bioorganik "katalizatorlar"ning yangi barqaror ferment preparatlarini yaratilishi natijasida, amaliy enzimologiya

oldida yangi istiqbollar ochildi. Nelson va Griffin Sujelar 1916-yilda invertaza fermentini toshko'mir yoki alyumogelda adsorbsiya qilishni muvaffaqiyatli amalga oshirib, fermentlarni immobillash yordamida katalitik faolliklarini saqlash usulini va ularni barqarorlashni ko'rsatib berdilar. Shundan so'ng, ferment preparatlari ustidagi ilmiy izlanishlar tez sur'atda rivojlanib ketdi. Geterogen katalizatorlarni ishlab chiqarishga yo'naltirilgan tadqiqotlar 50-yillarda katta istiqbollarga erishdi.

"Immobilangan fermentlar" atamasi rasmiylashtirilganligiga uncha uzoq vaqt bo'lmadi. Umuman "immobillanish" tushunchasini shunchaki, fermentning suvda erimaydigan tashuvchilar bilan bog'lanishidan ko'ra kengroq tushunish kerak. Bunga oqsil globularini quyi molekulyar bifunksional reagentlar bilan ichki molekulyar "tikilishi" yoki fermentning suvda eriydigan polimerga bog'lanishi orqali erishish mumkin. Lekin, bunday preparatlarni odatda immobillangan deb atalmaydi: ularni mos ravishda "tikuvchi" yoki polimer reagentlar bilan o'zgartirilgan fermentlarga kiritish maqsadga muvofiq hisoblanadi.

Immobilangan va o'zgartirilgan ferment preparatlari ularning "nativ" oldingi vakillari bilan solishtirilganda (amaliy maqsadlarda ishlatilishida) bir qator muhim afzalliklarga ega faol moddalar hisoblanadi. Birinchidan, reaksiyon muhitdan geterogen katalizatorni oson ajratish mumkin. Ushbu jarayon quyidagicha amalga oshirilishi mumki:

- 1) reaksiyani to'xtatish;
- 2) katalizatorni qaytadan qo'llash;
- 3) ifloslanmagan ferment asosida mahsulot olish.

Qayd etilgan yuqori ko'rsatgichlarga ega bo'lgan ferment preparatlarini oziq-ovqat va farmatsevtika sanoatida ishlatish mumkin. Ikkinchidan, geterogen katalizatorlar fermentli jarayonlarni to'xtovsiz o'tkazish (masalan, oqadigan reaktorlarda) va katalizlanuvchi reaksiyalar tezligini (yoki mahsulot chiqishini) oqim tezligi bo'yicha boshqarishga imkon beradi. Uchinchidan, fermentlarni immobillash yoki modifikatsiyalash ferment xususiyatini, jumladan, uning spetsifikligi (asosan

makromolekulyar substratlarga munosabatiga ko'ra), muhitning pH ko'rsatgichi o'zgarishiga va uni denaturlovchi omillarga barqarorligini maqsadga muvofiq o'zgartirishga imkon yaratadi.

Aynan mana shu uch jihat "enzimologiya muhandisligi" deb ataluvchi ilmiy-texnikaviy yo'nalishning asosini tashkil etadi.

Enzimologiya muhandisligining vazifasi fermentlar asosida ma'lum xususiyatlarni ko'zlagan holda bioorganik katalizatorlarni (shu jumladan, o'sish xususiyatiga ega bo'lmagan sun'iy poliferment komplekslarni va hatto hujayralarni qo'llagan holda) ishlab chiqarishdan iborat. Enzimlar xususiyatlari amaliyot uchun zarur ekanligini yodda tutish kerak. Masalan, ma'lum reaksiya sharoitlarida katalizatorning barqarorligi (termo va kislotaga barqarorligiga bog'liqligi), o'ziga xos reaksiyalarni katalizlashi (spetsifiklik), katalitik faolligi, ba'zi ta'sirlarga chidamliligi va boshqalar.

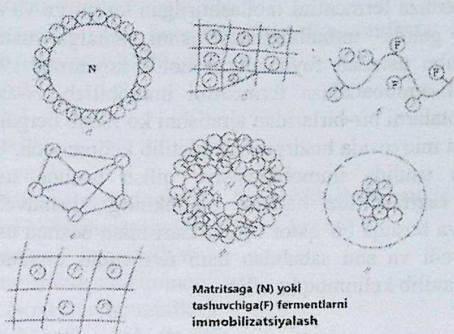
**Immobilash metodlari.** Fermentlarni tashuvchilar bilan bog'lash imkoniyatini beruvchi asosan uch yo'l mavjud bo'lib, bularga adsorbsion usullarni, mexanik bog'lanish va kimyoviy (kovalent) immobilashni kiritish mumkin.

1. Fermentlarni (fizik yoki ion bog'lanishlar natijasida) keramikaga, shisha, silikagel, metall oksidlari va gidroksidlari, polisaxaridlar, organik smolalar va boshqa tashuvchilarga adsorbsiyalash mumkin. Adsorbsiyani tezlashtirish uchun fermentlarning sirtiga ion va gidrofob guruhlarini to'ldiruvchi oqsil globularini kiritgan holda ba'zan esa ular kimyoviy jihatdan o'zgartirilgan holda adsorbsiyalash amalga oshiriladi.

2. Mexanik tarzda adsorbsiyalash usuli polimer geldagi fermentlar, yarimo'tkazgich polimer mikrokapsulalar, g'ovak tolalar, sirti-aktiv komponentlardan tarkib topgan membranalar yoki liposomalar uchun keng qo'llaniladi.

3. Fermentlarni kovalent bog' yordamida immobilash imkonini beruvchi kimyoviy usul kataliz uchun ahamiyatli bo'lmagan funksional guruhlari orqali, jumladan,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-SH$ ,  $-OH$  va boshqa guruhlar yordamida amalga oshiriladi. Noorganik tashuvchilarga yoki funksional guruhlari bo'lmagan tashuvchilarga (masalan, g'ovak shisha, keramika, temir), tabiiy

materiallarga (masalan, selluloza, xitin, dekstran, agaroz) yoki sintetik polimerlarga (masalan, neylon, polistirol, poliakrilamid, ionalmashuvchi smolalar) kimyoviy immobillash jarayoni qo‘shimcha bog‘ hosil qilish (bordiyu imkoni bo‘lsa) orqali amalga oshiriladi.



**1-rasm.** Fizik usulda immobilizatsiya qilish.

Yuqori ko‘rsatib o‘tilganidek, fermentlarni immobillashda, ular o‘z xususiyatlarini saqlagan holda – substrat yoki effektorlar bilan o‘zaro reaksiyaga kirishish qobiliyatlarini yo‘qotmasliklari zarur. Shu sababdan ham fizikaviy usulda immobillashda, bir necha usullardan foydalanish mumkin: masalan, suvda erimaydigan “tashuvchi”larga adsorbsiya qilish; gel g‘ovaklariga kiritish; yarim o‘tkazgich membranalar yordamida fermentni immobillab, reaksiyon tizimni boshqa qismidan ajratish; liposomalarga immobillash yoki kiritish. Bunday sharoitda ferment ikki fazalik reaksiyon muhitga kiritiladi va ushbu sharoitda ferment suvda eruvchan bo‘ladi va ikkinchi fazaga o‘ta olmaydi.

Keltirilgan klassifikatsiya shartlidir, chunki bu usullar orasida aniq ajrimlarni o‘rnatish mumkin emas. Masalan, gel g‘ovaklariga kiritish usuli bilan immobilizatsiya qilishni, yarim o‘tkazgich membranalar orqali ajratib turish deb, qarash mumkin. Shunga

qaramasdan, yuqorida qayd etilgan usullar fizikaviy usullar bilan immobilizatsiya qilishni bir tizimga solishda yordam bera oladi.

Adsorbsiya qilish orqali immobilizatsiya qilish, eng qulay usullardan hisoblanadi. Shu sababdan ham, yuqorida aytib o'tilganidek, 1916-yilda Dj.Nilson va E.Griffinlar adsorbsion usulda invertaza fermentini faollashtirilgan ko'mirga va aluminiy gidroksid gelida immobilizatsiyalashni amalga oshirganlar. Aynan ushbu usuldan foydalangan holda keyinroq, 1969-yilda I.Shibata L-aminoatsilaza fermentini immobillab, N-asetil-DL-aminokislotalarni bir-birlaridan ajratishni ko'rsatib bergan. Ushbu usul sanoat miqyosida hozirgacha ishlatilib kelinmoqda. Umuman adsorbsiya usulida immobilizatsiya qilish boshqa usullardan osonligi, vazifani tez bajarish mumkinligi, tashuvchilarning arzonligi va boshqa bir qator ustunliklari bilan boshqa usullardan ajralib turadi va shu sababdan ham fermentlar muhandisligida keng qo'llanilib kelinmoqda.

### Nazorat savollari

1. Immobillash deganda nimani tushunasiz?
2. Fermentlarni fizikaviy immobillash usullari qanday turlarga bo'linadi?
3. Fermentlarni immobillashning afzallik jihatlari nimalardan iborat?
4. Fermentlarni fizikaviy immobillash usullari boshqa usullardan nimasi bilan farq qiladi?

### Test savollari

**1. Fermentlar immobillanganidan so'ng ularning faolliklari qanday o'zgaradi?**

- A) Fermentativ faolligi kamayadi
- B) Fermentativ faollik ko'payadi
- C) Fermentni o'z substrati bilan bog'lanib, gidroliz jarayoni tezlashadi
- D) A va B

**2. Fermentlarni kimyoviy immobillashda tikuvchi sifatida qanday moddalarni ishlatish mumkin?**

- E) Glutar aldegidi, gossipol, karbodimid
- F) Gossipol, gidrozala, EDTA
- G) Karbodimid, gossipol, etilen
- H) Etilen, gossipol, lizin

**3. Immobillangan fermentlarni mikroanalizda qo'llashda necha xil ferment ishlatiladi?**

- E) 2 xil
- F) 3 xil
- G) 4 xil
- H) A va B

**4. Fermentlarni fizikaviy immobillashda quyidagilardan qaysi usul ko'proq iqtisodiy samara beradi?**

- A) Mexanik immobillash
- B) Statistik usulda immobillash
- C) Kolonkada immobillash
- D) Elektrodarga cho'ktirish

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Immobillangan fermentlarning oziq-ovqat sanoatidagi ahamiyati.

2. Farmatsevtika sanoatida immobillangan fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.

### **3.3. Adsorbsion immobillizatsiya qilish usullari**

Adsorbsiya qilish yo'li bilan immobilizatsiya qilish eng sodda usullardan biri bo'lib, ferment eritmasini "tashuvchi" bilan aralashtirish yo'li bilan amalga oshiriladi. Yopishmasdan fermentni yuvib tashlagach, immobilizatsiya qilingan ferment ishlatilishga tayyor bo'ladi. Adsorbsion immobilizatsiya qilingan fermentlarni olish uchun quyidagi uslubiy ko'rsatmalardan foydalanadi.

Statistik usul eng oson yo'l bo'lib, "tashuvchi" ferment eritmasiga tashlanib (solinib) hosil bo'lgan aralashma, ma'lum vaqtgacha inkubatsiya qilinadi. Immobilizatsiya fermentni o'z

o'zidan diffuziyasi tufayli boshlanib, adsorbsiya bilan tugallanadi. Ushbu usulning kamchiligi, ferment eritmasi bilan "tashuvchi" aralashmasi uzoq vaqt (bir necha kungacha) inkubatsiya qilinishi lozim. Laboratoriya sharoitida ko'proq aralashtirish, ya'ni mexanik usul ishlatiladi. Bu usulda statistik usuldan farqli o'laroq ferment eritmasi bilan "tashuvchi" doimiy ravishda aralashtirib turiladi.

Aralashtirish uchun magnit aralashtirgich, mexanik aralashtirgich yoki mikrobiologik tebratgichdan foydalanish mumkin. Bu usul oldingisidan ancha ustun bo'lib, "tashuvchi" yuzasida fermentni bir tekis joylanishini ta'minlab beradi. Ba'zida adsorbsion immobilizatsiya qilish uchun elektrocho'ktirish usulidan foydalaniladi. Buning uchun ferment eritmasiga ikkita elektrod tushiriladi, ulardan bittasining yuzasida bir qatlam "tashuvchi" joylashtirilgan bo'ladi. Elektrodlar tokka ulanganda ferment yuzasidagi faol guruhlar ( $-NH_2$ ;  $-COOH$  ba h.k.) harakatlanadi va tashuvchi yuzasida cho'kadi.

Ishlab chiqarishda foydalanish uchun eng qulay usul – kolonkalaridan o'tkazish usuli hisoblanadi. Ushbu usulni kolonkaning ikki tomonidan tepadan pastga qarab, mikronasoslar yordamida ferment eritmasi haydaladi va teskarisi, ferment pastdan tepaga qarab ferment eritmasi yo'naltiradi. Kolonkadan o'tkazish usulida fermentni haydash, yuvish, tozalash va shu bilan birga toza mahsulot olish jarayonlarini birgina kolonkaning o'zida amalga oshirish mumkin. Ushbu usulda hech qanday manipulyatsiya jarayonlari amalga oshirilmaydi.

### **Nazorat savollari**

1. Adsorbsion immobilash deganda nimani tushunasiz? Adsorbsiyadan nimasi bilan farq qiladi?
2. Fermentlarni adsorbsion immobilashda qanday usullar ishlatiladi?
3. Fermentlarni adsorbsion immobilashda qanday tashuvchilar ishlatiladi?

## Test savoli

1. Fermentlarni fizikaviy immobillashda quyidagilardan qaysi usul ko'proq iqtisodiy samara beradi?

- A) Mexanik immobillash
- B) Statistik usulda immobillash
- C) Kolonkada immobillash
- D) Elektrodarga cho'ktirish

## Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Adsorbsiya usulida immobillangan fermentlarning oziq-ovqat sanoatida ishlatilishi.

2. Adsorbsiya usulida immobillangan fermentlarning afzalliklari.

3. Farnatsevtika sanoatida immobillangan fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.

### 3.4. Fermentlar adsorbsiyasiga ta'sir etuvchi omillar

Adsorbsiya o'tish jarayoni va ferment bilan "tashuvchi" orasidagi bog'ning mustahkamligi, ko'pchilik hollarda immobilizatsiya qilish sharoitiga bog'liq bo'ladi. Ferment adsorbsiyasiga ta'sir etuvchi omillarga quyidagilar kiradi: tashuvchining g'ovakligi va uning sirt faolligi.

Tashuvchini sorbsiya qilish hajmi uning sirtini faolligiga to'g'ri proporsional oqsil yoki fermentga kelganda bu qonuniyat faqatgina tashuvchini g'ovakligi oqsil molekulasidan anchagina katta bo'lgandagina o'z kuchini saqlaydi. Tashuvchini g'ovakligi juda kichik bo'lganda, fermentlar g'ovaklarga kira olmasa, fermentlar uchun tashuvchilar sathining ma'lum bir qismigina foydali bo'ladi xolos. Bunday vaqtlarda tashuvchining sorbsiya qilish imkoniyatlari juda kam bo'ladi, boshqacha qilib aytganda, g'ovaklar qancha kichik bo'lsa, tashuvchining adsorbsiya qilish imkoniyatlari shuncha kam bo'ladi. G'ovaklarning mo'tadil hajmini hisoblashni birinchilardan bo'lib buni 1976-yilda R.Messing taklif etgan. U shisha va sopol materiallardan tashuvchi sifatida foydalanib, ularning g'ovaklarini kattaligini (hajmini) o'lchab chiqdi va g'ovaklarni kattaligi ferment

molekulasidan taxminan 2 marotaba katta bo'lgan hollarda tashuvchining adsorbsion imkoniyatlari maksimum bo'lishini tajribalarda isbotlab berdi.

Bunday holda substratni molekulyar o'lchami fermentdan ancha kichik bo'lmog'i va sorbsiya qilingan ferment g'ovaklariga bemalol kirib turishi lozim.

Substrat molekulasiining hajmi fermentnikidan katta bo'lgan hollarda tashuvchining g'ovakligi substrat molekulasi bilan belgilanadi. Ba'zi bir hollarda substratning o'zi tashuvchi vazifasini bajarishi ham mumkin. Masalan, sellulaza fermentini immobilizatsiya qilish uchun, uning substrati bo'lgan sellulozadan keng foydalaniladi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, enzimlarni immobilizatsiyada tashqi omillar katta ta'sir ko'rsatadi. Masalan, pH reaksiya muhit immobilizatsiya qilish jarayonida, ayniqsa sorbsiya, elektrostatik o'zaro ta'sir yordamida amalga oshirilgan holatlarda muhim rol o'ynaydi.

Bunga asosiy sabab, pH o'zgarishi bilan oqsil yoki tashuvchining sorbsiya uchun javobgar bo'lgan ionogen guruhlarining ionlashuvi o'zgaradi. Ionalmashuv xossalariiga ega bo'lmagan tashuvchilardan foydalanganda, sorbsiya oqsil yoki fermentni izoelektrik nuqtasida amalga oshirilsa yaxshi natija beradi.

Ammo, ushbu qonuniyatni chetlab o'tish hollari ham uchray turadi. Masalan, albuminni lateksga sorbsiya bo'lishini har xil pH da o'rganib chiqilganda bu jarayonni pH muhitga bog'liqligi aniqlangan, ko'mirga albumin adsorbsiya qilinganda esa, mo'tadil pH 3 dan 6 gacha o'zgarishi, bu o'zgarish ko'mirning tabiatiga bog'liqligi isbotlangan.

Ion kuchi ferment bilan tashuvchi orasidagi bog'lanish kuchiga ta'sir ko'rsatuvchi omil hisoblanadi. Ushbu holda bordiyu, tuzlarni konsentratsiyasi yuqori miqdorda bo'lsa, bunda tuz ionlari tashuvchi sirtidan elektrostatik yo'l bilan bog'langan fermentni siqib chiqaradi.

Boshqacha qilib aytganda, ion kuchini oshishi bilan fermentni desorbsiyalanishi oshib boradi. Ba'zi hollarda bunga aksincha

ta'sir ham bo'lishi mumkin. Bunday hollarda oqsilning "tuzlanishi" sodir bo'lishi mumkin.

**Fermentning miqdoriy konsentratsiyasi.** Eritmada fermentni miqdori oshib borgan sari, uni sorbsiya bo'lishi va immobilizatsiya bo'lgan fermentning katalitik faolligi ortib boradi.

Immobilizatsiya bo'lgan ferment faolligini, eritmadagi ferment miqdoriga nisbatan taqqoslab o'rganilganda, shu narsa ma'lum bo'ldiki, fermentning eritmadagi miqdorini oshib borishi bilan immoillangan fermentning katalitik faolligi ham oshib boradi, keyin esa faollik o'zgarmasligini va hatto kamayishini ham kuzatish mumkin.

Tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, fermentning faolligi tashuvchi sathini butunlay qoplab olgunga qadar ortar ekan. Shundan so'ng esa, tashuvchi yuzasida ferment molekularining qavatma-qavat joylashishi sodir bo'ladi. Bunda tashuvchi yuzasining eng yuqori qismida joylashgan fermentlargina faollik ko'rsata oladi. Quyi qismida, ya'ni ferment molekulasining molekula ostida joylashganlari esa substrat bilan reaksiyaga kirisha olmaydilar. Shu sababdan, ferment konsentratsiyasini muttasil oshirish, immobillash jarayoniga ijobiy ta'sir etmay, ferment molekulasi ortiqcha sarf bo'lishiga olib keladi.

**Haroratni oshishi** adsorbsiya jarayoniga ikki xil ta'sir qiladi. Birinchidan, haroratning oshishi fermentni inaktivatsiyasiga (denaturatsiya) olib keladi, ikkinchi tomondan esa haroratni oshishi ferment molekularini tashuvchi g'ovaklariga diffuziyasini kuchaytirishi natijasida, ferment faolligini oshishiga olib keladi. Demak, adsorbsiya yo'li bilan immobilizatsiya qilishni mo'tadil sharoit bo'lishi zarur.

Adsorbsiya jarayonida tashuvchi yuzasiga bog'liq bo'lib, har bir ferment yoki tashuvchi uchun ushbu omil tajribalar asosida aniqlanadi. Shunday qilib, fermentlarni adsorbsiya yo'li bilan immobilizatsiya qilish bir qator omillarga bog'liq bo'lib, adsorbsiya jarayonida yuqorida qayd etilgan omillar albatta inobatga olinishi kerak.

### Nazorat savollari

1. Fermentlar adsorbsiyasiga qanday omillar ta'sir etishi mumkin?
2. Fermentlar adsorbsiyasiga muhit pH i qanday ta'sir ko'rsatadi?
3. Fermentlar adsorbsiyasiga muhit harorati qanday ta'sir ko'rsatadi?
4. Fermentlar adsorbsiyasiga ion kuchi konsentratsiyasi qanday ta'sir ko'rsatadi?
5. Fermentlar adsorbsiyasiga tikuvchi konsentratsiyasi va tashuvchi yuzasi qanday ta'sir ko'rsatadi?
6. Fermentlar adsorbsiyasiga ferment miqdori va tashqi mexanik ta'sir qanday ta'sir ko'rsatadi?

### Test savoli

1. Fermentlar tashuvchiga qanday sharoitda maksimal adsorbsiyalanadi?

- A) Fermentlarning izoelektrik nuqtasida
- B) Fermentlar konsentratsiyasiga o'ta yuqori bo'lganda
- C) Fermentlarni o'ziga xos pH muhitda
- D) A va B

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Immobillangan fermentlarning oziq-ovqat sanoatida ishlatilishi.
2. Farmatsevtika sanoatida immobillangan fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.
3. Adsorbsiya usulida immobillangan fermentlarning afzalliklari.

### 3.5. Fermentni tashuvchi bilan bog'lanish kuchini oshiruvchi usullar

Tashuvchining yuzasini oldindan modifikatsiya qilish adsorbsiya kuchini keskin oshirishga olib keladi. Bundan tashqari, ferment molekulasi atrofida maxsus sharoit yaratilishi natijasida,

oldindan modifikatsiya qilingan tashuvchida immobilizatsiya qilingan fermentning katalitik faolligini ortadi.

Modifikatsiya qilmasdan adsorbsiya qilish, ferment faolligini butunlay yo'qolishigacha olib kelishi mumkin. Masalan, agar fermentni barqarorligi nordon sharoitda past bo'lsa, silikagelga sorbsiya qilingan fermentning faolligi butunlay yo'qoladi, chunki, silikagelning yuzasi nordon muhitga ega (pH 4,0).

Bunday sharoitda, immobilizatsiyadan oldin silikagelni ma'lum pH ga ega bo'lgan buferda, fermentni esa mo'tadil pH da saqlab turish lozim bo'ladi.

Xuddi shunday muammo, fermentlar faol markazida metall mavjud bo'lgan holatlarda, olib borilayotgan tadqiqotlarda kelib chiqishi mumkin. Bunga sabab, ba'zi bir tashuvchilar o'zlariga metall ionlarini tortib olish qobiliyatiga egalar. Bunday tashuvchilarda adsorbsiya qilingan fermentlar, o'z faol markazidagi metallni chiqib ketishi hisobidan faoliyatlarini yo'qotishlari mumkin. Ushbu holni bartaraf etish uchun, tashuvchini maxsus metall ionlari saqlagan eritmalarda uzoq vaqt ushlab turish va shu tufayli uni metall ioniga nisbatan bo'lgan ehtiyojini qondirish mumkin bo'ladi.

Tashuvchilarni metall ionlari bilan to'yintirish adsorbsiya yo'li bilan immobilizatsiya qilishni mo'tadillashtirishda ham ishlatiladi. Tashuvchi sirti metall ionlari bilan to'yintirilganda (buning uchun Ti, Sn, Zr, V ba Fe ishlatiladi), fermentning sorbsiya qilish xususiyati ortadi, bunga sabab metall ionlari ferment bilan tashuvchi orasida ko'priq bo'lib xizmat qilishidir. Immobilizatsiyaning bu usuli, selluloza, neylon shisha filtr qog'oz kabi tashuvchilardan foydalanilganda yaxshi natijalar berishi isbotlangan.

### Nazorat savollari

1. Fermentni tashuvchi bilan bog'lanishi qanday kuchlar ta'sirida amalga oshadi?
2. Fermentni tashuvchi bilan bog'lanishi nimalarga bog'liq?
3. Fermentni tashuvchi bilan bog'lanish kuchini oshiruvchi usullarga qaysi usullarni kiritish mumkin?

## Test savoli

### 1. Fermentlarga ta'sir etuvchi omillarni belgilang.

- A) pH-muhit, harorat, tashuvchi yuzasi, ferment miqdori, ion kuchi konsentratsiyasi
- B) Harorat, tikuvchi konsentratsiyasi, tashuvchi yuzasi, ferment miqdori
- C) Ferment miqdori, ion kuchi konsentratsiyasi, tikuvchi konsentratsiyasi
- D) pH muhit, harorat, tashqi mexanik ta'sir

## Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Fermentlarni modifikatsiya qilishning afzalliklari va ularning turli sohalarda ishlatilishi.
2. Adsorbsiya usulida immobillangan fermentlarning afzalliklari.
3. Farmatsevtika sanoatida immobillangan fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.

### 3.6. Modifikatsiya qilingan fermentlarni immobilizatsiya qilish

Fermentlarni ionalmashuvchi tashuvchilarga adsorbsiya yo'li bilan immobilizatsiya qilishda, fermentlarning izoelektrik nuqtasi va pH muhit mo'tadilligi bir-biriga yaqin bo'lgan holatlarda tajriba o'tkazilsa, bir qator muammolar paydo bo'lishi mumkin. Bunday holatda ferment bilan tashuvchi orasidagi mustahkam bog'lanish faqatgina, izoelektrik nuqtadan uzoqroq bo'lgan pH muhitda, ya'ni fermentni katalitik xususiyati past bo'lgan sharoitda amalga oshiriladi.

Shuning uchun ham fermentni oldindan modifikatsiya qilish, ya'ni ferment molekulasiga yangi ionogen guruhlar kiritish maqsadga muvofiq bo'ladi. Masalan, L-ximotripsin xlortriazin bilan aralastirilganda, uni izoelektrik nuqtasi ishqoriy tomonga siljishi va shu tufayli ferment ko'pgina tashuvchilarga adsorbsiya bo'lishi, natijada esa katalitik faolligi saqlanib qolishi isbotlangan.

Boshqa bir misol, L-ximotripsin KM-selluloza bilan modifikatsiya qilinsa, ferment neytral pH muhitda DEAE-sellulozaga yoki DEAE-sefadeksga o'z faolligini saqlagan holda immobilizatsiyalanishi muvaffaqiyatli amalga oshadi.

Immobilizatsiya bo'lgan fermentni tashuvchi yuzasidan oson yuvilib ketmasligi uchun adsorbsiya qilingan ferment qatlamiga bifunksional agentlar bilan ishlov berish kerak bo'ladi. Natijada, tashuvchi yuzasida fermentlarni bir-birlariga bog'langan holatidan iborat yupqa plyonka hosil bo'ladi. Bifunksional agent sifatida glutaraldegid, gossipol va boshqalarni ishlatish mumkin.

Immobilizatsiya qilishning original yo'li professor K.Martinek tomonidan amalga oshirilgan. Bunda tadqiqot davomida qisman kimyoviy destruksiyaga uchragan neylon iplaridan foydalanilib, ushbu tashuvchi, ferment eritmasiga solinadi va mexanik ravishda tortiladi. Natijada neylonni g'ovaklari yiriklashib, unga fermentning joylashishi osonlashadi. Ma'lum vaqtdan keyin tashuvchini tortish jarayoni to'xtatiladi. Bunda neylon yana o'z holatiga qaytadi, ferment molekulari esa g'ovaklarga siqilib kirib adsorbsiyalanadi.

Elektr toki yordamida faol moddani adsorbsiyalash usuli, immobilizatsiyaning yangi usullaridan bo'lib, membranalar yordamida ajratilgan elektrodlar bilan kollektorlarda elektr maydoni hosil qilish orqali amalga oshiriladi. Tashuvchi sifatida silikagel, ion almashuv smolalarini, turli minerallarni ishlatish mumkin.

Ferment kollektordagi tashuvchida elektrostatik va dipol-dipollik o'zaro ta'sir kuchlari orqali ushlab turiladi. Ushbu usulning salbiy jihati shundan iboratki, immobilizatsiya jarayoni butkul elektr toki ta'sirida bo'lishi shart. Elektr tokining uzatilishi to'xtatilsa, bunday holatda ferment tashuvchidan tezda yuvilib ketadi.

Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, adsorbsiya yo'li bilan immobilizatsiya qilishning o'ziga xos afzalliklari va kamchiliklari mavjuddir. Adsorbsiya jarayonining ijobiy xususiyatiga sorbentning arzonligi, tadqiqot o'tkazishni osonligi, bir vaqtning o'zida ferment preparatini tozalash mumkinligini kiritish

mumkin. Ushbu usulning kamchiliklariga esa, ferment va tashuvchi orasidagi bog'ning mustahkam emasligi, umumiy yagona yo'riqnomaning yo'qligidadir.

### **Nazorat savollari**

1. Modifikatsiya qilingan fermentlarga xos xususiyatlar nimalardan iborat?
2. Modifikatsiya qilingan fermentlarni immobilizatsiya qilishning qanday ahamiyati bor?
3. Modifikatsiya qilingan fermentlarga tashqi muhit omillarining ta'siri nimalardan iborat?

### **Test savollari**

**1. Immobillangan fermentlarni mikroanalizda qo'llashda necha xil ferment ishlatiladi?**

- A) 2 xil
- B) 3 xil
- C) 4 xil
- D) A va B

**2. Glukoza- fruktoza siropini olishda qanday immobillangan ferment preparati qo'llaniladi?**

- A) Glukozaizomeraza
- B) Glukoamilaza
- C) Amilaza
- D) Sellobiaza

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Modifikatsiya qilingan fermentlarni immobilizatsiya qilishning afzalliklari va ularning turli sohalarda ishlatilishi.
2. Farmatsevtika sanoatida immobillangan fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.
3. Adsorbsiya usulida immobillangan fermentlarning afzalliklari.

### 3.7. Fermentlarni gel ichiga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilish

Fermentlarni gel ichiga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilish usulining mohiyati shundan iboratki, ferment molekulasini, qattiq to'qilgan polimer zanjirlaridan iborat bo'lgan gel hosil qiluvchi elaklarga o'rnatiladi. Zanjir bog'lari orasidagi masofa ferment molekulasidan kichik bo'lgani uchun, u mahkam siqilib turadi va polimerdan chiqib keta olmaydi. Ferment bilan tashuvchi orasidagi bog'ni mustahkamligini oshiruvchi omil rolini ferment va tashuvchi gel orasida paydo bo'lgan vodorod bog'lari ham o'ynashi mumkin. Bunda polimer zanjirlari orasidagi bo'shliq, suv bilan to'ldirilgan bo'ladi. Masalan, akril kislotasi hosilalari asosida paydo bo'lgan gelda, uning miqdoriga qarab, 50 dan 90% gacha suv bo'lishi mumkin.

Fermentlarni gelda immobilizatsiya qilishning ikki usuli bor. Birinchisi, ferment monomer eritmasida eritiladi, so'ngra polimerizatsiya qilinadi. Bunday eritmaga ko'pchilik hollarda bifunksional agentlar ham qo'shiladi.

Ikkinchisi, P.Bertfeld va Dj.Uenlar ishlatgan N-N' metilenbiakrilamidni polimerizatsiya qilish asosida olinadigan immobilizatsiyalangan fermentlardir.

Gelga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilish usuli o'zining soddaligi bilan ajralib turadi. Bu usul bilan fermentni xohlagan geometrik konformatsiyada (sferik zarrachalar va h.k.) olish va fermentni tashuvchi ichida bir tekis tarqalishiga erishish mumkin.

Ko'pchilik polimer gellar o'zlarining mexanik va kimyoviy issiqqa chidamliligi bilan ajralib turadi. Bu xususiyatlar esa fermentlarni bir necha marotaba ishlatish imkonini beradi. Bu usul universal usul bo'lib, nafaqat barcha xildagi fermentlar, balki poliferment tizimlar, hujayra va hujayra fragmentlarini immobilizatsiya qilishda ham qo'llash mumkin. Bu usulni ijobiy tomonlaridan yana biri – immobilizatsiya fermentning barqaror holatga o'tishidir. Ushbu usulda immobilizatsiya qilingan ferment, bakteriologik zararlantmaydi. Sababi bunday holatda ferment molekulasidan katta bo'lgan bakteriyalar gelling ichiga kira olmaydilar.

Usulning eng katta kamchiligi ba'zi bir holatda, polimer matrikslari substratni diffuziyasiga halaqit beradi va shu tufayli fermentning faolligi past bo'lishi mumkin. Jarayon davomida ferment substratlari yuqori molekularli moddalar bo'lsa, u holda ushbu usul yaxshi natija bermaydi.

### Nazorat savollari

1. Fermentlarni gel g'ovaklariga kiritish usulining afzallik tomonlari nimalardan iborat?
2. Fermentlarni gel g'ovaklariga kiritish qanday amalga oshiriladi?
3. Fermentlarni gel g'ovaklariga kiritishda qanday tashuvchilar ishlatiladi?

### Test savollari

**1. Immobillangan fermentlarni mikroanalizda qo'llashda necha xil ferment ishlatiladi?**

- A) 2 xil
- B) 3 xil
- C) 4 xil
- D) A va B

**2. Fermentlar immobillangandan so'ng ularning faolliklari qanday o'zgaradi?**

- A) Fermentativ faolligi kamayadi
- B) Fermentativ faollik ko'payadi
- C) Fermentni o'z substrati bilan bog'lanib, gidroliz jarayoni tezlashadi
- D) A va B

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Fermentlarni gel ichiga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilish va uning ahamiyati.
2. Modifikatsiya qilingan fermentlarni immobilizatsiya qilishning afzalliklari va ularning turli sohalarda ishlatilishi.
3. Farmatsevtika sanoatida immobillangan fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.

4. Adsorbsiya usulida immobillangan fermentlarning afzalliklari.

### **3.8. Faol moddalarni yarim o'tkazgich membranalar va mikrokapsullash asosida immobilizatsiya qilish**

Yarim o'tkazgich membranalar yordamida immobilizatsiya qilish kichik molekulali substratni suvdagi eritmasi, katta molekulaga ega bo'lgan ferment eritmasidan yarim o'tkazgich membrana yordamida ajralib turishiga asoslangan. Yarim o'tkazgich membrana substratni oson o'tkazadi, ferment esa membranadan o'ta olmaydi.

Mikrokapsulalash – usuli esa birinchi bo'lib, 1964-yilda T.Chang tomonidan yaratilgan. Bu usul – fermentni suvdagi eritmasini mikrokapsulalar ichiga joylashtirishdan iborat. Mayda tashikli polimer plyonkalardan tashkil topgan kichik koptokchalar ichidagi fermentlarning tashqariga chiqishi ancha mushkul. Kapsulalarni olish usuliga qarab, ularning o'lchami har xil bo'ladi (10 dan 100 mikrometrgacha).

Mikrokapsulalar olishning bir necha usuli mavjuddir. Bunda fermentning suvdagi eritmasi PAV (sirti faol moddalar) saqlovchi dietilefiri bilan kuchli aralashtirish natijasida dispers holiga o'tkaziladi. Bu yerda PAV emulgator vazifasini bajaradi. Hosil bo'lgan emulsiyaga, to'xtatmasdan polimerning efordagi eritmasi qo'shib boriladi.

Polimer (nitrat selluloza) suvda erimasligi sababli, emulsiyaga tekkan joyida yupqa membrana, mikrokapsula hosil qiladi. Tayyor bo'lgan mikrokapsula sentrifuga yordamida yoki filtrlash yo'li bilan ajratib olinadi.

Mikrokapsula hosil qilishning ikkinchi yo'li – ikki moddaning fazalararo polikondensatsiya qilishiga asoslangan. Moddalardan biri suvning mayda emulsiyalarida, ikkinchisi esa organik fazada erigan bo'ladi. Ko'p tarqalgan va tadqiqotlarda qo'llaniladigan mikrokapsulalardan biri poliamiddir.

Poliamid mikrokapsula 1,6-geksametilendiamin (suv fazasi) va sebatsin kislotasining xlor gidridi (organik faza) asosida olinadi. Bu usul faqatgina yuqori pH ga chidamli bo'lgan (diamin

eritmasi) fermentlar uchun qo'llanilishi maqsadga muvofiq bo'ladi. Mikroapsula hosil qilish uchun ishlatiladigan ferment eritmasi 10% atrofida inert oqsil moddasi (gemoglobin) saqlashi lozim. Bu oqsil kapsula ichida kerakli bosim bo'lishini hamda fermentning mo'tadilligini ta'minlaydi. Fermentni mo'tadilligini oshirishi uchun glutaraldegid bilan ishlov beriladi, ba'zida esa adsorbsiya yoki gelga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilinadi.

Ba'zi holatlarda immobilizatsiya qilish uchun molekulari kovalent bog'langan oqsillardan tashkil topgan membranalardan ham foydalanish mumkin.

### **Nazorat savollari**

1. Fermentlarni yarim o'tkazgich membranalar asosida immobilizatsiya qilishda qanday tashuvchilar ishlatiladi? Usulning afzallik tomonlari nimalardan iborat?

2. Fermentlarni mikrokapsullash asosida immobilizatsiya qilishda nimalarga e'tibor berish kerak?

3. Yarim o'tkazgich membranalar va mikrokapsullash asosida immobilizatsiya qilingan fermentlarni qayerda ishlatish mumkin?

### **Test savoli**

**1. Fermentlar tashuvchiga qanday sharoitda maksimal adsorbsiyalanadi?**

- A) Fermentlarning izoelektrik nuqtasida
- B) Fermentlar konsentratsiyasi o'ta yuqori bo'lganda
- C) Fermentlarning o'ziga xos pH muhitida
- D) A va B

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Fermentlarni gel ichiga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilish va uning ahamiyati.

2. Modifikatsiya qilingan fermentlarni immobilizatsiya qilishning afzalliklari va ularning turli sohalarda ishlatilishi.

3. Farmatsevtika sanoatida immobillangan fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.

4. Adsorbsiya usulida immobillangan fermentlarning afzalliklari.

### **3.9. Fermentlarni emulgirlash asosida immobillash**

Fermentlarni emulgirlash asosida immobillash usuli bir qator afzalliklarga ega usul hisoblanib, enzimlarni immobillashining mavjud usullaridan o'ziga xos ustunliklari bilan farq qiladi. Ushbu usul bilan ferment preparati immobilizatsiya qilinganda, avvalo, fermentni suvdagi eritmasini organik polimerdagi emulsiyasi tayyorlanadi. Tayyor emulsiya yana bir bor suvda dispersiya qilinadi. Natijada, fermentni suvdagi eritmasini saqlagan organik moddani (polimerni) emulsiyasi hosil bo'ladi. Vaqt o'tishi bilan organik eritma qotadi va immobillangan ferment saqlovchi polimer zarrachalari hosil bo'ladi.

1972-yilda S.Mey va N.Li kabi olimlar ushbu usulni modifikatsiya qilganlar va membrana hosil qiluvchi materiallar sifatida suvda erimaydigan polimer o'rniga, katta molekulyar massaga ega bo'lgan suyuq uglevodorodlardan foydalanishni tavsiya etganlar. Ushbu usul suyuq membranalarda immobilizatsiya qilish deb ataladi. Bundan tashqari tolaga kiritish, liposomaga kiritish, mikroemulsiya hosil qilish kabi bir qator usullar ham mavjud. Fermentlarni emulgirlash asosida amalga oshiriladigan immobillash oqsil tabiatli biologik faol moddalarni tashqi ta'sirlardan saqlash bilan birga, preparatlar uzoq saqlanganda (oylar va yillar davomida) ularni faolliklarini juda ham kam miqdorda yo'qolishiga olib keladi.

#### **Nazorat savollari**

1. Fermentlarni emulgirlash asosida immobillashda qanday tashuvchilar ishlatiladi?
2. Emulgirlash asosida immobillangan fermentlarni qayerda ishlatish mumkin?
3. Fermentlarni emulgirlash asosida immobillashda tashqi muhit omillarining ta'siri nimalardan iborat?

### Test savoli

3. Fermentlar immobilanganlaridan so'ng ularning faolliklari qanday o'zgaradi?

- A) Fermentativ faolligi kamayadi
- B) Fermentativ faollik ko'payadi
- C) Fermentni o'z substrati bilan bog'lanib, gidroliz jarayoni tezlashadi
- D) A va B

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Fermentlarni emulgirash asosida immobilizatsiya qilish va uning ahamiyati.
2. Modifikatsiya qilingan fermentlarni immobilizatsiya qilishning afzalliklari va ularning turli sohalarda ishlatilishi.
3. Farmatsevtika sanoatida immobilangan fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.
4. Adsorbsiya usulida immobilangan fermentlarning afzalliklari.

### 3.10. Fermentlarni kimyoviy immobilash

Fermentlarni kimyoviy immobilash usulini boshqa usullardan asosiy farqi shundaki, bunda immobilizatsiya jarayonida, kimyoviy ta'sir natijasida, ferment bilan tashuvchi orasida qo'shimcha kovalent bog' paydo bo'ladi. Ushbu usulda immobilizatsiya qilingan fermentlar yuqorida qayd etilgan usullar yordamida immobilangan fermentlardan ba'zi ustun jihatlari bilan farq qiladi. Birinchidan, ferment va tashuvchi orasidagi kovalent bog', hosil bo'lgan konyugatni yuqori darajada mustahkam qiladi. Boshqacha qilib aytganda, ferment ishtirokida o'tadigan reaksiyalarda pH muhitning o'zgarishi, shuningdek, harorat ortishi va boshqa ko'rsatkichlarni texnologik jarayonda o'zgarishi, ferment molekulasini desorbsiyalanishiga va shu bilan birga olinadigan mahsulotning ifloslanishiga olib kelmaydi.

Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, ferment molekularini va shu bilan birga boshqa biologik faol moddalarning immobilash yo'li bilan barqaror formalarini olish va yaratish,

ayniqsa tibbiyotda, oziq-ovqat sanoatida, analitik ishlar uchun reaktivlar olishda o'ta muhim ahamiyat kasb etadi. Ikkinchidan, kimyoviy modifikatsiya fermentning faolligi va mo'tadilligi oshishiga olib keladi. Faqatgina kimyoviy yo'l bilan, ko'p nuqtalik bog'lanishlar natijasida fermentning mo'tadilligi oshirish o'z o'rnida bir qator ehtiyotkorlikni va o'ziga xos yondashuvni talab etadigan usul hisoblanadi. Sababi, ba'zi holatlarda fermentlarni tikuvchi yordamida modifikatsiya qilish ferment molekulasining faolligi qisman, ba'zida esa butkul yo'qolishiga olib kelishi mumkin. Shu sababli, fermentlarni tikuvchi reagent yordamida modifikatsiya qilishda tikuvchi konsentratsiyasini tanlash muhim rol o'ynaydi.

Tashuvchilarga yetarli darajadagi yuqori bog'lanuvchanlik xususiyatini berish uchun ba'zan uning sirtini "faollashga" to'g'ri keladi. 2-rasmda oqsilning polisaxarid matrisasidagi immobillashning klassik metodlari keltirilgan. Birinchi bosqichda tashuvchi kaliy peryodat asosida aldegid guruh paydo bo'lgunga qadar oksidlanadi. So'ngra esa ferment molekulasini, faollangan tashuvchi hamda azometin bog'lari bilan bog'lanadi. Bunda oqsil hamda tashuvchi orasidagi bog'larning barqaror bo'lishi uchun natriy borgidrid yordamida ishlov beriladi.

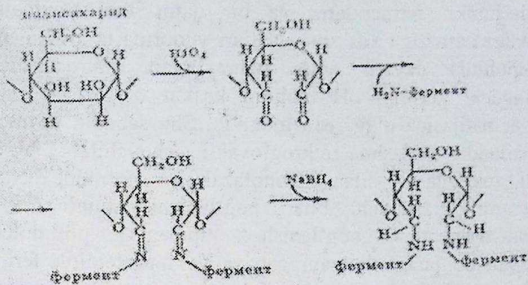
Faol moddalarni kimyoviy immobillash usullaridan biri bu sopolimerizatsiya metodidir (3-rasm). Birinchi bosqichda sopolimerizatsiyalanishga qulaylik uchun ferment molekulasiga qo'shbo'g'lar kiritiladi. Masalan, ferment akriloxlorid bilan atsillanadi. Keyin akrilolirlangan fermentni monomer eritmasiga kiritish orqali sopolimerizatsiyalanadi. Natijada ferment gelning polimer to'riga kimyoviy "tikilgan" ko'rinishda joylashadi. Faol moddalarni immobillashda tashuvchini tanlash va immobillash usuli va shu bilan birga fermentning tabiati muhim ahamiyatga ega.

Bu o'rinda shuni qayd etish kerakki, faol moddalarni immobillashda tashuvchining geometrik ko'rinishlari muhimdir. Immobillashda turli ko'rinishdagi tashuvchilar, masalan, kichik granularlar, sharchalar, trubachalar, tola, g'ovak plastinalar

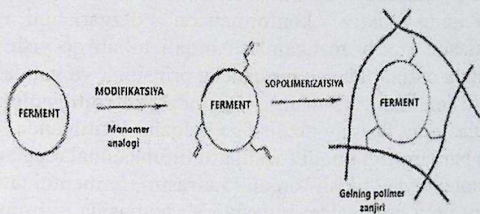
(filtrlar), yarim o'tkazuvchi membranalar va boshqa tur ko'rinishga ega tashuvchilar keng qo'llaniladi.

Bugungi kunda fermentlarni polielektrolit kompleksni egallab olishiga asoslangan immobillash usuli ham tadqiqotlarda qo'llaniladi. Bunda tashuvchini suvda eriydigan holatdan suvda erimaydigan holatga o'tkazish (eritmaning ion kuchi yoki pH ini o'zgartirish yo'li bilan) va teskari holatda, ushbu jarayonni amalga oshirish orqali fermentlarni immobillashni amalga oshirish mumkin. Usulni bajarish vaqtida immobillangan fermentning harakat kinetikasiga tashuvchi jiddiy ta'sir ko'rsatishi mumkin. Shuning uchun quyidagilarni inobatga olish talab etiladi. Masalan, ichki va tashqi diffuziya natijasida yuzaga keladigan qiyinchiliklarni, fermentning makromolekulyar substratlari bilan reaksiyalardagi sterik to'siqlarni, substratlar, ingibitorlar, vodorod va boshqa effektorlarining suvli eritma va matritsa oralig'idagi yoyilishini (elektrostatik yoki gidrofob bog'lanishlar, vodorod bog'lanishlar hisobiga). Qayd etilgan holatlarni tadqiqotlarda chetlab o'tish uchun, texnologik jarayonda tashuvchini yoki immobillanish sharoitini tanlash orqali erishish mumkin. Ba'zida masalan, yoyilish effektlaridan katalizatorga boshqa bir xususiyat berish maqsadida foydalanish mumkin.

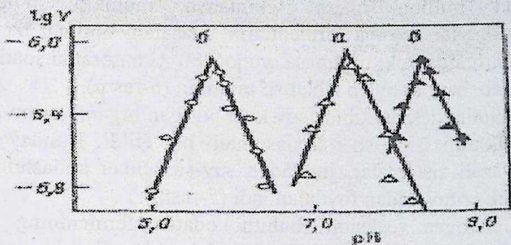
Anionli polielektrolitlarda boradigan immobillanish jarayonida esa (4-rasm, a) manfiy zaryadga ega matritsa zonasidagi gidroqsilionlarining konsentrlanishi sodir bo'ladi, bu esa eritma bilan solishtirilganda ferment mikroo'ramini xarakterlovchi pH ning lokal qiymatini "kislotali tomonga" siljishini ta'minlaydi. Natijada, kuzatilayotgan katalitik faollikni pH profili, bufer pH ining yuqori qiymati tomon o'zgaradi. Kation polielektrolitdagi immobillashda esa, teskari bog'liqlik uchun yuz beradi (4-rasm, b).



2-rasm. Fermentning polisaxaridli tashuvchiga kovalent birikishi.



3-rasm. Fermentning polimer geldagi immobillanishi uchun sopolimerlanish metodi.



4-rasm. Benzilpenisillinning penisillinamidaza bilan gidrolizi maksimal tezligining pH muhitga bog'liqligi; a – nativ ferment; fermentning polikation bilan (b) va polianion (a) bilan kompleksi.

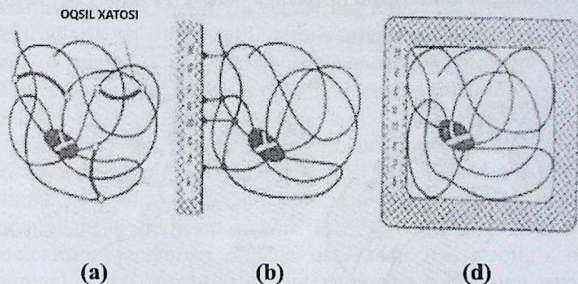
Ma'lumki, fermentlarni va bir qator faol moddalarning faolliklari va o'ziga xos xususiyatlari yuqorida ta'kidlanganidek, atrof-muhitda deyarli doim uchraydigan mikroorganizmlar, shuningdek, harorat, pH muhitni keskin o'zgarishi, mexanik ta'sirlar natijasida o'zgarishi mumkin. Shu sababli, fermentlarni uzoq muddat saqlashda mikrog'ovakli tashuvchilarga biriktirish orqali ekranlash bilan muhofazalash mumkin. Natijada, fermentning tashuvchi bilan bog'lanishi, shuningdek, turli ferment-fermentli bog'lanish tipidagi polimolekulyar inaktivatsion jarayonlar, agregatsiya yoki proteolitik fermentlar mavjud muhitlarda, avtoliz jarayonini kechish imkoniyati bloklanadi (yoki qiyin kechadi).

Fermentlarning inaktivatsiyasi va denaturatsiyasini, molekulaning aktiv konformatsion o'zgarishini, ferment molekulasini sun'iy mahkamlash orqali to'sib qo'yish mumkin. Bu o'rinda o'zini oqlagan bir qancha prinsiplar va yondashuvlarni keltirish mumkin (5-rasm). Rasmda ko'rsatilganidek, oqsil molekulasining fazoviy tuzilishiga halqalar kiritilganda, molekula yanada barqarorligi ortadi (oqsillarni bifunksional reagentlar bilan ichki molekulyar "tikish" orqali (5,a-rasm), fermentni tashuvchiga kovalent yoki nokovalent birlashtirish natijasida (5,b-rasm), yoki uni tashuvchining "tor" poralariga mexanik kiritilishi (5,d-rasm) orqali ham ferment barqarorligini oshirish mumkin. Shu bilan birga oqsil denaturatsiyasini (inaktivatsiya) bir necha ming, hattoki million marta sekinlatish mumkin. Yuqoridagi yondashuvlar asosida fermentlarni, masalan, optimal haroratdan past haroratda yoki bo'lmasa, yuqori 80<sup>0</sup> C haroratda soatlab yoki sutkalab, hattoki oylab ishlatish mumkin (6-rasm).

Shuningdek, tarkibida suv kam bo'lgan organik erituvchilarda fermentlarni ishlatish masalasi ham hal etildi. Bunday holatda ikki fazali sistemalar, jumladan suv-suv bilan aralashmaydigan organik erituvchidan foydalaniladi (7-rasm).

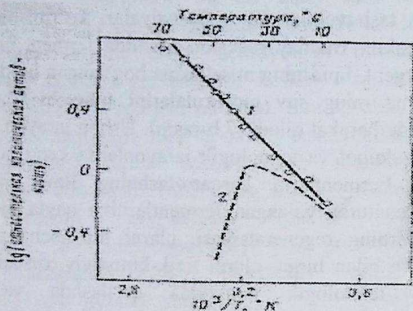
Geterojen reaksiyon muhitni odatda fermentning organik muhitdagi suvli eritmasi, mikroemulsiya singari yoki metodik va texnologik jihatdan yanada qulay fermentning suvli eritmasi bilan to'yintirilgan organik fazadagi (shisha, keramika va boshqalar)

g'ovaksimon tashuvchilarning suspenziyalari ko'rinishida hosil qilinishi mumkin. Bunday reaksiya muhitda ferment sirti aktiv modda (detergent, lipid)ning misellasiga bog'langan holda bo'lib, bir necha yuz ming suv molekularini tutuvchi o'ziga xos mikroreaktorda harakat qiladi (7,b-rasm). Ushbu jarayon bugungi kunda turli tadqiqot va texnologik jarayonlarda keng qo'llanilib kelinmoqda. Fermentlarni barqarorlashning ilmiy asoslarini yaratilishi, denaturatsiyalangan fermentlarning qayta faollanishi va kofaktorlarning regeneratsiyasi, ularni bir necha marotaba qayta ishlatish bilan birga, ularni fizik-kimyoviy xususiyatlarini o'rganishda, texnologik jarayonda qo'llashda va ishlab chiqarishda ulardan keng foydalanish imkoniyatini ochib bermoqda.

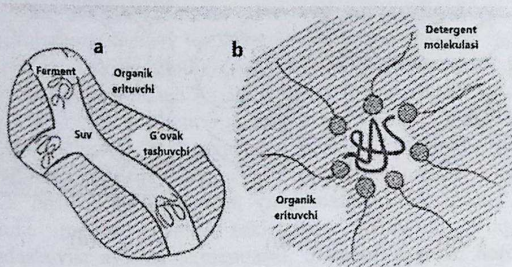


**5-rasm.** Ferment globulalari strukturasi mustahkamlashga yordam beruvchi fizik-kimyoviy omillar;

a–ichki molekulyar “tikish”; b–tashuvchiga kovalent yoki nokovalent birlashish; d–tashuvchining “tor” poralariga mexanik ulanish.



**6-rasm.** Ferment faolligining haroratga bog'liqligi. 1-sopolimerlanish usulida poliakrilamid gelida immobillangan ximotripsin (3-rasmga qarang); 2-erkin ferment.



**7-rasm.** "Suv – suv bilan aralashmaydigan organik erituvchi" qo'shfazali sistemasi. Tashuvchining porasiga kiritilgan ferment bilan (a) va sirti-aktiv moddaning organik erituvchidagi misellasiga fermentning ulanishi (b).

Immobilangan fermentlarni qo'llashning asosiy sohalariga organik sintez, diagnostika, farmatsevtika, bioelektronika, nanotexnologiya va oziq-ovqat sanoatlarini misol qilish mumkin.

Fermentlarning organik sintezda qo'llanilishi birinchidan, ko'pgina organik reagentlar xuddi fermentativ reaksiyalarning muhitdek, suvli muhitda yomon eriydi yoki umuman erimaydi. Qo'shfazali metodning ilmiy asoslanishi fermentativ sintezning rivojlanishida muhim turtki bo'lib xizmat qildi (7-rasm). Sintetik organik kimyo uchun fermentning ikki fazali reaksiyon muhitlaridagi katalitik faolligini hatto suvning juda kam (foiz miqdorini) miqdorida ham saqlaydi. Shu sababli katalizlanuvchi reaksiyaning muvozanatini (mahsulotning chiqishini) tadqiqotchi kerakli organik erituvchini tanlagan holda, katta diapazonda nazorat qilishi mumkin.

Immobilangan fermentlar ko'p komponentli organik birikmalar (ba'zi holatlarda noorganik) sistemalarining "reagentsiz" o'zgarmas tahlili uchun yangi usullarining yaratilishiga turtki berdi. Bu usullarning asosiy qatori – "fermentli elektrodlar" va "fermentli termistorlar"dir. Kelajakda atrof-muhitni nazorat qilishda va klinik diagnostikada biolyuminescent tahlilda hamda immunoenzim tahlili kabi usullar muhim o'rin egallaydi.

Energiya va massaning biokonversiyasi to'g'risidagi masalalar avvalo, mikrobiologik yo'l bilan hal qilingan va qilinmoqda. Biroq, bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, immobilangan fermentlar ular asosda boradigan fotoliz va bioelektroliz jarayonini amalga oshirishda real yoqilg'i olish mumkinligining ko'rsatilishi, biotexnologiya sohasining rivojiga sezilarli hissa qo'shdi.

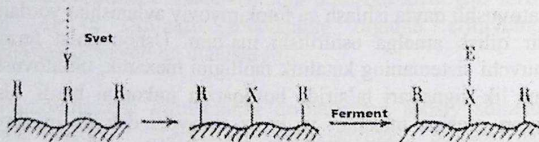
Kuchsiz signallarning sun'iy fermentativ kuchaytirish immobilangan fermentning faol markaziga tashuvchi orqali, ultratovushli qayta ishlash va fotokimyoviy aylanishlar yordamida ta'sir qilish amalga oshirilishi ma'lum. Ushbu holat ferment-tashuvchi sistemaning katalitik faolligini mexanik, ultratovush va yorug'lik signallari ta'sirida boshqarish imkonini berdi. Ushbu jarayon asosida mexano- va ovoz sezuvchi datchik qurilmalari yaratildi va kumushsiz fotografiyaga keng yo'l ochildi.

Fermentlarni immobilash usuli yordamida tasvirlarni olish g'oyasi juda ham oddiy (8-rasm). Dastlabki tashuvchining

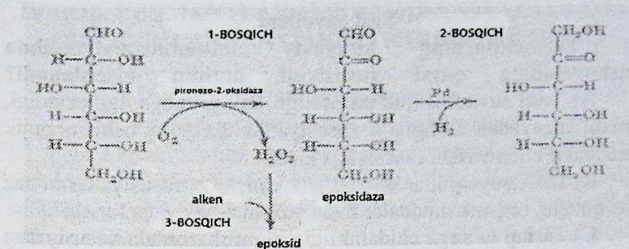
funksional guruhlari ferment bilan bog‘lanmasligi lozim, birgina, yorug‘likning ta‘siri ostida fragmentlarni hosil bo‘lishi ( $K \rightarrow X$ ) natijasida fermentni kimyoviy biriktirib olish xususiyatini paydo qiluvchi kimyoviy o‘zgarishlar amalga oshadi.

Shunday qilib, yorug‘lik tushgan qismlarda ferment immobillangan holatga o‘tadi, yoritilmagan joylarida esa ushbu jarayon amalga oshmaydi. Boshqacha aytganda, fermentning fotoimmobillanishi natijasida “yashirin tasvir” paydo bo‘ladi. “Tikilgan” fermentni yorug‘lik ta‘sirida bo‘yalgan mahsulotga aylanuvchi substrat eritmasi bilan taglikni qayta ishlab vizualizatsiyalash mumkin. Umuman, substratli taglikning paydo bo‘lishida har bir fotoimmobillangan ferment molekulasi millionlab bo‘yalgan mahsulot molekulalarini (birlamchi signali kuchayishining katalitik effekti) to‘playdi. Shu sababli, yashirin tasvirni oddiy ko‘z bilan ko‘rish mumkin bo‘lib qoladi. Ushbu jarayonni boshqa fermentativ-fotografik jarayonlardan farqi shundaki, fotoimmobillash usuli va immobillangan fermentni aniqlash, faol modda tabiatiga bog‘liq bo‘lmasligiga qaramay, universal hisoblanadi.

Immobilangan fermentlarga asoslangan texnologik jarayonlar birinchi navbatda oziq-ovqat va farmatsevtika sanoatida qo‘llanilgan. Bu yerda biz aytib o‘tmoqchi bo‘lgan asosiy g‘oya shundan iboratki, biokataliz oziq-ovqat va organosintetik texnologiyalar orasidagi birlamchi chegaralarni yo‘qotadi. Yaqqol misol – AQSHda “CETUS Corporation” firmasi ishlab chiqaruvchi fruktoza va alken oksidlarning olinish jarayoni ishlab chiqilgan (9-rasm).



**8-rasm. Fermentning fotoimmobillanish sxemasi.**



## 9-rasm. Fruktoza va alken-oksidlarni olishning texnologik jarayonlari.

Birinci bosqichda immobillangan piranozo-2-oksidaza ta'sirida D-glukoza D-glukozongacha oksidlanadi; ikkinchi bosqichda palladiy katalizatoridagi vodorod ta'siri ostida olingan glukoza bilan D-fruktozagacha qaytariladi. Birinci bosqichning qo'shimcha mahsuloti (vodorod peroksidi) D etilen yoki propilenning tegishli epoksidlargacha mikrobiologik oksidlanishiga sarflanadi. Ko'rinib turibdiki, bu jarayonda uchta sintetik metod birlashtirilgan: fermentativ (1-bosqich), kimyoviy (2-bosqich) va mikrobiologik (3-bosqich). Bu jarayonning yarmi ozuqaviy (fruktoza), yarmi organosintetik (epoksidlar), shuning uchun uni takomillashgan, kompleks va chiqindisiz biotexnologiya deb atash mumkin.

### Nazorat savollari

1. Fermentlarni kimyoviy immobillash qanday bog'lar hisobiga amalga oshiriladi?
2. Fermentlarni kimyoviy immobillashda faol guruhlar qanday ahamiyatga ega?
3. Fermentlarni kimyoviy immobillashning afzallik jihatlari nimalardan iborat?
4. Fermentlarni kimyoviy immobillash fizikaviy immobillashdan qanday farq qiladi?

### Test savollari

**1. Fermentlarning kimyoviy immobilizatsiyalashda tashuvchining qaysi xususiyati muhim hisoblanadi?**

A) Turli suyuqliklarda erimasligi, faol guruhga ega ekanligi, modifikatsiyadan so'ng o'z xususiyatini tez yo'qotishi, organik moddalar bilan yaxshi reaksiyaga kirishi

B) Turli suyuqliklarda yaxshi erishi, o'z xususiyatlarini tez yo'qotishi, organik moddalar bilan yaxshi reaksiyaga kirishi

C) Tashqi ta'sirga chidamliligi, yuqori haroratda xususiyatini yo'qotmasligi, organik moddalarda erimasligi

D) Barcha javoblar to'g'ri

**2. Immobillangan fermentlar barqarorligi qanday aniqlanadi?**

A) Fermentning maksimal fermentativ faolligini namoyish qilish nuqtasida inkubatsiya qilish bilan

B) O'ziga xos haroratda inkubatsiya qilish orqali

C) Aktivatorlar ishtirokida inkubatsiya qilish orqali

D) Substrat konsentratsiyasini o'zgartirish orqali

**3. Faol moddalarni statiklik usulda immobilizatsiya jarayoni qanday amalga oshiriladi?**

A) Fermentlarni tashuvchi yuzasiga solib, asta-sekin inkubatsiya qilish orqali

B) Ferment molekulasini tashuvchi bilan aralashtirib, inkubatsiyadan so'ng

C) Fermentni tikuvchi yordamida modifikatsiyalash orqali

D) Tashuvchini modifikatsiyalashdan so'ng ferment molekulasi bilan aralashtirish orqali

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Fermentlarni kimyoviy usulda immobilizatsiya qilish va uning ahamiyati.

2. Kimyoviy usulda fermentlarni immobilizatsiya qilishning afzalliklari va ularning turli sohalarda ishlatilishi.

3. Farnatsevtika sanoatida kimyoviy usulda immobilizatsiya qilishning ahamiyati va ishlatilishi.

4. Kimyoviy usulda fermentlarni immobilizatsiya qilishda faol guruhlar o'rtasidagi muhim bog'lar haqida ma'lumot bering.

## IV BOB. FERMENTLAR YORDAMIDA SELLULOLITIK CHIQUINDILARDAN QANDLI MODDALAR OLISH

### 4.1. Sellulolitik fermentlar.

#### Ularning funksiyalari va xususiyatlari

Tabiatda sellulolitik mikroorganizmlar mavjud bo'lib, ular selluloza tarkibidagi nafaqat amorf qismni, balki kristall holatdagi sellulozani glukozagacha parchalovchi fermentlar to'plamini, ya'ni sellulazalarni sintez qiladilar.

Selluloza saqlovchi materiallarning sirtiga tushgan mikroorganizmlar dastavval ularga mustahkam yopishib oladilar va keyin selluloza fermentlarini sintez qilib, sekin-asta ularni yemirib, glukozaga aylantirib boradilar. Bunday mikroorganizmlar glukozadan asosiy ozuqa muhiti sifatida foydalanadilar, ko'payadilar va shu tufayli ko'proq maydonni egallab, yanada ko'proq selluloza fermentini ishlab chiqaradilar. Bu hodisa, toki selluloza saqlovchi materiallar tamom bo'lguncha davom etadi. Biroq, tabiiy sharoitda ushbu jarayonlar juda sekin amalga oshadi. Tuproqqa tushgan g'o'zapoyani to'liq parchalanishi uchun bir necha yillar kerak bo'ladi.

Agar ushbu mikroorganizmlardan selluloza fermentlari ajratib olinsa va sellulozaga qo'shilsa, bu jarayon tezlashadi. Bunda hosil bo'lgan glukozaga mikroorganizmlar tomonidan iste'mol qilinmaydi va reaksiya mahsuloti to'planib boradi. Agar substrat sifatida toza sellulozadan emas, balki selluloza tutuvchi sanoat yoki qishloq xo'jalik chiqindilaridan foydalanilsa, yana bir eng muhim muammo – chiqindilarni yo'qotish – utilizatsiya muammosi hal bo'ladi.

Olingan glukozaning tozaligiga va jarayonning iqtisodiy samaradorligiga qarab, uni tibbiyotda, farmatsevtikada, oziq-ovqat sanoatida, kimyoviy texnologiyalarda yoki texnik mikrobiologiya amaliyotida qo'llash mumkin.

Ma'lumki, glukozani bijg'itib undan etanol olish, keyin esa uni har xil yo'llarda foydalanish mumkin. Masalan, yoqilg'i o'rnida ishlatish mumkin va shu bilan birga etanolning

degidratatsiyasi zamonaviy "katta kimyo"ning asosi bo'lgan etilen olishda qo'llash mumkin.

Selluloza eng ko'p miqdorda hosil bo'ladigan xomashyo hisoblanadi. Ekspertlarning hisob-kitobiga qaraganda, har yili 100 mlrd. tonnaga yaqin selluloza hosil bo'lar ekan. Bu mahsulotni inson tomonidan ishlatilishi selluloza saqlovchi chiqindilarning to'planishiga olib keladi. Bunday chiqindilarni juda kam miqdorini fermentativ yo'l bilan foydali mahsulotga aylantirilganda ham anchagina ozuqa uglevodlari va neftni almashtiruvchi mahsulotlar tayyorlash mumkin bo'ladi. Shuning uchun ham, bu muammoni yechish ustida oxirgi yillarda juda ko'p olimlar ishlamoqdalar.

Selluloza fermentining substratga ta'sir etishi bir necha bosqichda amalga oshadi. Sellulolitik fermentlarni o'z substratiga ta'sir qilishga va sellulozani parchalashiga qarab, fermentlarni 4 guruhga ajratish mumkin: birinchi guruhni *endofermentlar* tashkil etadi, keyingi ikki guruhni *ekzofermentlar* va to'rtinchi guruhga *sellulozani kichik fragmentlardan tortib, glukozagacha parchalovchi fermentlar* kiradi. Eslatib o'tish kerakki, "endo-" va "ekzo-" qo'shimchalari polimer substratning katta yoki kichik qismini parchalaydigan fermentlar nomiga aniqlik kiritish maqsadida qo'yiladi.

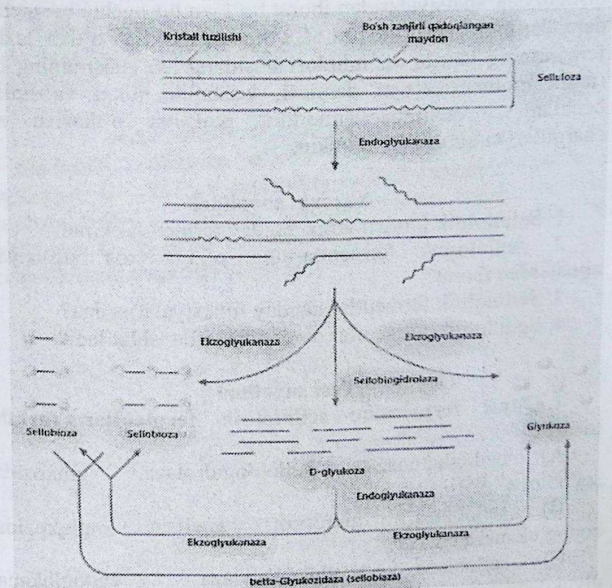
Agar ferment polimer substratning oxirgi qismidan bir polimer molekula uzoqlikda joylashgan bo'lakni parchalasa, bu ferment endota'sirli ferment deyiladi. Agar oxirgi qismlarini parchalasa ekzo ta'sirga ega fermentlar deyiladi.

Odatda, tabiatda polimer substratlarning degradatsiyasi tarkibida ham endo-, ham ekzofermentlarni tutuvchi poliferment komplekslar ta'sirida yuz beradi. Ularning hamkorlikdagi ta'siri polimer moddalarni optimal samaradorlik bilan monomerlargacha parchalaydi. Ushbu hosil bo'lgan moddalar organizm uchun kerak bo'lgan moddalarni hosil qilish uchun muhim qurilish materiallari bo'lib xizmat qiladi.

Sellulozani parchalashda birinchi bo'lib *endoglukonaza* kirishadi. Endoglukonazaning har bir muvaffaqiyatli hujumi polimer zanjirning uzilishiga va kaltalashgan selluloza

molekulasida kichik fragmentlarni va shu bilan birga ikkita so'nggi qism hosil bo'lishiga olib keladi. Oxirgi qismlar ko'paygan sari ekzofermentlar ta'siri kuchayadi. Boshqacha qilib aytganda, endofermentlar yordamida selluloza degradatsiyasi kuchaygan sari ekzofermentlarning ta'siri ham kuchayib boradi.

Qisman parchalangan sellulozaga ta'sir qiluvchi ekzofermentlar ikki turdan iborat selluloz kompleksida namoyon bo'ladi. Birinchi ferment oxirgi mahsulotgacha sellulozani parchalasa, ikkinchi ferment o'zining aktiv markazi xususiyatiga ko'ra sellulozani sellobiozagacha, ya'ni glukoza dimerigacha parchalaydi. Birinchi ferment ekzoglyukozidaza fermenti, ikkinchisi esa ekzosellobioidrolaza fermenti hisoblanadi.



**10-rasm. Selluloza biodegradatsiyasi**

Nihoyat, sellobioza, sellulaz kompleksining oxirgi fermenti – sellobiaza yordamida teng ikkiga bo‘linib, ikki molekula glukoza, ya’ni oxirgi mahsulot hosil bo‘ladi. Ushbu sellulozaning glukozagacha parchalanish jarayoni 10-rasmda namoyon qilingan.

Zanjirlar gidrolizi endoglukonazaning 1,4-bog‘larini zich bo‘lmagan bloklarga parchalaydi. So‘ng ekzoglukanazalar va sellobioidrolazalar oligosaxaridlarni qisman gidrolizlangan zanjirlarni reduksiyalanmagan uchidan ajratadi. So‘ngra glukozidaza sellobiozani va sellotriozeni glukozaga aylanishini katalizlaydi.

Shunday qilib, reaksiya sistemada glukoza, ya’ni oxirgi mahsulot hosil bo‘lishi uchun reaksiya boshlang‘ich substratning qisman degradatsiyalaridan iborat bo‘lgan bir nechta bosqich yoki darajalaridan o‘tishi lozim. Bu bosqichlarning o‘tish tezligiga fermentning tarkibi va miqdori boshlang‘ich substratning holati (uning polimerizatsiya darajasi, kristallik holati va hokazo), boshlang‘ich selluloza miqdori, reaksiya o‘tkazish shart-sharoitlari ta’sir qilishi mumkin.

### Nazorat savollari

1. Sellulolitik fermentlarga qanday fermentlar kiradi?
2. Sellulolitik fermentlarning o‘ziga xos xususiyatlari nimalardan iborat?
3. Sellulolitik fermentlar qanday funksiyalarga ega?
4. Sellulolitik fermentlar qaysi sohalarda ishlatiladi?

### Test savollari

1. Qaysi fermentlar sellulolitik fermentlar tarkibiga kiradi?

A) endoglukonaza, sellobioidrolaza, glukozidaza, sellobioza

B) sellobiaza, gidrolaza, maltaza, glukozidaza, endoglukanaza

C) sellobiaza, glukooksidaza, endoglukanaza, glyukoamilaza

D) gluukoamilaza, sellobiaza, maltaza, glukokanaza

**2. Selluloza va ligninselluloza materiallarini selluloza ferment kompleksi bilan parchalanganda qanday birikmalar hosil bo'radi?**

- A) glukoza, sellobioza
- B) glukoza, maltoza
- C) sellobioza, fruktoza
- D) galaktoza, fruktoza

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Oziq-ovqat sanoatida sellulolitik fermentlarning ishlatilishi.

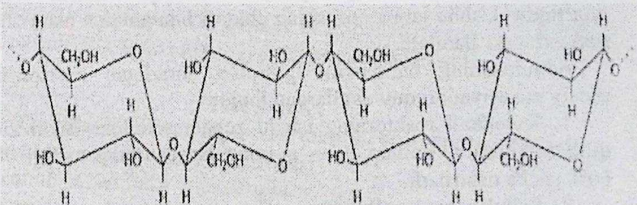
2. Qandli moddalar ishlab chiqarishning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.

3. Tibbiyotda fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.

4. Sellulolitik mikroorganizmlarning qandli moddalar olishdagi roli.

### **4.2. Sellulozali chiqindilar gidrolizi**

Ma'lumki, selluloza o'zaro 1,4-glyukozid bog'lar bilan bog'langan D- glukoza zanjiridan tashkil topgan bo'lib, uning uzunligi 1000 ta glukoza birligini tashkil etadi.. Selluloza tarkibidagi D- glukoza joylashgan bo'lib, u o'ziga xos bo'lgan kristallik darajasiga ega (11-rasm).



**11-rasm.** Selluloza polimer zanjirining segmentlarida glukoza qoldiqlarini 1,4-bog'lar bilan bog'lanishi.

Glukoza ning joylashishi va uning mustahkamligi o'zaro ko'ndalang joylashgan vodorod bog'lar bilan "tikilgan" bo'lib, ayni mana shu bog'lar selluloza ning mustahkamligini belgilab beradi.

Alohida olingan vodorod bog'lari unchalik mustahkam bo'lmas-da, ushbu zanjirda minglab bo'lganligi sababli, o'ta mustahkam blokni tashkil qiladi.

Shuning uchun selluloza nafaqat suvda erimaydi, balki uning kristall holatdagi qismi har qanday kimyoviy agentlar, jumladan kuchli kislotalar uchun ham parchalanishi ancha mushkul bo'ladi. Ammo, glukozali zanjirlar buzilgan joylarda (sellulozani sirtidan zanjir qayrilgan joylarda, shuningdek, sellulozaga maxsus ishlov berilgandan keyin, masalan, o'ta maydalangandan keyin) uning molekulasida amorf qismlar paydo bo'ladi.

Ayni mana shu xususiyat sanoat sharoitida mikrokristalli sellulozalar olish maqsadida ishlatiladi. Tabiiy sellulozaga kislotalar bilan ishlov berilganda selluloza tarkibidagi amorf qism yengil parchalanib eritmaga o'tadi. Bunda kichik mikrokristallar hosil bo'ladi. Bu mikrokristallar esa kimyoviy reagentlar ta'siriga o'ta chidamli bo'ladi.

Bugungi kunda sellulozali chiqindilardan fermentlar yordamida qandli moddalar olish texnologiyasi ishlab chiqilgan va ushbu jarayonlar yanadi takomillashtirilmoqda. Buning sababi, o'ta yuqori fermentativ faollikka ega transgen ferment preparatlarining texnologik jarayonlarda qo'llanilishi bilan bog'liqdir. Ushbu jarayonni ishlab chiqarishda amalga oshirishda reaktorlar qo'llaniladi.

Selluloza ning fermentativ gidrolizi boradigan reaktorning asosiy xususiyatlari quyidagilardan iborat:

1. Kolonkali reaktorning ishchi zonasi selluloza bilan zich qilib to'ldiriladi. Buning bilan gidroliz jarayonining tezligi 40–60% gacha oshiriladi.

2. Sellulozani – sellulozaga affin xromatografiyasi prinsipi bilan adsorbsiyalash yordamida reaktorda ushlab turiladi; bu bilan, qo'shimcha membranalarsiz fermentni reaktorda ushlab

turishga erishiladi; bu esa jarayonning sezilarli darajada arzonlashishiga olib keladi.

3. Undan tashqari, kam miqdorda sellulaza fermentini saqlovchi kultural suyuqliklardan foydalanish mumkin. Ular reaktorda adsorbsiya hisobiga konsentrlanadi.

4. Proteazalar va boshqa sellulazalarni inaktivatsiya qiluvchi fermentlar reaktordan selluloza gidrolizi boshlanguniga qadar chiqarib yuboriladi. Chunki, ular sellulazaga qaraganda sellulozaga yomonroq adsorbsiyalanadi.

5. Fermentativ gidroliz jarayoni muntazam ravishda selluloza qo'shib borilishi, ko'p martalab sellulaza ishlatilishi va doimiy fermentlar regeneratsiyasi hisobiga uzluksiz davom etadi.

Shunday qilib, selluloza bir qator sellulolitik fermentlar yordamida gidrolizlanadi. Ushbu texnologik jarayon maxsus reaktorlarda olib borilsa, maqsadga muvofiq bo'ladi. Bunda olingan toza glukoza asosida, glukoza siropini ham olish mumkin. Avval glukoza siropi ikki marotaba tozalanadi va keyin esa 60–70% gacha quyultiriladi. Olingan glukoza siropidan turli tarmoqlarda foydalaniladi.

### Nazorat savollari

1. Sellulolitik fermentlarga qanday fermentlar kiradi?
2. Sellulolitik fermentlarning o'ziga xos xususiyatlari nimalardan iborat?
3. Sellulolitik fermentlar qanday funksiyalarga ega?
4. Sellulolitik fermentlar qaysi sohalarda ishlatiladi?

### Test savoli

1. Quyidagi ko'rsatilgan fermentlardan qaysi birlari krxamal gidrolizini amalga oshiradi?

- A) amilaza, amilaza, glukoamilaza
- B) amilaza, glukoamilaza, glikozidaza
- C) amilaza, sellobiaza, glukozidaza
- D) amilaza, intertaza, sellobioza

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Oziq-ovqat sanoatida sellulolitik fermentlarning ishlatilishi.
2. Qandli moddalar ishlab chiqarishning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.
3. Tibbiyotda fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.
4. Sellulolitik mikroorganizmlarning qandli moddalar olishdagi roli.

#### **4.3. Kristall fruktoza olish texnologiyasi**

Fruktoza ketogeksozalarga mansub uglevod hisoblanadi. Fruktoza glukozaga nisbatan kislotalar va ishqorlar ta'siriga ancha labildir.

Fruktoza shirinlik darajasi va fiziologik ta'sir bo'yicha glukoza va saxarozadan ustun turadi. Odam organizmida fruktoza metabolizmi, glukozadan farqli, boshqa mexanizm bo'yicha amalga oshadi, bu esa uni hatto qandli diabet bilan kasallangan bemorlarga ma'lum miqdorda iste'mol qilish imkonini beradi.

Fruktoza olishning bir necha xil usuli mavjud: saxarozani gidroliz qilish asosida, fruktoza-glukoza siropidan, glukozani izomerlash asosida.

Boshqa uglevodlarni tutuvchi eritmalardan ham fruktoza turli usullar bilan ajratilishi mumkin.

Sanoat miqyosida kristall fruktozani saxarozadan ajratish mumkin. Fruktoza ishlab chiqarilishining samarali usuli – ion almashinuv texnologiyasini qo'llash yordamida saxarozadan ajratish orqali amalga oshiriladi. Ushbu usulda saxarozani gidrolizi ion almashinuv smola yordamida olib borilib, bunda texnologik va biokimyoviy jarayonning optimal sharoiti ishlab chiqilishi darkor.

Fruktoza saxarozadan olish jarayoni 12-rasmda ko'rsatilgan. Keltirilgan sxemaga ko'ra, tarkibida 50% gacha shakar saqlagan eritma avval, mineral moddalardan ionalmashinuv xromatografiya usulida tozalanadi. Tozalanagan eritma inversiya qilinadi. Inversiya jarayonida moddalar avval biroz kislotali muhitda ushlab inkubatsiya qilinib ishlov beriladi. Bunday ishlov berilgan

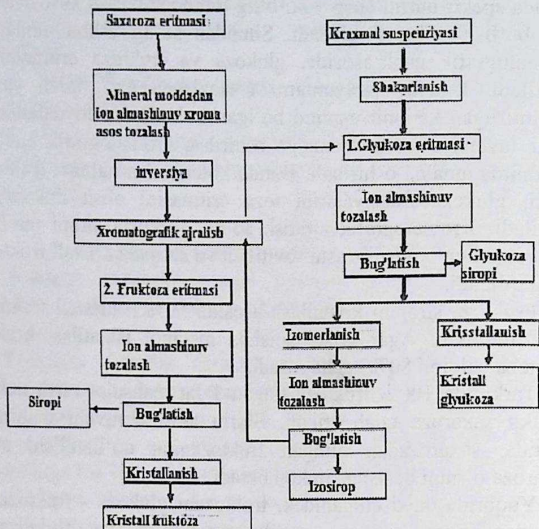
modda spektr nurini chap yoki o'ng tomonga burish xususiyatiga ega bo'lishi bilan farqlanadi. Shundan so'ng ushbu moddalar xromatografik usul asosida, glukoza va fruktoza eritmalariga ajratiladi. Bunday jarayonlarni o'tkazishda  $Ca^{2+}$  bilan yarim to'yintirilgan kationit mavjud bo'lgan kolonkadan foydalaniladi. Agar inversiya alohida amalga oshirilsa, xromatografik ajratish kationitda amalga oshiriladi. Bunda kolonkadan nafaqat fruktoza balki, glukoza fraksiyalarini toza eritmasini olish imkoniyati tug'iladi. Xromatografik ajratish so'ng, fruktoza siropi ma'lum haroratda bug'lantirilib, asta sovitiladi va natijada kristall fruktoza hosil qilinadi.

Fruktoza siropini kristallash asosida 50% li kristall fruktoza olish mumkin. Agar kristallanishda metanol ishlatilsa, kristall fruktoza chiqimi 80% gacha o'sadi.

Tarkibida 100% fruktoza tutgan 1 kg mahsulot olish uchun 1,5 kg saxaroza talab etiladi. Shirin ta'm beruvchi mahsulot sifatida, saxarozadan olingan fruktozaning qo'llanilishi s - saxaroza o'rni bosishga imkon beradi.

Yuqorida qayd etilganidek, fruktozani glukoza - fruktozanli siropdan ham ajratish mumkin. Glukoza va fruktozanli siroplardan (GFS) fruktozani ajratishda ham xromatografik usullar qo'llaniladi. Bunda o'lchami 0,3–0,35 mm li smola zarrachalari bilan to'ldirilgan kolonka ishlatiladi. Kolonkani yuqorigi qismiga GFS-42 solinadi va u suv bilan siqib chiqariladi. Ajratish uchun sulfopolistiro l smoladan foydalaniladi. Sulfopolistiro l smolaga fruktoza yaxshi bog'lanishi uchun 4–6% li divinilbenzol ishlatiladi. Sulfokislotali guruhlar kalsiy ionlarini tutadi.

Fruktoza esa ushbu kalsiy ionlari bilan kompleks hosil qilish xususiyatiga egadir. Shu sababli, fruktoza sorbent qavatidan glukozaga qaraganda sekinroq o'tadi.



12-rasm. Fruktóza va glukoza olish texnologik sxemasi

Glukoza esa kolonkadan tez yuviladi va izomerlanish jarayonini amalga oshirish uchun ishlatiladi. Kolonkadagi fruktoza fraksiyasi esa asta ajratiladi. Ajratish  $60^{\circ}\text{C}$  haroratda o'tkazilib, fruktozali fraksiya 90% ga yaqin (GFS-90) bo'lganda jarayonni to'xtatish zarur. Ushbu usulda olingan toza fruktoza fraksiyasi, tarkibida fruktozasi kamroq bo'lgan siropga, masalan, GFS-42 ga qo'shilsa, GFS-55 qandli siropini olish mumkin. Fruktóza bilan to'yingan sirop ionitlarda qo'shimcha tozalanadi va faol ko'mir bilan 75–77% gacha konsentrlanadi hamda GFS-55 mahsulot ko'rinishida iste'molchilarga yuboriladi. GFS-42 1-avlod siroplari, GFS-55 esa 2-avlod siroplari deb nomlanadi.

Bu o'rinda shuni ta'kidlash lozimki, fruktoza chiqimini oshirish uchun texnologiyada glukoza siropi izomerlanadi va izosirop olinadi. Olingan izosirop glukozadan farqli, saxaroza

kabi shirin va shu sababli shakar o'rnini bosuvchi uglevod sifatida ishlatiladi. Ushbu siropni xromatografik usulda ajratish orqali fruktoza olish mumkin. Bunda 1 kg toza fruktoza olish uchun, texnologik jarayonda 2,1 kg glukozani izomerlash talab etiladi.

### Nazorat savollari

1. Fruktozaning xalq xo'jaligidagi ahamiyati nimalardan iborat?
2. Fruktoza olishda xomashyo sifatida nimalardan foydalanish mumkin?
3. Kristall fruktoza olish texnologiyasi qanday bosqichlardan tashkil topgan?
4. Kristall fruktoza olish texnologiyasi qanday fermentlar ishlatiladi?

### Test savoli

1. **Glukozaning miqdorini aniqlash uchun qaysi fermentlar ishlatiladi?**

- A) glukozoksidaza, peroksidaza
- B) glukozidaza, katalaza
- C) peroksidaza, katalaza
- D) amilaza, katalaza

### 4.4. Kristall glukozani olish texnologiyasi

Saxarozadan fruktozadan tashqari, glukozani siroplarini va shu bilan birga toza kristall glukozani ham olish mumkin. Glukozani har xil maqsadda, bir qator sohalarda ishlatilishi ma'lum. Biroq, glukozani vitamin C ni ishlab chiqarishda keng ishlatilishini va shuning bilan uning o'rnini turli sohalarda nihoyatda muhimligini ta'kidlash lozimdir. Shu sababli, bugungi kunda glukozani olish texnologik jarayonlarini ishlab chiqarish va shu bilan birga ularni takomillashtirish, glukozani olishda dastlabki manba bo'lib xizmat qiladigan arzon xomashyoning manbalarini topish o'ta dolzarb muammolardan hisoblanadi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, glukozani, ya'ni qandli moddalarni sellyulozalni chiqindilarni fermentativ gidrolizlash asosida yoki tarkibida

kraxmal tutgan xomashyolarni kerakli fermentlar yordamida parchalash yordamida olish mumkin. Quyida glukozeni kraxmaldan olish texnologik jarayoni keltirilgan.

**Kraxmal gidrolizi asosida glukoza olish.** Kraxmalni gidrolizlash asosida kristal glukoza olish jarayoni 12-rasmda keltirilgan. Ushbu jarayonni amalga oshirishda dastlabki xom ashyo sifatida jo'xori kraxmalini ishlatish mumkin. Buning uchun dastlab jo'xori kraxmalning 38–40% li suspenziyasi tayyorlanib, kraxmal quyultiriladi. Quyultirilgan kraxmal yaxshilab aralashtiriladi va ferment preparati bilan kraxmal ikki marotaba suyultiriladi (asosiy ferment – betta-amilaza). Kraxmal suti nasos yordamida to'plovchi uskunadan injektorga uzatiladi. Injektor suspenziyani o'tkir bug' bilan tez isitish uchun mo'ljallangan. Isitilgan kraxmal kleysteri (110°C) ushlab turuvchi uskunaga yuboriladi, u yerda kraxmal kleysteri 0,3–0,4 atm. bosim ostida ushlab turiladi. So'ngra asbobning suyultiruvchi qismiga yuboriladi. Bu erda kraxmal kleysteri qaynab ketsa, uning destruksiyasi sodir bo'lishi mumkin. Shu sababli, suyultiruvchi asbobda kraxmal kleysteri 100° C haroratda inkubatsiya qilinadi. Bunda inkubatsiya vaqti 15–30 minutdan oshmasligi kerak. Birinchi bosqichda gidroliz darajasi 2–3% ni tashkil etib, qisman gidrolizlanish jarayoni amalga oshadi. Qisman gidrolizlangan kraxmal injektorga yuboriladi, bu erda sirop 140° C gacha isitiladi va bug'latgichda bug'lantiriladi. Bug'latgichdagi harorat 85–90° S tashkil etib, u yerdan sirop ba'zida dekstrinizatsiya bosqichi, deb ataluvchi suyultirishni ikkinchi pog'onasiga yuboriladi. Bug'latgichdan keyin siropga b-amilaza fermenti qo'shiladi. Odatda ushbu bosqichda ishlatiladigan fermentning miqdori, umumiy ishlatiladigan fermentning 2/3 qismini tashkil etadi. Suyultirishning 2-bosqichida, shakarlanish darajasi 14–17% gacha yetadi.

Kraxmalni suyultirishdan keyin, olingan gidrolizat 34–35% qandli modda bo'lib, u yod bilan ko'k rang bermaydi. Ushbu eritma o'ta qovushqoqligi bilan xarakterlanadi. Qovushqoq mahsulotga glukoamilaza fermenti ta'sir ettirilib, shakarlanish jarayoni amalga oshiriladi.. Ushbu jarayonni 50–60° C haroratda,

pH muhit 4,5da (4,2-4,7), 48-72s davomida o'tkazish mumkin. Siropni shakarlanishi, shakarlanish 97-98% ni tashkil etgunga qadar olib boriladi. Glukoza miqdori 97-98% gacha etkazilganda kraxmalni shakarlanishi to'xtatiladi. Buning uchun sirop 90° C haroratgacha isitiladi. Shakarga aylangan siropni eriydigan boshqa moddalardan tozalash uchun, u mexanik filtrlash stansiyasiga yuboriladi.

Eritmani eriydigan moddalardan tozalash uchun esa, ion almashinuv va ko'mirli tozalash usullari qo'llaniladi. Ko'mir yordamida tozalashda 10-15 kg ko'mir kukuniga yoki granulasiga, taxminan 1 t yaqin sirop tozalash uchun qo'shiladi. Tozalash jarayonida ishlatilgan granulali ko'mirmi, ya'ni sorbentni 600-800°C haroratda suv bug'i bilan regenerirlash mumkin. Buning natijasida ushbu sorbentni qaytadan qandli mahsulotlarni tozalashda ishlatish mumkin bo'ladi.

Bo'yovchi va eruvchi moddalardan tozalangan glukoza siropi ion almashinuv tozalashga yuboriladi. Odatda, sulfostirol kationitlar va kuchsiz asosli anionitlardan, masalan, KU-2-8 va ANT-E21 dan foydalaniladi. Kolonnalar ionitlar bilan, odatda, juft bo'lib ishlaydi - sirop kation va anion almashinuvdan ketma-ketlikda o'tadi va kolonkalardan o'tgan sirop tozalangan qandli modda hisoblanadi.

Ushbu holatda aralashma holatidagi ba'zi fraksiyalar saxaroza eritmasini tayyorlash uchun ishlatiladi. Glyukoza eritmalarini filtrlab, rangsizlantirilgandan keyin, sirop 50-70% li eritma hosil bo'lgunga qadar quyultiriladi va kerakli maqsadda ishlatiladi.

### Nazorat savollari

1. Glyukoza qaysi sohalarda ishlatiladi?
2. Glyukoza olishda xomashyo sifatida nimalardan foydalanish mumkin?
3. Kristall glyukoza olish texnologiyasi qanday bosqichlardan tashkil topgan?
4. Kristall glyukoza olish texnologiyasida qanday fermentlar ishlatiladi?

### Test savollari

1. Glyukoza-fruktoza siropini olish texnologik jarayonida, past sifatli glukoza eritmasi ishlatilganda immobillangan fermentning faolligini yarmiga kamayish davri necha kunni tashkil etadi?

- A) 20
- B) 15
- C) 10
- D) 5

2. Glyukozaning fruktozaga aylanish jarayoni qaysi yili amalga oshirilgan?

- A) 1973
- B) 1970
- C) 1971
- D) 1960

3. Glyukoza-fruktoza siropini olish texnologik jarayonida, toza glukoza eritmasi ishlatilganda immobillangan fermentning faolligini yarmiga kamayish davri necha kunni tashkil etadi?

- A) 50
- B) 25
- C) 20
- D) 15

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Kristall glyukozaning farmatsevtik dori vositalari ishlab chiqarishdagi ahamiyati.

2. Oziq-ovqat sanoatida sellulolitik fermentlarning ishlatilishi.

3. Qandli moddalar ishlab chiqarishning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.

4. Tibbiyotda fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.

5. Sellulolitik mikroorganizmlarning qandli moddalar olishdagi roli.

#### 4.5. Glyukoza-fruktozali sirop olish

Bugungi kunda turli sohalarda saxarozani to'liq o'rini bosa oladigan qandli moddalarga bo'lgan ehtiyoj tobora o'sib bormoqda. Ayniqsa, ushbu holat oziq-ovqat sanoatida ishlatiladigan glyukoza-fruktozali siroplarga bo'lgan ehtiyojni ortishi bilan bog'liqdir. Glyukoza-fruktozali siroplar (GFS) o'zini tarkibi va qimmatli xususiyatlari bilan saxarozadan ustun turadi va shunga muvofiq shakarni o'rini bosishi, sharbatlar, konditer va boshqa mahsulotlarni ishlab chiqarilishida shirin ta'm beruvchi asosiy komponent hisoblanadi. GFS va shakarni solishurma tahlili, GFSning namni yaxshi ushlab turish xususiyatiga egaligini ko'rsatgan. Aynan, ushbu xususiyat konditer sanoatida o'zining ta'mini, xususiyatlarini uzoq saqlab turish imkoniga ega bo'lgan turli kremlar tayyorlashda muhim rol o'ynaydi. GFS past kristallanish xususiyatiga ega bo'lganligi sababli, u murabbo, djem, povidlo tayyorlashda ham keng qo'llaniladi va ushbu mahsulotlarni tayyorlashda GFS ishlatilganligi sababli, ular shakarlanmaydi. GFSni yuqori osmotik bosimga chidamliligi uning asosida tayyorlangan mahsulotlarni, shuningdek, sharbatlarni sterillash imkoniyatini tug'dirib, mahsulotlarni mikroorganizmlar ta'siridan saqlaydi. GFSli mahsulotlarni iste'mol qilish, tishni karies bilan kasallanishini oldini oladi.

Tarkibida shakar o'rniga GFSni saqlagan mahsulotlar shakarga nisbatan 30–50% ga kamroq energetik qimmatga ega bo'lganligi sababli, organizm tomonidan tezroq o'zlashtiriladi. GFS yuqorida qayd etilgan noyob xususiyatlariga ko'ra, ko'pgina mamlakatlarda oziq-ovqat mahsulotlarini tayyorlashda va ishlab chiqarishda qo'llaniladi. Masalan, AQSHda shakarni iste'mol qilish 1970-yildan 1986-yilga kelib, 46 kg dan 28 kg gacha kamaydi. Ushbu davr mobaynida GFS ni ishlatilishi 0,3 dan 18,3 kg gacha oshdi. Glyukoza-fruktozali siroplarni ishlab chiqarish uchun asosiy xomashyo sifatida, tarkibida ikki xil uglevod tutuvchi polisaxarid, ya'ni kraxmal ishlatiladi. Kraxmal glyukoza qoldiqlaridan iborat bo'lib, chiziqli (amiloza) va shoxlangan (amilopektin)dan iboratdir.

GFSni kraxmaldan ko'p bosqichli fermentativ yo'l bilan ajratib olish mumkin. Bunda bir qator amilolitik ferment preparatlari qo'llaniladi. Jumladan, amilaza, amiloglyukozidaza va glucoizomeraza fermentlaridan foydalaniladi. Ko'p hollarda ishlab chiqarish tarkibida 42,6%li (ba'zi hollarda 90%) fruktoza tutuvchi GFS ishlab chiqariladi.

Izomerizatsiya uchun substrat sifatida 35–50% konsentratsiyali glyukoza (sellulolitik chiqinlarni sellulaza fermenti asosida gidroliz qilish orqali olingan glukozadan ham foydalanish mumkin) eritmasidan foydalaniladi. Glyukozani fruktozaga izomerlanish reaksiyasi qaytar reaksiya hisoblanadi. Reaksiya natijasida hosil bo'lgan massa, o'z tarkibida 48–52% fruktoza saqlaydi. Shuni qayd etish kerakki, ushbu texnologik jarayonni amalga oshirishda izomerlanish reaksiyasi haroratga o'ta bog'liqligi bilan xarakterlanadi (1-jadval).

Harorat, °C	Izomerlanishdan keyin fruktoza konsentratsiyasi, %
30	46,5
40	47,5
45	48,2
60	49,9
70	52,4
75	53,4
80	54,2
85	54,1

**1-jadval. Haroratning glyukozani izomerlanish jarayoniga ta'siri**

Jadvaldan ko'rinib turibdiki, haroratni 30<sup>0</sup> C dan 85<sup>0</sup> C gacha ko'tarilishi mahsulot chiqimiga, shu bilan birga izomerlanish reaksiyasiga ma'lum haroratgacha ijobiy ta'sir ko'rsatar ekan.

Shu sababli, glukoza asosida GFS olishda haroratni nazorat qilish muhim omillardan biri hisoblanadi.

*Glukozaning izomerlanishi.* GFS ishlab chiqarishni asosiy jarayoni glukozaning fruktozaga izomerlanishi hisoblanadi. Bunda qattiq asosga (masalan, titan oksidi – 30%, DEAE-selluloza – 30%, polistirol – 40%) birlashtirilgan (immobilizatsiya) glukozomeraza ferment preparatlaridan foydalaniladi.

Glyukoizomeraza hujayrachi, ya'ni endoferment bo'lib, ushbu ferment immobilizatsiya shaklda ishlatilishi kerak. Immobilizatsiya eng yaxshi usuli fermentni turli tashuvchilarga adsorbsiyalash yoki uni gelga kiritish hisoblanadi.

Izomerlanishni amalga oshirishda optimal sharoitni ishlab chiqish zarurdir. Masalan, ushbu jarayonni amalga oshirishda 55–57° C harorat va pH muhit 7,5±7,8 ni tashkil etsa, maqsadga muvofiq bo'ladi. Adabiyotlardan ma'lumki, glyukoizomeraza fermentining ingibitorlari kislorod, kalsiy, mis, nikel, rux ionlari va boshqa ba'zi moddalar hisoblanadi. Fermentni barqarorlash uchun magniy tuzlari va natriy gidrosulfit qo'shish kerak. Odatda, izomerlanishda 40–45% konsentratsiyali sirop ishlatiladi. Siropni ferment bilan inkubatsiya qilish davomiyligi 20–24 soatni tashkil qiladi. Izomerlanishdan oldin fermentni faollashtirish uchun siropga MgSO<sub>4</sub> (0,025–0,015 mol/l) yoki CoSO<sub>4</sub> (0,0003–0,003 mol/l), mikroflora o'sishini susaytirish uchun esa – natriy yoki kaliy bisulfit (0,008–0,016% massa) qo'shiladi.

Reaksiya qaytar bo'lgani uchun tenglik glukoza va fruktozani ekvimolyar mutanosibligida belgilanilishi kerak. Amaliyotda reaksiya fruktoza konsentratsiyasi 40–42% ga yetganda to'xtatiladi. Glukoizomeraza fermenti 28–30 sutka davomida ishlatiladi, bunda u o'zining faolligini yo'qotishi mumkin. Bunday holatda ferment texnologik jarayondan olib tashlanib, qaytadan yangi ferment ishlatiladi. Izomerlanishdan keyin sirop ionitlar (kationit, anionit) yordamida qattiq ba'zi tuzlardan tozalanadi va faol ko'mir bilan rangsizlantiriladi. So'ngra eritma filtrlanadi va 70–74% gacha vakuum ostida konsentrlanadi, 25–30° C haroratgacha sovutiladi.

Ba'zi holatlarda glyukoza kristallanishini oldini olish uchun siropga qo'shimcha fruktozali fraksiya qo'shib to'yintiriladi va GFS-55 olinadi. Shirinlik bo'yicha GFS-55 saxarozadan ustunroq turadi va keng foydalaniladi.

### Nazorat savollari

1. Glyukoza-fruktoza siropi qaysi sohalarda ishlatiladi?
2. Glyukoza-fruktoza siropi olishda xomashyo sifatida nimalardan foydalanish mumkin?
3. Glyukoza-fruktoza sirop olish texnologiyasi qanday bosqichlardan tashkil topgan?
4. Glyukoza-fruktoza sirop olish texnologiyasida qanday fermentlar ishlatiladi?

### Test savollari

1. Glukoza-fruktoza siropini olish texnologik jarayonida, toza glukoza eritmasi ishlatilganda immobillangan fermentning faolligini yarmiga kamayish davri necha kunni tashkil etadi?

- A) 50
- B) 25
- C) 20
- D) 15

2. Glukoza-fruktoza siropini olish texnologik jarayonida, past sifatli glukoza eritmasi ishlatilganda immobillangan fermentning faolligini yarmiga kamayish davri necha kunni tashkil etadi?

- A) 20
- B) 15
- C) 10
- D) 5

3. Glukozaning fruktozaga aylanish jarayoni qaysi yili amalga oshirilgan?

- A) 1973
- B) 1970
- C) 1971
- D) 1960

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Fruктоza olishning xalq xo'jaligidagi ahamiyati.
2. Kristall glukozaning farmatsevtik dori vositalari ishlab chiqarishdagi ahamiyati.
3. Oziq-ovqat sanoatida sellulolitik fermentlarning ishlatilishi
4. Qandli moddalar ishlab chiqarishning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.
5. Tibbiyotda fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.
6. Sellulolitik mikroorganizmlarning qandli moddalar olishdagi roli.

#### **4.6. L va D aminokislotalar olish texnologiyasi**

Aminokislotalar – organizmning asosiy qurilish materiali bo'lib, undan peptidlar va oqsillar shakllanadi. O'simlik va mikroorganizmlarning o'zlari ularga kerak bo'lgan barcha aminokislotalarni sintezlay oladi. Bunda ular sodda kimyoviy birikmalardan foydalanadi. Vaholanki, odam organizmi 20 ta aminokislotalardan hayotiy faoliyati uchun juda kerak bo'lgan faqatgina 12 tasini sintezlay oladi. Qolgan 8 ta aminokislotalar *almashmaydigan aminokislotalar* deb nomlanib, organizmga tashqaridan – ozuqa bilan kirishi kerak. Almashmaydigan aminokislotalarning bittasi yetishmasa ham organizm o'sishi sekinlashadi, patologiya namoyon bo'ladi. Shuning uchun bu aminokislotalarni davolash va profilaktika maqsadlarida, oziqlanish ratsioni va boshqalarni me'yorlashtirish uchun sanoat miqyosida sintezlash muhimdir. Bundan tashqari, aminokislotalar (almashadigan va almashinmaydigan) ko'pgina biotexnologik jarayonlarda uchun muhim xomashyo hisoblanadi.

Aminokislotalar sanoat miqyosida kimyoviy (oqsillar gidrolizi va kichik molekulyar birikmalardan sintezlash), mikrobiologik va shu bilan birga biotexnologik usullar bilan olinadi (2-jadval).

## Aminokislotalarni sanoatda ishlab chiqarilishi

2-jadval

Aminokislotalar	Ishlab chiqarish, t/yil	Texnologik jarayon turi	Qo'llanilishi
L-alanin	130	1, 3s	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi
DL-alanin	700	2	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi
L-arginin	1000	1, 3a	Kosmetika
L-asparagin	50	1,2	Tibbiyot
L-aspartat	4000	1, 3s	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi
-valin	150	3a, 3c	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi
L-gistidin	200	3a	Tibbiyot
Glisin	6000	2	Organik sintez
L-glutamat	370000	3a	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi
L-glutamin	500	3a	Tibbiyot
L-izoleysin	150	3a	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi
L-leysin	150	1, 3a	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi
L-lizin	70000	3a, 3s	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi
DL-metionin	70000	2	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi
L-metionin	150	3s	Tibbiyot

L-ornitin	50	3a, 3s	Tibbiyot
L-prolin	100	3a	—
L-serin	50	3a, 3b	Kosmetologiya
L-tirozin	100	1, 3c	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi, organik sintez
L-treonin	160	3a	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi
L-triptofan	200	3a, 3c	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi, medicina
L-fenilalanin	3000	3a, 3s	Tibbiyot, Oziq-ovqat ishlab chiqarishi, ozuqaviy qo'shimchalar
L-sistein	700	1	Oziq-ovqat ishlab chiqarishi

1—oqsillar gidrolizi, 2—kimyoviy sintez, 3—mikrobiologik sintez (a—to'g'ri fermentatsiya, b—mikrobiologik transformatsiya, c—fermentlar va immobillangan hujayralarni ishlatilishi).

— Biotexnologik usullar bilan aminokislotalar olish texnologik jarayonini 3ta asosiy guruhlariga birlashtirish mumkin:

- D, L- aminokislotalar aralashmasi va ularni hosilalarini optik faol izomerlarga fermentativ parchalanish usullari;
- Aminokislotalarning enzimatik sintez usullari;
- Aminokislotalarning mikrobiologik (fermentativ) sintez usullari.

**Rasematlarni fermentativ parchalanishi.** Odatda, kimyoviy usul bilan olingan D- va L-shakldagi aralashmadan L-aminokislotalarni ajratib olish uchun aminokislotalar hosilalari olinadi, so'ng ularga ferment yoki fermentlar aralashmasi bilan ishlov beriladi (3-jadval).

## Rasematlarning gidrolizi bilan L-aminokislotalar olish

3-jadval

Xomashyo	Ferment	Mahsulot
<i>N</i> -asetil-D,L-aminokislotalar	Aminoatsilaza	L-aminokislotalar (nordonlardan tashqari)
D,L-aminokaprolaktam	Gidrolaza	L-lizin
D,L-2-amino-2-tiazolin-4-karbon kislota (D,L-ATK)	Rasemaza gidrolaza karbamoilgidrolaza	ATK, ATK, L-sistein
Gidantoin hosilalari	Digidropirimidinaza	D-aminokislotalar (alanin, valin, leysin, fenilalanin)
Gidantoin hosilalari	Gidantoinaza, karbamoilgidrolaza	L-aminokislotalar
D,L-aminokislotalar efirlari	Esterazalar	L-aminokislotalar

*N*-asetil-D,L-aminokislotalarni fermentativ gidrolizi xomashyoni almashtirib turish va bir xil biokatalizatorlarni ishlatish sharoitida aminokislotalarni butun spektrini olish imkonini qamrab oladi.

Gidantoin hosilalarining gidrolizi qator faol aminokislotalarni olishga imkon beradi. Digidropirimidinaza qator mono-almashtiruvchi gidantoinlarni gidrolizlaydi va bunda *N*-karbomolaminokislotalar hosil bo'ladi. Ferment yordamida alanin, valin, leysin, serin, fenilalaninlarning gidantoinli hosilalari gidrolizlanadi; lizin va asparagin kislotalar hosilalarini gidroliziga ta'sir qilmaydi.

L-lizin olishni kombinatsion usuli "Toyo Reyon" yapon firmasi tomonidan taklif etilgan. Birinchi bosqichda kimyoviy reaksiyalar natijasida siklogeksan D,L-b-amino-ye-kaprolaktamga aylanadi. Ikkinchi bosqichda fermentlar yordamida optik izomerlarning ajralishi amalga oshadi; bunda hosil bo'ladigan asimmetrik aminokaprolaktam gidrolaza fermenti ta'sirida L-lizinni hosil qiladi.

### Nazorat savollari

1. L va D aminokislotalar olishning xalq xo'jaligidagi ahamiyati nimalardan iborat?
2. L va D aminokislotalar olishning qanday usullari mavjud?
3. L va D aminokislotalar olishda qanday fermentlar ishlatiladi?

### Test savollari

1. **Qanday aralashma ratsemik aralashma deb ataladi?**
  - A) D va L- holatidagi aminokislota aralashmasi
  - B) D va nuklein kislota aralashmasi
  - C) L va aminoatselaza
  - D) tashuvchi va aminokislotalar aralashmasi
2. **Organizm qanday holatdagi aminokislotalarni o'zlashtiradi?**
  - A) L-holatdagi
  - B) D-holatdagi
  - C) suyuqlikda yaxshi eriydigan
  - D) A va B
3. **Biotexnologik usul bilan D,L-rasematlardan L – aminokislotalarni ajratib olishda qo'llaniladigan fermentni ko'rsating.**
  - A) Aminoatsilaza
  - B) Aminopeptidaza
  - C) Aminooksidaza
  - D) Atsetatkinaza

4. a) atsilash; b) alkillash; c) krisstallizatsiyalash; d) gidroliz jarayonlarining qaysilari D,L-aminokislotalarni L-formaga o'tishida muhim ro'l o'ynaydi?

- A) a, c, d
- B) a, b, c
- C) b, c, d
- D) b, c, a

5. Aminoatsilaza fermenti qanday aminokislotalarni sintezlaydi?

- A) L-atsilaminokislotasini
- B) D- atsilaminokislotasini
- C) DL- atsilaminokislotasini
- D) Ratsematsiyalangan aminokislotalar

6. Sut zardobi gidrolizi natijasida qanday moddalar hosil bo'ladi?

- A) glukoza, galaktoza
- B) glukoza, fruktoza
- C) fruktoza, galaktoza
- D) sellobioza, galaktoza

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Aminokislotalar ishlab chiqarishning xalq xo'jaligidagi ahamiyati.

2. Kristall glukozaning farmatsevtik dori vositalari ishlab chiqarishdagi ahamiyati.

3. Oziq-ovqat sanoatida aminokislotalarning ishlatilishi.

4. Aminokislotalar ishlab chiqarishning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.

5. Tibbiyotda aminokislotalarning ishlatilishi va ahamiyati

6. D,L-rasematlardan L -aminokislotalarni ajratib olishda qo'llaniladigan fermentlar.

### 4.7. Enzimatik sintez

Ushbu usulga ko'ra aminokislotalar olish jarayoni aminokislotalarni keltirib chiqaruvchi old moddalarni enzimlar ta'sirida aminokislota olishga asoslangan. Ushbu sintezda

aminokislotani hosil qila oladigan xom ashyodan foydalanilib, uni transformatsiyalanishi natijasida aminokislotalar olinadi. Enzimatik sintez natijalari 4 va 5-jadvallarda keltirilgan.

**Aminokislotani keltirib chiqaruvchi moddalarni biotransformatsiya asosida aminokislotalar olish**

**4-jadval**

<b>Aminokislotani keltirib chiqaruvchi modda</b>	<b>Mahsulot</b>
b-Ketoizokapron kislota	L-Leysin
b-Ketomoy kislota	L-Izoleysin
D-Treonin	L-Izoleysin
Indol	L-Triptofan
Antranil kislota	L-Triptofan
Glisin	L-Serin

**Fermentlar yordamida L-aminokislotalar sintezi**

**5-jadval**

<b>Aminokislotani keltirib chiqaruvchi moddalar</b>	<b>Ferment</b>	<b>Mahsulot</b>
Ammoniy fumarat	Aspartaza	L-asparagin kislota
Fenilpirouzum va L-asparagin kislotalar	Transaminaza	L-fenilalanin va pirouzum kislota
b-Keto va b-oksikislotlar	Degidrogenaza	L-aminokislotalar
L-Asparagin kislota	Aspartat-v-dekarboksilaza	L-alanin
Fenol, pirouzum	Tirozinfenolliaza	L-tirozin

kislota, ammiak		
Fenol, serin	Tirozinfenolliaza	L-tirozin
Indol, pirouzum kislota, ammiak	Triptofanindolliaza	L-triptofan
Indol, serin	Triptofanindolliaza	L-triptofan
v-Xlor-L-alanin, natriy sulfid	Sisteindesulfgidraza	L-sistein
Glisin, metanol	Serindegidraza	L-serin
Glisin, tetragidrofolat	Serintranmetilaza	L-serin

### Nazorat savollari

1. Enzimatik sintezda aminokislotalarni keltirib chiqaruvchi modda sifatida qanday moddalar ishlatiladi?
2. Fermentlar yordamida L-aminokislotalar sintezi qanday amalga oshiriladi?
3. L - aminokislotalar sintezida aminokislotalarni keltirib chiqaruvchi modda sifatida qanday moddalar ishlatiladi va ajralib chiqadigan mahsulot to'g'risida ma'lumot bering.

### Test savollari

1. Fermentlar immobillanganlaridan so'ng, ularning faolliklari qanday o'zgaradi?
  - A) Fermentativ faollik kamayadi
  - B) Fermentativ faollik ko'payadi
  - C) Fermentni o'z substrati bilan bog'lanib, gidroliz jarayoni tezlashadi
  - D) A va B
2. Glukoizomeraza ta'sirida hosil bo'lgan siropda necha foiz fruktoza hosil bo'ladi?
  - A) 42-43 %
  - B) 25-27%

C) 51–52 %

D) 6–7 %

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Fermentlar ishlab chiqarishning xalq xo'jaligidagi ahamiyati.
2. Fermentlarning farmatsevtik dori vositalari ishlab chiqarishdagi ahamiyati.
3. Oziq-ovqat sanoatida fermentlarning ishlatilishi.
4. Fermentlarning ishlab chiqarishning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.
5. Tibbiyotda fermentlarning ishlatilishi va ahamiyati.
6. D,L-rasematlardan L -aminokislotalarni ajratib olishda qo'llaniladigan fermentlar.

### 4.8. Mikrobiologik sintez

Aminokislotalar olishning mikrobiologik (fermentativ) sintezi ma'lum sharoitlarda mikroorganizmlarning barcha L-aminokislotalarni sintezlash xususiyatiga asoslangan. Bunda mikroorganizmlarning aminokislotalarni yuqori sintezlash sharoitlari ta'minlanadi.

“Gipersintezlash” effekti faqatgina boshqarish sistemasi buzilgan hujayralarda, ya'ni tabiiy shtammlarni yo'naltirilgan seleksiya yo'li bilan olingan mutantlarda bo'lishi mumkin. Mutantlarni olish esa, qandaydir mikroorganizm – respipient (ko'proq *Escherichia coli*)ga gibrid (kerakli mahsulot fermentlarini sinteziga javob beruvchi genlarni tutuvchi) plazmidalarni kiritish (transformatsiya) yo'li bilan amalga oshiriladi.

Biosintezda aminokislotalar produsentlari bo'lib ko'pincha *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Escherichia* avlodlariga kiradigan bakteriyalar xizmat qiladi. Aminokislotalar ishlab chiqarilishida mikroorganizm substratlari sifatida, uglevodli xomashyo (melassa, kraxmal va selluloza gidrolizatlar), etanol, sirka kislotasi yoki boshqa organik kislotalar, shuningdek, boshqa turli uglevodlar ishlatiladi. Azot manbayi sifatida ammoniy

tuzlari, nitratlar, shuningdek, aminokislotalardan foydalaniladi. Aminokislotaning maksimal ishlab chiqarilishi, qoidaga binoan, biomassa o'sishi deyarli to'xtayotganida amalga oshadi. Shuning uchun fermentatsiyaning birinchi bosqichida ozuqa muhiti hujayralarini tenglashtirilgan, muqobil o'sishini, ikkinchi bosqichda esa – kerakli aminokislotaning gipersintezi uchun sharoitlar ta'minlashi kerak. Aminokislota preparatlarini olish jarayonlari mahsulotni qo'llash bilan bog'liq bo'lgan qator farqlarga ega.

Yemlarga qo'shiladigan aminokislotali qo'shimchalarni tayyorlash uchun ularni konsentrlashdan oldin kultural suyuqlik stabilashtiriladi, so'ng vakuum-parlatish amalga oshiriladi. So'ng bug'lantirilgan eritma standartlanadi.

Mahsulotda aminokislotalarni oxirgi konsentratsiyasi asosiy moddadan 10% gacha farqlanishi kerak.

Agar hosil bo'layotgan aminokislotalar keyinchalik dori preparatlari sifatida ishlatilsa, u holda ishlab chiqarish sxemasiga mahsulotni maxsus metodlar yordamida qo'shimcha tozalash bosqichlari kiritiladi.

Ko'pgina aminokislotalar, shuningdek, almashmaydigan aminokislotalarning ishlab chiqarilishi – kimyoviy sanoatning yirik tarmog'idir. Vaholanki, kimyoviy metodlar yordamida aminokislotalar optik izomerlarini aralashmasi, ya'ni L- va D-aminokislotalar olinadi. Bu aralashmaning L- va D-shakldagi molekullari izomerlardan iboratdir. Kimyoviy reaksiyalarda bu izomerlar deyarli farqlanmaydi, vaholanki, odam organizmi faqatgina L-aminokislotalarni o'zlashtiradi (metionindan tashqari). Ko'pchilik biotexnologik jarayonlar uchun D-aminokislotalar hech qanday qimmatga ega emas.

Rasemik aralashma deb ataluvchi L- va D-aminokislotalar aralashmasining, ularni tashkil etuvchi izomerlarga ajratilishi, sanoat darajasida, immobillangan fermentlar yordamida amalga oshirilgan, dunyodagi birinchi jarayon hisoblanadi. Ushbu jarayon 1969-yilda Yaponiyada "Tanabe Seyyaku" kompaniyasida amalga oshirilgan. O'sha davrda 15 yil davomida bu jarayon aminoatsilaza erituvchi fermentining qo'llanilishi bilan

o'tkazilgan, lekin u iqtisodiy jihatdan samarali hisoblanmagan. Ushbu jarayonni amalga oshirishda immobillangan aminoatsilazadan foydalanish yo'lga qo'yilgandan so'ng, jarayonning iqtisodiy samaradorligi 1,5 martaga o'sdi va hozirgi vaqtda kompaniyada 5 ta L-aminokislotalar ishlab chiqarilishi sanoat darajasida amalga oshirilmogda. Ulardan 4 tasi almashmaydigan (metionin, valin, fenilalanin, triptofan).

Boshlang'ich modda sifatida oddiy kimyoviy sintez yordamida olingan atsillangan D,L-aminokislotalardan foydalaniladi. Aminoatsilaza bitta atsil-L-izomerni gidrolizlab, undan atsil guruhni ajratadi va shu bilan birga, hosil bo'layotgan L-aminokislotalarni reaksiyon sistemadagi atsil- D-izomerlarga nisbatan eruvchanligini oshiradi. Shundan keyin moddalar bir-biridan ma'lum fizik-kimyoviy metodlar bilan oson ajratiladi. Shu tarzda toza L-aminokislota ajratiladi. Qolgan atsil- D-aminokislota isitilganda rasematsiyalanadi, ya'ni atsillangan D-L-aminokislotalar aralashmasiga o'tadi va jarayon qaytadan boshlanadi. Shu tarzda davom etgan jarayon natijasida yagona mahsulot bo'lib L-aminokislota hosil bo'ladi. Shunisi aniqlandiki, aminoatsilaza uchun qaysi aminokislota gidrolizlashi hech qanday ahamiyatga ega emas. Bu ferment uchun atsil guruh muhim bo'lib, ferment o'ta spetsifiklik faol modda hisoblanadi. Buning natijasida immobillangan aminoatsilaza bilan bir xil reaksiyon kolonna turli L-aminokislotalarni ishlab chiqarilishda qo'llanilishi mumkin.

Immobillangan fermentni tayyorlash oson, chunki u maxsus smolada oson adsorbsiyalanadi, so'ng uni reaksiyon kolonnaga joylashtiriladi. Immobillangan fermentni yarim inaktivatsiya muddati, sanoat sharoitida 65 sutkani tashkil etadi. Katalizator faolligi normadan pastroqqa tushadi, kolonnaga yangi ferment eritmasi qo'shiladi (bir necha oyda bir marta) va u yana tashuvchiga adsorbsiyalanadi. Shuni qayd etish lozimki, ba'zi sifatli polimer tashuvchilarning barqarorligi yuqori bo'lib, ularni texnologik jarayonda uzoq ishlatish mumkin. Masalan, "Tanabe Seyyaku" yapon kompaniyasi ishlatgan tashuvchi 8 yildan

ko'proq vaqt mobaynida bir kolonkada aminokislota olish jarayonida ishlatilgani ma'lum.

### Nazorat savollari

1. Aminokislotalar olishning mikrobiologik (fermentativ) sintezi qanday amalga oshiriladi?
2. Biosintezda qaysi avlod mikroorganizmlari aminokislotalarning asosiy produtsenti bo'lib xizmat qiladi?
3. Aminokislotalar olishning mikrobiologik sintezida ishlatiladigan xomashyolarga nimalar kiradi?
4. Ratsemik aralashma deganda nìmani tushunasiz?
5. Aminokislotalar olishning mikrobiologik sintezida qanday jihozlardan foydalanish mumkin?

### Test savoli

1. **Birinchi L-glutamin kislotasi qanday usulda sintez qilingan?**

- A) Mikrobiologik usulda
- B) Biotexnologik usulda
- C) Biokimyoviy usulda
- D) Kimyoviy usulda

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Biosintezda aminokislotalar produsentlarining roli.
2. Mikrobiologik sintezning xalq xo'jaligidagi ahamiyati.
3. Mikrobiologik sintezning farmatsevtik dori vositalari ishlab chiqarishdagi ahamiyati.
4. Oziq-ovqat sanoatida mikroorganizm fermentlarining ishlatilishi.
5. Mikrobiologik sintezning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.
6. Tibbiyotda mikroorganizm fermentlarining ishlatilishi va ahamiyati.

#### 4.9. Lizin olish texnologiyasi

Lizin (b, e-diaminokapron kislota,  $H_2NCH_2CH_2CH_2CH_2CH(NH_2)COOH$ ) almashmaydigan aminokislotalarga kiradi. 2001-yilga kelib, jahon miqyosida lizin ishlab chiqarish miqdori 550 ming tonnani tashkil qildi. Sababi lizin aminokislotasiga bo'lgan ehtiyojning yanada o'sib borayotganligini ko'rsatadi.

Lizinning sanoat produsentlari bo'lib *Brevibacterium flavum* va *Corynebacterium glutamicum*, *Mikrokokkus* bakteriya turlarining auksotrof shtamlari hisoblanadi.

- a) ekish materialini olish
- b) oziqa muhitini tayyorlash
- d) havoni sterillash
- e) fermentatsiya
- f) lizin ajratish

Dastlab kultura go'shtli peptonli agarda qattiq oziqa probirkalarida 28–30<sup>0</sup> C haroratda bir sutka davomida o'stirib olinadi. So'ngra mikroorganizm suspenziyasi steril suyuq oziqa muhitiga o'tkaziladi va tebratgichda 180–200 tez/ min bir sutka o'stiriladi. Bu onalik ekish materiali deb ataladi. Onalik ekish materiali boshqa kolbalarga ko'chirib o'tkaziladi va o'stiriladi.

*Muhit tarkibi.* Lizinning barcha produsentlari biotinga bog'liq mikroorganizmlar hisoblanadi. Shu sababli muhitda biotinning miqdori mikroob hujayraning normal o'sishi va rivojlanishi uchun kerak bo'lgan miqdorga (4–5 mkl) nisbatan yuqori (29 mkl/l) bo'lishi kerak. Agar biotin miqdorini 1–2 mkg/l gacha pasaytirilsa, lizin biosintezi sekinlashadi, lekin shu bilan bir vaqtda glutamin kislota hosil bo'lishi kuchayadi.

Biotin, vitaminlar va qator aminokislotalarning manbayi bo'lib, odatda, makkajo'xori ekstrakti va lavlagili melassada ularning miqdori katta bo'ladi. Lizinning maksimal biosintezi saxarozali muhitlarda kuzatiladi (6-jadval). 10–12% saxarozatutgan muhitdan ko'p miqdorda lizin olish mumkin. Saxarozaning yuqori konsentratsiyalarida produsent o'sishining solishtirma tezligi pasayadi va shakar konversiyasi ko'effitsiyenti (YP/S) kamayadi.

*Brevibacterium flavum* produsenti bilan L-lizinning biosinteziga uglerod manbayining ta'siri (konsentratsiya 7,5%)

6-jadval

Uglerod manbayi	ASB*, g/l	Lizin, g/l	Uglevod assimilyat siyasi, %	YP/S
Glukoza	15,2	22,0	7,6	0,37
Saxaroza	18,2	25,0	7,1	0,42
Galaktoza	2,0	1,0	0,7	0,02
Ksiloza	5,2	3,5	2,5	0,06
Mannoza	9,3	6,0	4,5	0,10
Ramnoza	3,6	2,0	1,3	0,03
Arabinoza	1,0	0,1	0,7	

Sanoat sharoitlarida uglerod manbai sifatida melassa, gidrol, selluloza tutuvchi xomashyo gidrolizatleri, kraxmal, shuningdek, sirka kislotadan foydalaniladi.

Azot manbalari sifatida ko'pincha ammoniy tuzlari va makkajo'xori ekstrakti, kazein yoki achitqilarning kislotali gidrolizatleri ishlatiladi. Achitqilar va kazein o'zida auksotrof shtammga kerak bo'lgan aminokislotalar va vitaminlarni tutadi. Muhitda uglerod va azotni optimal nisbati 11:1 ni tashkil qilishi zarur (uglerod miqdori oshib ketsa lizin chiqishi pasayadi, kamaysa alanin to'planadi). Ozuqa muhitida, shuningdek, kaliy, magniy va fosfor tuzlari bo'lishi kerak.

Ekuvchi material ikki bosqichda ko'paytiriladi: avval kolbalarda, so'ngra ekish apparatida, ya'ni (ularning hajmi sanoat fermentyorda. Fermenterning hajmi odatda 10 m<sup>3</sup> ni tashkil qilishi lozim.

**Fermentatsiya sharoitlari.** Suyuq lizin olish jarayonida aseptika shartlariga qattiq rioya qilish kerak. Lizin produsentining kulturasini o'stirilishi odatda, davriy usullar bilan fermentyorlarda (hajmi 50, 63 yoki 100 m<sup>3</sup>) amalga oshiriladi. Ekiluvchi material ozuqa muhiti hajmidan 5-10% miqdorda fermentyorga

yuboriladi. Ekilgandan keyin unga 50°C gacha isitilgan havo beriladi (1 min da 1 havo hajmiga 1 hajm ozuqa muhiti, 0,12–0,13 MPa bosimda).

Fermentatsiya davomiyligi 55–72 soatni tashkil qiladi. jarayon muhitni intensiv aralashtirgan holda, 28–32°C harorat va pH muhit 7,0–7,5 da (muhitga ammiakli suv qo'shib ushlab turiladi) o'tkaziladi.

Kultivatsiyalash, ya'ni fermentatsiya jarayoni ikki bosqichdan iborat. Birinchi sutkalarda hujayralar 25% gacha yaqin uglevodlar va azot moddalarni iste'mol qiladi; bu vaqtda deyarli butun biomassa to'planadi. Ikkinchi bosqichda biomassa to'planishining tezligi keskin pasayadi, lekin kultural suyuqlikda lizin to'planishi amalga oshadi. Jarayon oxirida titrlanuvchi agent (ammiakli suv) iste'mol qilinishi to'xtaydi va lizin konsentratsiyasi 60–100 g/l ni tashkil qilganda fermentatsiya to'xtatiladi.

Lizinni qanday maqsadda ishlatishga qarab, turli holatdagi lizinni olish mumkin. Masalan: lizinning suyuq konsentrati, lizinning quruq yem konsentrati, kristall lizin shular jumlasidandir (13-rasm).

**Lizinning quruq konsentrati.** Lizinning suyuq konsentratidan lizinni quruq konsentratini olish uchun 10–13% li kultural suyuqlik HCl bilan pH 5,0 gacha nordonlashtiriladi va lizinni barqarorlash uchun 0,15% li natriy gidrosulfit eritmasi qo'shiladi. Barqarorlashtirilgan kultural suyuqlik vakuumda 35–40% gacha bug'lantiriladi. Ana shu usulda olingan lizin suyak uniga, oziqa achitqilariga, bug'doy kepagiga qo'shib quritiladi. Bunda "sochiluvchan quruq oziqa lizinni" olish mumkin.

Bundan tashqari **kristall lizinni** ham olish mumkin. Bunda hujayra suyuqligidan biomassa ajratiladi va massa sentrifugalanadi. Shundan so'ng cho'kma filtrlanadi va tozalangan massa ajratib olinadi. Keyingi bosqichda biologik massani ion-almashinish xromatografiyasi usuli yordamida tozalash davom ettiriladi. Ion-almashinish xromatografiyasidan so'ng, lizin 0,5–5,0% ammiak suvida yuvib olinadi. Xlorid kislota bilan nordonlashtirilib, so'ng bug'lantiriladi. Lizinga xlorid kislota ta'sir ettirilganda monoxlorigidrat lizin hosil bo'ladi va

ushbu preparat 10–12<sup>0</sup>C da sovitilganda sarig‘imtir kristall lizin hosil bo‘ladi. Yuqori tozalikka ega bo‘lgan preparatni olish uchun tozalash jarayonida eritmaga faol ko‘mir bilan ishlov berish zarur va shu bilan birga 50% li etanol yordamida qayta kristallantirish talab etiladi.

### Nazorat savollari

1. Lizin ishlab chiqarishning xalq xo‘jaligidagi ahamiyati nimalardan iborat?
2. Lizin ishlab chiqarishda qaysi produtsentlar ishlatiladi?
3. Lizin ishlab chiqarishda ishlatiladigan ozuqa muhiti tarkibiga qanday moddalar kiradi? Uglevod manbayi sifatida xomashyolardan foydalanish mumkin?
4. Lizin ishlab chiqarish qanday bosqichlardan iborat?
5. Lizin ishlab chiqarishda qaysi jihozlardan foydalanish mumkin?

### Test savollari

1. Aminokislotalarning eng ko‘p qo‘llaniladigan sohasini aniqlang.
  - A) Oziq-ovqat sanoati
  - B) Chorvachilik
  - C) Tibbiyotda
  - D) Barcha javoblar to‘g‘ri
2. Lizinni hayvon ozuqasiga qancha miqdor qo‘shilishi yetarli darajada hisoblanadi?
  - A) 0,1 %
  - B) 10 %
  - C) 2 %
  - D) 1 %

### Mustaqil ta‘lim mavzulari

1. Lizin olish texnologiyasining xalq xo‘jaligidagi ahamiyati.
2. Lizin olish texnologiyasi yordamida qishloq xo‘jaligi preparatlari ishlab chiqarish.
3. Lizin olish texnologiyasida produtsentlarning roli.

4. Lizin olish texnologiyasida oziqa muhitining o'ziga xos komponentlari.

5. Mikrobiologik sintez yordamida lizin ishlab chiqarish texnologiyasi.

6. Lizin - farmatsevtik dori vositasi sifatida.

7. Oziq-ovqat sanoatida lizinning ishlatilishi .

8. Mikrobiologik sintezning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.

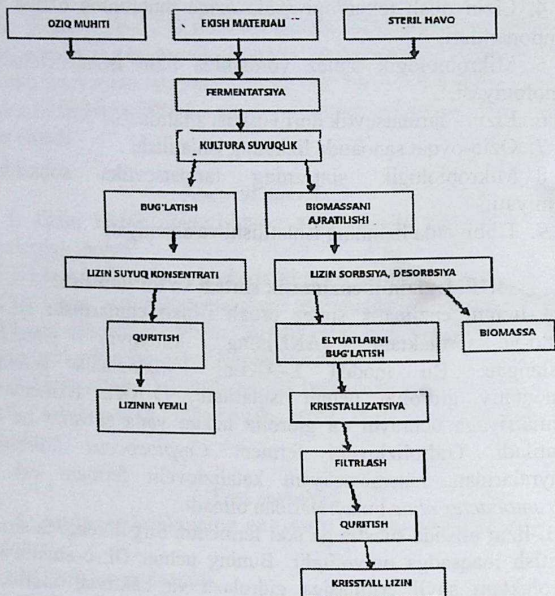
9. Tibbiyotda lizinning ishlatilishi va ahamiyati.

#### 4.10. L-lizinni enzimatik sintezi va qo'llanilishi

L-lizinni enzimatik sintez orqali ishlab chiqarilishi DL-b-amino-ye-kaprolaktam (AKL)ning kimyoviy sinteziga asoslangan. Bu modda L-AKLni L-lizingacha selektiv fermentativ gidrolizi uchun ishlatiladi; D-AKL fermentativ rasematsiyaga uchraydi va gidroliz uchun yana substrat bo'lib ishlatiladi. Gidrolizlovchi ferment *Cryptococcus laurendii* hujayralaridan, rasemizatsiyani katalizlovchi ferment esa -- *Achromobacter obae* hujayralaridan olinadi.

L-lizin olishda substratga ikki fermentni birgalikdagi ta'sirini ishlatish maqsadga muvofiqdir. Buning uchun DL-b-amino-ye-kaprolaktam suvli eritmasiga gidrolaza va bakterial faollikni namoyon qiluvchi achitqi va bakterial hujayralarning kerakli miqdori kiritiladi. Ikkala fermentni ta'siri uchun optimal pH muhit ko'rsatgichi 8,0–8,5 va harorat 30–50 °C ni tashkil etishi kerak. Bu jarayonda L-lizinni chiqimi 99,8% ni tashkil qiladi.

L-lizin asosan yemga qo'shimcha sifatida ishlatiladi. Bu esa ushbu aminokislotani o'simlik yemlarida kam miqdorda bo'lishi bilan bog'liq. Tozalangan lizin oziq-ovqat mahsulotlariga qo'shimcha sifatida, shuningdek, tibbiyot preparatlarida va boshqa maqsadlar uchun ishlatiladi.



**13-rasm. Lizin preparatlarini ishlab chiqarishning texnologik sxemasi.**

Lizin tutuvchi preparatlar o‘simlikshunoslikda ham keng qo‘llaniladi. Aminokislotalardan tashqari boshqa biostimulyatorlarni ham tutuvchi bunday preparatlarning qo‘llanilishi issiqxona va dala qishloq xo‘jalik ekinlar hosilining oshishiga olib keladi. Lizinning oksi-lizin formasi va fitin kislotali tuzlari anemiyaga qarshi va anabolik ta‘sirga ega. Lizin asetil-aspartati miokard, jigar kasalliklari, endogen yoki ekzogen kelib chiqishga ega bo‘lgan intoksikatsiyalar va boshqa kasalliklarni davolashda qo‘llanilishi mumkin.

### Nazorat savollari

1. L-lizinning enzimatik sintezi nimaga asoslanadi?
2. Hidrolizlovchi ferment produtsentlari sifatida qaysi mikroorganizmlar ishlatiladi?
3. L-lizin ishlab chiqarishning bosqichlarini tushuntiring.
4. L-lizin ishlab chiqarishning xalq xo'jaligidagi ahamiyati nimalardan iborat?

### Test savoli

#### 1. L-lizin qanday usullar yordamida olinadi?

- A) barcha javoblar to'g'ri
- B) o'simlik gidrolizatlaridan ekstratsiyalash
- C) mikrobiologik va kimyoviy sintez
- D) biotexnologik usul asosida

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. L-lizin – farmatsevtik dori vositasi sifatida
2. Mikrobiologik sintezning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.
3. L-lizin olish texnologiyasining xalq xo'jaligidagi ahamiyati.
4. L-lizin olish texnologiyasi yordamida qishloq xo'jaligi preparatlari ishlab chiqarish.
5. L-lizin olish texnologiyasida produtsentlarning roli.
6. L-lizin olish texnologiyasida oziqa muhitining o'ziga xos komponentlari.
7. Mikrobiologik sintez yordamida lizin ishlab chiqarish texnologiyasi.
8. Oziq-ovqat sanoatida lizinning ishlatilishi .
9. Mikrobiologik sintezning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.
10. Tibbiyotda lizinning ishlatilishi va ahamiyati.

#### 4.11. Fermentlarning analitik kimyoda qo'llanilishi

Zamonaviy biotexnologiya – bu, rekombinat oqsillar olish transgen hayvon, o'simlik va mikroorganizmlar yaratish va ular

asosida biologik faol moddalar olish jarayonlaridir. O'tkir raqobat ostida bugungi kunda biotexnologiya yo'nalishi muvaffaqiyatli rivojlanmoqda. Sababi, turli mahsulotlarga bo'lgan ehtiyoj, aholi sonining ko'payishi bilan keskin ortib bormoqda. Shuning uchun transgen hayvon zotlarini va o'simlik navlarini yaratish, rekombinant oqsillar olish uchun qat'iy sharoitlar va katalizatorlar zarur.

Biotexnologiyaning tirik hujayralardan (ma'lum kimyoviy reaksiyalarda katalizatorlar vazifasini bajaruvchi bakteriya sifatidagi achitqi zamburug'lari va alohida enzimlar kabi mikroorganizmlar) foydalangan holda farmatsevtik sanoati uchun biologik faol moddalarning olinishi va qo'llanilishi yangi imkoniyatlarni yaratdi. Birgina noyob spetsifiklikka ega bo'lgan enzimlarni immobilangan formalari asosida chiqindisiz toza mahsulot olish texnologiyalari yaratildi.

Fermentlar o'zining noyob xususiyatlarini (effektivligini, tanlovchanligini) hujayra tashqarisida ham saqlaydi. Kimyoviy katalizatorlarga qaraganda fermentlar zaharli emas, ularning sanoatda qo'llanilishi iqtisodiy va ekologik nuqtayi nazardan qulay hisoblanadi. Sanoat hajmiga ko'ra fermentlar aminokislotalar va antibiotiklardan keyin uchinchi o'rinni egallaydi va to'qimachilik, teri, selluloza-qog'oz sanoati, tibbiy, kimyo sanoatida keng qo'llanilmoqda. Turli sinf fermentlari atrof-muhitga tushuvchi antropogen organik birikmalarni parchalash va o'zgartirish uchun ishlatiladi.

Fermentlar tibbiyot sohasida ham muhim rol o'ynaydi. Proteolitik fermentlar (amilaza, lipaza) oshqozon-ichak, jigar va oshqozon osti bezi kasalliklarida qo'llaniladi. Oxirgi yillarda proteinazaning o'sma hujayralarni davolashda qo'llanilishi yaxshi samara berganligi ma'lum. Proteolitik fermentlar qon tomirlaridagi tromblarni yo'qotishda ham ishlatiladi. Kollagenaza chandiqlar hosil bo'lishini tarqatishda, elastaza esa ateroskleroz rivojlanishini to'xtatish uchun qo'llaniladi. Fermentlar diagnostik maqsadlarda, masalan, miokard infarktini yoki jigar kasalliklarini davolashda ishlatiladi.

Immobilangan fermentlar tibbiyotda, birinchidan, past darajadagi zaharli va allergik ta'sirga ega dori vositalarini yaratish uchun yo'l ochdi. Dunyodagi birinchi immobilangan ferment preparati (streptokinaza) qon-tomir kasalliklarida ishlatildi. Ikkinchidan, inkapsullangan ferment preparatlari organizmga dorilarning yo'naltirilgan transporti muammolarini yechdi. Fermentlar immobilanishi va ularning sanoatda qo'llanilishiga misol sifatida alanini aminokislota va model sistemalardagi koferment regeneratsiyasidagi (NAD) o'zgarmas jarayonlarni misol qilib keltirish mumkin. Bu sistemada dastlabki substrat (sut kislota) dekstran NAD va ikkita NADga bog'liq dehidrogenazalarda: laktat va alanindehidrogenazada immobilangan kamera-reaktorga nasos yordamida beriladi; reaktorning qarama-qarshi tomonida reaksiyaning mahsuloti ultra-filtratsiya metodi asosida yo'qotiladi.

Bu turdagi reaktorlar farmatsevtika sanoatida, masalan, gidrokartizon antirevmatoiddan prednizolon preparatini sintez qilishda qo'llaniladi. Immobilangan fermentlar va kofermentlar yordamida bog'langan kimyoviy reaksiyalarni (almashinmaydigan metabolitlar biosintezini hisobga olgan holda) yo'naltirilganlik asosida amalga oshirish mumkin. Shu asnoda, yangi metodologik yondashuvlar yordamida fan "sintetik biokimyo" sohasiga o'zining birinchi qadamlarini qo'ymoqda.

Tadqiqotlarning yangi muhim yo'nalishlari bo'lib hujayraning immobilanishi va genotexnika metodlari (gen muhandisligi bo'yicha loyihalash) asosida mikroorganizmlarning sanoat shtammlarini, ya'ni vitaminlar va almashinmaydigan aminokislotalarning produsentlarni yaratish mumkinligi hisoblanadi. Biotexnologiya yutuqlarining tibbiyotda qo'llanilishiga misol sifatida biologik suyuqliklar yoki to'qina ekstraktlaridagi tireotrop gormonini aniqlash uchun, qalqonsimon bez hujayrasini immobilangan formalarining yaratilishini ta'kidlash mumkin.

Yana shuni ta'kidlash lozimki, – kaloriyasiz shirinliklar, jumladan, yuqori kaloriyaga ega bo'lmagan, shirinligini his qilish mumkin bo'lgan, shakarning o'rnini bosa oladigan qandli

moddalarni olishning biotexnologik usulini yaratilishini aytish lozim. Shunday istiqbolli moddalardan biri tarkibida dipeptid metil efiri – aspartilfenilalanin tutgan aspartam hisoblanadi. Aspartam shakardan ko‘ra 300 marta shirinroq, zararsiz va organizmda uchraydigan tabiiy erkin aminokislotalar: asparagin kislota (aspartat) va fenilalanin ko‘rinishida tarqaladi. Aspartam, shubhasiz, tibbiyotda ham, oziq-ovqat sanoatida ham keng qo‘llaniladi. Masalan, AQSHda uni bolalar ozuqalarini tayyorlashda va dietik koka-kola tayyorlashda ishlatiladi. Genotexnika metodlari asosida aspartamni ishlab chiqarish uchun faqatgina erkin asparagin kislotalari va fenilalaninni emas, balki bu dipeptidning biosintezini katalizlovchi bakterial fermentni ham olish zarurdir.

### Nazorat savollari

1. Fermentlarni turli sohalarda ishlatilishi qanday ahamiyatga ega?
2. Fermentlarning tibbiyot sohasida turli xil davolashdagi ahamiyati nimalardan iborat?
3. Fermentlarning oziq-ovqat sohasida ishlatilishi?

### Test savollari

**1. Fermentlar immobillanganlaridan so‘ng, ularning faolliklari qanday o‘zgaradi?**

- A) Fermentativ faollik kamayadi
- B) Fermentativ faollik ko‘payadi
- C) Fermentni o‘z substrati bilan bog‘lanib, gidroliz jarayoni tezlashadi
- D) A va B to‘g‘ri

**2. Glukoizomeraza ta‘sirida hosil bo‘lgan siropda necha foiz fruktoza hosil bo‘ladi?**

- A) 42–43 %
- B) 25–27 %
- C) 51–52 %
- D) 6–7 %

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Fermentlarning ishlab chiqarishning farmatsevtika sohasidagi ahamiyati.

2. D,L-rasematlardan L –aminokislotalarni ajratib olishda qo'llaniladigan fermentlar.

3. Fermentlarning farmatsevtik dori vositalari ishlab chiqarishdagi ahamiyati.

4. Oziq-ovqat sanoatida fermentlarning ishlatilishi.

## V BOB. FERMENTLARNI TEZKOR USULLARDA QO‘LLASH

### 5.1. Antigen va antitana tuzilishi, xossalari

Antigenlar, odatda, ular yuboriladigan organizm uchun yot bo‘lgan, immun tizimni ishga tushira oladigan, tarkibida oqsil yoki polisaxaridlar tutuvchi organik modda yoki makromolekulalardir. Antigenlar organizmga kirishi bilanoq o‘ziga qarshi va spetsifik bo‘lgan, o‘z navbatida antigen bilan o‘zaro ta’sirlashadigan yangi oqsillarni vujudga keltiruvchi immunogen faol modda hisoblanadi. Hayvon, o‘simlik, mikroorganizmlar, viruslar, ulardagi maxsus guruhlar va antigen determinantlari, antigen vazifasini bajaradi. Shu bilan birga, fermentlar, oqsillar, polisaxaridlar, mitoxondriyalar, ribosoma va nukleoidlarda, hujayra, hattoki to‘qimalarda ham shunday xususiyat mavjud.

Modda to‘liq antigen bo‘lishi uchun birinchidan, molekulyar og‘irligi 10 000 D dan yuqori bo‘lishi, ikkinchidan, kimyoviy geterogen bo‘lishi kerak. Masalan, oqsillar bir necha aminokislota qoldig‘idan tashkil topgan bo‘lsa, shuning hisobiga ular ikkilamchi, uchlamchi va to‘rtlamchi tuzilmalar hosil qila oladi. Antigen qanchalik murakkab tuzilgan bo‘lsa, shuncha antigen determinantlari, ya’ni gomologik AT va limfotsitlar bilan ta’sirlashadigan qismlari shuncha ko‘p bo‘ladi.

Umuman olganda, antigen deb shunday moddani aytish mumkinki, ya’ni organizm uchun yot bo‘lgan modda organizmda unga qarshi bo‘lgan yangi oqsil moddani – glikoproteidlar sinfiga kiruvchi immunoglobulinlar sintezlanishiga olib kelishi kerak. Bordiyu yot modda organizmga kirsa, antitelalar hosil bo‘lmasa, bunday moddalar serologik jihatdan faol modda hisoblanmaydi. Biologik faol moddaga nisbatan antitelalar hosil qilish kerak bo‘lsa, avvalo ana shu moddaning titri, ya’ni serologik jihatdan faolligi aniqlanadi. So‘ngra immunologik jihatdan stimullovchi moddalar bilan (adyuvand Freyd moddasi yoki boshqa stimulyatorlar) hayvon organizmiga yuboriladi va shundan so‘ng organizmda antitelalar hosil bo‘lish jarayoni kuchayadi.

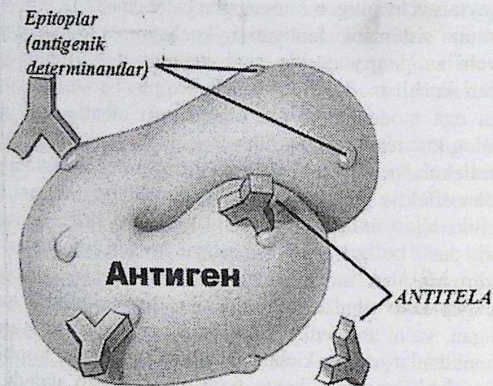
Organizmida sintezlangan antitelalarda faol markazlari mavjud bo'lib, V – variabel qismi deb yuritiladi. Antitelalar ana shu variabel qismi bilan antigen bilan o'zaro ta'sirlashib bog'langanda, ulardagi faol markazlar muhim rol o'ynaydi. Antigenda mavjud bo'lgan faol markaz, ya'ni antitela bilan bog'lanadigan qismi – antigen determinanti deb ataladi. Antitelalar antigenlar bilan molekulyar komplementar prinsipi asosida birikadi va fermentning substrat bilan maxsus bog'lanishini ta'minlovchi ko'pgina nokovalent o'zaro ta'sirlashuvning yuzaga kelishiga sabab bo'ladi. Immun tizimga javob qaytaruvchi antigen immunogen hisoblanadi.

Immun sistemani faoliyatini kuchaytiruvchi va vujudga keltiruvchi antigen, yuqorida qayd etganimizdek, immunogenlik xususiyati kuchli modda hisoblanadi. Ko'pincha antigenlar oqsil tabiatiga ega moddalar bo'lib, organizmda albatta ma'lum bir immunologik reaksiya turini amalga oshiradi. Odatda, makromolekulalar, masalan, yot oqsillar, nuklein kislotalar va uglevodlar effektiv immunogen bo'lib, molekulyar massasi 10000 dan kichik, lekin antigenlik xususiyatiga ega. Lekin antigenlik xossalari past bo'lgan, ba'zi boshqa turdagi moddalar ham mavjuddir. Masalan, nuklein kislotalar, antibiotiklar, gormonlar, yog'lar, gaptenlar shular jumlasidandir. Immun javob qaytara olmaydigan, ya'ni antigenlik yoki immunogenlik xususiyati past bo'lgan moddalar asosan kichik molekulyar moddalar hisoblanib, ular gaptenlar (yunoncha, hapto–tutib oluvchi) deb ataladi. Ular yirik tashuvchi-oqsillar bilan kovalent birikkandagina immun tizimga javob qaytaradi. Masalan, odatda, noimmunogen 2,4-dinitrofenil guruhiga zardob albumini kabi tashuvchi-oqsil birikkanda bu guruh immunogen bo'ladi.

Kichik molekulyar birikmalarni o'zaro yoki boshqa makromolekulalar bilan birlashtirib, assotsiatlarni, ya'ni immunogenlik xususiyatini hosil qiluvchi moddalar, gibridd, molekulyar massasi katta bo'lgan moddalarni sintezlash mumkin. Bundan tashqari antigenlarni sun'iy ravishda olish mumkin. Hozirga kunda sun'iy sintezlangan makromolekulalar hosil qilish

bilan immunokimyo yo'nalishida faoliyat ko'rsatayotgan bir guruh olimlar shug'ullanishmoqda.

Antigen (AG) haqida so'z borganda yana shuni aytib o'tish lozimki, antigenlar faqat tashqi muhitdan kiradigan moddalar hisoblanmay, balki organizmda fiziologik o'zgarishlar natijasida hosil bo'lgan, organizmning shaxsiy o'ziga xos molekulalari ham antigen hisoblanadi. Ular ham spetsifik oqsillar – antitelalar hosil bo'lishiga ko'maklashadigan, genetik jihatdan muhim ahamiyatga ega bo'lgan oqsil tabiatli moddalar guruhi hisoblanadi.



**14-rasm. T parotopi tuzilishining AG epitopi tuzilishiga to'g'ri kelish darajasi.**

Immunoglobulinlar gruppasiga kiruvchi barcha murakkab oqsillar plazma oqsillaridir. Plazmatik hujayra va B-limfotsitlar tomonidan AG ta'sirida sintez qilinib, shu AG bilan maxsus birlasha oladigan qon plazmasi oqsillari (glikoproteidlar) immunoglobulinlar (Ig) yoki antitelalar (AT) deb ataladi. ATlar bir necha xil xususiyatga ega: maxsuslik, valentlik, affinlik va avidlik. ATlar maxsusligi – immunoglobulinlarning faqat

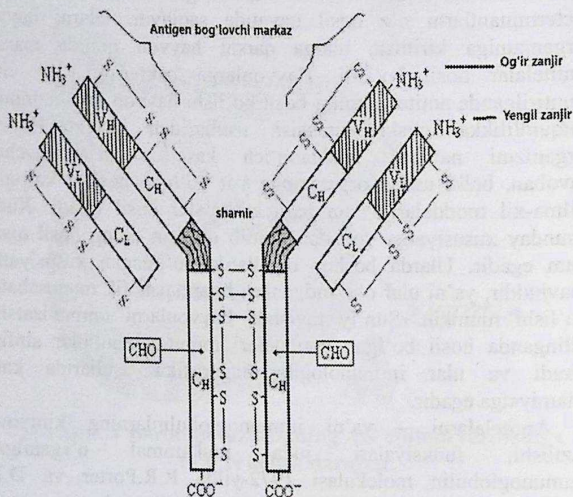
gomologik AGLar bilan ta'sirlasha olishi, ya'ni AG determinantlariga qarshi ATlarda determinantlar mavjudligi. **Valentlik** – ATning AGni biriktirib oluvchi faol markazlar soni. Masalan, IgG – bivalent bo'lsa, IgM – o'n valentli. **Affinitet**, affinlik (ingl. Affinity – moyillik) – AT parotopi tuzilishining AG epitopi (RAsm) tuzilishiga to'g'ri kelish darajasi, buning hisobiga AG-AT birikmasining mustahkamligi (avidligi) ta'minlanadi. **Avidlik (lot. Aviditos – ochko'zlik)** – paratop va epitop orasidagi bog'ning mustahkamligi. Bog'ning kuchi antitelalarning yuqori affinligi bilan belgilanadi.

Ma'lumki, viruslar ham boshqa antigenlar kabi turli antigen determinantlarni o'z oqsil qavatida saqlaydi. Ularni hayvon organizmiga kiritilsa, ularga qarshi hayvon qonida maxsus antitelalar hosil bo'ladi. Hayvonlarga bakteriya yoki virus yuqtirilganda antitelalarning hosil bo'lishi hayvon organizmining yuqumlilikka qarshi kurashish usullaridan biridir. Hayvon organizmi nafaqat, boshlang'ich kasallik qo'zg'atuvchiga javoban, balki ushbu organizmga yot bo'lgan boshqa ko'pgina xilma-xil moddalar uchun ham antitelalar hosil qiladi. Xuddi shunday xususiyatga virusdan ajratib olingan uning oqsil qismi ham egadir. Ularda boshqa oqsillarda bo'lmagan xususiyatlar mavjuddir, ya'ni ular o'z antigenlari bilan spetsifik munosabatda bo'lishi mumkin. Sun'iy ravishda hayvonlarni immunizatsiya qilinganda hosil bo'lgan antitelalar immunoglobulinlar sinfiga kiradi va ular immunologik diagnostika usullarida katta ahamiyatga egadir.

Antitelalarni – ya'ni immunoglobulinlarning kimyoviy tuzilishi, funksiyalari juda mukammal o'rganilgan. Immunoglobulin molekulasi 1972-yilda R.R.Porter va D.M. Edelman tomonidan aniqlangan bo'lib, u N (ingl. heavy – og'ir) deb atalgan ikki og'ir zanjir (molekulyar massasi 53kD) va L (ingl. light – yengil) deb nomlangan ikki yengil zanjirdan (molekulyar massasi 23kD) tuzilgan.

Ular o'zaro kovalent birikkan disulfid ko'priklari bilan bog'lanib, **to'rt zanjirli polipeptid kompleksini** tashkil etadi. N zanjirlar S qismda molekulaning egiluvchanligini ta'minlovchi

sharnir (“oshiq-moshiq”) hosil qilib birikadi. Har bir polipeptid zanjir V o‘zgaruvchan (ingl. variable-o‘zgaruvchan) va S o‘zgarmas (ingl. constant – doimiy) qismlardan iborat. Yengil va og‘ir zanjirlarning karboksil oxirlari (S-oxirlari) **konstant** deb atalib, bir sinf antitelalarda identikdir. Ikki og‘ir zanjirlar S-oxirlari yarmida hosil bo‘lgan immunoglobulin molekulari hududi **Fc-uchastka** deyiladi. Xilma-xil spetsifiklikka ega antitelalarda yengil va og‘ir zanjirlari aminoguruh (N-oxirlari) uchastkalari aminokislota ketma-ketliklari turlicha bo‘ladi (15-rasm).



15-rasm. Immunoglobulin molekulasining tuzilishi

Yengil va og‘ir zanjirlar **variabel** uchastkalari o‘zaro 15-rasmda keltirilganidek, Antitela molekulasida antigen bog‘lovchi markazlar hosil qilib ta’sirlashadi. Antitelaning **valentligi** molekuladagi identik antigen **bog‘lovchi markazlar** soniga ko‘ra

aniqlanadi. Antitelalarning aktiv markazlari affinligi – uning antigen determinantasi bilan mustahkam bog‘lanishini ko‘rsatadi. **Avidlik** termini polivalent antiteloning **polideterminant** AG bilan o‘zaro ta‘sirini umumiy kuchini ta‘riflashda ishlatiladi.

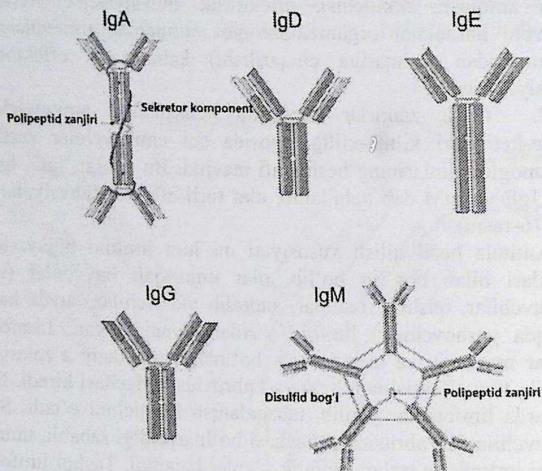
1. Variabel va konstanta uchastkalar antitelaning ikki xilma-xil funksiyasiga mas‘ul: birinchisi – antitela birikadigan joyni aniqlash; ikkinchisi, effektorlik funksiyasiga. Aylanib yuruvchi antitelalar organizmdan yot antigenlar eliminatsiyasi (organizmdan tashqariga chiqarilishi) kabi qator effektorlik funksiyalariga ega.

2. Og‘ir zanjirlar konstanta uchastkalari aminokislota ketma-ketliklari xilma-xilligi asosida sut emizuvchilar zardob immunoglobulinlarining besh sinfi mavjud. Bu sinflar, IgG, IgA, IgD, IgE va IgM deb belgilanib, ular turli effektor funksiyalarga ega (16-rasm).

Antitela hosil qilish xususiyati ma‘lum limfoid hujayralari xossalari bilan bog‘liq bo‘lib, ular umurtqali hayvonlar (sut emizuvchilar, qushlar, baliqlar, sudralib yuruvchilar, suvda ham quruqda yashovchilar) limfoid a‘zolarida aniqlangan. Limfoid a‘zolar markaziy va tashqi turga bo‘linadi: markaziy a‘zolariga ko‘mik, timus (ayrisimon bez) va Fabritsius xaltachasi kiradi. Bu a‘zolarida limfotsitlar yetilib, tabaqalanish bosqichini o‘tadi. Sut emizuvchilarda Fabritsius xaltachasi bo‘lmaganligi sababli, uning o‘rnini ko‘mik va tashqi limfatik a‘zolar bajaradi. Tashqi limfoid a‘zolariga taloq, limfa tugunlari, murtak bezi, ko‘richak, qon, ichak (Peyyer pilakchalari) va bronxlardagi limfatik follikulalar kiradi. Lekin ba‘zi umurtqasiz hayvonlarda ham yuborilgan antigen bilan qandaydir darajada ta‘sirlashadigan moddalar hosil bo‘lishi mumkin. Tashqi a‘zolarida limfotsitlar antigen bilan reaksiyaga kirishgandan so‘ng maxsus immun javob rivojlanadi.

Antitela hosil bo‘lish joyi ma‘lum darajada AG yuborilish usuliga bog‘liq. Qorin terisi yoki muskul orasiga AG yuborilganda antitelalarning katta qismi AG ushlanib qoladigan limfa tomirlarida hosil bo‘ladi. Vena tomiriga AG yuborilganda antitelalar asosan qora taloq, jigar, suyak iligi va o‘pkada hosil bo‘ladi. antitelalarning hosil bo‘lish jarayonida fagotsitar

(boshlang'ich fazada) va limfoid (oxirgi fazada) tipidagi hujayralar ishtirok etadi. Antitelalarning xususiyatlaridan biri, bu ularning maxsusligi bo'lib, ular faqat qaysi AGga qarshi hosil bo'lgan bo'lsa, shu AG bilan ta'sirlashadi, yoki ularning kimyoviy munosabati gomologik AGga juda yaqin bo'lgan moddalar bilan ta'sirlashishi mumkin.



**16-rasm. Turli immunoglobulinlarning submolekulyar strukturalari.**

Ma'lumki, qon zardobi – bu murakkab tarkibli biologik suyuqlik. Uning tarkibida juda ko'p xilma-xil anorganik birikmalar, ko'p sonli murakkab organik birikmalar – oqsillar, albuminlar, globulinlar va boshqa azottutuvchi birikmalar mavjud. Uning asosiy tarkibini albuminlar va globulinlar tashkil etadi. Antitela tutuvchi zardob AZ bo'lib, uning sifati hosil bo'lgan antitelalar miqdori va virus AG tuzilishiga bog'liq.

Tarkibida antitelalar miqdori kam bo'lgan AZlar dastlab tarkibida yuqori miqdor ATlar mavjud AZga nisbatan o'z

faolligini tez yo'qotadi. Boudenning ta'kidlashicha, sharsimon shaklli viruslarga qarshi AZlarning titri tayoqchasimon shaklli viruslarga nisbatan tez pasayadi. Yuqori titrli AZolish uchun hayvonlarni immunizatsiya qilish ratsional sxemasi katta ahamiyatga ega. Shuning uchun amaliyotda odatda quyonlardan foydalaniladi. Ular yuqori titrli antitelalar hosil qilishi bilan o'simlik viruslariga faol ta'sir ko'rsatadi.

Immunoglobulinlar o'zlariga xos bo'lgan, alohida genlarda sintezlanadilar. DNK strukturasi immunoglobulinlarni doimiy va variabel uchastkalar haqida ma'lumot yozilgan gen uchastkalari bo'ladi. Ushbu gen uchastkalari bir necha tur antitelalar hosil qilishga javobgar hisoblanadi. Hujayra darajasida immunoglobulinlarning hosil bo'lishi uch turdagi hujayralarni kelishilgan ishtirokida kechadi, ya'ni T – limfotsitlar B – limfotsitlar va makrofaglar. Makrofaglar komplement sistemasi uchun retseptorlarga ega hujayra hisoblanadi. Organizmga tushgan antigen spetsifik kompleks ko'rinishida T hujayraga va makrofagga yoki faqat makrofagga bog'lanadi. Makrofag antigenni antitelalar sintezini stimullaydigan immunogenga aylantiradi. Makrofagni antigen bilan bog'lanishi B-limfotsitlarni ko'payishiga ham sabab bo'ladi. B- limfotsitlar antitelalarni sintezini boshlash uchun, plazmatik hujayralarga aylanadi va o'ziga xos antitelalarni sintezlay boshlaydi.

**Antitelalar faol markazi va uning roli.** Antitelalar molekulari orasidagi ingichka bo'shliq antigen bog'lovchi maydonni hosil qiladi. Faol markazda gipervariabel' yuqori darajada o'zgaruvchanlikka ega uchastka sigmentlari joylashgan bo'ladi. Aminokislota ketma-ketligi bilan farqlanadigan antigen bog'lovchi uchastka antigen determinantini komplementar o'zaro ta'sirini ham ta'minlaydi. Bu o'rinda shuni aytib o'tish lozimki, bitta polisseptid zanjiridan hosil bo'ladigan fermentlarning aktiv markazidan farqi o'laroq, antitelalarda kombinatsion xilma-xillikni ta'minlaydigan ikkita zanjir ishtirok etadi. Buning natijasida ularda yangi xususiyatlar vujudga kelib, ular polispetifik hisoblanadi, ya'ni birgina antitela molekulasini, bir qator antigenlar to'plamiga komplementar bo'lishi mumkin.

Bunday holatda, antitela o'xshash tuzilishga ega antigen determinantlari hamda umuman boshqa strukturaga ega determinant bilan ham birikishi mumkin.

### Nazorat savollari

1. Antigen nima, qanday molekular antigen bo'lishi mumkin?
2. Antitelalar strukturasi va funksiyasi?
3. Antigen va antitana o'rtasidagi spetsifik bog'lanishni tushuntiring.
4. Antigen determinantlari deganda nimani tushunasiz?
5. Antitelalar domenlari nima va ular qanday funksiyani bajaradi?
6. Antitelalarda "Sharnir" qismning funksiyasi va roli nimada?

### Test savollari

1. **Antigenlar tabiatan qanday moddalar hisoblanadi?**
  - A) oqsil tabiatli moddalar
  - B) past molekularli moddalar
  - C) glikoproteidlar
  - \*D) organizm uchun genetik jihatdan yot bo'lgan moddalar.
2. **Antigen determinantasiya nechta aminokislota qoldig'idan iborat bo'ladi?**
  - A) 3-18
  - \*B) 5-20
  - C) 7-15
  - D) 4-20
3. **Organizmda antitanalar qanday asosiy funksiyani bajaradi?**
  - \*A) Organizmdagi yot moddani tanish, unga spetsifik bog'lanish, biologik faol moddalar yordamida lizis qilish,
  - B) Yot moddaga bog'lanish, uni yo'q qilish, blokirlash,
  - C) Yot moddani yo'q qilish, kerakli hujayralarni faollash, faol moddalarni stimullash
  - D) faol moddalarni stimullash, interferon ishlab chiqarish, yot moddani yo'q qilish

**4. Antigen yoki antitelalarning serologik faolligi qanday birlik bilan izohlanadi?**

- A) mol
- \*B) titr
- C) mikrolitr
- D) yed/g

**5. Qanday moddalar antigenlik xususiyatini namoyon etadi?**

- A) oqsillar, immunoglobulinlar
- B) nuklein kislotalar, viruslar
- C) bakteriyalar, polisaxaridlar
- \*D) barcha javoblar to'g'ri.

**6. Antitelalar qaysi immunologik organda sintezlanadi?**

- A) limfa tugunlarida
- B) qon plazmasida
- C) qonning globulyar fraksiyasida
- \*D) birlamchi limfoid organda

**7. Antitelalarning qanday sinflari mavjud?**

- A) Ig A, Ig B, Ig D, Ig F, Ig C
- \*B) Ig A, Ig M, Ig G, Ig E, Ig D
- C) Ig D, Ig G, Ig C, Ig T, Ig H
- D) Ig F, Ig E, Ig T, Ig P, Ig K

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Antigen-antitelalarni o'zaro bog'lanish qonuniyatlari.
2. Antitelalar sintezida B- limfotsitlarning roli va funksiyasi.
3. Monoklonal antitelalar texnologiyasi.
4. Turli kasalliklarni aniqlashda zamonaviy diagnostik usullarining ishlatilishi.

### **5.2. Immunoferment tahlil usullari**

Immunoenzim tahlili (IET) 60-yillarning o'rtalarida vujudga kelib, avval, gistologik preparatda antigenni identifikatsiyalash, keyin esa immunodiffuziya va immunoэлектроforez testlarida pretsipitatsiya chiziqlarini aniqlashda qo'llanilgan. Bundan tashqari biologik suyuqliklarda antigenlar va antitelalarni

Bunday holatda, antitela o'xshash tuzilishga ega antigen determinantlari hamda umuman boshqa strukturaga ega determinant bilan ham birikishi mumkin.

### Nazorat savollari

1. Antigen nima, qanday molekular antigen bo'lishi mumkin?
2. Antitelalar strukturasi va funksiyasi?
3. Antigen va antitana o'rtasidagi spetsifik bog'lanishni tushuntiring.
4. Antigen determinantlari deganda nimani tushunasiz?
5. Antitelalar domenlari nima va ular qanday funksiyani bajaradi?
6. Antitelalarda "Sharnir" qismning funksiyasi va roli nimada?

### Test savollari

1. **Antigenlar tabiatan qanday moddalar hisoblanadi?**
  - A) oqsil tabiatli moddalar
  - B) past molekularli moddalar
  - C) glikoproteidlar
  - \*D) organizm uchun genetik jihatdan yot bo'lgan moddalar.
2. **Antigen determinantasiya nechta aminokislota qoldig'idan iborat bo'ladi?**
  - A) 3-18
  - \*B) 5-20
  - C) 7-15
  - D) 4-20
3. **Organizmda antitanalar qanday asosiy funksiyani bajaradi?**
  - \*A) Organizmdagi yot moddani tanish, unga spetsifik bog'lanish, biologik faol moddalar yordamida lizis qilish,
  - B) Yot moddaga bog'lanish, uni yo'q qilish, blokirlash,
  - C) Yot moddani yo'q qilish, kerakli hujayralarni faollash, faol moddalarni stimullash
  - D) faol moddalarni stimullash, interferon ishlab chiqarish, yot moddani yo'q qilish

**4. Antigen yoki antitelalarning serologik faolligi qanday birlik bilan izohlanadi?**

- A) mol
- \*B) titr
- C) mikrolitr
- D) yed/g

**5. Qanday moddalar antigenlik xususiyatini namoyon etadi?**

- A) oqsillar, immunoglobulinlar
- B) nuklein kislotalar, viruslar
- C) bakteriyalar, polisaxaridlar
- \*D) barcha javoblar to'g'ri.

**6. Antitelalar qaysi immunologik organda sintezlanadi?**

- A) limfa tugunlarida
- B) qon plazmasida
- C) qonning globulyar fraksiyasida
- \*D) birlamchi limfoid organda

**7. Antitelalarning qanday sinflari mavjud?**

- A) Ig A, Ig B, Ig D, Ig F, Ig C
- \*B) Ig A, Ig M, Ig G, Ig E, Ig D
- C) Ig D, Ig G, Ig C, Ig T, Ig H
- D) Ig F, Ig E, Ig T, Ig P, Ig K

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Antigen-antitelalarni o'zaro bog'lanish qonuniyatlari.
2. Antitelalar sintezida B- limfotsitlarning roli va funksiyasi.
3. Monoklonal antitelalar texnologiyasi.
4. Turli kasalliklarni aniqlashda zamonaviy diagnostik usullarining ishlatilishi.

### **5.2. Immunoferment tahlil usullari**

Immunoenzim tahlili (IET) 60-yillarning o'rtalarida vujudga kelib, avval, gistologik preparatda antigenni identifikatsiyalash, keyin esa immunodiffuziya va immunoэлектроforez testlarida pretsipitatsiya chiziqlarini aniqlashda qo'llanilgan. Bundan tashqari biologik suyuqliklarda antigenlar va antitelalarni

miqdoriy tahlili uchun ishlatila boshlangan. Metodni geterogen usulini ishlab chiqishda Y.Engvall va R.Perlmann, shuningdek, ularga bog'liq bo'lmagan ravishda V.K. Van Veyemen va A.Shuurslar 1971-yili o'z tadqiqot ishlarini olib borganlar va ushbu usulning muallifi hisoblanadilar.

1972-yili esa Y.K. Rubenshteyn o'z shogirdlari bilan IET gomogen usulini ishlab chiqishga muvaffaq bo'lganlar. Ushbu IET lari usullarini ishlab chiqqan mualliflar aynan, o'z tadqiqot ishlarida va shuningdek, amaliyotda IET talablariga javob bera oladigan ferment molekulalarini va ularning kofaktorlarini nishon sifatida qo'llab, konyugat olish mumkinligini isbotlaganlar. Sababi yuqorida aytib o'tilganidek, fermentlar o'z substratlari ishtirokida kimyoviy reaksiyani I06-1012 marotaba tezlashtirar ekanlar, shu bilan birga ular antigen va antitelalar o'rtasida bo'ladigan immunokimyoviy jarayonlarning sezgiriligini ham bir necha bor oshirib, aniqlanishi kerak bo'lgan modda miqdorini (pkM) juda kichkina qiymatlarda aniqlash uchun kerakli fermentativ reaksiya turini katalizlash imkoniyatga ega moddalar hisoblanadilar. Shuning uchun immunokimyoviy reaksiyalarda, faqat ferment molekulalari emas, balki ularning kofaktorlari ham maxsus markerlar sifatida IETning turli usullarida keng qo'llanilmoqda.

Hozirgi vaqtda immunoenzim tahlili usulining xilma-xil turlari ishlab chiqilgan. IET turli xil moddalarni aniqlash uchun keng qo'llaniladi. Jumladan, dorivor preparatlarni, gormonlarni, antitelalarni, virus va bakterial antigenlarni, oziq-ovqat toksinlarini, fitotoksinlarni, narkotik moddalarni hamda sifiliz, malyariya taksoplazmoz, alveokok, qizilcha va gelmintlarni, salmonellezni va kasallik tug'diruvchi mikroorganizmlarni diagnostika qilishda keng qo'llaniladi. Modomiki, IET antitelalarni aniqlashda ham qo'llanilar ekan, bu esa o'z navbatida ko'p kasalliklarning boshlanish bosqichida oldini olish va serodiagnostika qilish imkoniyatini yaratadi.

IETning asosiy mohiyati shundan iboratki, biokatalizator molekulasi reaksiya ketadigan zonada antigen bilan yoki antitela bilan bog'langan shaklda bo'lishidir. Antigen yoki antitelaning

ferment molekulasida bilan bog'langan shakli konyugat deb yuritiladi. IETni o'tkazish vaqtida antigen antitana molekulasida bilan bog'langandan so'ng, ushbu kompleksni aniqlash uchun, fermentning substrati kiritiladi va reaksiya natijasida hosil bo'ladigan mahsulotlar aniqlanadi.

Shuni aytib o'tish lozimki, IETda fermentativ reaksiyani deteksiya qilish hosil bo'lgan mahsulotni aniqlash bilan chegaralanmay, balki reaksiyasi natijasida rangli o'zgarish, issiqlik ajralish yoki yutilish, flyuretsensiya, paramagnit xususiyatlarni yoki boshqa fizik-kimyoviy parametrlarni o'zgarishi natijasida aniqlashni amalga oshirish mumkin.

IETning qaysi usuli amalga oshmasin unda albatta nishon sifatida ferment molekulari ishlatiladi. Shu sababdan avvalo antigen yoki antitela konyugati sintezlanadi. Buning uchun antigenga nisbatan aniq spetsifik bo'lgan antitela tikuvchi komponent bilan modifikatsiyalanadi – ya'ni antitela ferment molekulasiga kimyoviy (kovalent) bog'lanadi. Kimyoviy sintezlangan konyugatlarning fermentativ va serologik faolliklari aniqlanadi. Konyugatlar tahlilni o'tkazish uchun yaroqli bo'lsa, nihoyat so'nggi bosqichda IET o'tkaziladi. Olingan ma'lumotlar kerakli asboblar yordamida tahlil qilinadi. Bu o'rinda shuni qayd etish lozimki, immunoenzim tahlilini o'tkazishda bir qancha qoidalarga rioya qilish talab etiladi.

Immunoenzim tahlilini ishlab chiqishda, yaratishda bir qator qoidalarga rioya qilish kerak. Birinchidan, aniqlanayotgan moddani, ya'ni antigenni tahlil qilishda yuqori darajada mos keladigan, unga o'ta spetsifik bo'lgan antitanalarni tanlab olish talab etiladi. Ikkinchidan – shunday fermentni nishon sifatida ishlatish uchun tanlab olish kerakki, u antigen yoki antitana bilan shuningdek, tashuvchi bilan kimyoviy usulda bog'langanda ham, o'z xususiyatini o'zgartirmasligi va bir vaqtning o'zida antigen va antitana o'rtasida kechadigan immunologik reaksiyaga ta'sir qilmasligi va ayniqsa, fermentativ faolligini saqlab qolishi kerak. Uchinchidan IETni o'tkazishda qo'llaniladigan reagentlar va asbob-uskunalar, shuningdek, immun komponentlarni immobillash uchun ishlatiladigan tashuvchilar har tomonlama

qulay va iqtisodiy jihatdan talabga javob beradigan bo'lishi lozim. Nihoyat ahamiyatli omillardan yana biri IETda komponentlarni barqarorligini ta'minlash muhimdir. Bunda yuqori barqarorlikka ega bo'lgan komponentlarni olish uchun tikuvchi agentlar yordamida tashuvchilarga immobillash jarayonini amalga oshirish yordamida erishish mumkin. Bu o'rinda shuni aytib o'tish lozimki, immunoenzim tahlilini, asosan ikkita katta usulga ajratish mumkin: geterogen va gomogen usullarga.

**IETning gomogen usulida (GIET)** – immunoenzim tahlilining sodda usuli hisoblanadi, bunda barcha jarayonlar suyuq muhitda, ya'ni qattiq tashuvchi ishtirok etmagan sharoitda olib boriladi. Ushbu usulda immun reaksiyaning komponentlaridan biri (odatda bu quyi molekulyar **antigen**) **ferment bilan nishonlanadi**. Shundan so'ng, antigen-antitana kompleksi shakllanadi. Jarayon bosqichlarida ferment faolligining o'zgarishi kuzatiladi. IETning geterogen usuli qattiq tashuvchi ishtirokida olib boriladi Bunda immun kompleks tashuvchiga immobillangan antitana yoki antigen va ferment bilan nishonlangan antitana yoki antigen bilan immun kompleks hosil qiladi va immun reaksiya amalga oshgandan so'ng, fermentativ faollikni o'lchash orqali antigen miqdori kalibrovka chizig'i yordamida aniqlanadi.

IETda konyugatlarni sintez qilishda tahlil uchun har tomonlama mos fermentlardan foydalaniladi. Bunda nishon sifatida qo'llanilishi mumkin bo'lgan fermentlar eritma tarkibida o'zining faolligini namoyon qilishi kerak. Sababi, fermentning fermentativ faolligi qancha yuqori bo'lsa, sezgirlik ham shuncha oshadi. Shu sababdan, IETda nishon sifatida qo'llaniladigan fermentlarga quyidagi talablar qo'yiladi:

1) kichik konsentratsiyadagi molekullarni aniqlash uchun qo'llaniladigan ferment yuqori spetsifiklikka va fermentativ faollikka ega bo'lishi kerak;

2) nishon sifatida qo'llaniladigan fermentlar kimyoviy modifikatsiyadan so'ng, yuqori fermentativ faollikka ega bo'lishi kerak;

3) fermentlar antigen va antitanalar ta'sirida, shuningdek, ular bilan kimyoviy bog' hosil qilganlarida ham, o'z barqarorliklarini yo'qotmasligi zarur;

4) ferment faolligini aniqlash usuli sodda va yuqori sezuvchanlik darajasiga ega bo'lgan usul bo'lishi kerak;

5) ferment preparati rangli mahsulot berishi kerak. Sababi IFAni miqdor, sifat jihatdan tahlil qilish mumkin.

IFAda 15 xildan kam bo'lmagan fermentlar ishlatilishi mumkin. Yuqorida aytib o'tilgan talablarga javob bera oladigan va ko'p qo'llaniladigan ferment – xren peroksidazasi, ishqoriy fosfotaza va v-D-galaktozidaza. Mana shu uchta ferment barqaror bo'lib, yuqori sezuvchanlikka ega bo'lgan reaksiyalar katalizlaydi. Bundan tashqari, shu fermentlar bilan katalizlanadigan reaksiyalar natijasida olinadigan mahsulotlar ishlatilayotgan substratga qarab nafaqat kolorimetrik metodlar, balki flyuoresent metodlar bilan ham aniqlanishi mumkin. Boshqa fermentlar nisbatan kam ishlatiladi. Bu esa ularning xren peroksidazasi va ishqoriy fosfotazaga nisbatan ancha past solishtirma faolligi bilan tushuntiriladi.

**Substratlar.** Substratni tanlash birinchi navbatda nishon sifatida ishlatilayotgan ferment bilan belgilanadi, chunki ferment-substrat reaksiyasi yuqori spetsifikdir. Substrat sifatida ishlatiladigan moddalarga quyidagilar kiradi: O-fenilendiamin-gidroxlorid, 5-aminosalitsil kislotasi, R-nitrofenilfosfat, 5-brom 4-xlor 3-indolilfosfat va hokazo.

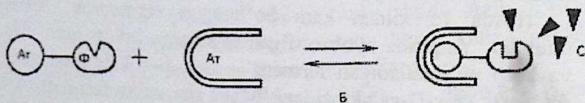
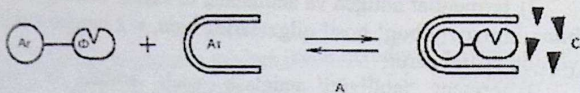
Substratga asosiy talablar:

fermentni konyugatda aniqlashda metodni yuqori sezgirligini ta'minlash;

ferment-substrat reaksiyasining aniq ko'rinadigan (masalan, bo'yalgan) mahsulotlarini hosil bo'lishi (18-rasm);

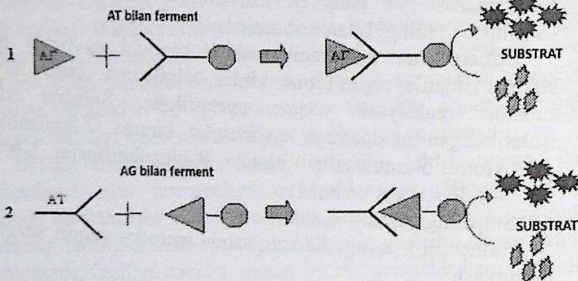
substrat xavfsiz, arzon va ishlatish uchun qulay bo'lishi kerak.

Hozirgi kunda qo'llaniladigan immunoenzim tahlili metodlarining umumiy ko'rinishini sxematik ravishda quyidagicha izohlash mumkin:

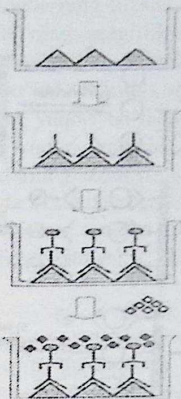
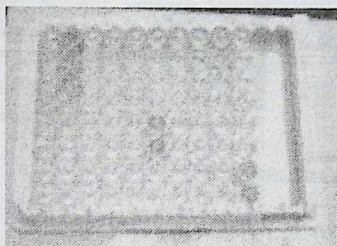


**17-rasm. A- AG va ATning o‘zaro ta‘sirida ferment (F) va substrat (S)ni fazoviy to‘siqlar hisobiga ajralish effekti; B- antigen-antitana kompleksini shakllanishida ferment konformatsiyasini o‘zgarish effekti.**

**Immunoenzim tahlilining asosiy prinsipi quyidagicha:**



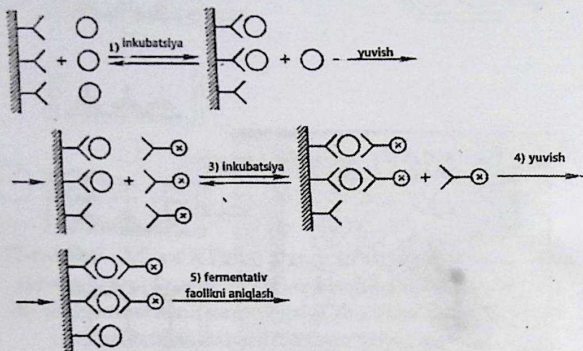
**1-AGlarni aniqlash**  
**2- ATlarni aniqlash**



**18-rasm. IFA natijasi. Chuqurchadagi sariq rang eritmasi ijobiy natija hisoblanadi.**

Antitelalar immobillangan tashuvchiga antigenli suyuqlik solinadi. Inkubatsiya jarayonida AG-AT kompleksi hosil bo'ladi. Keyin tashuvchi bog'lanmagan komponentlardan yuvilib, ferment bn nishonlangan antitela solinadi. 2-inkubatsiyadan so'ng fermentli antitela konyugatining ortiqchasi yuvilib, fermentativ faollik o'lchanadi. Antigen immobillangan va nishonlangan AT lar molekulari o'rtasida siqilib qolgani uchun "Sendvich" usuli deb nomlanadi (19-rasm).

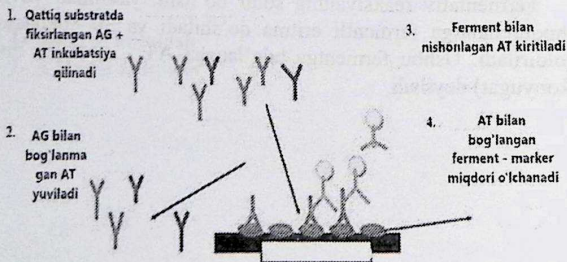
Fermentativ reaksiyaning sodir bo'lishi: yaxshilab yuvilgan chuqurchalarga fermentli eritma qo'shiladi va 30-60 daqiqaga qoldiriladi. Ushbu fermentga bog'langan AT - spetsifik nishon (konyugat) deyiladi.



**19-rasm. Nishonlangan AT va immobillangan ATlar yordamida AGni aniqlash (Sendvich usuli – raqobatsiz).**

Ferment reaksiyasini olib borishi natijasida, ushbu maxsus nishon (substrat) bog'langan modda (mahsulot)ga aylanadi. Qo'shilgan maxsus nishon antitanalar bilan bog'lanishi sababli bog'langan mahsulot reaksiyasini konsentratsiyasi antitana konsentratsiyasiga teng bo'ladi.

#### Qattiq fazali IFA bevosita usuli



IETni o'tkazishda immun komponentlarning tozalik darajasi muhim ahamiyatga egadir. Sababi IETning sezgirlik darajasi komponentlarga va ayniqsa unda nishon sifatida qo'llanilayotgan ferment molekulasi faolligiga bog'liq bo'ladi. Antitela serologik jihatdan faol va antigenga nisbatan titri yuqori bo'lishi uchun antigenning immunogenlik xususiyati yuqori bo'lishi bo'lishi kerak. Shunda antigen kerakli antitelalarning uzluksiz sintezini amalga oshirishga qodir bo'ladi. IETda ishlatilayotgan immun komponentlarning titri yuqori bo'lmasa, ushbu eqsillar modifikatsiyadan so'ng denaturatsiyalanishi hisobiga inaktivlanadi.

### Nazorat savollari

1. Immunoenzim tahlilida qanday usullar mavjud?
2. IETda qo'llaniladigan tashuvchi qanday talablarga javob berishi kerak?
3. IETning gomogen usuli birinchi bo'lib kim tomonidan ishlab chiqilgan va u qanday amalga oshiriladi?
4. IETning geterogen usuli birinchi bo'lib kim tomonidan ishlab chiqilgan va u qanday amalga oshiriladi?
5. Immunoenzim tahlilida nishon sifatida qo'llaniladigan fermentlar qanday talablarga javob berishi kerak?
6. Qanday moddalar immunokonyugatlar deb nomlanadi va ular qanday maqsadda qo'llaniladi?

### Test savollari

**1. IFAda nishon sifatida qo'llaniladigan fermentlarga qanday talablar qo'yiladi?**

- A) yuqori spetsifiklik, solishtirma faollik
- B) ferment barqarorligi, ferment konsentratsiyasini aniqlash usuli sodda va yuqori sezuvchanlikka ega bo'lishi
- C) antigen va antitela o'zaro ta'sirida ularni o'z barqarorligini yo'qotmasligi, fermentativ va serologik faollik
- \*D) barcha javoblar to'g'ri

**2. IFAda ferment-nishoni sifatida eng ko'p ishlatiladigan fermentni ko'rsating.**

\*A) peroksidaza

B) esteraza

C) papain

D) katalaza

**3. Konyugat qanday sintez qilinadi?**

A)\* antitana yoki antigen bilan ferment molekulasini ma'lum kimyoviy modda yordamida modifikatsiya qilish yo'li bilan

B) ferment preparatlari har tomonlama talabga javob berishi va kimyoviy modifikatsiyaga uchratish yo'li bilan

C) antigen va antitanalarning bog'lanish konstantasi aniqlanib va antitanalarning geterogenligini aniqlash yo'li bilan

D) antitanalarning solishtirma faolliklari aniqlanib, tikuvchi modda ta'sirida modifikatsiyalab

**4. Konyugat sintezining biokimyoviy usulida ferment va antitana qaysi guruhlar yordamida tikiladi?**

\*A) NH<sub>2</sub>, COOH, OH-, SH-guruhlari

B) SO, RO<sub>4</sub>, Cl, SOON

C) NH<sub>2</sub>, COOH, OH-, SH- va glyukooksidaza

D) biotin-avidin, RO<sub>4</sub>

**5. Immunoferment analizining geterogen usuli qachon va kim tomonidan ishlab chiqilgan?**

A)\*1971–1972-y. Veyemen

B) 1983-y. Rubeynshteyn

C) 1975–1977 y. R Erlix

D)1980-y. Karl Ereki

**6. Immunoglobulinlar qanday moddalar sinfiga kiradi?**

\*A) Glikoproteidlar

B) Proteidlar

C) Uglevodlar

D) Oligosaxaridlar

**7. IETning asosiy prinsiplarini ko'rsating.**

A) Sendvich, titrlash

B) Raqobatlashish, ekranlashtirish

C) Geterogen, sendvich

D) A va B javoblar to'g'ri

**8. Gomogen IETda nishon sifatida qo'llaniladigan fermentlarni aniqlang.**

A) Lizotsim, malatdegidrogenaza, atsetilxolinesteraza, D-galaktozidaza

B) Fosfolipaza, amilaza, atsetilxolinesteraza, esteraza,

\*C) Ureaza, malatdegidrogenaza, peroksidaza, ishqoriy fosfataza

D) Katalaza, atsetilxolinesteraza, D- galaktozidaza, lipaza

**9. IETning geterogen usulida ishlatiladigan tashuvchilar qanday nomlanadi?**

\*A) Organik, anorganik

B) Organik, analitik

V) Mexanik, anorganik

G) Statistik, sintetik

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Immunoenzim tahlilining mohiyati va uning qo'llanish sohalari.

2. Immunoenzim tahlilida nishon sifatida qo'llaniladigan fermentlar.

3. Poliklonal va monoklonal antitelalar olish.

4. O'simlik viruslariga qarshi antitelalar olish usullari.

## VI BOB. FERMENTLAR YORDAMIDA ORGANIK MODDALAR OLISH. BIOSENSORLAR VA ULARNING AHAMIYATI, QO'LLANILISHI

### 6.1. Fermentlar yordamida organik kislotalarning olinishi

Organik kislotalarni olishda aniq biotexnologik jarayonni ko'rib chiqishdan avval, „bijg'ish“ terminiga anaerob sharoitda faqat sut va propion kislotalari mos bakteriyalar orqali hosil qilishni kuzatamiz. Chunki, limon, glukon va boshqa organik kislotalarining mikromitsetlar bilan biosintezi turli oksidlanish (aerobli) jarayonida ketadi. Shuning uchun ularni bijg'ish jarayoniga kiritish shartli ravishdadir.

Sut kislota ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ) tabiiy sharoitda sut va sut mahsulotlarining laktobakteriya bilan bijg'ishi natijasida hosil bo'ladi. Yana ishlab chiqish sharoitida maqsadga muvofiq ravishda olinadi. Nordon sut bakteriyalari to'rtta naslga mansub: *Lactobacillus*, *Seoconostoc*, *Streptococcus* va *Pedicoccus*. *Lactobacillus* nasli uchta guruhga bo'linadi: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* va *Betabacterium*. Birinchi guruh vakillari  $15^{\circ}\text{C}$  da o'smaydi, ammo  $50^{\circ}\text{C}$  dan yuqori haroratgacha bardosh beradi. Betabakteriyalar glukozadan DL – sut kislotani hosil qiladi, ulardan ayrimlari (termobakteriya, streptobakteriya, streptokoka va pedikoka) gomoferment hisoblanadi. Geksozani bijg'itib sut kislotani hosil qiladi.

Boshqalari (betabakteriya va leykonostok) – geteroferment bo'lib, sut va sirka kislota,  $\text{CO}_2$ , ayrim holda etanolni hosil qiladi. Nordon sut bakteriyalarni maltoza, glukozaga, laktoza, shakarli kraxmal va boshqalarda ishlatish mumkin. Umuman, laktobakteriyalar ozuqa muhitiga talabchan bo'ladi, ularga vitaminlar (13 guruhi), aminokislotalar, purin va pirimidin, alifatik qatoridagi organik kislotalar (sirka, limon, olein) kerak bo'ladi.

Glukoza va kraxmal gidrolizati uchun amaliyotga, odatda, *Lactobacillus delbruechii*, *L.Bulgaricus*, *L.leichmanii* (alohida, yoki o'zaro aralashma holda yoki *Streptococcus lactis* bilan) ishlatiladi. Maltozaning bijg'ishi uchun ayrim hollarda *L.casei*

ishlatiladi. Sanoatda sut kislotani ishlab chiqarish uchun, odatda, termofil gomof ferment turlari ishlatiladi. U 50<sup>0</sup>C da butun mahsulotni faol sintezlaydi. Bunday turga yuqori stabilli va faol kislota hosil qila oluvchi *L. delbrueckii* shtamm A-3 kiradi. Ishlatilayotgan shakar miqdoriga qarab sut kislotasining chiqishi 95–98 % ni tashkil etadi.

Bu usul 1923-yilda sanoatda V.N. Shaposhnikov rahbarligida qo'llangan. L (+) – sut kislotasini olish texnologik sxemas: quyidagi bosqichlardan iborat: undirilgan solod, 5–20 % shakar, achiq ekstrakti, vitaminlar, ammoniy fosfat tutgan melassli muhitga *L. delbrueckii* ekiladi. Bijg'ish 49–50<sup>0</sup> C da pH=6,3-6,5 da ketadi. Sut kislotaning chiqishiga qarab bo'r (mel) bilan tayyorlab turiladi. Fermentlanish jarayoni 5–10 kunda tugaydi, bunda hosil bo'lgan suyuqlik-78 da 11–14 % kalsiy laktat va 0,1–0,5 % saxaroza 80–90 g laktak 100 g saxarozadan hosil bo'ladi. Bakteriya hujayralari va bo'r filtrlab olinadi (chiqindi), filtrat 30 % konsentratsiyada bug'latiladi, 25<sup>0</sup>C gacha sovutilib kristallanadi.

Kristallanish jarayoni 1,5–2 sutkagacha davom etadi. Kalsiy laktat kristallari 60–70<sup>0</sup> S da sulfat kislota bilan qayta ishlanadi. Gips cho'kmaga tushadi, cho'kma ustidagi suyuqlikka 65<sup>0</sup>C da temir ionlarini yo'qotish uchun sariq qon tuzi qo'shiladi. So'ng og'ir metallarni yo'qotish uchun natriy sulfat qo'shiladi. Bo'yoq moddalar faollangan ko'mir yordamida yo'qotiladi. Keyin sut kislota eritmasi vakuum-bug'latkichda (800–920 kPa qoldiq bosim ostida) 50 % yoki 80 % gacha bug'latiladi. Oxirigacha tozalanmay qolgan sut kislota eritmasi texnik maqsadlarda foydalaniladi. Toza kislota uning murakkab metil efirlaridan haydab, qarama-qarshi oqimli nasadkali minoralarda oddiy izopropil efiri bilan ekstraksiyalab olinadi. *L. bulgaricus* yordamida sut zardobidan sut kislota olinadi. *L. brevis* hujayrasi bilan bijg'ish uchun jo'xori, somon va boshqa pentozli xomashyolar ishlatiladi.

XX asrning 80-yillari oxiriga kelib *Streptococcus*, *Thermobhilus* hujayrasi yordamida sut kislotasining olish texnologiyasi yaratildi. Bu jarayon uchun mavhum qaynovchi

yoki qo'zg'atuvchan qatlam prinsipida ishlovchi bioreaktorlar ishlatilib, bu qatlam orqali mikrosferalar aralashtiriladi. Pastki qismda ular substratni yuqorida sut kislotani sorbsiyalaydi. Natijada pH ni boshqarib ko'rishga hojat qolmaydi. Sistemaning mahsuldorligi - 12 g/l s<sub>1</sub> sut kislotasi bo'ladi.

Shu narsani unutmashlik kerakki, sut kislota ko'rinarli korroziyalovchi agent hisoblanadi va u tez polimerlanadi. Uning ko'pchilik tuzlari suvda yaxshi eriydi. Shuning uchun sut kislotasi oziq-ovqat, to'qimachilik, dori-darmon ishlab chiqarishda, erituvchilar va plastifikator olishda va hokazolarda keng ishlatiladi.

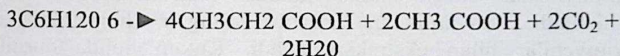
Gomo va geterofermentli nordon sut bakteriyalari ilgaridan non pishirishlarda qo'llanilib kelmoqda. Drojja bilan aralashmasidan shirin maza, g'ovaklik, rang va aynimaslik xossalarini beruvchi achitqilar olinadi. Bu narsa laktobakteriyalarning chirituvchi bakteriyaga, sirka va moy kislota bakteriyalariga, enterobakteriyaga antagonistik ta'siri bilan tushuntiriladi, faqat achitqidagi drojjaga emas.

Maxsus toza tayyorlangan achitqilar aralash – assotsiatsiyaga qaraganda boshqarilishi osondir. Siloslash va sabzavotlarni (karam, bodring), ho'l meva hamda mevalarni ko'pchitish asosida sutli bijg'ish yotadi. Bu jarayon ko'pchish obyektida bo'ladigan tabiiy mikroorganizmlar hisobiga boradi.

Oxirgi paytda jarayonni kutilgan natijalarga erishishi va sharoitni boshqarish maqsadida maxsus achitqilar ishlatilmoqda. Yog'sizlantirilgan va butun sutdan olinadigan pishloqlar sut kislota mahsulidir. Sut laktobakteriya va sut kislota ta'sirida chiriydi. Tvorog qismi zardobdan ajratib olinib, maxsus mikroorganizmlar bilan (pishloq turiga qarab) bir necha haftadan sakkiz oygacha (masalan, Cheddar“ pishlog'i) yetilish uchun saqlab qo'yiladi. Sutni chiritish yana yosh buzoq oshqozon fermenti – rennin yordamida yoki mikrobgga mansub rennin ishtirokida olib boriladi. Sut bakteriyalari turli dori preparatlari va profilaktik kompozitsiyalarga qo'shiladi: bifidum bakterin, bifikol, kolibakterin, laktobakterin. Birinchisi tirik quritilgan bifidobakteriyadan, ikkinchisi tirik bifidobakteriya (shtamm 1) va

ichak tayoqchalari (shtamm M-17), uchinchi – tirik ichak tayoqchalari (shtamm-17), to‘rtinchi liofil quritilgan laktobatsill (*L.fermenti* va *L.plantarum*)dan iborat. Chet elda vitamin A, D3 va E qo‘shimchalari bo‘lgan sut bakteriyadan iborat „Ferlak-5“w probiotik ishlab chiqiladi. Uni yemga bir million bakteriya hujayrasi hisobida aralashtiriladi. Bu probiotik cho‘chqa, buzoq va qushlar uchun tavsiya qilinadi.

**Propion kislotaning olinishi.** Propion kislotali bijg‘ish propion bakteriyalarga xos bo‘lib, glukoza uglerodga mo‘l bo‘lgan ozuqa muhitida o‘sadi. Uch molekula glukoza bijg‘ish natijasidan to‘rt molekula propion kislota, ikki molekula sirka kislota, ikki molekula CO<sub>2</sub> va ikki molekula suv hosil bo‘ladi:

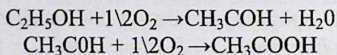


Amalda propion kislota hosil bo‘lish mexanizmi murakkabdir. Bunda piruvat, metil-malonil-KoA, propionil-KoA, suksinil-KoA, oksaloatsetat ishtirok etadi. Propion bakteriyalar gram musbat, sporasiz, harakatsiz tayoqchalari bo‘lib, „teri“ (*P.acnes*, *P.avidum*, *P.granulosum*) va „klassik“ (*P.freudenreichii*, *P.thoenii*, *P.jensenii*, *P.acidipropionici*) Propionibacteriaceae oilasiga mansub. „Teri“ bakteriyalar inson terisida va ayrim kavsh qaytaruvchi hayvonlar oshqozonida yashaydi. Ular aniq patologik jarayonlar sababchisi bo‘lishi mumkin (o‘sishi uchun optimal harorat 37<sup>0</sup>C). „Klassik“ bakteriyalar sut va sut mahsulotlarida bo‘ladi (optimum harorat 37<sup>0</sup>C). Anaerob, ammo katalazani, peroksidaza va superoksidismutaza (SOD)ni hosil qiladi. Ularning ayrimlari CO<sub>2</sub> molekular azotni bog‘laydi, elementar oltingugurtni utilizatsiyalaydi va B guruhi vitaminlari (biotin, pantotenat va tiaminga)ga ehtiyoji bor. CO<sub>2</sub> bilan bog Matib super oksid radikalini hosil qiladi, u SOD yordamida vodorod peroksidga aylanadi. Oxirgi mahsulot katalaza va peroksidaza ta‘sirida parchalanadi. Propion kislotani olishda turlari *P.freudenreichii* va *P.acidipro pionici* hisoblanadi. Propion kislota biosintezi oddiy

sharoitda olib boriladi. Masalan, (% da) uglerod – 1-2; ammoniy sulfat – 0,3; kaliy gidrofosfat – 0,2; kobaltxlorid – 0,0001; biotin – 0,00001; pantotenat – 0,1; tiamin – 0,01.

Jarayonni takomillashtirib, fiksatsiyali qatlamda immobillangan hujayralar ishtirokida olib borish sezilarli o'zgarishga olib keldi. Natijada *P.acidipropionici* qo'llanilganda D 0, 05 s-1 da 15 g/l gacha yalpi mahsulot olinadi. Biosintetik usulda olingan propion kislota neft mahsulotlaridan olinadigan propionat bilan raqobatlashishi mumkin, hatto afzallikka ham egadir. Chunki biosintetik propion kislota oziq-ovqat va dori-darmon ishlab chiqarishda konservant sifatida ishlatiladi.

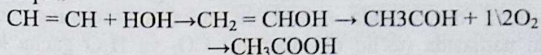
Fermentlanishning oxirgi mahsulotlarini (propionat va atsetat) ajratish shart emas. Chunki ikkalasi ham konservant sifatida ishlatiladi. Suyuqlikdan ajratib olingan hujayralar mos erituvchilar bilan ekstraksiyalanadi. Kukun holda quritilgan ekstrakt oziq-ovqat sanoatida antioksidant va vitaminli preparat sifatida ishlatiladi. Atsetobakteriyalar quyidagi sxema bo'yicha etanolni sirka kislotasigacha oksidlaydi:



Ayrim shtammlar porfirinlar saqlashi mumkin (to'qima biomassasi pushti rang hosil qiladi), yoki suvda eriydigan jigar rang pigment hosil qiladi. Ko'pgina atsetobakteriyalar ozuqa muhitida vitaminlarsiz rivojlanadi. Ularni sof holda sabzavotlarda, mevalarda, achigan meva sharbatlarida, sirkada va ayrim spirtli ichimliklarda uchratish mumkin. Uning tipik ko'rinishi – *Acetobacter aceti*.

Sirka (4-9%) kislotasini turli taomlarga ziravor sifatida, shuningdek, mayonez, gorchitsa, tuzlamalar, souslar tayyorlashda ishlatiladi. Shuning uchun oldin shakarli va mevali siroplardan, vino, buta mevalari va boshqa analoglardan taxminan drojgilarni etanolgacha bijg'itish yo'li bilan olingan sirka kislotasi yuqori sifatli ta'mi bilan ajralib turadi. Lekin hozirgi kunda sirka

kislotasining asosiy qismini atsetilendan sintez yo'li bilan olinmoqda:



Taxtani quruq haydash yo'li bilan sirka kislotasi hosil bo'ladi, bu yo'l bilan olingan kislotasi „muzli“ deb ataladi (77–80 % knts.). Muzli sirka kislotasini 10–20 marta suyultirib, oziq-ovqatda ishlatiladigan sirka kislotasini olish mumkin. Toza etalondan olingan sirka kislotasining sifati o'zgarmaydi. Meva sharbati, vino va boshqa mahsulotlardan olingan sirka kislotasi uzoq saqlash davomida sifati yaxshilanadi. Sirka bakteriyalari uglevodlardan to'g'ridan - to'g'ri sirka kislotasi hosil qilmaydi, chunki xomashyo spirtli bijg'ish jarayonidan o'tishi lozim. Sifatli sirka kislotasini olishning eng qadimgi texnologiyasi sekinlashtirilgan yoki orlean (fransuzcha) usuli hisoblanadi. Bu jarayonda xomashyo sifatida yengil uzum vinosi olinadi. Uni ustiga (2/5) oziq-ovqat solinadi. Aralashmaning ustki qismida atsetobakteriyalar plyonka hosil qiladi. Etanolning oksidlanishi tugagandan so'ng idishdan 10 % suyuqlik olinib, o'rniga shuncha miqdorda vino qo'shiladi. Jarayonni uzluksiz davom ettirish mumkin, bunda yangi vino solib va tayyor sirka kislotasini olib turish lozim.

Hozirgi kunda oziq-ovqat uchun sirka kislotasini 1832-yilda yo'lga qo'yilgan „generatorli“ usulda olinmoqda. Bu usulning maxsusligi shundaki, sirka bakteriyalarining ustki qismini maksimal darajada havo bilan ta'minlash va spirtni tezda sirka kislotasigacha oksidlanishidir. Bu texnologiyani uch seksiyali yog'och generatorlarda olib boriladi. Yuqoridagi seksiyada sepuvchi moslama o'rnatilgan bo'lib, u 3–10 % li etanolning suvdagi eritmasini sachratib turadi, o'rtadagi seksiyaga yig'gich o'rnatilgan, pastki seksiyada tayyor sirka kislotasi yig'iladi. Generatoridagi seksiyalar bir-biridan teshikli to'siqlar bilan ajratilgan. Havo pastki tomonidan berib turiladi va yuqoridan chiqib ketadi. Generatorlar resirkulatsion tipda bo'lishi ham

mumkin, bunda havo bir xil tezlikda berib turiladi, harorat (27–29 °C) sirka aralashmasini sovitish yo‘li bilan regulirovka qilinadi.

Sirkani olayotganda spirtni va sirka kislotasining yonib ketishi natijasida (to‘liq oksidlanishi) CO<sub>2</sub> va H<sub>2</sub>O gacha ko‘p miqdorda yo‘qotilishining oldini olish uchun haroratni va havoni yuborilib turilishini nazorat qilib turish lozim. Shuni e‘tiborga olish kerakki, etanolning eritish uchun ishlatiladigan suvning sifati jarayonda mikroblarning faolligi pasayishiga ta‘sir qilishi mumkin. Eritilgan etanoldan olingan sirka, odatda, eskirmaydi, chunki unga turli xil qo‘shimcha moddalar qo‘shilmaydi. Tayyor bo‘lgan sirkani filtrlash yo‘li bilan tozalanadi, shisha idishlarga solinib sterilizatsiya qilinadi. Sirkaning chiqishi sirka kislotasining massasi bo‘yicha baholanadi. Odatda, bu ko‘rsatkich oddiy generatorlarda 1,4 kg/m<sup>3</sup>/sut ga resirkulatsion generatorlarda 5–12 kg/m<sup>3</sup>/sutkaga tengdir.

Chorak asrdan buyon sirka kislotasini ko‘p miqdorda olish maqsadida atsetobakteriyalarni chuqur kultivatsiya qilish usuli o‘rganib kelinmoqda. A. Atsetinx muntazam ravishda 25–30 °C da 10–11 % etanolli, 1 % sirka kislotali va mineral tuzlar saqlagan muhitda o‘stirish natijasida sirka kislotasining chiqishi 18–23 kg/m<sup>3</sup>/sut gacha oshdi. Fermentatorlar batareyasida uzluksiz ravishda olib borilgan jarayon ishlab chiqarishni oshirdi. Ishlab chiqarish jarayonida 4 % etanol, 1,5 % li sirka kislotasi va mineral tuzlat (monogidro fosfat ammoniy, digidrofosfat kaliy, magniy sulfat) uzluksiz birinchi fermentatorlarga tushadi. Keyingi fermentatorlarda spirt bilan to‘yinadi. Shu tarzda etanolning konsentratsiyasi pasayib, sirka kislotaga to‘yinadi. Oxirgi fermentatorlardan sirka kislotasi uzluksiz oqib turadi. Sirka kislotasining chiqish unumi 30 kg/m<sup>3</sup>/sut gacha yetadi va undan oshishi ham mumkin.

**Limon kislotasining olinishi.** Taxminan 60 yil avval limon kislotasi sitrus mevalaridan olingan. Hozirgi kunlarda esa, asosan, *Aspergillus niger* zamburug‘ining ayrim shtammlaridan olinadi. Ayni vaqtda limon kislotasi KHR, AQSH, Fransiya, Rossiya va boshqa bir qancha davlatlarda ishlab chiqariladi. 1917-yilda ishlab chiqarish mikrobyoduvchilar ustki qismidan kultivatsiya

qilish orqali amalga oshirilgan; 1939–1942-yillarda germetik fermentatorlarda chuqur kultivatsiya qilish yo'liga qo'yilgan. Buning natijasida jarayonni mexanizmlashtirish va avtomatlashtirishga, mahsulot tannarxini arzonlashtirishga, texnologik jarayonning umumiy vaqtini qisqartirishga, ishlab chiqarish sharoitining aseptik holatlarini yengillashtirishga erishildi.

Ayni vaqtda limon kislotasining chiqish unumi 98–99 % ni beradigan *A. niger* shtammi (masalan, r-3 shtamm) ishlatilmoqda. Limon kislotasi avval produsent to'qimalarida yig'ilib, so'ngra ozuqa muhitiga chiqadi. Yuqorida ko'rsatilgan omillar akonitatgidrotaza, azositratdegidrogenaza va a-ketoglutaratdegidrogenaza fermentlarini ingibirlaydi. Shuning uchun organizmda limon kislotasining to'liq metabolizmi ketmaydi va uni juda ko'p miqdorda kommersiya qilish maqsadida olish mumkin.

Melassa limon kislotasini ishlab chiqarishda asosiy xomashyo bo'lib, uning tarkibining ko'p miqdorini temir moddasi tashkil etadi. Shuning uchun uni fermentlanish jarayonidan oldin sariq qon tuzi ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ) yordamida cho'ktirish lozim. Yana shu ham isbotlanganki, bu tuz va limon kislotasi to'qimalarda izositratdegidrogenazaning ingibitori bo'lib chiqadi. *A. niger* ikkita fermentlanish usuli ma'lum yuza va chuqur. Birinchi usulni kichik va o'rta korxonalarda suyuq muhitda, suyuq fazali fermentlanish ko'rinishlari (masalan, Yevropa va Amerika) va qattiq muhitda qattiq faza fermentlanishlari (masalan, Yaponiya) tatbiq etiladi.

R.Ya.Karklinsh va A.K.Probok (1972) tomonidan suyuq faza fermentlanishining texnologik sxemasi keltirilgan. Maxsus sexlarda uch bosqichli sxema bo'yicha zamburug' sporalariga (konidiy) ishlov berish amalga oshiriladi. Birinchi bosqichda *A. niger* agarli muhitda (suslo-agar) probirkalarda o'stiriladi, ikkinchi va uchinchi bosqichlarda uni qattiq yoki suyuq ozuqa muhitida kolbalarda ko'paytiriladi. Har bir bosqich 32 °C haroratda ikki sutka davom etadi. Konidiy o'sish davrida mitseliy avval rangsiz bo'lib, so'ngra qora rangga aylanadi, konidiyning asperatsiya usulida maxsus vakuum nasosda yig'iladi,

termokamerada 28–30 °C da quritilib, steril faollangan ko'mir (1 2) bilan aralashiriladi, steril flakonlarga (kolba) qadoqlanadi va olti oydan ikki yilgacha saqlanadi. 10 dm<sup>2</sup> kyuvetadagi muhitdan 4–5 g gacha quruq konidiy olish mumkin.

Sanoatda *A.nigerni* suyuq faza fermentlanishining yuzali usulini „bijg'ish kamerasi“da ishlab chiqarish tatbiq etilgan, bunda (8–10 ta) stellajlarga maxsus kyuvetalar o'rnatilgan bo'ladi. Har bir kyuvetaning pastki qismida shtutser bor. „Bijg'ish kamerasi“ga ventilatsiya o'rnatilgan, u ma'lum bir haroratda steril havo kelishini ta'minlaydi. Kameradagi harorat 34–36°C da ushlab turiladi. Maksimal issiq havo chiqishi 5 sutka davom etadi; shakar konsentratsiyasi o'rtacha 12 % ga yetadi; boshlang'ich pH muhiti 6,0–7,0; birinchi uch sutkada 4,5 % gacha va jarayon oxirigacha 3,0 % ga (8–9 sutkada) tushadi. Kislotalar hosil bo'lishi 5–6 sutkada maksimal darajada chiqadi.

## 6.2. Biosensornlarning qo'llanilishi

**Biosensornlar** – analitik qurilmalar bo'lib, ulardagi sezuvchi qatlam biologik materiallardan iborat va u ma'lum bir komponentning mavjudligi yoki aniq bir konsentratsiyaga funksional bog'langan holda elektr signal orqali reaksiya beradi. Biologik material sifatida fermentlar, to'qimalar, bakteriyalar, zamburug'lar, antigen va antitanalar, lipasomalar, organellalar, retseptorlar, DNK va shu bilan birga fizik datchiklarga immobillangan hujayralar ham ishlatiladi. Biosensor texnologiyasi biologiya va mikroekologiya fanlarining uyg'unlashgan shakli asosida yaratilgan.

Bunday qurilmani yaratish g'oyasi 1960-yillarda birinchilardan bo'lib buni 1967-yilda L. Klark va K. Liney olimlar tomonidan ilgari surilgan. Klarkning g'oyasi shundan iborat ediki, fermentli elektrodan, ya'ni yuzasiga ferment immobillangan elektrokimyoviy datchikdan foydalanish muhimligini ta'kidlagan. Shundan keyin esa “biosensor” tushunchasi kirib kelgan.

Ko'pchilik biosensornlar biologik suyuqliklarning analizida qo'llaniladi. Masalan, qonni tarkibida 1000 dan ortiq birikmalar

uchrab, ba'zida kerakli birikmani konsentratsiyasini tez va effektiv aniqlash kerak bo'lib qoladi. Masalan, diabet bilan kasallangan bemorlar uchun glukozaning tahlili juda muhim hisoblanadi, biosensorlar bu imkoniyatni ta'minlab beradi. Funktsional ravishda biosensorlar tirik organizm datchiklari, ya'ni tashqi muhitdan keladigan signallarni elektrga aylantirib beradigan biosensorlar bilan tengma-teng turadi.

**Biosensorlarni konstruktorlash prinsiplari.** Konstruktori jihatidan biosensorlar o'zidan 2 ta tashkil qiluvchilari yoki biokimyoviy va fizik transdyuserlardan iborat bo'lib, ular o'zaro qisqa kontaktda bo'lishadi. Biokimyoviy tashkil qiluvchi (yoki biotransdyuser, biosektor) aniqlashning biologik elementi vazifasini bajarib, aniqlanayotgan komponentni (aniqrog'i kimyoviy bog' haqidagi ma'lumotni) fizik yoki kimyoviy tarkibi hamda signalga aylantirib beradi. Bular sifatida ancha tipdagi biologik strukturalar: fermentlar, antitela, retseptorlar, nuklein kislotalar va hatto tirik hujayralar ishtirok etadi. Fizik tashkil qiluvchi (yoki transdyuser) aniqlanayotgan komponentni (aniqrog'i konsentratsiyaviy signali) maxsus qurilma yordamida elektrga aylanadi. Informatsiyani o'qish va yozish uchun signalni registratsiya qiluvchi va tezlashtiruvchi elektron sistemalar qo'llaniladi.

Fizik transdyuserlarni ko'pgina turlari mavjud: elektrokimyoviy, spektroskopiya, termik, gravitatsion, plyuzoelektrik, kolorimetrik, rezonans sistemalar va boshqalar.

Bioelektrik elementlarning barcha turlarini turli xil transdyuserlar bilan kombinatsiya qilib, biosensorlarning turli-tuman tiplarini yaratish mumkin. Biosensor analizni zamonaviy metodlar bilan taqqoslanishining asosiy xarakteristikasi bo'lib, analizning operativligi, yuqori spetsifiklik, qimmatbaho apparatlarga ehtiyojsizlikdan iborat. Qurilmada biomaterialning mavjudligi uning juda ham murakkab aralashmadagi kerakli birikmalarni yuqori selektivlik bilan aniqlash imkonini beradi.

**Biosensorlar turlari va ularning qo'llanilishi.** Biosensorlar yaratish fan bilan texnologiyalarga oid bo'lib, hozirgi zamonaviy biotexnologiyaning yo'nalishlaridan hisoblanadi.

Biosensornlarning turlari juda ko'p bo'lib, ular orasida yetarlicha taraqqiy etganlari fermentli va hujayrali biosensornlardir.

**Fermentli biosensornlar** xemi va biolyuminissensiya asosida fermentli elektrodlar, fermentli mikrokalinmetrik datchiklar, biodatchiklar taqdim etilishi mumkin.

Fermentli yoki reagentsiz elektrodlar fermentativ o'zgarish jarayonida hosil bo'luvchi moddani elektrokimyoviy uslub yordamida aniqlashga asosan moslamani tashkil qiladi. Tuzilishi jihatidan bir yoki bir necha immobillangan fermentlardan (ba'zida ferment erigan holda membrana qurshovida elektrodga yaqin holda joylashishi mumkin) iborat qatlamdan o'ralgan elektrod shaklida bo'ladi. Elektrod asosini hosil qiluvchi tipga qarab, moslamalar potensiommetrik va amperometrik turlarga bo'linadi.

Fermentli mikrokalinmetrik datchiklar fermentativ reaksiyalarning issiqlik effektidan foydalanishga asoslangan moslamalardir. Tuzilish jihatidan ferment bilan immobillangan tashuvchi va termistorlar bilan ta'minlangan ikkita kolonkada (o'lchovchi va nazoratli) tashkil topgan. O'lchovchi kolonka orqali analiz qilinayotgan namuna o'tkazilganda issiqlik effekti namoyon bo'ladigan kimyoviy reaksiya amalga oshadi. Aynan o'sha issiqlik effekti o'lchagichda qayd etiladi. Ko'rilayotgan datchik turi o'zining keng ko'lamliligi (universalligi) bilan ahamiyatga molikdir.

Hemilyuminessentli va biolyuminessentli datchiklar fermentativ reaksiya mahsulotlarini g'alayonlangan holatda turli to'lqin uzunligiga yorug'lik nurlanishini qayd qilishga asoslangan. Tuzilishi bo'yicha ferment bilan immobillangan (lyusiferaza yoki peroksidaza bilan) kolonka hamda yorug'lik qabul qiluvchi moslamadan iborat. Bu sistemada qo'llaniladigan datchik tipiga asoslangan analitik uslub yuqori sezgirligi bilan ajralib turadi va o'z navbatida moddani fentomol (10-12 M) miqdorini aniqlash imkoniga ega.

Immobillangan fermentlar qo'llanilgan elektrodlar chidamli bo'lib, bir necha yuz o'lchashlarni amalga oshirish mumkin. Tabiiy ferment preparatlari qo'llanilgan elektrodlar bilan esa 50 tagacha o'lchashlarni qayd qilish mumkin.

Hozirgi davrda qon tarkibida qandni aniqlashda (immobillangan glukozoksidaza asosida) qo'llaniladigan ampiriometrik biosensor keng tarqalgan. Tarixiy jihatdan bu biosensor qadimiy hisoblanadi.

Bakteriyalarni yetishtirishda ozuqa muhitida penitsilin miqdorini nazorat qilish uchun penitsilinli elektrod-penitsilaza fermenti bilan immobillangan pH datchik ishlatiladi.

Kislorodli elektrodga (fizikaviy transdyuser) asoslangan biosensorlar fermentlarning turli substratlarni: laktadlarni, L-aminokislotalarning salisilatlarini, aksolatlarni, ayni karbon kislotalarning anionlarni aniqlashga imkon beradi.

**Hujayrali biosensorlar.** Biotexnologiya fanining yutuqlaridan biri tirik hujayralarni polimerlar va turli tabiatga ega bo'lgan qattiq tashuvchilar tarkibiga kiritish uslubi hamda bunday turdagi materiallarni tibbiyot va boshqaruvli biosintez muammolarni hal qilishda qo'llash bilan bog'liq. Hujayralarni immobillash usullari fizikaviy va kimyoviy uslub bo'lib, fermentlarni immobillash uslublariga o'xshashdir. Immobillangan hujayralarning barqarorligi ularni metabolizm, tashuvchilik va muhitning xossalari bilan belgilanadi.

Immobilizatsiya uchun yengil kultivatsiyalanadigan, qayta tiklanadigan mikroorganizm hujayralari, shuningdek, o'simliklar, hayvon va odam hujayralari keng qo'llaniladi.

Fermentlardan farqli ravishda immobillangan hujayralarni qo'llashda noyob tozalash bosqichini qo'llash talab etilmaydi. Mavjud uslublar ferment aktivligining 100% ni saqlagan holda uzoq vaqt oralig'ida (ba'zi holatlarda bir necha yillar oralig'ida) faoliyat ko'rsatadigan hujayralar yaratishga imkon beradi.

Hujayrali biosensornlarning asosiy kamchiliklari qo'llanilayotgan elektrod sekinlik bilan javob (qalin membranalarning qo'llanish zaruriyati bilan bog'liq) hamda hujayra yoki to'qimada bir necha ferment sistemalar ishtirok etishi sababli namoyon bo'ladigan past tanlanuvchanliklardan (selektivlik) iborat. O'sish va ko'payish jarayonida intakt hujayralar tashuvchini parchalaydi, qolgan hujayralar esa hosil bo'layotgan mahsulotni ifloslantiradi.

Bu muammo o'z navbatida bakteriya hujayralarni qo'llanilayotgandan antibiotiklarni qo'shish yoki immobillangan o'simlik hujayralari uchun fitogormonlar tanqisligi yaratilib o'sish jarayonini sekinlashtirish yo'li bilan hal etiladi.

Biosensorlar yaratish uchun turli mikroorganizmlar qo'llaniladi. Chunonchi *Nigrospora ammiakni* aniqlash uchun, *Trichosporan brassica* – sirka kislotasini aniqlash uchun, *Sarsina flava* – glutaminni aniqlash uchun, *Azotobakter vinebaudit* – nitratlarni aniqlash uchun. *As. niger* zamburug'i asosida bir guruh yapon olimlari tomonidan go'sht mahsulotlari tarkibidagi aminlarni aniqlashga mo'ljallangan biosensorlar yaratilgan. Shuning bilan birga cho'chqa jigari va buyragi kesmalari, qovoq va banan kesmalari to'qimali elektrod yaratishda qo'llanilmoqda.

Boshlang'ich davrlarda faolligi saqlangan holatda hujayralarni immobillash uchun tabiiy materiallar: jelatin, agar, alginat kalsiy, karraginan qo'llaniladi. Hozirgi vaqtga kelib hujayralarni sintetik polimer gellariga kiritish uslubi ishlab chiqildi va rivojlantirildi.

Immobillangan hujayralar xalq xo'jaligining turli sohalarida biotexnologiya usuli bilan kimyoviy moddalar sintez qilishda keng qo'llanilmoqda. Bundan tashqari biosensorlarni quyidagi maqsadlarda ham qo'llash mumkin:

- oziq-ovqat mahsulotlarining ozuqa qiymatini, yangiligini va xavfsizligini aniqlashda;

- bevosita bemor yonida turib bemorning qonini ekspress analiz qilishda;

- atrof-muhitning zararlanganligini, ifloslanganligini aniqlash va darajasi o'lchashda;

- portlovchi moddalar, toksinlar hamda biologik qurol miqdorini o'lchashda;

- oqava suvlardan metallarni ajratib olishda;

- tabiiy va oqova suvlarni tozalashda.

Immobillangan biomaterial yordamida ma'lum bir moddani aniqlash uchun davr talab darajasidagi uslub bo'lib qoldi. Ba'zi biosensorlar aptechkalarida individual qo'llashda (asosan qon tarkibidagi qandni aniqlashda) keng tarqalmoqda. Navbatda hid

bilish va ta'm bilish "sun'iy organlarni" yaratishga imkon beradigan tirik organizmlarning retseptorlari o'rnini egallay oladigan hamda qator kasalliklarni aniq tashxis qila oladigan biosensorlar tuzilmalarini yaratish turibdi.

Zamonaviy biochiplar uchun 1975-yilda E.Sauzern tomonidan yasalgan Sauzernblott asos bo'ldi. Buning uchun E.Sauzern qattiq podlojka qotirilgan DNK fragmentlarini xususiy ketma-ketligi aniqlash uchun belgilangan nuklein kislotasini qo'lladi. Rossiyada biochiplar A.D.Mirzabekov rahbarligida RFA molekulyar biologiya institutida 1980-yillar oxirida yaratila boshladi.

Mikrochiplar texnologiyasi laboratoriya tadqiqotlarini prinsipial jihatdan yangi bosqichi bo'lib, bir vaqtning o'zida 1000 ta namunalarni testdan o'tkazish imkonini beradi. DNK yoki oqsilning chiplarini yaratish uchun aynan DNK yoki oqsillarning minglab molekulalari plastinkalarga joylashtiriladi. Hosil bo'lgan bunday kichik moslamalar biologik makromolekulalarning spetsifik o'zaro ta'sirlashuvini analiz qilish uchun qo'llaniladi. Bunday chiplarda zondlar sifatida oligonukleotidlar, genomli DNK, RNK fragmentlari oqsillar, retseptorlar, ligandlar va boshqalar xizmat qiladi.

**Biochip va uning ishlash prinsipi.** Hozirgi paytda biochiplarning quyidagi turlari mavjud:

- matritsali (immobillangan DNK bilan) biochip;
- mikroflyuidli (kapilyarli) biochip;
- rangli kodga ega bo'lgan mikrosferalar qo'llanilgan biochiplar.

Zamonaviy mikrochiplarda yacheyka o'lchamlari 50–200 mikron oralig'ida bo'ladi, har bir yacheykaning hajmi esa 1 ml dan 1 mkl gacha tashkil qiladi; analiz qilinayotgan makromolekula konsentratsiyasi esa 10 mkM gacha bo'ladi. Chipdagi yachaykalarining umumiy miqdori 103–105. Uning chiziqli o'lchamlari esa taxminan 1 cm ga teng. Namuna bilan ta'sirlashadigan mikrozonddar pochta markazi o'lchamidan katta bo'lmagan podlojkaga joylashtiriladi. Har bir mikrozondd tomchi shaklida bo'lib, ko'ndalang kesimi bo'yicha 100 mikron atrofini

tashkil qiladi. Bitta mikrozonning yacheyklari o'lcham bo'yicha bir xil bo'lib 1 mm da 10–30 tomchilar joylashadi. Fermentativ reaksiyalar amalga oshadigan chiplarda yacheykalar sayoz joylashishga ega. DNK reaksiyalar amalga oshadigan chiplarda esa yacheykalar zichroq joylashishga ega bo'ladi. Bunday texnologiya bitta biochipda odam genomini 30 dan 100 ming genomni analiz qilish imkonini beradi. Bunda qo'yilgan maqsadga qarab uzunligi 6 dan bir necha mingga nukleotidlardan tashkil topgan DNK uchastkalari mavjudligini aniqlash mumkin.

Chiplar tayyorlash uchun ko'p hollarda shisha, plastik, yarim o'tkazgich yoki metall plastinkalari xizmat qiladilar. Ularning sirtlariga tadqiqot (analiz) qilinayotgan eritma tarkibida bo'lgan moddalarni tanlab bog'laydigan qobiliyatga ega bo'lgan biologik makromolekulalar (DNK, oksillar, fermentlar) joylashtiriladi.

DNK-mikrochiplari odam va boshqa tirik organizmning genomini analiz natijalari bo'yicha olingan ma'lumotlarni amalda foydalanish maqsadida ishlatiladi. Chunonchi:

- genda turli kasalliklar bilan bog'liq bo'lgan mutatsiyalarni aniqlash;
- genlarni faolligini kuzatish;
- infeksiyon kasalliklar diagnostikasi va ularni davolashning samara uslublarini aniqlash;
- qishloq xo'jaligi ekinlarining hosildorligiga mas'ul bo'lgan genlarni aniqlash;
- patogen hamda foydali mikroorganizmlarni skrining qilish.

Turli quyi molekulyar birikmalarga "sezgir" bo'lgan molekulalarni tashuvchi oqsilli biochiplar yaqin kelajakda keng ko'lamdagi dorivor moddalarni, gormonlarni, narkotiklarni, zaharlarni, analiz qilinayotgan namuna (qon, suv, oziq-ovqat yoki tuproq)dagi pestisidlarni hamda turli allergenlarni, onkogenlarni, biologik aktiv moddalarni hatto genetik deffektlarni aniqlashga imkon bermoqda. Oqsilli biochiplar texnologiya yaqin kelajakda butun bir immunologik laboratoriyalarning vazifasini o'z zimmasiga olib, ko'pchilik diagnostik uslublarning

samaradorligini bir necha ming marta oshirib, analizning tannarxini sezilarli darajada pasaytirib beradi.

Oqsilli mikrochiplar quyidagi maqsadlar uchun qo'llanilishi taklif qilinmoqda:

– turli kasalliklar, hatto ularning turli bosqichlari uchun xos bo'lgan oqsilli bimarkerlarni aniqlashda:

– dorilarni klinikadan oldingi sinovlari jarayonida ularni samaradorligi va zaxarliligini baholashda:

– oqsillarni alohida turdagi hujayralar bilan sintezidagi tafovutlarni aniq o'lchashda: rivojlanishi har xil bosqichda bo'lgan hujayralar bilan sog'lom hamda patologik o'zgargan hujayralar bilan:

– oqsillarning tuzilishi va funksiyalari orasidagi o'zaro bog'liqlikni o'rganish:

– yangi dorivor moddalar uchun nishonlarni aniqlash maqsadida oqsillarni ekspressiyasini baholashda:

– oqsillar va boshqa molekulalar orasidagi o'zaro ta'sirlashuvini o'rganishda.

Biochiplar ilmiy maqsadlar bilan birga amaliy tibbiyotda qo'llanilmoqda. Ular turli genlarni aniqlashda va funksiyalarini baholashda yordam beradilar. Qisqa muddat oralig'ida genetik mutatsiyalarni tavsiflash hamda odamni ma'lum bir kasallikka, masalan, onkologik kasalliklarga moyilligini (60% rak bilan kasallanganlarda aniqlanadi) aniqlashga imkon beradi. Hozirgi vaqtda leykemiya kasalligining diagnostikasi uchun mo'ljallangan biochip sertifikatsiyalash jarayonidan o'tmoqda.

Genli onkomarkerlaridan tashqari oqsilli onkomarkerlar (rak haqida signal beruvchi molekulalar) ham mavjud bo'lganligi sababli munosib biochiplar ham ishlab chiqildi. Bemor organizmi gepatit va OITSga tekshirilayotganda, qon quyish jarayonida moyillikni aniqlashda qo'llaniladigan biozondlar ham yaratildi.

Biochiplar yordamida irsiy kasalliklarni diagnostika qilishdan tashqari hayot davomida genetik koddagi mutatsiyalar natijasida olib kelinadigan kasalliklarni ham aniqlash imkoni mavjud. Mikrochiplar molekulyar mexanizmlarni o'rganishda va turli dorilarning ta'sirini tadqiq qilishda yordam beradilar. Organlarni

qayta o'tkazishda biochiplar alohida o'rin egallaydi. Jarrohlik operatsiyalarining bu turida implantant organi odamning immun sistemasi tomonidan qabul qilinmaslik asosiy muammo hisoblanadi. Gisto moyillikning asosiy omillarini oqsillar tashkil qilib, ular o'z navbatida odam organizmidagi hujayralarni identifikatsiyalaydigan mikrochip vazifasini bajaradi. Implantatsiya qilingan donor organ qabul qilishi uchun donor organ to'qimalaridagi oqsil markerlar iloji boricha bemorning oqsil markerlaridan kamroq farqlanishi kerak. Shu nuqtayi nazardan immun sistemasining salbiy reaksiyani kamaytirish maqsadida moyilligi yuqori bo'lgan organ tanlash vazifasini biochiplar yengillashtirib beradi.

Bundan tashqari tuberkulyozning turli shakllarini diagnostika qilish uchun biochiplar yaratilmoqda. Ma'lumki, hozirda antibiotik ta'siriga barqaror bo'lgan bir necha turdagi tuberkulyoz tayoqchalari aniqlangan. O'z navbatida biochip barcha ma'lum bo'lgan tuberkulyoz qo'zg'atuvchilarini ochib berib, kasallikning aynan shaklini davolashi mumkin bo'lgan antibiotiklarni ham aniqlab beradi. Diagnostika jarayoni uzoq muddatli uslublardan farqli ravishda bir kunda amalga oshiradi. Biochiplar yordamida o'ta xavfli bakteriyalarni – sibir yarasi, o'sma, bruselyoz va o'latni aniqlash hamda grippni diagnostika qilish mumkin.

### Nazorat savollari

1. Biosensorlar yaratish texnologiyalari nimaga asoslanadi?
2. Biosensorlar yaratishda qanday komponentlar muhim hisoblanadi?
3. Biosensorlar yaratish jarayoni qanday bosqichlardan iborat?
4. Bakteriyalarning biosensorlar yaratishdagi roli nimada?
5. Organik kislotalar olishda qanday produtsent mikroorganizmlar ishtirok etadi?
6. Limon kislota olish texnologiyasi qanday bosqichlardan iborat?
7. Sirka kislota olish texnologiyasi qanday bosqichlardan iborat?

### Test savollari

#### 1. Almashinmaydigan aminokislotalar qaysi?

- A)\* Lizin, metionin, glitsin, alanin.
- B) Prolin, serin, triptofan, fenilalanin
- C) Asparagin, glitsin, glutamin, prolin.
- D) Lizin, metionin, treonin, triptofan.

#### 2. Almashinadigan aminokislotalar qaysi javobda to'g'ri berilgan?

- A)\* Serin, triptofan, izoleysin, sistein.
- B) Glitsin, glutamin, prolin, serin.
- C) Asparagin, metionin, glutamin, serin
- D) Lizin, prolin, glitsin, glutamin kislota.

#### 3. L-Lizinni enzimatik yo'l bilan ajratib olishda qaysi modda asosiy xomashyo hisoblanadi?

- A) \* Siklogeksanon
- B) Piperidin.
- C) Piridin.
- D) Benzol.

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Organik kislotalar olishning xalq xo'jaligidagi ahamiyati.
2. Lizin ishlab chiqarishning farmatsevtika sohasidagi roli.
3. Oziq-ovqat sanoatida sirka kislotasining ishlatilishi.
4. Biosensornlarning xalq xo'jaligidagi ahamiyati.
5. Zamonaviy biosensornlarning tibbiyotdagi roli.
6. Biosensornlar yaratishda muhim komponentlar tavsifi.

## VII BOB. CHIQINDISIZ TEXNOLOGIYA YARATISH. BIOO'G'ITLAR OLISH

### 7.1. Biogaz olish texnologiyasining tarixi

Biogaz texnologiyasidan dastlab eramizdan avvalgi XVII asrda Xitoy, Hindiston, Assiriya va Persiya davlatlarida turli xil ko'rinishlarda foydalanishganligi qayd etiladi. Ammo, oradan 3,5 ming yil o'tgachgina, ya'ni XVIII asrdagina biogaz texnologiyasi bo'yicha tizimli ilmiy tadqiqotlar boshlandi.

Bu haqida dastlabki ma'lumotlar 1764-yilda Bendjamin Franklinning Djozefu Pristliga AQSHdagi Nyu Djersi shtatida amalga oshirgan tajribalari haqida yozgan xatida uchraydi.

1776-yilda Aleksandr Volt botqoqlikdan alangalanuvchi gaz hosil bo'lishini va buning metan gazi ekanligini ilmiy isbotlab berdi. 1804-yilda esa metan gazining formulasini Dalton ochdi va shundan so'nggina biogaz bo'yicha amaliy tadqiqotlar boshlandi.

Biogaz hosil bo'lishini o'rganishda rossiyalik olimlarning hissasi katta bo'ldi, jumladan Popov 1875-yilda haroratning ajraladigan gaz miqdoriga ta'sirini o'rganib chiqdi. Natijada, biogaz ajralishi  $3^{\circ}\text{C}$  dan boshlanib harorat  $60^{\circ}\text{C}$  gacha oshirilganda, ajraladigan gaz miqdori oshishi, ammo gaz tarkibi o'zgarishsiz qolishini aniqladi (metan – 65%, karbonat anhidrid – 30%, oltingugurt – 1% va juda kam miqdorda azot, kislorod, vodorod).

V.L.Omelyanskiy esa anaerob bijg'ish jarayonining tabiati va unda ishtirok etuvchi bakteriyalarni mukammal o'rganib chiqdi. 1881-yildan boshlab yevropalik olimlar binolarni qizdirish va ko'chalarni yoritishda biogazdan foydalanish bo'yicha amaliy tajribalarni boshlab yubordilar.

1895-yilda Ekseter shahrida oqova suvni yopiq idishlarda bijg'itish orqali biogaz olinib, ko'cha chiroqlari yoritila boshlandi. Oradan ikki yil o'tib, Bombeyda biogaz olinib, kollektorlarda saqlanayotganligi va motor yoqilg'isi sifatida turli xil dvigatellarda foydalanish mumkinligi to'g'risida ma'lumotlar chop etildi.

Germaniyalik olimlar Imxoff va Blanklar 1914–1921-yillarda bijg'ish amalga oshadigan idishni qizdirish orqali jarayonni tezlashtirish va biogaz miqdorini oshirishga erishishdi.

Yevropada biogaz uskunasidan keng ko'lamda foydalanish Ikkinchi jahon urushi davrida paydo bo'lgan yoqilg'i tanqisligi muammosidan keyingina rivojlandi. Ammo ushbu uskunalar takomillashmaganligi va bijg'ish uchun mo'tadil sharoitlar tanlanmaganligi sabab yetarli samara bermadi.

Biogaz texnologiyasining rivojlanish tarixida eng muhim tadqiqotlardan biri XX asrning 30-yillarida Busvella shahrida amalga oshirilgan tadqiqotlar hisoblanadi. Bunda turli xil organik chiqindilar va go'ngdan xomashyo sifatida foydalanilgan.

Birinchi katta masshtabdagi biogaz ishlab chiqarish zavodi 1911-yil Angliyada Birmingem shahrida qurib ishga tushirildi. Xomashyo sifatida shahardan chiqayotgan oqova suvlardan foydalanilgan. Demak, bu texnologiyani amaliyotga joriy etishda birinchi pionerlar angliyalik olimlar hisoblanadi. Bunda hosil bo'lgan biogazdan elektroenergiya ishlab chiqarishda foydalanilgan. 1920-yilga kelib ular oqova suvlarni qayta ishlash uchun bir qancha uskunalarni ishlab chiqishdi.

1930-yilda mikrobiologiyaning rivojlanishi bilan biogaz jarayonida ishtirok etuvchi bakteriyalar kashf qilindi. Dunyoda energetik inqirozning yuzaga kelishi bilan keyingi yillarda yoqilg'ilarning tiklanuvchan va alternativ sohasidagi ishlarni rivojlanishiga, shu qatori biogaz sanoatining rivojlanishiga turtki bo'ldi.

1938-yilda angliyalik olimlar Neman va Dyusellar qattiq chiqindilarni qayta ishlovchi 10 m<sup>3</sup> hajmli biogaz uskunasi yaratdilar va Aljirda ishga tushirdilar.

Ikkinchi jahon urushi davrida Fransiya va Germaniyada elektroenergiyaga bo'lgan talab katastrofa darajasiga yetganligi sababli, biogaz olishda qishloq xo'jalik qoldiqlaridan, jumladan go'ngdan foydalanishga e'tibor qaratishdi.

1940-yilning o'rtalariga kelib Fransiyada 2 mingdan ortiq go'ngni qayta ishlovchi biogaz uskunasi ishga tushirildi. Xuddi

shu kabi uskunalar Vengriya fermer xo'jaliklarida ham ko'plab qurildi.

O'tgan asrning 70-yillariga kelib Osiyo davlatlarida ham biogaz olish texnologiyasi rivojlana boshladi. Biomassadan energiya manbai sifatida foydalanishga qiziqish, eng avvalo, biomassani har yili qaytadan paydo bo'lishi; biogazda yig'ilgan energiyani saqlanishi va uzoq muddat davomida xohlagan holatda ishlatilishi mumkinligi; bu energiyani boshqa turdagi energiyaga o'tkaza olish mumkinligi; ba'zi mintaqalarda esa issiqlikni bu manbai, tabiiy issiqlik manbalaridan arzonroq turishi; biogazni ekologik toza issiqlik manbai bo'lganligi; undan foydalanganda atrof-muhitga oltingugurtli zaharli oksidlari paydo bo'lmasligi; atmosferadagi karbonat angidridi balansi o'zgartmasligi va boshqa qator sabablar bilan uzviy bog'liqdir.

Keyingi yillarda elektr va issiqlik energiyalariga talab ortishi natijasida, biogazdan foydalanishga talab ortib bormoqda. Biogaz texnologiyasi rivojlanib, qishloq xo'jaligida (parrandachilik va chorvachilikda) yuqori natijalarga erishilmoqda. Bu sohalarda arzon elektr va issiqlik manbayiga ega bo'linyapti.

Hozirda bu texnologiya Xitoy, Italiya, Qirg'iziston, Fransiya, Germaniya, Amerika, Ukraina kabi davlatlarda ishlatilmoqda. Shu qatori bu texnologiya Respublikamizda ham qo'llanilmoqda, xususan Toshkent, Jizzax, Qashqadaryo, Xorazm, Samarqand, Farg'ona viloyatlarida qurilgan va hozirda ishlamoqda. Respublikamizda qurilgan texnologiyalar yangi bo'lganligi sababli bu qurilmalarni asosan ko'rgazmali desa bo'ladi.

## **7.2. Azot yutuvchi mikroorganizmlar asosida tayyorlangan preparatlar**

**Nitragin** – jahonda birinchilardan bo'lib, tunganak bakteriyalar asosida tayyorlangan biopreparatlardir. 1888-yil M.Beyerkning tomonidan toza holda rizobiylar avlodiga mansub tunganak bakteriya ajratib olingandan keyin, bu bakteriyalarni tunganak hosil qilishdagi roli va dukkakli o'simliklarni azot bilan ta'minlashi mumkinligi haqida fikr uyg'ondi.

«Nitragin» nomi bilan birinchi preparat 1896-yil Germaniyada tayyorlangan. Hozir bu nomli preparat o'nlab mamlakatlarda ishlab chiqarilishiga qaramasdan, O'zbekistonda bu preparatni chel elda valuta hisobiga sotib oladi. Masalan, Andijon viloyatida soya yetishtirish uchun preparat AQSHdan xarid qilinadi. Chet eldan keltirilgan biopreparatlarning o'ziga yarasha kamchiliklari borligi to'g'risida yuqorida aytib o'tgan edik. 1997-yildan boshlab UzFA mikrobiologiya institutida soya o'simligiga spetsifik bo'lgan biopreparat «mikrobl o'g'it» nomi bilan chiqarila boshladi. Dastlabki sinovlar preparat ta'sirida soyaning dukkaklar hosil qilishi ancha oshib, hosildorligi ko'tarilgani haqida dalolat berib turibdi.

Nitragin yerda yangi dukkakli o'simliklar ekilganda va bu yerda boshqa dukkaklilar bo'lmagan sharoitda juda katta foyda keltirish aniq bo'ldi. Aksincha, agar beda ekilgan maydonga soya ekiladigan bo'lsa hech qanday tuganak hosil bo'lmaydi va hosildorlik ham kam bo'ladi. Uzoq ishlatilib kelingan va dukkakli o'simliklar ekilib kelingan yerlarda nitragin ishlatish ancha muammo, chunki bunday tuproqlarda tuganak bakteriyalarni shu o'simlikka xos va tuproqqa moslashgan shtammlari to'planib qolgan bo'ladi.

**Zamburug'lar asosida olinadigan entomopatogen preparatlar.** Zamburug'li preparatning hasharotga ta'siri sporalarning tana bo'shlig'iga teri orqali kirishdan boshlanadi. Hasharot tanasiga tushgan zamburug' sporasi o'sib gifga aylanadi, keyin mitseliyga, qaysiki ulardan gifli tanachalar entomopatogen zamburug'larning infeksiyali birligini tashkil qiluvchi konidiyalar ajralib chiqadi. Konidiyalar o'sib chiqqandan keyin to hasharotlar nobud bo'lishgacha bo'ladigan oraliq vaqti hasharotlar katta-kichikligiga qarab 2 sutkadan 8 sutkagacha davom etishi mumkin. Beauveria avlodiga mansub zamburug'lardan preparatlar olish ularning *B.bassiana* vuill (60 ortiq turdagi hasharotlarni nobud qiladi) va *B.tenella* Del.(10 ortiq turdagi hasharotlarni nobud qiladi) turlari asosida sanoat miqyosida preparatlarni ishlab chiqarishga asoslangan.

Hozirgi paytda *B. bassiana* (Bals.) Vuill. ffl. gafolitseti konidiosporasini tashkil qiluvchi zamburug'li entomopatogen preparat-boverni ishlab chiqarish keng yo'lga qo'yilgan. Tayyor holdagi bu preparat oq yoki kremsimon ko'rinishidagi poroshok bo'lib, 1 g preparatda 1,5 dan 6 mlrd. gacha konidiosporalar mavjud. Sporalar bilan bir qatorda boverin aktivligi zamburug'da sintez qilinadigan toksin boveritsin bilan ham belgilanadi. Bu preparatning ko'payishi dehqonchilikda qo'llaniladigan yadoximikatlarni 90 gacha qisqartirishga imkon beradi.

### Nazorat savollari

1. Biomassani energiyaga aylantiruvchi jarayon haqida ma'lumot bering.
2. Metan gazi hosil bo'lishini birinchi bo'lib kim aniqlagan? Biogaz olish jarayonida ushbu kashfiyotning roli.
3. Organik birikmalarning metanli bijg'ish jarayoni necha bosqichda amalga oshadi?
4. Organik birikmalarning metanli bijg'ish jarayoni qanday ketma-ketlikda boradi?
5. Metanli bijg'ish jarayonida termofil bakteriyalarning roli.
6. Biogaz olish jarayonida qanday mikroorganizmlar ishtirok etadi?
7. Metanli bijg'ish jarayonida uglerod (C)ning roli nimadan iborat?
8. Biogaz olish jarayonida qanday holatda S:N muvozanati buziladi?

### Test savollari

1. Botqoqda metan gazi borligini birinchi bo'lib kim aniqlagan?
  - A) Volta
  - B) J. Nelson
  - C) Rubenshteyn
  - D) Lui Paster

**2. Biogaz olish jarayonida qanday mikroorganizmlar ishtirok etadi?**

- A) Psixrofil, mezofil, termofil
- B) Mezofil, gidrofil, psixrofil
- C) Termofil

**3. Necha metr kub biogaz 20,8 l neftga ekvivalent?**

- A) 28
- B) 20
- C) 25
- D) 50

**4. Organik birikmalarning metanli bijg'ish jarayoni qanday ketma-ketlikda boradi?**

- A) Organik birikmalarni gidrolizlash, fermentatsiya fazasi, atsetonogen, metanogen
- B) Fermentatsiya fazasi, atsetonogen, metanogen, organik birikmalarni gidrolizlash
- C) Gidrolizlash, fermentatsiya, atsetonogen, metanogen
- D) Atsetonogen, metanogen, organik moddalarni gidrolizlash

**5. Quyida ko'rsatilgan texnologik jarayonlardan qaysi biri qo'llanilganda yuqori natijalarga erishiladi?**

- A) Chiqindisiz texnologiya yarashishi
- B) Etanol olish
- C) fotovodorod olish

**6. Biomassani energiyaga aylantiruvchi jarayon qanday ataladi?**

- A) Biometanli bijg'ish
- B) Mikroorganizmlar asosida bijg'ish
- C) Harorat o'zgarishi asosida
- D) Kislotali bijg'ish

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Biotexnologiya va energiya tanqisligi.
2. Chiqindisiz texnologiyalar yaratish.
3. Hozirgi vaqtda biogazning roli.

## VIII BOB. GEN MUHANDISLIGI.

### GENLAR BANKINI YARATISH. TRANSLATSIYA VA INSIATSIYA. O'SIMLIK GEN MUHANDISLIGI

Biotexnologiyaning asosiy yo'lishlaridan biri gen muhandisligi o'tgan asrning 70-yillarida rivojlana boshladi va bugungi kunda ushbu soha jahonshumul muvaffaqiyatlarga erishdi. Bugungi kunda gen muhandisligi qishloq xo'jaligi va ishlab chiqarish, sanoat uchun zarur bo'lgan har qanday geni o'zgartirilgan mahsulotlarni keng miqyosda ishlab chiqarish imkoniyatiga egadir. Gen muhandisligida asosiy obyekt sifatida "biozavod" yoki "biofabrika" vazifasini bajaradigan ba'zi o'simliklarni, sutemizuvchilar, bakteriya va achitqi hujayralarini misol qilish mumkin. Ushbu bioobyektlar bugungi kunda biotibbiyot, tibbiyot, farmatsevtikada keng ishlatiladigan biofaol moddalarni katta hajmda olish va ularni dori-darmon sifatida ishlatish imkonini beradi.

Gen muhandisligi – bu *in vitro* sharoitda funksional faol genetik tuzilmalarni (rekombinant DNK) qurish yoki boshqacha aytganda, sun'iy genetik dasturlarni yaratishdir (A.A Bayev). Ye.S. Piruzyaning fikricha, gen injeneriyasi – bu laboratoriya sharoitida (probirkada) rekombinant yoki gibrid DNK molekulalari deb ataladigan shaklda sun'iy genetik tuzilmalarni yaratish imkonini beradigan eksperimental usullar tizimidir.

Gen muhandisligi – hujayradan tashqarida nuklein kislotalar molekulalari bilan manipulyatsiyalar o'tkazish orqali, genetik materialning yangi birikmalarini olish va yaratilgan gen konstruksiyalarini tirik organizmga o'tkazishdan iborat bo'lib, buning natijasida geni modifikatsiyalangan maqsadli organizm yaratishga erishiladi. Bu oldindan yo'naltirilgan, tanadan tashqarida molekulyar genetik tizimlarni qurish bo'yicha ma'lum dastur bo'lib, ularni keyinchalik tirik organizmga joriy etish mumkin. Shu bilan birga, rekombinant DNK retsipient organizm genetik apparatining ajralmas qismi hisoblanib, unga yangi noyob genetik, biokimyoviy, keyin esa fiziologik xususiyatlarni beradigan gen fragmenti hisoblanadi.

Bu o'rinda amaliy gen muhandisligining maqsadiga to'xtaladigan bo'lsak – shunday rekombinant DNK molekularini loyihalash zarurki, bunda ular genetik apparatga kiritilganida, inson organizmi uchun foydali bo'lgan xususiyatlarni beradigan DNK konstruksiya bo'lishi kerak. Shunday DNK konstruksiyalar farmakologik faol moddalarni ishlab chiqaradigan transgen mikroorganizmlar, shuningdek, inson uchun qimmatli belgilarga ega bo'lgan o'simlik navlari va hayvon zotlarini yaratish imkonini beradigan bo'lishi zarur. Gen muhandisligi usullari genetik sertifikatlashni amalga oshirish, irsiy kasalliklarni tashxislash, DNK vaksinalarini yaratish va turli kasalliklar uchun gen terapiyasini amalga oshirishga keng yo'l ochdi desa to'g'ri bo'ladi.

Bu o'rinda hozirgi kunda insulin va somatotropin kabi muhim gormonlarni faol holda olishda keng ishlatiladigan va gen muhandisligi sohasining asosiy obyektiga aylangan ichak tayoqchasi (*E. coli*)ni misol qilish mumkin. Shuni ta'kidlash joizki, gen muhandisligi sohasi rivojlangunga qadar, insulin gormoni hayvonlarning oshqozon osti bezi hujayralaridan olingan. Shu sababli, ushbu gormonning tannarxi juda yuqori bo'lib, 100 g kristall insulin olish uchun 800–1000 kg oshqozon osti bezi talab etilgan. Bitta qoramol oshqozon osti bezining og'irligi 200–250 gramm ekanligini inobatga olsak, insulin gormonining qanday qimmat preparat ekanligini bilish qiyin emas. Shunga ko'ra bir qator olimlar, 1975–1978-yillarda katta ilmiy tadqiqotlar olib borib, katta yutuqlarga erishdilar. Ayniqsa, "Genentec" kompaniyasi tadqiqotchilari birinchi marta ichak tayoqchasi asosida vektor konstruksiyalab, (maxsus ishlab chiqilgan) bakteriya shtammidan insulin gormonini olishga muvaffaq bo'lishdi.

Insulin 51 aminokislotani o'z ichiga olgan, ikkita zanjiridan iborat polipeptiddir. Ushbu gormon endotoksinlar va boshqa zararli moddalarni o'zida saqlamagan modda hisoblanib, hayvonlardan olingan insulin kabi nojo'ya ta'sirlarni keltirib chiqarmaydi va biologik faolliklari bo'yicha tabiiy manbadan olingan gormondan farq qilmaydi. *E. coli* hujayralarida proinsulin

gormoni ham sintez qilinib, ushbu gormon teskari transkriptaza fermenti yordamida RNK asosida DNK nusxasining sintezini amalga oshiradi. Olingan proinsulin tozalanib, so'ngra undan nativ holatdagi insulin olinadi. Ushbu insulin olish texnologik jarayonlarining bosqichlari optimallashtirilib, bunda 1000 l kultural suyuqlikdan 200 grammacha gormon olish mumkinligi ko'rsatib berildi. Bu esa 1600 kg cho'chqa yoki qoramolning oshqozon osti bezidan ajratilgan insulin miqdoriga teng.

Gen muhandisligi usuli yordamida nafaqat insulin balki, somatotropin- gipofiz bezidan ajralib chiqadigan inson o'sish gormoni ham olingan. Ushbu gormonning yetishmasligi gipofiz rivojlanmasligiga olib keladi. Agar somatotropin haftasiga uch marta tana vazniga qarab, 10 mg dozada qo'llanilsa, unda bir yil ichida ushbu kasallikdan aziyat chekayotgan bola 6 cm ga o'sishi mumkin. Ilgari somatotropin o'lik biomaterialidan olinar edi. Bunda bitta biomaterial asosida farmatsevtika mahsulot sifatida 4-6 mg somatotropin gormoni olish imkoniyati bo'lgan. Shu sababli, gormonni olish ancha mushkul jarayon hisoblangan va uning tannarxi ham qimmat bo'lgan, shu bilan birga ushbu holat ancha qiyinchiliklar tug'dirgan.

1980-yillarga kelib, "Genentec" kompaniyasi bakteriyalardan foydalangan holda yuqorida keltirilgan kamchiliklardan xoli bo'lgan somatotropin gormonini olish texnologiyasini ishlab chiqdi. 1982-yilda esa Fransiyadagi Paster nomidagi ilmiy tekshirish institutida *E.coli* va hayvon hujayralari kulturasidan odamning o'sish gormoni olindi va 1984-yildan boshlab, gormonni sanoat miqyosida ishlab chiqarish yo'lga qo'yildi. Interferon ishlab chiqarishda ham gen muhandislik usullari qo'llanilib, ushbu texnologiyada *E. coli*, *S. cerevisiae* (achitqilari), hamda fibroblastlar kulturasini yoki transformatsiyalangan leykosit hujayralar ishlatilgan.

Bu o'rinda shuni qayd etish kerakki, gen muhandisligiga oid tadqiqotlarni amalga oshirishda rekombinant DNK olish texnologiyasi alohida o'rin egallaydi. Yuqori o'ziga xos DNK-zondlarni ishlab chiqarish rekombinant DNK texnologiyasiga asoslangan bo'lib, ushbu zondlarni gen muhandisligida ishlatilishi

bilan to'qimalarda genlarning ekspressiyasini, xromosomalarda genlarning lokalizatsiyasini o'rganish va yaqin qarindoshlik genlari funksiyalariga ega bo'lgan genlarni aniqlash imkoni tug'ildi. DNK-zondlar tibbiyotda, diagnostikada turli kasalliklar diagnostikasida ham qo'llanila boshladi. Rekombinant DNK texnologiyasi noan'anaviy "teskari genetika" nomli protein-gen yondashuvini amalga oshirishga imkon berdi. Ushbu yondashuvda hujayradan oqsil ajratiladi va ushbu oqsil geni klonlanadi, modifikatsiyalanadi. Oqsilning o'zgartirilgan shaklini kodlaydigan mutant genni yaratilib, hujayra ichiga kiritiladi. Agar ushbu gen ekspressiya amalga ohsa, uni tashuvchi hujayrada, oqsilning o'zgartirilgan shakli sintez bo'ladi. Ushbu gen muhandisligidagi zamonaviy yondashuv, nuqsonli genlarni tuzatishda va irsiy kasalliklarni davolashda keng qo'llaniladi.

Agar gibrid DNK urug'lantirilgan tuxum hujayraga kiritilsa, mutant genni ekspressiyalovchi va uni nasldan naslga o'tkazadigan transgen organizmlarni olish mumkin.

Genetik transformatsiya alohida genlarni va ularning oqsil mahsulotlarini, shuningdek, boshqa genlar faoliyatini tartibga solishda, turli patologik jarayonlarni o'rganish imkonini ham beradi. Genetik muhandisligi asosida hayvonlarning virusli kasalliklarga chidamli liniyalari va odamlar uchun foydali xususiyatlarga ega hayvonlar zotlari ham yaratilgan. Masalan, sigir somatotropin genini o'z ichiga olgan rekombinant DNK ni quyon zigotasiga mikroinyeksiya qilish, ushbu gormon giper mahsulotini ishlab chiqaradigan transgen hayvonni olish imkonini berdi.

### **8.1. Viruslar, faglar, kosmidlar, fazmidlar**

Hujayrani nobud qilmaydigan viruslar bor, lekin mezbon hujayraning genomiga integratsiyalanib, u bilan birgalikda ko'payadi, u bilan birga yoki uning nazoratisiz o'sishga olib keladi, ya'ni saratonga aylantiradi. Bularga SV-40 DNK viruslari va polioma virusi kiradi. Ba'zi onkogen RNK viruslarining kiritilishi hujayradan virusli zarrachalarning kurtaklanishiga olib keladi, uni lizis qilmaydi. Bunday viruslarga, masalan,

retroviruslar (Raus sarkoma virusi va OITS) kiradi. Bakterial hujayralar uchun vektor sifatida ko'pincha bakteriofaglar ishlatiladi.

Viruslar begona DNKni kiritish uchun vektor sifatida asosiy nomzodlardan biridir. Virusli infeksiyada har bir hujayra begona genning ko'p sonli nusxalarini olishi mumkin. DNKni shunday joylashtirish muhimki, u genning yuqori darajadagi ekspressiyasini ta'minlaydigan va uning mahsulotlari tadqiqot uchun qulay bo'ladigan kuchli virusli promotorlar nazoratida bo'lishi kerak.

So'nggi yillarda hayvonlar va bakteriya hujayralarida ko'payish qobiliyatiga ega bo'lgan va hayvonlar hujayralarida klonlangan genni samarali ekspressiya qila oladigan ko'plab "chelnok" vektorlar va ularning rekombinant hosilalari yaratilgan. Eng keng tarqalgan vektorlar pBR322 plazmidi va intakt DNK SV40 transkripti, kerakli gen promotori yoki qo'shimcha erta promotor nazorati ostida kiritiladi. Masalan, SV40 DNK ga quyon  $\beta$ -globin geni joylashtirilgan, u rekombinant virus bilan kasallangan maymun hujayra liniyasiga ekspressiyalangan. Globin genining mRNKsi ham, oqsilning o'zi ham hujayralarda sintez qilingan.

Virus DNKga rekombinatsiya qilinganidan keyin, u hayotchanligini yo'qotmasligi kerak. Viruslarning bakteriyalarga kirishi ancha oson kechadi. Viruslarning vektor sifatidagi kamchiliklari ham mavjud bo'lib, ulardan biri bu ularning juda kichik hajmga egaligidir. Bundan tashqari, viruslar kichik doiradagi xo'jayinlarni zararlantiradi.

Fag DNK si va plazmidlarni o'z ichiga olgan gibrid vektorlar ham mavjud. Bularga, masalan, *kosmidlar* va *fazmidlar* kiradi.

*Kosmidlar* – bu plazmid vektorlari, ularda  $\lambda$  fag genomining uchastkasi kiritilgan bo'lib, DNK molekulasini fag zarrachasiga joylashishini ta'minlash imkoniyatini beradi. Fag zarralari gibrid DNKning hujayra ichiga yaxshi kirib borishini ta'minlaydi (inyeksiya yo'li bilan), shundan so'ng DNK yopishqoq uchlarida halqaga yopiladi va plazmid turi bo'yicha replikatsiya qilinadi. *Fazmidlar*, shuningdek, fag va plazmid o'rtasidagi duragaylardir.

Begona DNK kiritilgandan so'ng, bir xil sharoitda ba'zida faglar, ba'zan esa plazmidlar shaklida rivojlanishi mumkin.

**Xloroplast va mitoxondrial DNK** ham genlarni hujayraga o'tkazishda ishlatish mumkin bo'lgan vektor sifatida olimlarning e'tiborini tortmoqda. Ushbu hujayrali subgenomlarning strukturaviy tashkil etilishi sezilarli darajada farq qiladi.

Xloroplastlar va boshqa plastidlar plastom deb ataladigan bir xil genetik ma'lumotga ega. Yuqori o'simliklarda, u 100 ga yaqin oqsillarni kodlash uchun yetarli bo'lgan 150 (t.n.p) ming juft nukleotid uzunlikdagi yopiq DNK molekulasidir. Plastidlarni sintez qilish uchun sezilarli darajada ko'proq oqsillar kerak. Qolgan oqsillar yadro tomonidan kodlanadi, sitoplazmada sintezlanadi va xloroplastlarga kiradi. Eng muhim xloroplast oqsillarining ba'zilari bir nechta oqsillari subbirliklardan iborat, ularning ba'zilari sitoplazma ribosomalarida sintezlanadi va xloroplastga transport bo'ladi va u yerda xloroplastning o'zida kodlangan hamda sintez qilingan boshqa polipeptidlar bilan birlashadi. Shunday qilib, funksional faol xloroplastning biosintezi uchun genom va plastomning muvofiqlashtirilgan ekspressiyasi zarur bo'ladi.

Xloroplast DNKdan farqli o'laroq, mitoxondrial DNK juda xilma-xilligi va o'lchamlari bilan ajralib turadi va ularning kattaligi 200 dan 2400 t. n. p.. tashkil etadi. Biroq, mitoxondrial genomning kattaligi va izolyatsiya qilingan mitoxondriyalar tomonidan sintez qilingan protein mahsulotlari soni o'rtasida hech qanday bog'liqlik yo'q. Bu hodisa, shuningdek, mitoxondrial DNKning katta hajmi, mitoxondriyaning ishlashi uchun foydasiz bo'lgan DNK mavjudligi bilan izohlanishi mumkin.

Mitoxondrial DNK tarkibida polipeptidlarni kodlovchi strukturaviy genlar, ribosomalar uchun genlar va transport RNK mavjud. Biroq, mitoxondrial oqsillarning aksariyati, xloroplastlar kabi, yadro genlari bilan kodlangan. Lekin xloroplastlar genomi katta halqali molekulalarning gomogen populyatsiyasi bilan ifodalanganligi sababli, mitoxondriyalar bir nechta halqali molekulalarni o'z ichiga oladi, ammo ularning hammasini funksiyasi hali ham aniqlanmagan.

### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligida viruslar qanday maqsadlarda ishlatiladi?
2. Faglar qanday tuzilishga ega, nima maqsadda ishlatiladi?
3. Kosmidlar haqida batafsil ma'lumot bering, kosmidlar gen muhandisligida nima maqsadda ishlatiladi?
4. Fazmidlar qanday tuzilishga ega, nima maqsadda ishlatiladi?
5. Gen muhandisligida viruslardan vektor konstruksiya sifatida foydalanish mumkinmi?
6. Xloroplast va mitoxondrial DNK genlarni hujayraga o'tkazishda vektor sifatida ishlatish mumkinmi?

### Test savollari

#### 1. Gen muhandisligi bu ..... amaliyotidir:

- A) hujayralarning irsiy xususiyatini ma'lum maqsadga ko'ra yo'naltirish orqali genetik axborotini o'zgartirish
- B) tirik mikroorganizmlarni o'simliklar yoki hayvonlar to'qimasiga ko'chirib o'tkazish
- C) o'simliklarning yangi navlari va hayvonlarning yangi zotlarini yaratish
- D) yangi toifadagi hujayralarni olish

#### 2. Viroidlar qachon kashf etilgan?

- A) 1971
- B) 1968
- C) 1973
- D) 1977

#### 3. Viroidlar qanday tuzilgan?

- A) 1 zanjirli RNK dan
- B) zanjirli DNK dan
- C) 2 zanjirli RNK dan
- D) 2 zanjirli DNK dan
- E) 2 zanjirli RNK dan

#### 4. Viroidlarning nuklein kislotalari oqsillari bilan...

- A) Birikmagan
- B) Birikkan

- C) Ajralgan
- D) Adsorbsiyalangan

**5. Hujayra muhandisligi nimaga asoslangan?**

A) O'simlik yoki hayvonlar hujayralarini organizmdan tashqarida o'stirish;

- B) O'simlik va hayvonlarni tanlash
- C) O'simliklarni saralash
- D) Genlarni sintezlash

**6. In vitro sharoitida funksional faol genetik strukturalarni klonlash qanday ataladi?**

- A) Genetik injeneriya
- B) Klonlash
- C) Yig'ish
- D) GMO

**7. Irsiy axborotlarning hujayrada saqlanishi quyidagi molekularlarning qaysi birida amalga oshadi?**

- A) DNK da
- B) oqsillarda
- C) i RNKda
- D) t- RNKda

**Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Plazmidalar va boshqa vektorlar.
2. Vektorlarni organizm genomiga kiritish.
3. Mikroorganizmlar gen muhandisligi.

**8.2. Transpozonlar**

Transpozonlar DNK segmentlari bo'lib, ular bir joydan o'zlarining transpozitsiyasini (harakatini) boshqaradi, ya'ni DNKni kesib olib, boshqa xromosoma yoki plazmida DNKni yangi joyiga kiritish kabi jarayonlarda ishtirok etadi. Ular birinchi marta 40-yillarda amerikalik olim Barbara Mak-Klintok tomonidan makkajo'xori tarkibida topilgan. Ushbu genlar, makkajo'xori genlarining ekspressiyasini bloklash xususiyatiga ko'ra indentifikatsiya (aniqlangan) qilingan bo'lib, o'simlikning genomi bo'ylab harakat qilish imkoniga egadirlar. Regulator

elementlar (tartibga soluvchi elementlar)ning kiritilishi avval o'chiq bo'lgan genlarni ishlay boshlashini ta'minlaydi.

Ma'lum bo'lishicha, regulyator elementlar bilan bog'liq genlar beqaror bo'lib, ko'pincha bu elementlarning beqarorligi tufayli mutatsiyaga uchragan. Ko'p yillar davomida makkajo'xori bunday mobil genetik elementlar topilgan yagona tizim bo'lgan. Endi esa bakteriyalar, drozofillar va boshqa organizmlarda ham aniqlangan.

DNK fragmentlarining genom bo'ylab harakatlanish mexanizmi to'liq aniqlanmagan. Ushbu jarayonda fragment DNK transpozaza fermenti yordamida tashiladi. Ferment transpozonning o'rtasida taxminan 20 ta nukleotidlar ketma-ketligi bilan kodlanadi va mobil elementning oxirgi uchlari bilan spetsifik ta'sirlashib, uni xromosomadan kesib ajratib olishi mumkin. Kesish aniq sodir bo'lishi mumkin, ya'ni DNK uchastkasining asl strukturasi (tuzilishini) tiklash bilan va noaniq, ya'ni bir yoki bir nechta nukleotidlarni ajratish va kiritish bilan. Bu yangi DNK ketma-ketligini yaratish mexanizmlaridan biri bo'lib, barqaror mutatsiyalarning paydo bo'lishiga olib keladi.

Transpozonlar genlarning gorizontal uzatilishida ham ishtirok etadi.

Bakteriyalarda 2 sinf mobil (harakatchan) genlar topilgan, ular uzunligi va murakkab tuzilishi bilan farqlanadi.

**1. Inersion ketma-ketliklar, yoki IS elementlar**, uzunligi taxminan ming juft nukleotidlarga ega bo'lgan va faqat ularning harakati uchun mas'ul bo'lgan genni o'z ichiga olgan elementlar.

**2. Transpozonlar**, uzunligi 3 dan 20 minggaacha nukleotid ketma-ketligiga ega bo'lib, bakteriyalarni turli toksik moddalarga chidamliligiga mas'ul bo'lgan bir qator qo'shimcha genlardan iborat.

Mobil genlar genom ichida bir joydan ikkinchi joyga ko'chishi mumkinligi sababli, ular rekombinant DNKni uzatish uchun juda samarali vektorlar bo'lishi mumkin. Transpozonlar asosidagi vektorlar yordamida genetik transformatsiya birinchi marta drozofillada amalga oshirilgan. Transpozon elementi yordamida R drozofillaga ko'zlar jigarrangligini ta'minlovchi gen

o'tkazilgan. Transpozonlar yordamida genlarni uzatish juda katta afzalliklarga ega, chunki u yuqori chastotada sodir bo'ladi va integratsiyalangan DNKni sezilarli darajada qayta tashkil etilishini talab qilmaydi. Bundan tashqari, ushbu usul yordamida juda katta DNK fragmentlarini kiritish mumkin.

### Nazorat savollari

1. Transpozonlar qanday tuzilishga ega?
2. Transpozonlar qachon va kim tomonidan aniqlangan?
3. Transpozonlar gen muhandisligida nima maqsadda ishlatiladi?

### Test savollari

#### 1. Transpozonlar qanday shaklga ega bo'ladi?

- A) To'g'ri chiziqli
- B) Halqasimon;
- C) Spiralsimon.
- D) Zanjir ko'rinishida

#### 2. Transpozonlar qachon kashf etilgan?

- A) 30-yillarda
- B) 40-yillarda
- C) 1971-yilda
- D) 20-yillarda

#### 3. Transpozonlarni kim kashf etgan?

- A) Barbara Mak Klintok
- B) Pol Berg
- C) Frederik Senger
- D) Mak Leod

#### 4. Transpozonlar villar «panshaxa»lari evolutsiyasida muhim rol o'ynaydimi?

- A) Ha
- B) Yo'q
- C) Qisman
- D) Evolutsiyasiga bog'liq emas

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Transpozonlar va boshqa vektorlar.
2. Vektorlarni organizm genomiga kiritish.

## IX BOB. GEN MUHANDISLIGIDA ISHLATILADIGAN FERMENTLAR BA ULARNI QO‘LLASH. PLAZMIDALAR BA ULAR ASOSIDAGI VEKTORLAR

Gen muhandisligida genetik enzimologiya nuklein kislotalar kimyosi yutuqlari tufayli muvaffaqiyatlarga erishdi. Genetik enzimologiyaning asosiy quroli va molekulyar manipulyatsiyaning asosiy vositalari – fermentlar hisoblanadi. Gen muhandisligida ishlatiladigan asosiy fermentlarga restriktazlar, ligazalar, polimerazalar kiradi. Hujayralar va hujayra organellalari bilan ishlashda fermentlarning roli katta. Sababi DNK va RNK makromolekulalari bilan ishlashda kichik mikrojarrohlik asboblari yordam bermaydi. Bunda "skalpel", "qaychi" va "tikuv uchun ip" vazifalarini fermentlar bajaradi.

Faqat ushbu fermentlarga nukleotidlarning ma'lum ketma-ketligini spetsifik ravishda topa oladi, u yerda molekulani "kesadi" yoki aksincha, DNK zanjiridagi uzulishni "tikadi". Ushbu fermentlar hujayrada uzoq vaqtdan beri o'zlariga xos funksiyani bajaradilar. Ya'ni DNK hujayra bo'linishida replikatsiya (ikki marta ko'payish) ishini bajaradilar, shikastlangan uchastkalarni tiklash (molekulaning yaxlitligini tiklash), genetik ma'lumotni hujayradan hujayraga uzatish jarayonlarida va h.k. Gen muhandisligida qo'yilgan vazifaga qarab, ferment tanlanadi. Shuni ta'kidlash kerakki, gen muhandisligida qo'llaniladigan fermentlar turlarga xos spetsifik emas, shuning uchun tadqiqotchi o'zi tanlagan ketma-ketlikda DNK bo'laklarini bir butun qilib, birlashtira oladi. Ushbu holat gen muhandisligida tabiat tomonidan o'rnatilgan turlararo to'siqlarni yengib o'tishga va turlararo chatishtirishni amalga oshirishga imkon beradi.

Rekombinant DNKni konstruksiya qilishda (qurishda) ishlatiladigan fermentlarni bir necha guruhlariga bo'lish mumkin:

– DNK fragmentlarini olishda ishlatiladigan fermentlar (restriktaza fermentlari);

– DNK yoki RNK matritsada DNKni sintez qiluvchi fermentlar: DNK (polimerazalar) yoki RNK (teskari transkriptazalar);

– DNK fragmentlarini bog'lovchi fermentlar (ligazalar);

– DNK fragmentlari uchlari (strukturasi) tuzilishini o'zgartirishga imkon beruvchi fermentlar.

### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligida ishlatiladigan fermentlar qanday vazifani bajaradi?

2. Rekombinant DNKni konstruksiya qilishda (qurishda) ishlatiladigan fermentlar qanday guruhlarga bo'linadi?

3. Gen muhandisligida ishlatiladigan fermentlar qanday guruhlarga bo'linadi?

### Test savollari

1. *Streptomyces* albusdan ajratilgan restriktazaning nomi nima?

- A) Sal GI
- B) EcoRI
- C) BamHI
- D) KpnI

2. *Escherichia coli* dan ajratilgan restriktazaning nomi nima?

- A) EcoRI
- B) Sal GI
- C) BamHI
- D) KpnI

3. Xromosoma chegarasida DNK ning muayyan uchastkalari migratsiyasiga javobgar genetik element nomini ko'rsating

- A) Transpozonlar
- B) Mezonlar
- C) Myuonlar
- D) Mionlar

**4. Matritsa sintezining mohiyati nimada?**

- A) o'zining tuzilishiga o'xshash tuzilmalardan molekularning sintez qilinishida
- B) aynan bir xil kimyoviy reaksiyalarning mavjudligida
- C) bir xil tuzilishga ega moddalarning sintezida
- D) o'ziga xos mahsulotlarning hosil bo'lishida.

**5. Oqsil biosintezida matritsa rolini quyidagilardan qaysi biri bajaradi?**

- A) i- RNK
- B) t- RNK
- C) DNK
- D) Oqsil

**6. Genlar qanday ma'lumotlarni saqlashi mumkin?**

- A) Oqsilning birlamchi strukturasi to'g'risidagi
- B) Oqsilning ikkilamchi strukturasi to'g'risidagi
- C) Oqsilning uchlamchi strukturasi to'g'risidagi
- D) Aminokislotalar to'g'risidagi

**7. Replikatsiya bu....**

- A) DNK molekulasining sintezi
- B) RNK molekulasining sintezi
- C) Oqsil molekulasining sintezi
- D) Oqsil molekulasining birlamlamchi sintezi

**8. Transkrpitsiya bu ...**

- A) i- RNK sintezi
- B) r RNK sintezi
- C) qiz DNK lar sintezi
- D) oqsil sintezi

**9. Translyatsiya jarayoni bu ...**

- A) aminokislotalarning zanjir bo'lib ulanishi
- B) ATF ning ribosomalarga qarab siljishi
- C) Aminokislotalarning ribosomalarga qarab harakatlanishi
- D) i-RNK ning ribosomalarga siljishi

**10. Turli kasalliklar diagnostikasida zamon talabiga javob beradigan testni ko'rsating.**

- A) Immunoferment testlar
- B) Pretsipitatsion testlar
- C) Agglyutinatsion testlar

## Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Gen muhandisligida ishlatiladigan fermentlar va ularning xususiyatlari.
2. Molekulyar biotexnologiya. DNK, RNK va oqsillar sintezi.
3. Gen muhandisligining tibbiyot bilan uzviy bog'liqligi.

### 9.1. Restriktazalar

Restriktaza fermentlari (Restriksiya qiluvchi endonukleazalari, Restriktaza endonukleazlari) – DNK molekulasidagi (restriksiya saytlari) o'ziga xos ma'lum nukleotidlar ketma-ketligini taniydigan va ularga hujum qiladigan fermentlardir. 1953-yilda boshqa shtammning hujayralariga kiritilgan *E. coli* ma'lum shtammining DNK si (masalan, B shtammning DNK si – C shtammi hujayralariga) tezda kichik fragmentlarga parchalanib, genetik faollikni namoyon qilmasligi aniqlangan.

1966 yilda ushbu hodisa mezbon DNKning spesifik modifikatsiyasi bilan bog'liqligi ko'rsatilgan - mezbon DNK modifikatsiya qilinmagan DNKda mavjud bo'lmagan bir nechta metillangan asoslarni u o'z ichiga oladi, jumladan metillanish (ya'ni, asosga metil guruhini qo'shish) replikatsiya tugagandan so'ng sodir bo'ladi. Bakteriya o'z DNKsini har qanday "begona" DNKdan modifikatsiyasi turiga ko'ra aniq ajrata oladi. DNK-metilazalar – deb ataladigan modifikatsiyaning metillashtiruvchi fermentlari «metka», ya'ni "yorliq" uchun javobgardir. Modifikatsiyadagi farqlanish begona DNKni tegishli saytlarda metil guruhlari yo'qligini taniydigan restriktaza fermentlari ta'siriga sezgir qiladi.

Bakteriyalarda restriksiya va modifikatsiyalash tizimlari keng tarqalgan; ularning mavjudligi rezident DNKni kelib chiqishi ketma-ketligi begona bo'lgan ketma-ketliklar bilan ifloslanishdan himoya qilishda muhim rol o'ynaydi.

Metillanmagan DNKni parchalaydigan restriktaza ferment 1968-yilda Mezelson va Yuan tomonidan ajratilgan. Bu ferment ma'lum bir DNK ketma-ketligiga nisbatan yuqori spetsifik edi, lekin u molekullarni nospetsifik ravishda, boshqa joyda, tanib

olish uchastkasidan ma'lum masofada parchalagan. Ko'p o'tmay, 1970-yilda Smit va Vilkoeks *Haemophilus influenzae* dan qat'iy belgilangan DNK ketma-ketligini parchalaydigan birinchi restriktaza fermentini ajratdilar (Hind III). Turli bakteriyalar o'zlarining DNKlarini boshqacha belgilashlari sababli, restriktaza fermentlari ham turli xil ketma-ketlikni taniy olishlari kerak. Haqiqatan ham, o'shandan beri 150 dan ortiq restrikt saytlarini (DNK parchalanish joylari) taniydigan restriktaza fermentlari ajratilgan.

### Nazorat savollari

1. Restriktaza fermentlari gen muhandisligida qanday vazifani bajaradi?
2. Restriktaza fermentlari ta'sirida qachon va kim tomonidan ajratilgan?

### Test savollari

1. Restriktaza-ligaza usulini kim birinchi bo'lib kashf etgan?
  - A) Koen
  - B) Berg
  - C) Mak Leod
  - D) Eyveri
2. Restriktaza-ligaza usulida DNK molekulasi uchlarining birikishi qanday amalga oshadi?
  - A) Yopishqoq-yopishqoq
  - B) Yopishqoq-to'mtoq
  - C) To'mtoq-to'mtoq uchlari yordamida.
  - D) Turli nomdagi yopishqoq;
3. DNKning ikki xil tipini restriktazalar yordamida parchalanishidan hosil bo'lgan quyidagi qismlarning qaysi biri uchun linkerlar qo'llaniladi?
  - A) Turli nomdagi yopishqoq
  - B) Bir nomdagi yopishqoq
  - C) To'mtoq uchlar uchun.
  - D) To'mtoq- to'mtoq uchlari

4. DNKni 2 xil tipdagi restriktazalar bilan qirqqanda qanday uchlar hosil bo'ladi?

- A) To'mtoq va yopishqoq
- B) Bir nomdagi yopishqoq
- C) To'mtoq
- D) Turli nomdagi yopishqoq;

5. Restriktazalar yordamida parchalanishi natijasida olingan DNKning 2 xil tipi qismlari uchun linkerlar qachon qo'llanilmaydi?

- A) Bir nomdagi yopishqoq
- B) Turli nomdagi yopishqoq
- C) To'mtoq
- D) To'mtoq va yopishqoq uchlar hosil bo'lganda

## 9.2. Polimerazalar

Birinchi marta DNK polimeraza 1958-yilda Kornberg va boshqa tadqiqotchilar tomonidan E. coli.dan ajratilgan.

E. coli (Pol I) DNK polimeraza I ikki zanjirli halqali DNK molekulalari bilan bog'lanmaydi. Biroq, bunday molekulalarni denaturatsiya qilib, bir zanjirli shakllarni olish mumkin, so'ngra polimeraza ushbu uchastkalarining uzunligiga proporsional ravishda bog'lanadi, ya'ni 300 ta nukleotid qoldig'iga taxminan bitta molekula. Pol I DNK qo'sh spiralining bir zanjirli uchastkalari bilan, bir zanjirli uzilish joylarida Z'-gidroqsilva 5'-fosfat bilan, shuningdek, ikki zanjirli DNK molekulalarining uchlari bilan ham bog'lanadi.

Ferment molekulyar og'irligi 103 kDa bo'lgan monomer polipeptid zanjiridan iborat va 3 domenli strukturaga ega. Har bir domen o'ziga xos fermentativ faollikka ega: 5'-3' polimeraza, 3'-5' ekzonukleaza, 5' - 3' ekzonukleaza.

1. **5'-3' polimeraza faolligi.** Reaksiya uchun bir zanjirli DNK-matrisa va bu zanjirga komplementar 3'-ON -oxirli fragment - praymer mavjud bo'lishligi talab qilinadi.

2. **3'-5' ekzonukleaza faolligi.** 3'-ON oxirli bir yoki ikki zanjirli DNKni gidrolizlaydi. 3'-5' nukleaza DNKning juft bo'lmagan qismlarida diefir bog'ini parchalaydi. Ma'lumki,

polimeraza reaksiyasi paytida ma'lum bir chastotada, o'sib borayotgan zanjirga komplementar bo'lmagan nukleotidni kiritish mumkin. Biroq, polimeraza uning ishtirokida hosil bo'lgan noto'g'ri juftlashgan oxirlariga nukleotid biriktira olmaydi. Bunda noto'g'ri nukleotidni olib tashlaydigan 3'—5' ekzonukleaza yordamga keladi, keyinchalik u to'g'ri nukleotid — predshestvennikka almashtiriladi. 3'—5' ekzonukleolitik faollik DNK sinteziga qarama-qarshi yo'nalishda namoyon bo'ladi. Shunday qilib, DNK polimerazaning 3'—5' ekzonukleaza faolligi matritsa tomonidan yo'naltirilgan polimerizatsiyaning aniqligida muhim rol o'ynaydi. Optimal sharoitda bu ekzonukleazaning samaradorligi yoki aylanishlari soni polimeraza faolligi bo'lgan subbirliklarning aylanish sonining 2% ni tashkil qiladi.

**3. 5'—3' ekzonukleaza faolligi.** Ikki zanjirli DNKning bir zanjirini erkin 5' oxiridan boshlab parchalaydi. 3'—5' ekzonukleazadan farqli o'laroq, 5'—3' ekzonukleaza qo'sh zanjirli DNK molekulasining juftlashgan uchastkalarida diefir bog'ini parchalaydi. Bundan tashqari, 3'—5' nukleaza bir vaqtning o'zida faqat bitta nukleotidni parchalaydi, 5'—3' nukleaza 5'-oxiridan boshlab o'ntagacha bo'lgan oligonukleotidlarni qoldig'ini (gidroliz mahsulotlarining taxminan 20%) kesib tashlashi mumkin: bir vaqtning o'zida polimerizatsiya reaksiyasi bilan nukleazalarning bo'linish tezligi ortadi. Bunda DNK gidrolizi mahsulotlarida oligonukleotidlarning nisbiy miqdori oshadi.

Fermentativ faolliklarning bunday kombinatsiyasi *E. coli* DNK polimeraza I ning *in vivo* holatda DNK shikastlanishini tiklanishida faol rol o'ynashiga imkon beradi. N — oxirli domeni "qo'shni" halqa bilan aminokislotalar qoldiqlaridan tashkil topgan halqa yordamida bog'langan va proteolitik fermentlar tomonidan osongina ajratiladi. Qolgan qismi polimeraza va 3' — 5' ekzonukleazalardan tashkil topganligi uchun ikki funksiyalidir. Unga **Klenov fragmenti** deb ataladi (uni tasvirlagan mualliflardan birining ismi bilan). Klenovning fragmenti (Pol IK) odatda restriktaza fermentlar tomonidan hosil qilinadigan bir zanjirli 5'-oxirlarini ikki zanjirli DNK molekulalarining to'ntoq

holatiga o'tkazish uchun ishlatiladi; bir zanjirli DNKda ikkinchi zanjirni sintez qilish uchun, shuningdek, ikki zanjirli DNK molekulalarida bir zanjirli Z'-oxirlarini gidroliz qilish uchun ishlatiladi.

### Nazorat savollari

1. Polimeraza fermentlari qachon va kim tomonidan ajratilgan?
2. Gen muhandisligida ishlatiladigan fermentlar qanday fermentativ faolliklarga ega?
3. Polimeraza fermentlari o'ziga xos xususiyatlari nimalardan iborat?
4. Polimeraza fermentlari gen muhandisligida nima maqsadda ishlatiladi?

### Test savollari

**1. DNKning to'mtoq uchlarini tikishda ligaza qanday miqdorda ishlatiladi?**

- A) Ortiqcha
- B) Standart
- C) Kam
- D) Umuman ishlatilmaydi

**2. Amplikatsiya nima?**

- A) RNK molekulasini polimeraza fermenti yordamida sintezi
- B) Genni (DNK molekulasi yoki uning fragmenti) izchillik bilan ko'p marotalab nusxalanishi
- C) DNK molekulasining vodorod bog'lar yordamida bog'lanishi
- D) DNKdan RNK sintezi

### 9.3. Teskari transkriptaza

Teskari transkriptaza DNKning komplementar zanjiriga mRNKni ko'chirish (transkripsiya) uchun ishlatiladi. Genomi bir zanjirli RNK molekulalaridan iborat bo'lgan retroviruslarni o'rganish davomida ma'lum bo'ldiki, hujayra ichki rivojlanish jarayonida retrovirus o'z genomini ikki zanjirli DNK shaklida

xromosomalarga integratsiyalash bosqichidan o'tishi aniqlandi. 1964 yilda Temin RNK-matritsada komplementar DNKni sintez qilish qobiliyatiga ega bo'lgan virus-spetsifik ferment mavjudligi haqidagi farazni ilgari surdi. Bunday fermentni ajratish bo'yicha urinishlar muvaffaqiyatli bo'ldi va 1970-yilda Janob Temin Mizutani bilan birgalikda, shuningdek, ulardan mustaqil ravishda Baltimor Rous sarkomasi virusining hujayradan tashqari virionlari preparatida ushbu fermentni topdi. Ushbu RNK – bog'liq DNK – polimeraza **teskari transkriptaza** yoki **revertaza** deb ataladi.

Parranda retroviruslarining revertazasi batafsil o'rganilgan. Har bir virionda bu fermentning 50 ga yaqin molekulari mavjud. Teskari transkriptaza ikkita subbirlikdan iborat: a (65 kDa) va b (95 kDa), ekvimolyar miqdorda mavjud. Teskari transkriptaza kamida uchta fermentativ faollikka ega:

1) RNK va DNK kabi matrisa sifatida ishlatiladigan DNK polimeraza;

2) RNKaza N faolligi bilan, ya'ni RNK-DNK gibridi tarkibida RNKni gidrolizlovchi RNKaza N faolligi, lekin bir yoki ikki zanjirli RNK emas;

3) DNK endonukleaza faolligi.

Virus DNK sintezi uchun birinchi ikkita faollik zarur, endonukleaza virus DNKsini xo'jayin hujayra genomiga integratsiya qilish uchun muhimdir. Tozalangan teskari transkriptaza RNK va DNK matritsalarida DNKni sintez qiladi. Revertazaga, boshqa polimerazalar singari, sintezni boshlashi uchun qisqa ikki zanjirli hudud (praymer) zarur. RNK va DNKning bir zanjirli segmenti praymer bo'lib xizmat qilishi mumkin, ular reaksiya davomida yangi sintez qilingan DNK zanjiri bilan kovalent bog'lanadi.

Teskari transkriptaza asosan matritsa RNKni komplementarga DNK (kDNK)ga ko'chirish (transkripsiya) uchun ishlatiladi. Teskari transkripsiya reaksiyasi maxsus tanlangan sharoitlarda RNKaza faolligi kuchli bo'lgan ingibitorlar yordamida amalga oshiriladi. Bunday holda, maqsadli RNK molekularining to'liq uzunlikdagi DNK nusxalarini olish mumkin. Poli (A)-tutuvchi mRNK teskari transkripsiyasi uchun oligo (dT), 3'-poli (A)

oxirlari bo'lmagan RNK molekulalari uchun kimyoviy sintezlangan oligonukleotidlar praymer sifatida ishlatiladi. mRNK da komplementar DNK zanjiri sintez bo'lganidan va RNK parchalanganidan so'ng (odatda, ishqor bilan ishlov beriladi) DNKning ikkinchi zanjirining sintezini amalga oshiriladi. Bunday holda revertaza xususiyatlaridan foydalaniladi, ya'ni revertazaning bir zanjirli kDNK ning 3'-oxirlarida praymer funksiyasini bajara oladigan o'z-o'ziga komplementar ilmoqlar (shpilka) hosil qilish xususiyatlari qo'llaniladi.

DNKning birinchi zanjiri matritsa vazifasini bajaradi. Ushbu reaksiya revertaza va E. coli DNK polimeraza I tomonidan katalizlanishi mumkin. Ushbu ikki fermentning kombinatsiyasi to'liq ikki zanjirli kDNK molekulalarining ajralib chiqishi samaradorligining oshishini ta'minlaydi. Sintez tugagandan so'ng, kDNK birinchi va ikkinchi zanjirlari ilmoqlar (shpilka) bilan kovalent bog'lanib, ikkinchi zanjirning sintezida praymer bo'lib xizmat qiladi. Bu halqa nuklein kislotalarning bir zanjirli uchastkalarini spetsifik parchalaydigan S1- endonukleaza bilan parchalanadi. Hosil bo'lgan oxirlar har doim ham to'mtoq bo'lmaydi, shu sababli keyingi klonlash samaradorligini oshirish uchun ushbu oxirlarga E. coli DNK polimerazasining I Klenov fragmenti yordamida to'mtoq qilib tiklanadi. Olingan ikki zanjirli kDNKni keyinchalik klonlash vektorlariga kiritish, gibrid DNK molekulalarining tarkibida ko'paytirish va keyingi tadqiqotlarda foydalanish mumkin.

### Nazorat savollari

1. Teskari transkriptaza qanday jarayon?
2. Teskari transkriptaza gen muhandisligida nima maqsadda ishlatiladi?
3. Teskari transkriptaza qanday fermentativ faollikka ega?

### Test savollari

1. DNKning matritsa RNKsidagi sintezi uchun qaysi ferment javobgar bo'ladi?
  - A) Teskari transkriptaza
  - B) Restriktaza

C) Polimeraza

D) Ligaza

**2. DNKning denaturatsiyasi uchun:**

A) pH muhiti ishqoriy va haroratning yuqori bo'lishi talab etiladi

B) pH muhiti kislotali bo'lish

C) pH muhiti kislotali va yuqori harorat bo'lishi

D) pH muhiti ishqoriy bo'lishi

**3. DNK denaturatsiyasi uchun qanday harorat talab etiladi 0(S):**

A) 94

B) 65

C) 97

D) 95

**4. DNK renaturatsiyasi uchun qanday harorat talab etiladi (0S)?**

A) 50-65

B) 37-45

C) 100

D) 94-96

**5. Gibridizatsiyada quyidagilarning qaysilari birlashishi mumkin?**

A) Yuqoridagilarning barchasi

B) DNK-RNK

C) RNK-RNK

D) DNK-DNK

#### **9.4. Ligazalar**

1961-yilda Mezelson va Veygl olimlar, rekombinatsiya – DNK molekulalarining parchalanishi va keyinchalik qayta birlashishini o'z ichiga olishini fag I misolida ko'rsatdilar. Ushbu ma'lumotlar DNK fragmentlarini o'zaro bog'lanishida (ya'ni tikilishida) ishtirok etuvchi fermentni aniqlash uchun asos bo'ldi. 1967-yilda shunday ferment topildi va DNK-ligaza deb nomlandi. DNK-ligaza ikki zanjirli nuklein kislota molekulasidagi fosfodiefir bog'i sintezini katalizlaydi.

Boshqacha qilib aytganda, DNK-ligazalar – shakar qoldiqlari o‘rtasida bog‘ hosil qilib, yonida joylashgan qo‘shni nukleotidlarni o‘zaro bog‘laydi. DNK-ligazalar DNKning tiklanish jarayonlarida (reparatsiya), replikatsiya jarayonlarida – DNK zanjirini ikki barobar ko‘payishida juda zarurdir.

Gen muhandisligida kofaktor talablari va ta‘sir qilish xususiyatlariga ko‘ra farqlanuvchi 2 turdagi DNK ligazalar ishlatiladi. E. coli DNK-ligazasi kofaktor sifatida difosfopiridin nukleotididan foydalanadi, T4 fag ligazasi esa  $Mg^{2+}$  ishtirokida ATFDan foydalanadi. T4 fag ligazasi universal bo‘lib, yopishqoq uchlarni bog‘lashdan tashqari, to‘mtiq uchlari bo‘lgan ikki zanjirli DNK bo‘laklarining birlashishi reaksiyasini katalizlash xususiyatiga ega va shu sababli tez-tez ishlatiladi.

### Nazorat savollari

1. Ligaza fermentlari qanday xususiyatlarga ega?
2. Gen muhandisligida ligazalar qanday maqsadlarda ishlatiladi?

### Test savollari

**1. Tadqiq etiladigan nuklein kislotalarning DNK-zondi bilan gibridizatsiyasi qayerda amalga oshiriladi?**

- A) Nitrotsellulozada
- B) Gelda
- C) Eritmada
- D) Sellulozada

**2. Odatda har qanday hujayraga kirgan begona DNK o‘z faolligini namoyon eta olmaydi, chunki u quyidagi fermentlarning biri ta‘sirida parchalanadi:**

- A) Restriktaza
- B) Metilaza
- C) Ligaza
- D) Transkriptaza

**3. Gen muhandisligiga qachon asos solingan:**

- A) 1972
- B) 1971

C) 1973

D) 1974

4. DNKning muayyan aniq ketma-ketligini qirqadigan restriktazani birinchi bo'lib kim ajratib olgan?

A) Smit va Vilkoks

B) Mezelson va Veygl

C) Mezelson va Yuan

D) Berg

5. DNK molekulasining qaysi uchlarini terminal transferaza birikishi uchun katalizlaydi?

A) 3'-OH

B) 5'-OH

C) 5'-P

D) 3'-P

6. DNKning matritsa RNK sidagi sintezi uchun qaysi ferment javobgar bo'ladi?

A) Teskari transkriptaza

B) Restriktaza

C) Polimeraza

D) Ligaza

### 9.5. Terminal transferaza va poli-A - polimeraza

**Terminal transferaza** (dezoksinukleotidiltransferaza oxirlari) Bollum tomonidan 1962-yilda buzoq timusidan kashf etilgan.

Terminal transferaza uchun Z'-ON oxirli bir zanjirli DNK yoki bir zanjirli Z'-ON oxiri bo'lgan ikki zanjirli DNK substrat bo'lib hisoblanadi ( $Mg^{2+}$  ionlari kofaktor sifatida ishlatilganida). Agar kofaktor sifatida  $Co^{2+}$  ishlatilsa, bu ferment to'g'ri uchli ikki zanjirli DNKning Z'-ON uchiga deoksinukleotidlarning birikishini katalizlashi mumkin.

Aynan dezoksinukleotidiltransferaza yordamida 1972-yilda DNK molekulalarining rekombinatsiyasi bo'yicha birinchi tajriba in vitro o'tkazilgan.

E. coli ning poli (A) – polimerazasi 1973-yilda Sippel tomonidan kashf etilgan. Poli (A) – polimeraza bir zanjirli RNK

molekulari 3'-ON oxirlariga poli(A) ketma-ketliklarini ulanishini katalizlaydi. U RNK molekularini tayyorlashda, ya'ni ulardan komplementar DNKni nusxalash uchun RNKning 3'-oxiriga radioaktiv nishonni kiritish uchun ishlatiladi.

### Nazorat savollari

1. Terminal transferaza qachon va kim tomonidan kashf etilgan?
2. Terminal transferaza nima uchun ishlatiladi?
3. Poli-A-polimeraza qachon va kim tomonidan kashf etilgan?

### Test savollari

**1. Agarozali gelda xromosomaning harakatida start chiziqqa yaqin joyda qanday fragmentlar joylashadi?**

- A) Uzun
- B) Qisqa
- C) O'rtacha
- D) Qiyshiq

**2. Agarozali gelda (1%gacha) plazmida DNK sining harakatida start chizig'idan eng uzoqda qanday shakllar joylashadi?**

- A) Chizikli
- B) Halqasimon
- C) Superspiral
- D) Spiral

**3. Birinchi restriksion xarita nima uchun tuzilgan?**

- A) pBR 322 plazmidasi uchun
- B) SV-40 virusi uchun
- C) Raussarkomasivirusi uchun
- D) Bakteriofag uchun

**4. Restriksion xaritalar qanday imkoniyat beradi?**

- A) DNKning gomologiyalari darajasini aniqlash
- B) Genlar ishidagi o'zgarishlarni aniqlash
- C) Genlarning strukturasi aniqlash
- D) Genlar ishidagi o'zgarishlarni ta'minlash

## 9.6. Restrikt endonukleazalar klassifikatsiyasi

Umumiy terminlar "restriktaza", "restrikt endonukleaza" va "sayt spetsifik endodezoksiribonukleaza" sinonimlar bo'lib hisoblanadi.

Bakteriyalarning barcha restrikt endonukleazalari spetsifik bo'lgan juda qisqa DNK ketma-ketliklarini tanib, ular bilan bog'lanish xususiyatiga ega. Ushbu jarayon DNK molekulasini kesish bilan birga tanib olish saytining o'zida yoki ferment aniqlanadigan boshqa joyda sodir bo'ladi. Restrikt faolligi bilan bir qatorda bakterial shtamm DNKni metillash xususiyatiga ham ega; bu jarayon uchun DNK ketma-ketliklari uchun va restiriksiya uchun o'ziga xos spetsifiklik muhimdir. Metilaza adenin yoki sitozin qoldiqlariga metil guruhlarini restriktaza fermenti bog'langan joyda (saytda) qo'shadi. Metillanish natijasida sayt restriksiyaga (cheklovga) chidamli bo'ladi. Shuning uchun metillanish DNKni kesishdan himoya qiladi.

Restriktazalarning 3 asosiy sinfi mavjud.

Barcha restriktazalar ikki zanjirli DNKda qat'iy belgilangan ketma-ketliklarni taniydi, lekin **1-sinf restriktazalar** DNK molekulasining ixtiyoriy nuqtalarida uzilishlarni amalga oshirishi mumkin, **2 va 3-sinf restriktazalar** DNKni tanib olish saytlaridagi qat'iy belgilangan nuqtalarida yoki ulardan ma'lum masofada aniq belgilangan (fiksirlangan) nuqtalarda taniydi va parchalaydi.

1 va 3-sinfdagi fermentlar murakkab subbirlik strukturasi ega bo'lib, ikki turdagi faollikni namoyon qiladi – modifikatsiya qiluvchi (metillash) va ATF – bog'liq endonukleaza.

2-sinf fermentlari 2 xil oqsildan: restrikt endonukleaza va modifikatsiya qiluvchi metilaza tashkil topgan. Shuning uchun gen muhandisligida faqat 2-sinf fermentlari ishlatiladi. Ularga kofaktor sifatida magniy ionlari zarur bo'ladi.

Hozirgi vaqtda 500 dan ortiq 2-sinf restriktazalari ajratilgan, biroq mikroorganizmlardan ajratilgan turli fermentlar orasida DNKdagi bir xil ketma-ketlikni taniydiganlar fermentlar mavjud. Bunday juftliklar yoki guruhlar izoshizomerlar deb ataladi. Izoshizomeriya haqiqiy va noto'g'ri ("yolg'on") bo'lishi mumkin, haqiqiy izoshizomeriyada fermentlar – yagona va bir xil

nukleotidlar ketma-ketliklarini tanib, shu nuqtada uzadi, noto'g'ri izoshizomeriyada fermentlar – DNK saytidagi yagona va bir xil ketma-ketlikni tanib turib, shu sayt doirasidagi har xil nuqtalarni uzadi.

Ko'pgina 2-sinf restriktazalari 4 dan 6 gacha nukleotid juftliklarini o'z ichiga olgan ketma-ketliklarni taniydi, shuning uchun restriktazalar kichik va katta kesuvchilarga bo'linadi. Kichik kesuvchi fermentlar tetranukleotidni taniydi va uning molekularida 6 nukleotid juftlik ketma-ketligini taniydigan yirik kesuvchi fermentlarga nisbatan ko'proq uzishlar (kesmalar) hosil qiladi. Shuni ta'kidlash lozimki, to'rt nukleotiddan iborat ma'lum bir ketma-ketlikning uchrash ehtimoli olti nukleotidli ketma-ketlikdan ancha yuqori. Masalan, 40 000 juft asosdan tashkil topgan T7 bakteriofagining DNK sida *E. coli.* dan ajratib olingan R1 restriktaza taniydigan ketma-ketlik mavjud emas.

Kichik kesuvchi fermentlarga Hpa II va Alu (*Arthrobacter luteus* dan olingan), katta kesuvchi fermentlarga Eco R I (*Escherichia coli* dan olingan) va Hind III restriktazalar kiradi. Taxminlarga ko'ra, restriktazalar taniydigan uchastkalar DNK zanjiri bo'ylab tasodifiy taqsimlangan bo'lsa, to'rtta nukleotidlar ketma-ketligini (saytlarini) taniydigan fermentlar uchun nisbatan o'rtacha har 256 ta juft asosdan keyin 1 marta bo'lishi, olti nukleotidni taniydigan fermentlar uchun har 4096 ta juft asosdan keyin bo'lishi kerak. Agar restriksiya sayti gen ichida bo'lsa, u holda DNK-restriktaza fermenti bilan ishlov berish uning inaktivatsiyasiga olib keladi. Kichik kesuvchi restriktazalar bilan ishlov berishda bunday hodisaning sodir bo'lish ehtimoli juda yuqori, katta kesuvchi endonukleazlardan foydalanganda esa sezilarli emas. Shu sababli, shikastlanmagan genni olish uchun, parchalashni bir nechta katta kesuvchi restriktazalar bilan navbatma-navbat amalga oshiriladi yoki "restriktazalargacha" usuli qo'llaniladi, ya'ni, faqat bitta saytda restriksiya sodir bo'ladigan sharoit tanlanadi.

### Nazorat savollari

1. Restrikt endinukleazalar qanday xususiyatlarga ega? Ular qanday vazifalarni bajaradi?
2. Restrikt endinukleazalarning nechta sinfi mavjud?
3. Nima uchun restriktazalar kichik va katta kesuvchilarga bo'linadi?

### Test savollari

#### 1. Kimyoviy sikvens nimaga asoslangan?

A) har bir reaksiyon aralashmada 4 ta nukleotiddan birini parchalash

B) 1 nukleotidni parchalash

C) DNKning komplementar qismini sintezlash

D) Genlarning strukturasi aniqlash

#### 2. DNKning kimyoviy sikvensini kimlar taklif etgan?

A) Maksam va Gilbert

B) Sevidj va Maksam

C) Senger va Gilbert

D) Sevidj

#### 3. Fermentativ sikvensni kim taklif etgan?

A) Senger

B) Gilbert

C) Senger va Gilbert

D) Sevidj

#### 4. Kimyoviy sikvensda DNK qanday nishonlanadi?

A) Bir uchidan

B) Ikki uchidan

C) Jami uzunligi bo'yicha

D) Teng miqdorda

#### 5. Fermentativ sikvensda nukleotidlarning modifikatsiyasi qaysi qismda bo'lishi nazarda tutiladi?

A) 3'-OH

B) 5'-OH

C) 3'-OH va 5'-OH

D) 5'-P

6. Fermentativ sikvensda modifikatsiya qilingan nukleotidlar normal nukleotidlarga nisbatan qanday miqdorda qo‘llaniladi?

- A) Ortiqcha
- B) Teng miqdorda
- C) Kam miqdorda
- D) Yetarli miqdorda

### Mustaqil ta’lim mavzulari

1. Gen muhandisligida ishlatiladigan fermentlar va ularning xususiyatlari.
2. Molekulyar biotexnologiya. DNK, RNK va oqsillar sintezi.
3. Gen muhandisligining tibbiyot bilan uzviy bog‘liqligi.

### 9.7. Restriktazalarning nomenklaturasi va xususiyatlari

1973-yilda Smit va Natans restriktazalar uchun quyidagi punktlarni o‘z ichiga olgan nomenklaturani taklif qilishdi:

1. Har bir ferment nomining qisqartmasi ushbu metilaz-restriktaza tizimini o‘z ichiga olgan mikroorganizmning binar nomidan kelib chiqqan holda belgilanadi. Qoidaga muvofiq tuziladi: avlod nomining birinchi bosh harfiga turning birinchi ikkita kichik harfi qo‘shiladi: *Streptomyces albus* – *Sal*, *Escherichia coli* – *Eco*.

2. Agar kerak bo‘lsa, serotip yoki shtammning belgisi qo‘shiladi, masalan, Yeso B.

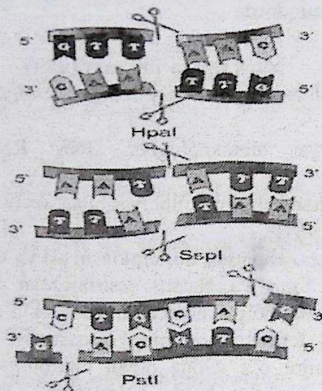
3. Turli xil restriksiya tizimlari – bitta bakterial hujayra tomonidan kodlanadigan modifikatsiyalar rim raqamlari bilan belgilanadi: **Hind II**, **Hind I**, **Hind III** (*Haemophilus influenzae*).

4. Restriktazalar – **R (R Hind III)**, metilazlar – **M (M Hind III)** harfi bilan belgilanadi.

Yangi restriktazalarning kashfiyoti 1978-yilda Robertsni fermentlarni ratsional belgilash tizimiga qo‘shimchalar kiritishga majbur qildi: agar qisqartirilgan nomi bir nechta fermentlar uchun mos kelsa, u holda, qisqartmaning birinchi 2 ta harfi

o'zgarimasdan qoladi, uchinchisi esa tur nomining quyidagi harflaridan olinadi: *Haemophilus parainfluenzae* – Hpa I, *Haemophilus parahaemolyticus* – Hph I.

Restriktazalar DNKni turli yo'llar bilan parchalaydi (20-rasm).



20-rasm. Restriktazalarning DNKni parchalashi.

Ba'zilar taniqli ketma-ketlikning simmetriya o'qi bo'ylab kesadilar (Hpa I, Ssp I). Boshqalari – siljish bilan, "qadam" bilan (Pst I). Birinchi holda, "to'mtoq" uchlar, ikkinchisida – "yopishqoq" uchlar hosil bo'ladi, ya'ni fragmentlar uchlarida to'rtta nukleotiddan iborat bo'lgan bir zanjirli o'zaro komplementar uchastkalarga ega bo'ladi. Bunday fragmentlar ayniqsa rekombinant DNK yaratish uchun qulay.

### Nazorat savollari

1. Restriktazalar uchun taklif etilgan nomenklatura qanday bo'limlardan iborat?
2. Restriktazalar uchun tuzilgan nomenklaturaga xos belgilar nimalardan iborat?

## Test savollari

1. Endonuklezalarning to'liqsiz qirgishi uchun ularning qancha miqdori zarur bo'ladi?

- A) Kam miqdorda
- B) Ko'p miqdorda
- C) O'rtacha
- D) Yetarli miqdorda

2. Rekombinant DNKni endogen DNKaza va nukleaza ta'siridan saqlash uchun qanday fermentlar ishlatiladi?

- A) N-metilaza
- B) DNK-polimeraza
- C) Revertaza
- D) Fosfataza

## Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Gen muhandisligida ishlatiladigan fermentlar va ularning xususiyatlari.

2. Molekulyar biotexnologiya. DNK, RNK va oqsillar sintezi.

3. Gen muhandisligining tibbiyot bilan uzviy bog'liqligi.

## 9.8. Rekombinant DNKning konstruksiyasi

Rekombinant DNK deganda, turli biologik manbalardan ajratilgan *in vitro* (probirkada) ikki yoki undan ortiq fragmentlarni birlashtirish natijasida hosil bo'lgan DNK tushuniladi.

Ushbu ta'rifdagi "DNK fragmenti" va "*in vitro* birlashtirish" kalit so'zlari bo'lib, bu gen muhandisligining mohiyatini va uning gibrid (yoki ximer) organizmlarni olishning boshqa barcha usullaridan, masalan, genetik seleksiya, embrion muhandisligi va boshqalardan farqini ko'rsatadi. DNK fragmentlari, shu jumladan genlarni o'z ichiga olgan fragmentlar, restriktaza fermentlar yordamida olinadi. Restriktazalar ham to'mtoq, ham yopishqoq uchlari bo'lgan fragmentlar hosil qilishi mumkin. DNK bo'laklarini o'zaro bog'lash (tikish) uchta asosiy usul bilan amalga oshiriladi, bu o'zaro bog'lanishi kerak bo'lgan DNK fragmentlarining qaysi uchlari borligiga bog'liq.

### Nazorat savollari

1. Rekombinant DNK texnologiyasining qanday usullari mavjud?
3. Rekombinant DNK texnologiyasida qanday fermentlar ishlatiladi?

### Test savollari

1. Odatda to'liqsiz restriksiyadan qaysi restriktazalar qo'llanilganda foydalaniladi?

- A) Yirik qirquvchi
- B) Mayda qirquvchi
- C) 1-sinf
- D) 2-sinf

2. Restriktaza-ligaza usulida ma'noga ega bo'lmagan ketma-ketliklar bo'lishi:

- A) Mumkin emas
- B) Mumkin
- C) Sharoitga qarab
- D) Qisman

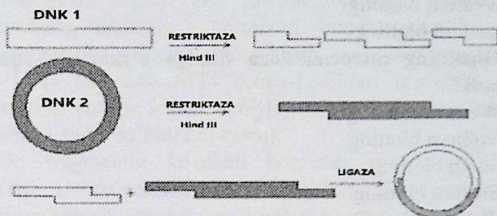
3. Restriktazalar tanlab qirqadigan saytlar  $180^{\circ}\text{C}$  ga o'girilganda:

- A) Simmetrik bo'ladi
- B) Simmetrik bo'lmaydi
- C) Nosimmetrik bo'ladi
- D) Qisman simmetrik

### 9.9. "Yopishqoq" uchlilar bilan tikish (restriktaza-ligaza usuli)

Bu usul eng keng tarqalgan va mashhur. Birinchi marta bu usul bilan gibrid DNK S. Koen va uning hamkasblari tomonidan 1973-yilda olingan. Ba'zi restriktazalar, masalan, Pst I, DNK zanjirlarida tanish sayti markazidan teng masofada simmetrik uzilishlar va "qadam" hosil qiladi. Bu bir-biriga komplementar uchastkalar asoslarning juftliklari bog'lanishiga moyil bo'lib, shuning uchun ularni *qo'shimcha yoki yopishqoq uchlilar* deb ataladi. Asoslar juftligi faqat komplementar ketma-ketliklar orasida sodir bo'ladi, shuning uchun Eco RI tomonidan yaratilgan AATT uchlilar, masalan, Hind III tomonidan hosil bo'lgan AGST-

uchlari bilan bog'lanmaydi (21-rasm). Lekin bir xil restriktaza ta'sirida hosil bo'lgan har qanday ikkita fragment (kelib chiqishidan qat'i nazar), komplementar nukleotidlarning bir zanjirli uchastkalari o'rtasida vodorod bog'lari hosil bo'lishi tufayli bir-biriga yopishishi mumkin.



**21-rasm. Restriktaza-ligaza metodi sxemasi.**

Biroq, bunday juftlikdan so'ng, ikkilama spiralning to'liq yaxlitligi tiklanmaydi, chunki fosfodiefir bog'ida ikkita uzilish qoladi. Uni qayta tiklash uchun, ya'ni iplarni o'zaro tikish (ligirovanie) yoki bog'lash uchun DNK-ligaza fermenti ishlatiladi. Tirik hujayradagi ushbu ferment aynan shu funksiyani bajaradi, ya'ni replikatsiya jarayonida sintezlangan DNK fragmentlarini o'zaro tikish.

### Nazorat savollari

1. Gibrid DNK qachon va kim tomonidan yaratilgan?
2. Restriktaza-ligaza usulining mohiyatini tushuntiring.

### Test savollari

1. DNKning nitrotselluloza filtriga o'tkazilishi qanday nomlanadi?

- A) Southern blotting
- B) Northern blotting
- C) Western blotting
- D) Eastern blotting

**2. RNKning nitrotselluloza filtriga o'tkazilishi qanday nomlanadi?**

- A) Northern blotting
- B) Southern blotting
- C) Western blotting
- D) Eastern blotting

**3. Oqsilning nitrotselluloza filtriga o'tkazilishi qanday nomlanadi?**

- A) Western blotting
- B) Nothern blotting
- C) South blotting
- D) Eastern blotting

**4. Blottingda filtr qog'ozida qanday yo'nalishda bufer eritmadagi tokning harakatini ta'minlaydi?**

- A) Elektroforezga perpendikular yo'nalishda
- B) Elektroforezga teskari yo'nalishda
- C) Elektroforez bo'yicha
- D) Elektroforezga birikkan

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Gen muhandisligida ishlatiladigan zamonaviy tadqiqot usullari.

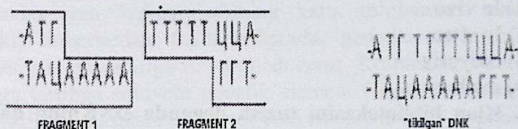
2. Turli kasalliklarni diagnostika qilishda polimeraza zanjir reaksiyasini qo'llash.

### **9.10. "To'mtoq" uchlari bilan tikish (konnektor usuli)**

Yopishqoq uchlari DNK fragmentlarini tikish uchun juda zarur emas. To'mtoq uchlari ham DNK ligaza ta'sirida birlashishi mumkin, agar ligaza va to'mtoq uchlari ham reaksiya aralashmasida yuqori konsentratsiyalarda mavjud bo'lsa. Bunday holda, ligirlash reaksiyasi o'ziga xos xususiyatlarga ega bo'lib, uning samaradorligi yopishqoq uchlari bilan o'zaro bog'lanishga qaraganda past bo'ladi. Birinchi bunday tajribalar 1972-yilda Pol Berg tomonidan Stenford universitetida, AQShda o'tkazilgan. Yopishqoq uchlarni to'mtoq uchlari bo'lgan DNK molekulariga ham fermentativ tarzda birlashtirish mumkin. Buning uchun buzoq

timusidan olingan transferaza fermenti ishlatiladi, ushbu ferment DNK zanjirlarining 3-oxiriga nukleotidlarni biriktiradi. Agar *in vitro* rekombinatsiya qilinayotgan DNK fragmentlaridan birining 3'-oxiriga deoksinukleotidiltransferaza yordamida ma'lum uzunlikdagi bir zanjirli oligo (dA)-segmentlarini ulansa, boshqa fragmentning uchlariga – taxminan shunday uzunlikdagi oligo (dT)- segmentlarni ulansa, unday holda, aralashtirilganidan so'ng, oligo (dA) va oligo (dT) ketma-ketliklari o'rtasida vodород bog'larining yuzaga kelishi tufayli hosil bo'lgan fragmentlarning juftlashishi sodir bo'ladi (22-rasm).

Ikki fragmentni kovalent bog'lash uchun DNK ligaza ishlatiladi. Ushbu protseduralar rekombinant DNK molekularini olishning ikkinchi umumiy usuli uchun asos bo'lib xizmat qiladi.



## 22-rasm. “Yopishqoq” uchlarni va DNK fragmentini tikish.

### Nazorat savollari

1. Rekombinant DNK olish texnologiyasining konnektor usuli qachon va kim tomonidan kashf etilgan?
2. Konnektor usulida qanday tajribalar amalga oshiriladi?

### Test savollari

1. “Bo'laklash” (drobirovka) usuli qanday bibliotekalarga nisbatan ishlatiladi?

- A) Genom
- B) Klon DNK
- C) Genom va klon DNK
- D) Fragmentar

**2. RNK matritsada DNK sintezidan qanday bibliotekalarning hosil bo'lishi boshlanadi?**

- A) Klon DNK
- B) Genom
- C) Genom va klon DNK
- D) Fragmentar

**3. Genom bibliotekalarini tuzishda genom qanday ifoda etiladi?**

- A) Fragmentar
- B) Yaxlit
- C) Genom va klon DNK
- D) Klon DNK

**4. Genom bibliotekasini tuzish deganda DNKning qanday sharoitdagi amplifikatsiyasi tushuniladi?**

- A) In vivo
- B) In vitro
- C) ixtiyoriy
- D) majburiy

**5. Klon bibliotekasini tuzish deganda DNKning qanday sharoitdagi amplifikatsiyasi tushuniladi?**

- A) In vivo
- B) In vitro
- C) ixtiyoriy
- D) majburiy

**6. Qanday sharoitdagi DNK amplifikatsiyasini polimeraza zanjir reaksiyasi natijasi deb tushunish mumkin?**

- A) In vitro
- B) In vivo
- C) ixtiyoriy
- D) Majburiy

**7. Bakteriya hujayralaridan foydalanib, hayvon oqsillarini olishda DNK bibliotekasining qanday turidan foydalanish afzal?**

- A) Klon DNK
- B) Genom va klon DNK
- C) Genom DNK si
- D) Vaziyat taqozosiga ko'ra

## 8. Polimeraza zanjir reaksiyasini kim ishlab chiqqan?

- A) Mallis
- B) Sauzern
- C) Gilbert
- D) Berg

## 9.11. Turli xil yopishqoq uchlari bo'lgan fragmentlarni o'zaro tikish (linker usuli)

Turli xil restrikt endonukleazalardan hosil bo'lgan va har xil, ya'ni o'zaro komplementar bo'lmagan yopishqoq uchlarga ega bo'lgan fragmentlarni tikish zarur bo'lgan vaziyatda, **linkerlar (yoki "adapterlar")** ishlatiladi. Linkerlar – kimyoviy sintezlangan oligonukleotidlar bo'lib, restriksiya saytlari yoki ularning kombinatsiyasidan tashkil topgan. Ushbu g'oya birinchi marta Sheller va uning hamkasblari tomonidan 1977-yilda taklif qilingan.

Bunday gen "adapterlari"ning katta to'plamlari mavjud. Tabiiyki, linkerlardan foydalanilganda, genetik ma'lumotning ekspressiyasi qoidalariga rioya qilish zarur. Ko'pincha linkerning o'rtasiga tartibga soluvchi genetik element (regulyator element) joylashtiriladi, masalan, promotor yoki ribosoma bilan bog'langan sayt. Bunday holda, linkerlar nafaqat genlarning birikishini ta'minlaydi, balki ularning ekspressiyasini ham aniqlaydi. "To'mtoq uchli – yopishqoq uchli" linkerlar mavjud. Agar kerak bo'lsa, yopishqoq uchlarni to'mtoq uchlarga aylantirish mumkin. Bunga ferment – endonukleaza S1 yordamida yopishqoq uchlarni ajratish orqali erishiladi, ushbu ferment faqat bir zanjirli DNKni parchalaydi, yopishqoq uchlari "quriladi", ya'ni DNK polimeraza I yordamida bir zanjirli yopishqoq uchlarda ikkinchi zanjir sintezlanadi.

### Nazorat savollari

1. Rekombinant DNK olish texnologiyasining linker usuli qachon va kim tomonidan kashf etilgan?
2. Linker molekulari deganda nimani tushunasiz?
3. Linker usulida qanday tajribalar amalga oshiriladi?

## Test savollari

1. DNKni nitrotselluloza filtrga ko'chirib o'tkazish usulini kim ishlab chiqqan?

- A) Sauzern
- B) Mallis
- C) Berg
- D) Gilbert

2. Polimeraza zanjiriy reaksiyasida DNKning miqdori sikldan siklga qarab qanday oshib boradi?

- A) Geometrik progressiya bo'yicha
- B) Arifmetik progressiya bo'yicha
- C) Bir necha fragmentga
- D) Oshmaydi

## Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Gen muhandisligida ishlatiladigan zamonaviy tadqiqot usullari.

2. Turli kasalliklarni diagnostika qilishda polimeraza zanjir reaksiyasini qo'llash.

## 9.12. Rekombinant DNK texnologiyasi

Rekombinant DNK texnologiyasi biotexnologiyada ko'p qo'llaniladi. Rekombinant DNK texnologiyasida quyidagi usullar ishlatiladi:

- individual genlarning ajratib olish uchun restrikt nukleazalar tomonidan DNKning spetsifik parchalanishi;
- tozalangan DNK fragmentidagi barcha nukleotidlarni sekvenirlash, bu gen chegaralarini va u tomonidan kodlangan aminokislotalar ketma-ketligini aniqlash imkonini beradi;
  - rekombinant DNKni qurish (konstruksiya qilish);
  - nuklein kislotalarning gibridlanishi, bu esa spetsifik RNK yoki DNK ketma-ketligini katta aniqlik va sezgirlik aniqlash imkonini beradi;
- DNKni klonlash: polimeraza zanjiri reaksiyasi yordamida *in vitro* amplifikatsiya yoki transformatsiyadan so'ng millionlab

nusxalarda ko'paytiradigan DNK fragmentini bakterial hujayraga kiritish;

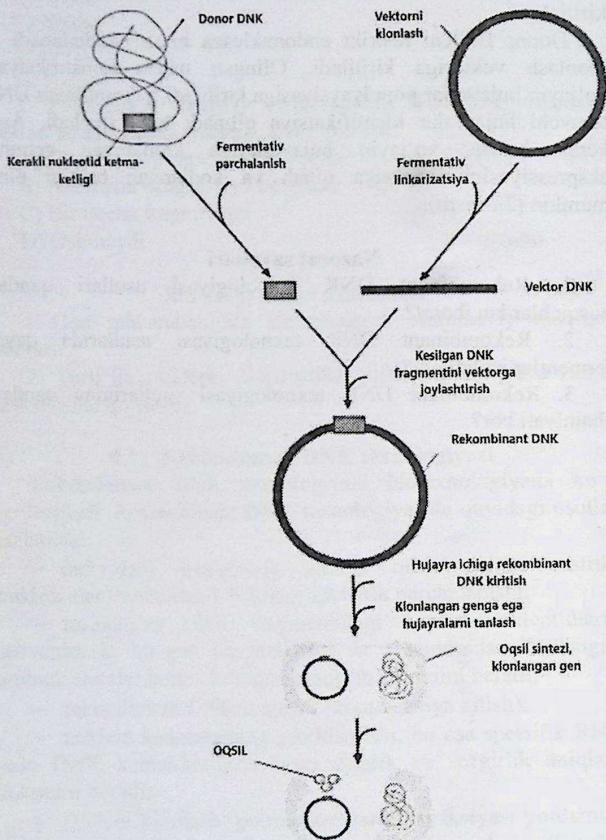
– hujayralar yoki organizmlarga rekombinant DNKni kiritish.

Donor DNKni restrikt endonukleaza bilan parchalanadi va klonlash vektoriga kiritiladi. Olingan ushbu konstruksiyani xo'jayin hujayralar populyatsiyasiga kiritiladi, rekombinant DNK tutuvchi hujayralar identifikatsiya qilinadi va o'stiriladi. Agar kerak bo'lsa, xo'jayin hujayralarida klonlangan genning ekspressiyasini induksiya qilish va kodlangan oqsilni olish mumkin (23-rasm).

### **Nazorat savollari**

1. Rekombinant DNK texnologiyasi usullari qanday bosqichlardan iborat?
2. Rekombinant DNK texnologiyasi usullarida qaysi fermentlar ishlatiladi?
3. Rekombinant DNK texnologiyasi usullarining qanday ahamiyati bor?

## Rekombinant DNK texnologiyasi



23-rasm. Rekombinant DNKni klonlash.

### Test savoli

1. Ko'pincha tibbiyot diagnostikasida DNK amplifikatsiyasining qaysi klonlashdan foydalaniladi?

- A) Hujayrasiz molekulalar
- B) Virusda
- C) Bakteriyada
- D) Hayvonlarda

### 9.13. Selektiv va reportyor genlar

Rekombinant genni hujayraga kiritishning 2 usuli mavjud: vektor yordamida yoki to'g'ridan-to'g'ri inyeksiya.

Vektor DNKga qo'yiladigan talablar, uning tarkibi Vektor ikki komponentdan iborat DNK yoki RNK molekulasi: vektor qismi (tashuvchisi) va klonlangan begona gen. Vektorning vazifasi tanlangan DNKni qabul qiluvchi – retsipient hujayraga olib kirish, uni genomga integratsiya qilish, o'zgartirilgan hujayralarni aniqlash imkonini berish va kiritilgan genning barqaror ifodalanishini ta'minlashdir. Shunday qilib, vektor kichik bo'lishi, mezbon hujayrada ko'paytirish (replikatsiya), ko'p nusxalash (amplifikatsiya), tegishli genni ekspressiya qilish (tegishli tartibga soluvchi ketma-ketlikni o'z ichiga oladi), samarali seleksiya uchun gibrid hujayralarni farqlash imkonini beruvchi marker geniga ega bo'lishi kerak; mos keladigan organizmning hujayrasiga o'tish imkoniyatiga ega bo'lishi kerak.

### Nazorat savollari

1. Selektiv genlar qanday maqsadlarda ishlatiladi?
2. Antibiotikka chidamli genning xususiyatlarini tushuntiring.
3. Reportyor genlar deganda qanday genlarni tushunasiz?

### Test savoli

1. Intron va ekzonlar quyidagilarning qaysi biri DNKsida uchramaydi?

- A) Bakteriyalarda
- B) Achitqi zamburug'larida

C) O'simliklarda

D) Hayvonlarda

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Rekombinant texnologiya usulining tibbiyot sohasida ishlatilishi.

2. Rekombinant texnologiya usullari bo'yicha xorijiy tadqiqotlar yangiliklari.

## X BOB. TRANSGEN O'SIMLIK OLISH. HAYVON GEN MUHANDISLIGI

Transgen o'simliklar – bu boshqa o'simlik turlarining genini muvaffaqiyatli tarzda boshqa bir tur o'simlikda rivojlanishi natijasida kelib chiqadigan o'simliklardir. Adabiyotlarda “Genetik modifikatsiyalangan (geni o'zgartirilgan) organizmlar” (GMO) degan termini uchratish mumkin, Ushbu geni o'zgartirilgan organizmlarga o'simliklardan olingan mahsulotlar ham kiradi. Sababi, transgen hayvon, transgen o'simliklar asosida yangi xususiyatli inson tomonidan iste'mol qilinadigan mahsulotlar (GMO) olinadi. Shu bilan birga, bugungi kunda gerbisidlarga chidamli, zararkunandalarga, shuningdek, virusli kasalliklarga chidamli bo'lgan qishloq xo'jaligi mahsulotlari yaratilmoqda. Ana shunday genetik o'zgartirilgan organizmlardan olingan ozuqa mahsulotlari boshqacha ta'm berish xususiyatiga, yaxshi ko'rinishga ega bo'lishi mumkin va uzoq saqlanishi mumkin. Bundan tashqari, bunday o'simliklar ularning tabiiy holdagilariga nisbatan barqaror va samarali mahsulot berishi tadqiqotlar asosida tasdiqlangan.

Bugungi kunda transgen o'simliklar olish – biotexnologiyaning agroishlab chiqarish doirasida eng rivojlanayotgan va kelajagi bor yo'nalish hisoblanadi. Transgen o'simliklar olish biotexnologiyasi an'anaviy seleksiya metodlari yordamida yechim topolmagan va buning uchun ko'pgina yillar talab qilingan muammolarni yechmoqda.

Hozirgi kunda transgen o'simliklar olishda quyidagi maqsadlar qo'yiladi:

- yuqori hosil olish;
- vegetatsiya davrini qisqartirish va bir yilda bir necha bor hosil olish (Rossiyada qulupnayning shunday remontant navi yaratildiki, undan 1 yozda 2 marta hosil olinadi);
- ba'zi zararkunandalarga qarshi toksik xususiyatga ega bo'lgan o'simliklar olish (Rossiyada shunday kartoshka navi yaratildiki, uning barglari kolorado qo'ng'izi va uning lichinkalariga qarshi toksin xususiyatga ega);

– noqulay iqlim omillariga qarshi turg'unlikni yaratish (masalan, o'simlik geniga chayonning genini o'tkazish orqali qurg'oqchilikka chidamli o'simliklar olinadi);

– hayvon va odam odam organizmida mavjud bo'ladigan ba'zi bir oqsillarni sintez qilish xususiyatiga ega bo'lgan o'simliklar olish (masalan, Xitoyda insondagi laktoferrin oqsilini sintez qiladigan tamaki navi yaratildi);

– "tirik vaksina" xususiyatiga ega bo'lgan o'simliklar olish.

Transgen o'simliklar biotexnologiyasi ushbu qo'yilgan maqsadlarga erishsa, kompleks, agrotexnik, ishlab chiqarish, texnologik, farmakologik va boshqa muammolar o'z yechimini topadi.

Transgen o'simliklar qanday olinadi? Transgen o'simliklar olish jarayoni dastlab bizga kerakli bo'lgan genni topishdan boshlanadi, ya'ni u o'simlikda yoki hayvon organizmida mavjud bo'ladi. Keyingi bosqich – kerakli genni begona DNKdan ajratib olish va uni bizga kerakli bo'lgan o'simlikning DNK molekulasiga joylashtirish jarayonini o'z ichiga oladi. Ushbu texnologiya ancha qiyin jarayon hisoblanadi va ko'pincha chiqish ehtimoli 5–100% ni tashkil etadi.

Bir necha o'n yil oldin maxsus restriktaza fermentlari ixtiro qilindi, u uzun DNK molekulasini alohida uchastkalarga - genlarga ajratish funksiyasini bajaradi. Restriktaza bilan kesilgan DNK fragmentlari (bo'laklari) yopishqoq uchlar hosil qiladi, bu yopishqoq uchlar yordamida ular xuddi shu asnoda kesilgan boshqa DNK molekulasiga joylashadilar, birikadilar. Begona genni o'simlikning genomiga joylashtirishning keng tarqalgan usuli bu o'simliklarda shish kasalligini keltirib chiqaruvchi *Agrobacterium tumefaciens* bakteriyasining xususiyatiga asoslangan. Ushbu bakteriya zararlagan o'simlikning xromosomasida o'zining DNKsining bir qismini joylashtirish, kiritish xususiyatiga ega, bu esa o'simlikning yanada ko'progormon ishlab chiqarishiga va natijada ba'zi bir hujayralarining jadal bo'linishi hisobiga shish hosil qilishni keltirib chiqaradi. Shishda bakteriya o'zi uchun yaxshi ozuqa muhitini topadi va u yerda ko'payadi. Gen injeneriyasi uchun maxsus agrobakter

shtammi yaratilgan bo'lib, u o'simlik hujayrasiga kirish xususiyatiga ega.

Kerakli genni restriktaza fermenti ishtirokida bakteriyaning halqa DNK molekulasiga yopishtiriladi, bu halqa plazmida deb ataladi. Bu plazmida o'zida marker genni saqlaydi. Masalan, kanamisin geni, ya'ni antibiotikka chidamli bo'lgan gen. Odatda, gen ko'chirib o'tkazishda ushbu gen juda kam samarali natija beradi. O'zining genetik apparatiga "kesib o'zgartirilgan" plazmidani kiritgan bakteriya hujayralari yangi foydali gendan tashqari antibiotikka chidamli xususiyatga ham ega bo'lib qoladi. Ularni ajratish oson bo'lib qoladi, bakteriya oziqa muhitiga antibiotik quyilganda hamma hujayralar nobud bo'ladi, lekin kerakli plazmidani o'zida saqlagan hujayra, ushbu oziqa muhitida samarali ko'payadi. Endilikda ushbu bakteriya bilan o'simlik bargidan olingan hujayralar zararlanmoqda. Yana antibiotikka chidamli bo'lganlarni tanlashga to'g'ri kelmoqda: agrobakteriya plazmidasidan chidamlilikni olgan hujayralargina yashab qoladi, demak, bizga kerakli bo'lgan gen olinadi.

Keyingi bosqichda alohida hujayralardan to'qima hosil qilib va uning asosida yetuk o'simliklarni hosil qilish jarayonlari amalga oshiriladi. Ushbu jarayonlar agrobakteriyadan foydalanishga asoslangan, lekin barcha hollarda ham yuqori samara bermasligi mumkin. Masalan, guruch, bug'doy, makkajo'xori kabi muhim oziqa o'simliklari agrobakteriyalar bilan zararlanish xususiyatiga ega emas. Shu sababli, yot genlarni retsipient organizmga o'tkazishning yangi yo'llarini izlash va qo'llash talab etiladi. Bugungi kunda shunday fermentlar topildiki, ular o'simlik hujayrasining qalin qobig'ini eritadi va polietilenglikol (PEG) kabi faol moddalar begona DNKning hujayraga kirishiga yordam beradi. Ya'ni faol modda PEG hujayra membranasining o'tkazuvchanligini oshirish xususiyatiga ega, buning uchun hujayraga yuqori kuchlanishli qisqa impulslar bilan ta'sir ettirilsa (**elektroporatsiya metodi**) hujayra poralari kengayadi va yot genni kiritish imkoniyati oshadi.

Ba'zi hollarda mikroskop ostida hujayra DNKsiga mikroshpris yordamida yot genni kiritish mumkin. Shu bilan

birga ijobiy natijalarga DNK pushka usuli (biolistika) yordamida ham yot genni kiritish orqali erishish mumkin. Bunda o'ta kichik metall "o'qchalar", masalan, diametri 1–2 mikron keladigan volfram sharchalari DNK molekulasi bilan qoplanadi (ya'ni yot gen tutgan DNK fragmenti) va ushbu metall o'qchalar maxsus pushka yordamida o'simlik hujayrasiga "otiladi". O'qchalar teshgan hujayra devoridagi yoriqchalar tezda bitib ketadi, protoplazmada qolgan o'qchalar esa o'ta kichik bo'lganligi sababli, hujayraning funksiyalariga halaqit qilmaydi. O'qchalar samarali natija beradi, ya'ni ularda mavjud DNK kerakli joyga integratsiyalanadi.

### 10.1. Gen muhandisligida ishlatiladigan vektorlar

Vektorlarning bir nechta turlari mavjud bo'lib, ular yuqorida qayd etilgan usullar asosida donar hujayradan olingan genetik ma'lumotni retsipient hujayraga olib o'tish vazifasini bajaradi. Genetik ma'lumotni olib o'tishda avval vektorlar konstruksiya qilinadi. Bunda plazmidalar, transpozonlar, ba'zi viruslar keng qo'llaniladi.

**Bakterial plazmidlar.** Bakteriyalarning hujayra DNKsining asosiy qismi xromosomada (*E. coli* xromosomasida, masalan, 4 million juft nukleotidlar) joylashgan. Biroq, bakteriyalarda xromosomalardan tashqari uzunligi bir necha ming juft bo'lgan plazmidlar juda ko'p sonli juda kichik dumaloq DNK molekulalari mavjud (molekulyar og'irligi 1,5 dan 300 megadaltongacha, 1 MD = 1500 bp). Bunday mini-xromosomalar **plazmidlar** deyiladi.

Plazmidlar xo'jayin hujayrasiga turli xususiyat beradi. Masalan, antibiotiklarga chidamlilik, og'ir metallar ionlariga (R-plazmidlar) barqarorlik beradi, shuningdek, ba'zi organik birikmalarning katabolizmini boshqaruvchi genlarni o'z ichiga olib, katabolizm jarayonini boshqarishda ishtirok etadi. Plazmidlar bir nechta yoki juda ko'p nusxalarda bo'ladi. Plazmidlarning ko'p nusxaligi hujayraga antibiotiklarni yoki ksenobiotiklarni kimyoviy jihatdan neytrallashtiradigan fermentlarning sintezini ham amalga oshiradi. Plazmidlar hamma

joyda uchraydi, chunki ular har xil shtammlar va bakteriyalar turlaridan ajratilgan, ammo ular genomning muhim tarkibiy qismlari emas va ba'zi tabiiy shtammlarda plazmidlar umuman topilmagan.

Plazmid DNK xromosoma DNKsidan ancha kichik bo'lgani uchun uni sof holda ajratib olish juda oson. Kalsiy ionlari mavjud bo'lgan muhitda, plazmidlar retsipient bakteriyalar tomonidan osongina so'riladi va hatto ular tarkibida hech qachon bo'lmagan bo'lsa ham, integratsiyalangan plazmidning ko'plab nusxalarini boshqa bakterial hujayralarda topish mumkin. Biroq, bakterial hujayra odatda o'z tarkibida bir xil xususiyatli plazmidni o'z ichiga olishi mumkin. Bunday holatda boshqa turdagi plazmidlar bilan ular yashay olmaydi va ular mos kelmaydigan plazmidalar deb yuritiladi. Mavjud mos kelmaslik guruhlari – Inc-guruhlari (ingliz tilidan incompatibility – mos kelmaslik xolatini yuzaga keltiradi. Bunday holat albatta, guruhda bir-biriga o'zaro mos keladigan, lekin boshqa plazmidlar bilan mos kelmaydigan bir nechta plazmidlar mavjud bo'lganda yuzaga keladi. Yana shuni ta'kidlash lozimki, hujayradagi plazmid nusxalari soni jihatidan sezilarli darajada farq qilishi mumkin. Bunday holat hujayralar va shuningdek, plazmidlarning genetik xususiyatiga bog'liq bo'lib, "kuchsiz nazorat ostida" bo'lgan plazmidlar deb yuritiladi va ularning soni har bir hujayra uchun 10–200 nusxada bo'lishi mumkin.

Agar plazmid "qat'iy nazorat ostida" bo'lsa, u asosiy xromosoma bilan bir xil tezlikda ko'payadi. Bunday plazmidlar hujayrada bir yoki bir nechta nusxada bo'ladi. Tabiiyki, rekombinant DNKni klonlash uchun ular birinchi turdagi plazmidlardan foydalanishga harakat qilinadi. Ammo bu shart emas, chunki xloramfenikol ishtirokida plazmidlar xromosoma ko'payishidan qat'i nazar ko'payishi ham mumkin va ushbu vaziyat plazmidning nusxalari soni ko'p marta ortishiga sabab bo'ladi.

Genlarni klonlashda eng ko'p ishlatiladigan plazmidlardan biri pBR322 bo'lib, E. coli dan ajratilgan plazmidlar hisoblanadi. Ushbu plazmidada ikkita antibiotikka chidamlilik genlari. ya'ni

ampisillin, tetratsiklin kabi antibiotiklarga chidamlilik genlari mavjud bo'lib, restriksiya saytlari ham mavjud. Agar birorta chidamlilik geniga begona DNK fragmenti joylashtirilsa, u holda keyingisi inaktivatsiyaga uchraydi. Shuning uchun, ushbu genlardan biriga begona DNK fragmentini muvaffaqiyatli joylashtirilganligini bakteriyalarning ushbu antibiotikka chidamliligi yo'qolishi bilan osongina aniqlash mumkin. Biroq, shu bilan birga boshqa antibiotiklarga chidamliligi xususiyati saqlanib qoladi. Shunday qilib, vektorlar rekombinant plazmid hisoblanib, begona genlarni retsipient hujayraga olib o'tish vazifasini bajaradi.

### Nazorat savollari

1. Bakterial plazmidlarning qanday turlari mavjud? O'lchamlari haqida ma'lumot bering.
2. Gen muhandisligida bakterial plazmidalar qanday maqsadlarda ishlatiladi?
3. Genlarni klonlashda eng ko'p ishlatiladigan plazmidlarga misol keltiring.

### Test savollari

1. Gen muhandisligining birinchi obyektini ko'rsating.  
A) E.coli  
B) S.cerevisae  
C) B.subtilis  
D) A.tumifaciens
2. Gen muhandisligida vektor sifatida ishlatilgan birinchi plazmida qaysi mikroorganizmdan olingan?  
A) E.coli  
B) B.subtilis  
C) S.cerevisae  
D) A.tumifaciens
3. Hayvon hujayralariga begona genni kiritishda qanday vektordan foydalaniladi?  
A) SV-40 virusi  
B) mitoxondriya va xloroplast DNKsi

- C) viroidlar
- D) agrobakteriyalarning plazmidalari

**4. Hayvon hujayralariga begona genni kiritishda qanday vositalardan vektor sifatida foydalaniladi?**

- A) retroviruslar
- B) mitoxondriya va xloroplast DNK si
- C) bakteriya plazmidalari
- D) agrobakteriyalarning plazmidalari

**5. Hayvon hujayralariga begona genni kiritishda qanday vositalardan vektor sifatida foydalanilmaydi?**

- A) T-plazmida
- B) SV-40 virusi
- C) Mitoxondriya DNK si
- D) Transpozonlar

**6. O'simlik hujayralariga begona genni kiritishda qanday vektordan foydalaniladi?**

- A) T-plazmida
- B) Raus sarkomasi virusi
- C) SV-40 virusi
- D) Viroidlar

**7. O'simlik hujayralariga begona genni kiritishda qanday vektordan foydalanilmaydi?**

- A) pET-45b
- B) Xloroplast DNK si
- C) Bakterial plazmidalari;
- D) Viroidlar, transpozonlar

**8. Quyidagilardan qaysi biri viruslar asosidagi vektorlar tarkibiga kirmaydi?**

- A) Nishon (marker) belgilarga
- B) Replikatsiyaga
- C) Virulentlikka
- D) Patogenlik

**9. Quyidagilardan qaysi biri viruslar asosidagi vektorlar tarkibiga kiradi?**

- A) Xo'jayin hujayrasiga ko'chirib o'tkazish xususiyati;
- B) Amlifikatsiya xususiyati

- C) Marker belgisi
- D) Replikatsiyaga

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Transgen o'simliklar olishda ishlatiladigan genetik strukturalar.
2. Transgen o'simliklar yaratishda qo'llaniladigan fitogormonlar.

### 10.2. Agrobakteriya plazmidlari

Vektor sifatida bakterial shish hosil qiluvchi plazmidlardan foydalanish mumkin. Agrobacterium turlari evolyutsion jihatdan Rhizobium turkumiga mansub tuganakli bakteriyalar bilan bog'liq bo'lib, ular bilan ko'pgina umumiy xususiyatlarga ega. Lekin, agrobakteriyalarning o'simlik bilan o'zaro ta'siri o'ziga xos xususiyatlarga ega.

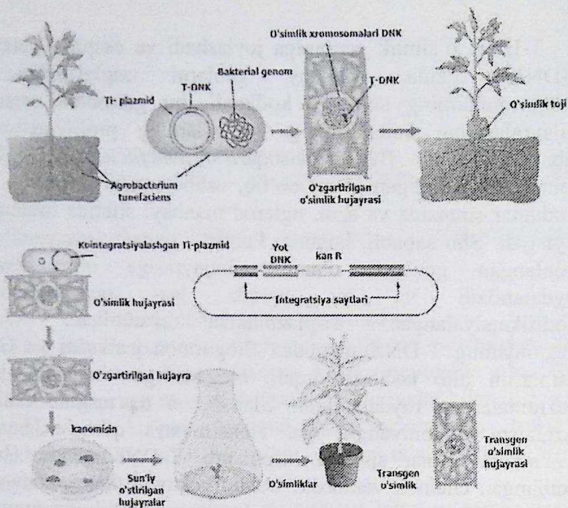
Agrobacterium turlarining o'simliklar bilan o'zaro ta'siri alohida qiziqish uyg'otadi, chunki ushbu turdagi bakteriyalar o'z genlarini xo'jayin genomiga integratsiyalash orqali xo'jayinning xususiyatlarini maxsus o'zgartiradi. Bundan tashqari, ushbu xususiyat prokariot DNKsining eukariot hujayraga migratsiyasining noyob namunasi bo'lib hisoblanadi. Mitoxondriya va xloroplastlarning DNKsi to'liq genetik tizimni, ya'ni genetik ma'lumotlar ekspressiyasi uchun zarur bo'lgan barcha komponentlarni o'z ichiga oladi: DNK, DNK-polimerazalar, RNK-polimerazalar va oqsil sintezi apparati (ribosomalar, t-RNK, aminoatsil-tRNK sintetazalar).

O'simliklarni tabiiy yo'l bilan transformatsiya qilish tuproq bakteriyasi *A.tumefaciens* yordamida samarali tarzda amalga oshiriladi. *A.tumefaciens* o'simlikni zararlagach, unda o'ziga xos faol moddalar ishlab chiqarila boshlaydi. Bu kimyoviy signalga javoban *A.tumefaciens* o'simlik hujayrasining membranasiga yopishib oladi. Shundan so'ng, bakteriyaning Ti-plazmidasini T-DNK qismi o'simlik hujayrasining yadrosiga ko'chirilishi sodir bo'ladi.

T-DNK o'simlik genomiga joylashadi va ekspressiyalanadi. T-DNK o'zida shunday genlarni saqlaydiki, ular fitogormonlarning sintezini kodlaydi, bu gormonlar o'simlik hujayralarining kattalashuviga va ularning proliferatsiyasiga sababchi bo'ladi. Bundan tashqari, *A.tumefaciens* T-DNKsida opin sintez qiladigan qismi bo'lib, ushbu modda bir qator faol moddalar sintezida va azot, uglerod manbayi sifatida muhim rol o'ynaydi. Shu sababli, bugungi kunda *A.tumefaciens* yordamida klonlangan genlarni o'simlik hujayrasiga olib o'tishda foydalaniladi va bu borada gen muxpandisligida modifikatsiyalangan Ti-plazmidalar yaratilgan. Bunda plazmidaning T-DNK qismidan fitogormon genlarini va OMG qismlarini olib tashlash orqali, o'zgartirilgan T-DNK qismli plazmidalardan foydalaniladi. Ular *E.coli* da turg'un faoliyat yurgizishi imkoniyatiga ega. Konstruksiya qilingan bunday plazmidalar Binar sistema hisoblanib, T-DNK genomi bilan klonlangan chelnok vektordir. Ushbu vektor *A.tumefaciens* ning shtammiga yuborilsa, ushbu bakteriya o'simlik hujayrasiga integratsiyalanishi natijasida yot gen o'simlik genomiga kiradi (24-rasm).

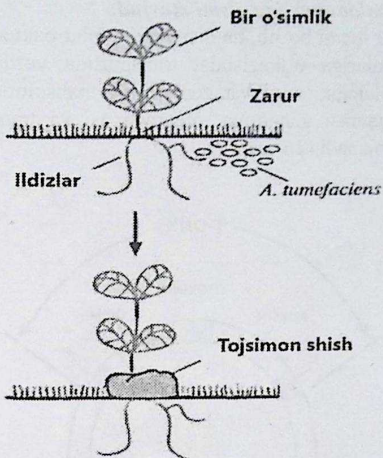
DNK turli o'simlik hujayralariga kiritishning samarali yo'llaridan biri mikrozarachalar bilan (biolistika) o'simlik hujayrasini bombardirovka qilishdir. O'simlik hujayrasiga kiritilgan begona genlarning ekspressiyasini ta'minlash uchun o'simlik promotorlaridan foydalaniladi.

Begona genlarni o'simlik xloroplasti yoki mitoxondriya DNK sig'a shunday joylashtirish metodlari ishlab chiqildiki, bunda kodlanadigan oqsil, aynan shu organellalarda sintez bo'ladi. Bu o'rinda shuni qayd etish kerakki, transgen o'simlik olishda marker genlar keyingi avlodlarda xalaqit beradi. Shu sababli, bugungi kunda transgen o'simliklardan marker genlarni olib tashlash metodlari ham ishlab chiqilan.



**24-rasm. *A. tumefaciens* ning o'simlikka integratsiyalanish jarayoni (A) va kanamisin tutgan vektor konstruktsiya (B).**

*Agrobacterium tumefaciens* ning Ti-plazmidasi yordamida yot genni o'simlikka transformatsiya qilish. Gramm "manfiy" tuproq bakteriyasi *Agrobacterium tumefaciens* – fitopatogen bo'lib, o'zining hayot sikli davomida o'simlik hujayrasiga transformatsiyalanish xususiyatiga ega. Ushbu transformatsiya o'simlikda shish hosil bo'lishiga olib kelib, o'simlikning normal o'sishiga to'sqinlik qiladi (25-rasm).

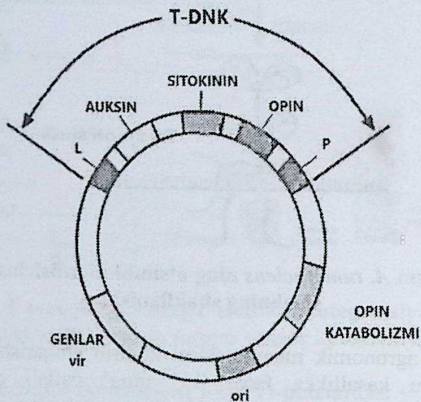


**25-rasm *A. tumefaciens* ning o'simlikni infisirlashi va shishning shakllanishi**

Jiddiy agronomik muammolarni keltirib chiqarishi mumkin bo'lgan bu kasallikka faqat ikki urug' pallali o'simliklar chalinadi, masalan, uzum, danakli daraxt mevalari, atirgullar. Shishning hosil bo'lishi o'simlik hujayrasiga kirishidan boshlab, o'simliklar hujayralarining genomiga integratsiyasi va bakteriya plazmidasining spetsifik segmenti – T-DNK qismiga ekspressiyasidan boshlanadi. T-DNK plazmidaning shunday qismiki, u yerda yetuk shishlar indutsirlanadi: u aksariyat hollarda *A. tumefaciens* shtammlarida mujassamlashgan bo'ladi. T-DNK ning uzunligi shtammga qarab 12 dan to 24 t.p.n. (ming nukleotid juftligi) gacha bo'ladi. Ti-plazmidani tutmaydigan *A. tumefaciens* shtamlari shakllangan o'simlik shishlarini hosil qila olmaydi (25-rasm).

### **Ti - plazmidaning 4 ta qismi mavjud:**

1. Vir qismi bo'lib, bu qismdagi genlar bakteriya genlarini o'simlik genlariga o'tkazishda, transportida yordam beruvchi genlar hisoblanadi, ya'ni Vir genlarining mahsulotlari T-DNKni o'simlik hujayrasi genomiga integratsiyasi va transporti uchun muhim hisoblanadi (26-rasm).

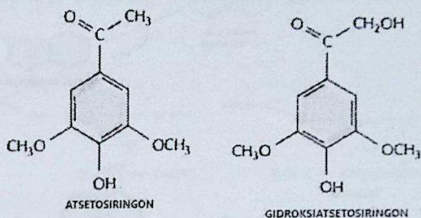


**26-rasm. Ti-plazmidaning genetik xaritasi.**

T-DNK faqatgina transkripsiyanadigan va translyasiyanadigan auksin, sitokinin va opin genlarini o'zida tutadi. T-DNK chegarasidan tashqarida Vir -genlari, (OMG) opin katabolizmini kodlaydigan ferment va **ori** – replikatsiyaning inisiatsiyalash sayti, ya'ni, *A.tumefaciens* plazmidasining barobar ta'minlaydigan qismlari, shuningdek, chap va o'ng tomon (L va P) flankalar bo'ladi. Fenol gruppasini tutgan asetosirengon va gidroksiasetosirengonlar virulentlik genlarini (vir) aktivlashtiradi, ular DNKdan tashqarida joylashgan bo'lib, 35 ming juft nukleotid

ketma-ketligi uzunligidagi Ti-plazmidida maydonida lokalizatsiyalangan bo'ladi.

Asetoseringon va gidroksiasetoseringonlarning struktura formulalari:

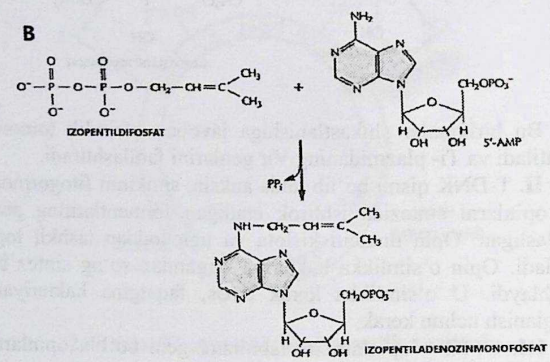
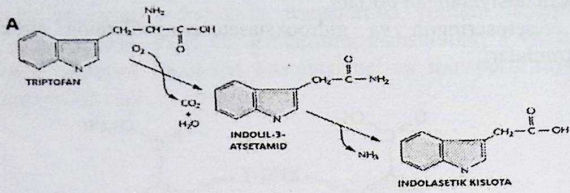


Bu birikmalar shikastlanishiga javoban o'simlik tomonidan ajratiladi va Ti-plazmidaning Vir genlarini faollashtiradi.

III. T-DNK qismi bo'lib unda auksin, sitokinin fitogormonlari va opinlarni sintezida ishtirok etadigan fermentlarning genlari joylashgan. Opin nuklein kislota va uglevoddan tashkil topgan bo'ladi. Opin o'simlikka bakteriya kirgandan so'ng sintez bo'la boshlaydi. U o'simlikka kerak emas, faqatgina bakteriyaning oziqlanish uchun kerak.

III. OMG – opinlarni metabolizmi geni bo'lib, opinlarning metabolizmidagi, ya'ni hazm jarayonida qatnashadigan genlar hisoblanadi.

IV. Ori – replikatsiyani inisiatsiyalash sayti hisoblanadi. Infektsion jarayon *A. tumefaciens* ni o'simlikning jarohat mavjud qismidan hujayraga kiradi va barcha jarayonlar amalga osha boshlaydi. Bakteriya odatda tabiatda spora holatida bo'ladi, u o'simlik hujayrasiga kirgandan so'ng, o'simlik tezda gormonlar ishlab chiqara boshlaydi, natijada o'simlik hujayralari tez bo'lina boshlaydi va shishni hosil qiladi. Ushbu holatda *tumefaciens* ning Ti-plazmidasidagi T-DNK qismida auksin va sitokininlar ishtirokidagi biosintez amalga oshadi.

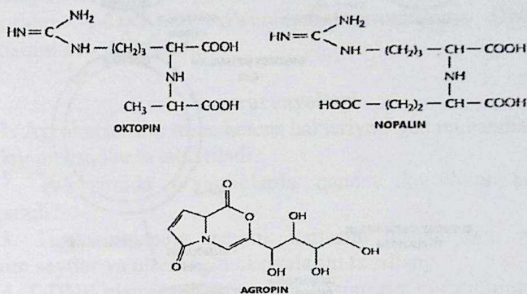


A – auksinning sintezi triptofanning triptofanmonooksigenaza tomonidan katalizlanadigan indolil-3-asetomidga aylanishidan boshlanadi. So‘ng indolil-3-asetomidning indolil-3-asetomidgidrolaza fermenti ishtirokida indolil sirka kislotasiga aylanishi sodir bo‘ladi.

B – sitokininning sintezi izopentiril gruppasiga ega izopentirildifosfatni 5'-AMP ga izopentiriltransferaza fermenti ishtirokida birikishidan sodir bo‘ladi va natijada izopentirila-denozinmonofosfat hosil bo‘ladi.

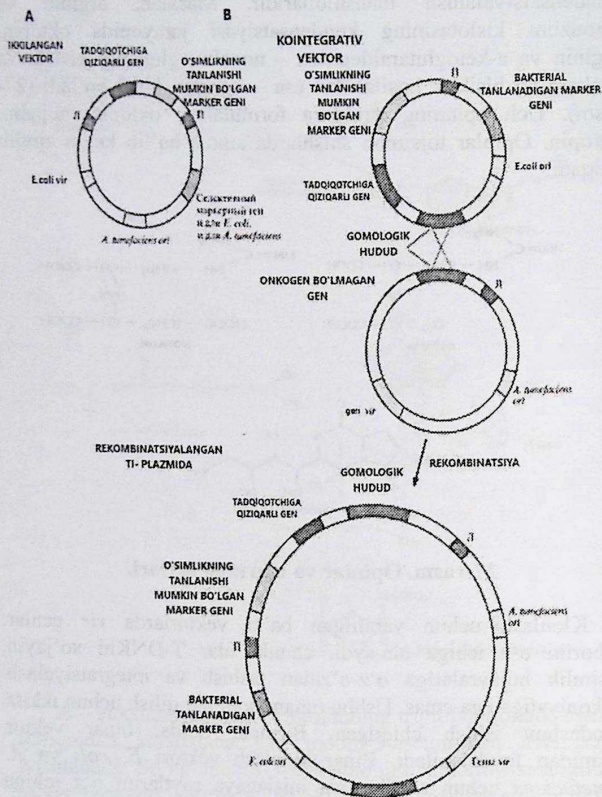
Har bir o‘ziga xos Ti-plazmidning T-DNKsida auksin va sitokinin genlaridan tashqari, opin sinfga mansub birikmalarni sintez qiluvchi gen mavjud. Opinlar – aminokislotalar va keto

kislotalar yoki aminokislotalar va shakarlarning noyob kondensatsiyalanish mahsulotlaridir. Masalan, arginin va pirouzum kislotasining kondensatsiyasi jarayonida oktopin, arginin va a-ketoglutaraldegidda – nopalin, glutamin kislota va shakarning bisiklik hosilasidan esa – agropin hosil bo‘ladi (27-rasm). Uch opinning struktura formulalari: oktopin, nopalin, agropin. Opinlar tojsimon shishlarda sintez bo‘lib keyin ajralib chiqadi.



### 27-rasm. Opinlar va ularning turlari.

Klonlash uchun yaratilgan ba’zi vektorlarda *vir* genlar naborini o‘z ichiga olmaydi, chunki ular T-DNKni xo‘jayin o‘simlik hujayralariga o‘z-o‘zidan tashish va integratsiyalash imkoniyatiga ega emas. Ushbu muammoni hal qilish uchun ikkita yondashuv ishlab chiqilgan. Birinchi holda, binar vektor tizimidan foydalaniladi. Binar klonlash vektori *E. coli* va *A. tumefaciens* uchun replikatsiya inisiatsiya saytlarini o‘z ichiga oladi, lekin *vir* genlarini olib yurmaydi, ya’ni u amalda *E. coli* chelnok vektori – *A. tumefaciens* hisoblanadi (28-rasm).



**28-rasm. Plazmidalar asosida vektor konstruksiya.**

Barcha klonlash bosqichlari *Ye. soli* da amalga oshiriladi va keyin vektor *A. tumefaciens* ga kiritiladi. *A. tumefaciens* ning retsipient shtammida modifikatsiyalangan onkogen bo'lmagan

("qurolsizlangan") Ti-plazmidida mavjud; u *vir*-genlarining to'liq to'plamini o'z ichiga oladi, lekin T-DNKning bir qismi (yoki hammasi) undan olib tashlangan (shuning uchun T-DNKni tashish mumkin emas). Ushbu tizimda onkogen bo'lmagan Ti-plazmidida *vir*-genlari mahsulotlari sintezlanadi, bu binar vektorining T-DNK uchastkasini harakatga keltiradi. *Vir*-genlari bilan kodlangan oqsillarni ishlab chiqarish orqali onkogen bo'lmagan Ti-plazmid yordamchi vazifasini bajaradi va binar vektoridan T-DNKning o'simlikning xromosoma DNKsiga birikishini osonlashtiradi.

### Nazorat savollari

1. *Agrobacterium tumefaciens* bakteriyasi gen muhandisligida qanday maqsadlarda ishlatiladi?
2. Ti-plazmidida o'simliklarda qanday kasallikni keltirib chiqaradi?
3. Ti-plazmidaning genetik kartasini tushuntiring, undagi muhim saytlar va ularning funksiyalarini ta'riflang.
4. T-DNK qismidagi gormonlar biosintezini tushuntiring.
5. Opinlarga mansub birikmalar va ularning sintezi qanday amalga oshadi?

### Test savollari

**1. O'simlikning agrobakteriyalar bilan zararlanishi natijasida qaysi qismi o'simlik genomiga o'tadi?**

- A) Ti plazmidaning onkogen qismi
- B) Ti plazmidaning barcha qismi
- C) agrobakteriyaning yaxlit o'zi
- D) agrobakteriyaning hech qaysi qismi o'simlik genomiga o'tmaydi

**2. Kointegrativ vektorlarni olish nimaga asoslanadi?**

- A) ikkita plazmidada o'rtasidagi rekombinatsiyaga
- B) genlar izchilligini klonlashga
- C) vektorlar sonini selektiv sharoitlarda ko'paytirishga
- D) vektorlarni har birini alohida-alohida kiritishga

3. Quyida ko'rsatilgan usullardan qaysi biri, ikki urug'pallali o'simliklardan transgen o'simliklar olishda eng keng tarqalgan usul hisoblanadi?

- A) kokultivatsiya
- B) genlarni to'g'ridan-to'g'ri ko'chirib o'tkazish
- C) Bioballistik transformatsiya
- D) DNK mikroinyeksiyasi

4. Transgen o'simlikda T-DNK ketma-ketliklari mavjudligini to'liq isbotlashda tahlil qilishning qaysi turidan foydalaniladi?

- A) polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR tahlili) DNK blot-gibridizatsiyasi
- B) kokultivatsiya
- C) Bioballistik transformatsiya
- D) genlarni to'g'ridan-to'g'ri ko'chirib o'tkazish

5. O'simliklar genomiga begona genlar ekspressiyasi uchun nimadan foydalaniladi?

- A) CaMV 35S promotori
- B) eukariot RNK polimeraza
- C) eukariot promotorlar
- D) umuman promotorlardan foydalanishning keragi yo'q

6. O'simliklarda lizinga boy oqsillarning sintez bo'lishi va ozuqaviylik qiymatining oshirilishi uchun ularga qanday genlar kiritiladi?

- A) prolamin genlariga qo'shimcha lizin kodonlari
- B) prolamin genlariga qo'shimcha metionin kodonlarini
- C) lizin oqsillarini
- D) Leguminlarni

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Transgen o'simliklar olinishida qo'llaniladigan zamonaviy usullar.

2. Virussiz o'simlik olishda qo'llaniladigan gen muhandisligi usullari.

3. O'simliklar gen muhandisligida vektor vazifasini bajaruvchi mikroorganizmlar.

### 10.3. Transgen o'simlik olish usullari

Transgen o'simliklar olishda genlarni hujayraga (bevosita) to'g'ridan-to'g'ri kiritish bir necha usullar bilan amalga oshiriladi:

- **Elektroporatsiya**
- «**Mini-hujayralar**»
- **Liposomalar kiritish**
- **Elektron zambaraklar usuli yoki Biologik ballistika**

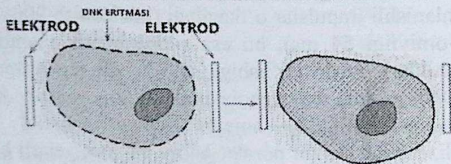
**Elektroporatsiya usuli.** Elektroporatsiya usuli yuqori kuchlanish impulslarining biomembrananing o'tkazuvchanligini qaytar ravishda oshirishga asoslanadi. Elektroporatsiyani amalga oshirish uchun muhitga hujayralarga kiritilishi kerak bo'lgan hujayralar va DNK fragmentlari qo'shiladi (29-rasm). Muhitdan yuqori kuchlanishli impulslar o'tkaziladi (kuchlanish 200–350 V, impuls davomiyligi 54 ms), bu esa sitoplazmatik membranada poralar (teshiklar) paydo bo'lishiga olib keladi (elektroprobov). Natijada DNK kabi makromolekulalarning osmotik kuchlar ta'sirida tashqi muhitdan hujayra ichiga bema'lol kirishi ta'minlanadi, buning uchun poralar hajmi va vaqt yetarli bo'ladi, shu bilan birga, hujayraning hajmi ham ortadi.

Hujayralar tomonidan DNKning maksimal darajada o'zlashtirilishi uchun elektr maydonining kuchlanishi, uning ta'sir qilish muddati, transformatsiyalanuvchi DNK konsentratsiyasi va retsipient-hujayralar har bir hujayra tizimi uchun eksperimental ravishda tanlanadi. Optimal elektroporatsiya sharoitida transformatorlar soni tirik qolgan hujayralarning 80% ga yetishi mumkinligi ko'rsatilgan.

Elektroporatsiya biokimyoviy emas, balki fizik usuldir va bu uning keng qo'llanilishiga sabab bo'ladi. Ko'pgina tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, elektroporatsiya usuli DNK molekulalarini turli hujayralarga kiritish uchun muvaffaqiyatli ishlatilishi mumkin: hayvon hujayralari, protozoa, achitqi, bakteriyalar, o'simlik protoplastlari va boshqa hujayralar. Ikki qavatli lipid membranasiga yuqori kuchlanishli razryadning elektroporativ ta'siri uning egrilik radiusiga bog'liq. Shuning uchun kichik

bakteriya hujayralari yuqori maydon kuchlanishida (10 kV / cm va undan ko'p) yirik hayvon va o'simlik hujayralariga qaraganda DNKnI samarali o'zlashtiradi.

Elektroporatsiya DNK molekularini hujayralarga kiritishning eng oddiy, samarali va ishonchli usuli hisoblanadi. Biroq, yaqin vaqtgacha bu usul maxsus asboblardan – elektroporatorlardan yo'qligi sababli cheklangan miqdordagi laboratoriyalarda qo'llanilgan. Kelgusi yillarda bunday qurilmalarning paydo bo'lishi va takomillashtirilishi gen muhandisligida bu yondashuvni turli xil hujayralar uchun keng ko'lamda qo'llashga olib keladi.



### 29- Rasm. Elektroporatsiya usuli.

**"Mini-hujayralar" usuli.** "Mini-hujayralar"ni donor hujayralarni kolsemid bilan mitozda bloklash orqali olinadi. Hujayralarni kolsemid bilan uzoq muddat ishlov berilganda har bir xromosoma atrofida yangi yadro membranasi hosil bo'ladi. Sitoxalazin V bilan ishlov berish va sentrifugalash sitoplazmatik membranaga inkapsullangan mikroyadro ko'rinishidagi mini-hujayralarning shakllanishiga olib keladi. Olingan mini-hujayralar turli xil ta'sirlarga juda sezgir, shu sababli, ularning sintezi uchun maxsus yumshoq sharoitlar tanlanadi. Usul qiyin, injiq, samaradorligi past –  $10^{-6}$  -  $10^{-7}$ .

**Liposomalarga kiritish.** Liposomalarga kiritish usuli ekzogen genetik materialni restriktazaning zararli ta'sirlaridan himoya qilish uchun ishlatiladi.

Liposomalar – fosfolipidlardan tashkil topgan sharsimon qobiq. Ular suvli eritma va lipidlar aralashmasini kuchli silkitish orqali olinadi, yoki fosfolipidlarning suvli emulsiyalarini ultratovush bilan ishlov berish orqali olinadi. Fosfatidilserin va xolesterindan iborat liposomalar DNKni hayvon va o‘simlik hujayralariga kiritish uchun juda mos keladi. Liposomalar yordamida tizimga kiritish usuli hujayralarga nisbatan kam toksikdir.

**Elektron zambaraklar usuli yoki biologik ballistika.** Biologik ballistika (biolistika) usuli bugungi kunda o‘simliklar transformatsiyasida, ayniqsa bir pallali o‘simliklar transformatsiyasida eng samarali usullardan biridir. Usulning mohiyati shundaki, diametri 0,6–1,2 mkm bo‘lgan volframning eng kichik zarralariga transformatsiya uchun zarur bo‘lgan gen konstruksiyasini o‘z ichiga olgan vektor DNK changlatiladi. DNK tutuvchi volfram zarralari selofan podlojkaga sepiladi va biolistik qurol ichiga joylashtiriladi. Kallus yoki hujayra suspenziyasi agar muhiti bo‘lgan Petri chashkasiga surtiladi va biolistik zambarak ostiga 10–15 cm masofada joylashtiriladi. Zambarakdagi bosim vakuum nasosi bilan 0,1 atm. gacha kamaytiriladi. Bosimning chiqishi paytida volfram zarralari biolistik to‘pdan katta tezlikda chiqariladi va hujayra devorlarini yorib sitoplazma va yadroga kiradi.

Odatda, to‘g‘ridan-to‘g‘ri markazda joylashgan hujayralar volfram zarralarining katta miqdori va bosimi tufayli nobud bo‘ladi, markazdan 0,6–1 cm masofada joylashgan zonada esa eng muvaffaqiyatli protransformatsiya bo‘lgan hujayralar mavjud bo‘ladi. Keyinchalik, hujayralarni o‘stirish va qayta tiklash uchun ehtiyotkorlik bilan muhitga o‘tkaziladi.

Biolistik zambarak usuli yordamida makkajo‘xori, sholi, bug‘doy, arpa kabi bir pallali o‘simliklar protransformatsiya qilingan va barqaror transformator o‘simliklari olingan. Bir pallali transgen o‘simliklar olish yutuqlaridan tashqari, biolistik transformatsiya seleksiyada muhim bo‘lgan tadqiqotlarda DNKni embriogen gulchangga to‘g‘ridan-to‘g‘ri o‘tkazish va keyinchalik transgen digaploid o‘simliklarni tezroq olishda muhim qadamdir.

Hozirgi vaqtda bu usul tamaki o'simliklarini transformatsiya qilish uchun ishlatiladi va gaploid o'simliklar qayta tiklangandan keyin barqaror transformatorlar olinadi.

### Nazorat savollari

1. Transgen o'simliklar olishning qanday usullari mavjud?
2. Elektroporatsiya usuli qanday maqsadlarda ishlatiladi?
3. "Mini-hujayralar" usulining qo'llanilishini tushuntiring.
4. Liposomalarga kiritish usulining qulaylik tomonlarini tushuntiring.
5. Elektron zambakarlar usuli yoki biologik ballistika usulining o'simliklar transformatsiyasida qanday maqsadlarda foydalaniladi?

### Test savollari

**1. Transgen o'simliklar olishdagi asosiy muammolardan biri nima?**

- A) o'simliklar xromosomasiga begona genni kiritish
- B) transgen o'simliklarning yashovchanligi pastligi
- C) o'simliklarning qiyin ko'payishi
- D) o'simliklardan kerakli genni ajratib olish

**2. Fitopatogenlarga chidamli transgen o'simliklar olishda qanday genlardan foydalaniladi?**

- A) xitinaza va glukonazani kodlovchi genlar
- B) peroksidaza, amilazani kodlovchi genlar
- C) oksidoreduktaza, izomeraza genlari
- D) bunday genlar mavjud emas

**3. O'simliklarni klonli mikroko'paytirish nima?**

- A) genetik bir xil o'simliklarning in vitro sharoitida jinssiz ko'paytirish
- B) probirkada o'simliklarni o'stirish
- C) o'simliklarni o'ziga xos ko'paytirish usuli
- D) o'simliklarni mayda bo'laklarga bo'lib ko'paytirish

4. Ajratilgan meristemalarni kulturalash va ularni mikroo'paytirishda xonalarning yoritilish darajasi qanday bo'lishi lozim?

- A) 3000-10000 lk (luks)
- B) 2000-8000 lk
- C) 1000-2000 lk
- D) 30000-50000 lk

5. O'simlik hujayralari differensiallanishi va uning kallusga aylanishi uchun ozuqa muhiti tarkibida fitogormonlarning qanday guruhlari bo'lishi zarur?

- A) Auksinlar, sitokininlar
- B) Gibberlin, sitokinin
- C) Etilen, absizov kislotasi
- D) Brassinosteroidlar, fuzikoksinlar

6. Bitta hujayradan hosil bo'lgan to'qima

- A) kallus
- B) shtamm
- C) inokulyum
- D) klon

#### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. O'simliklar gen muhandisligida ishlatiladigan gormonlarning roli.

2. Transgen o'simliklar olinishida qo'llaniladigan zamonaviy usullar.

3. Virussiz o'simlik olishda qo'llaniladigan gen muhandisligi usullari.

4. O'simliklar gen muhandisligida vektor vazifasini bajaruvchi mikroorganizmlar.

#### 10.4. Marker genlarni tutmagan transgen o'simliklar olish

Odatda, o'simlikka begona gen kiritilayotganda shu vaqtda selektiv marker geni ham kiritiladi. Bugungi kungacha bu genlarning birortasining odamga, hayvonlarga yoki atrof-muhitga salbiy ta'sir mexanizmi aniqlanmagan. Lekin ba'zi bir marker genlarning mahsulotlarida allergen yoki toksik moddalar bo'lishi

mumkin, antibiotikka chidamli bo'lgan genlar esa patogen tuproq mikroorganizmlariga tushib qolishi mumkin. Bundan tashqari, selektiv marker genlarning bo'lmasligi texnik jihatdan transgen o'simliklarning qo'shimcha genlar bilan transformatsiya bo'lishini qiyinlashtiradi, ya'ni bitta selektiv markerni 2 marta ishlatib bo'lmaydi. Bu muammolarni hal qilish uchun transgen o'simliklarni markerlarsiz olish metodlari ishlab chiqildi.

Markerlarsiz transgen o'simlik olishning bir eksperimental yo'li – o'simliklarni 2 ta turli DNK bilan kotransformatsiya qilish hisoblanadi. Bu DNKning bittasi o'zida marker genni saqlaydi, boshqasi esa bizni qiziqtirgan gen bo'ladi. Bu holatda 30% dan 80% gacha o'simliklar 2 ta genni o'zida saqlashi mumkin, lekin ular xromosoma DNKsining turli saytlarida integratsiyalangan bo'ladi. Transformatlar tanlab olingach, marker genini transgen o'simlikdan chatishtirish orqali olib tashlash mumkin bo'ladi. Boshqacha yo'lida esa selektiv marker geni o'simlikning mobil elementlarining o'rtasiga joylashtiriladi, ya'ni mobil elementlar – DS elementlar deb ataladi va bu konstruksiyani transpozaza genomi bilan birgalikda T-DNKga kiritiladi, bu genom DS elementlar o'rtasidagi DNK qismini kesadi va uni boshqa xromosoma saytiga o'tqazadi.

T-DNKni o'simlik xromosoma DNKsiga integratsiyasidan so'ng transpozaza fermenti selektiv marker genni kesishi mumkin va uni boshqa xromosoma saytiga joylashtirishi mumkin. Ma'nosi: Ch va O' – chap va o'ng flankiraydigan ketma-ketliklar, DS mobil element T-DNKni o'simlik xo'jayin DNKsiga joylashtirish jarayonida 90% holatda 2 ta DS elementlar orasiga joylashtirilgan selektiv marker boshqa DNK xromosomasining saytida bo'lib qoladi, bunda 50% ehtimol bilan bu sayt boshqa keyingi saytdan uzoqda joylashgan bo'ladi. Shu yo'sinda selektiv marker gen transformatsiyalangan o'simliklarni identifikatsiyalash uchun qo'llanilishi mumkin, keyin u chatishtirish jarayonida yo'qotiladi.

## Nazorat savollari

1. Marker genlarni tutmagan transgen o'simliklar olishning qanday ahamiyati bor?
2. Markerlarsiz transgen o'simliklar olishning qanday yo'llari bor?

## Test savollari

### 1. Antibiotiklarga chidamlilik genini toping.

- A) Selektiv genlar
- B) Reporter genlar
- C) Tinim davridagi genlar
- D) O'simlik meristemalarining himoya genlari

### 2. Hujayralar uchun neytral oqsillarni kodlaydigan va ularning to'qimalarda mavjudligini oson aniqlash mumkin bo'lgan genlar bu ....

- A) Reporter genlar
- B) Selektiv genlar
- C) Uyqudagi genlar
- D) Tinim davridagi genlar

## 10.5. O'simliklarda ekspressiyalanadigan rekombinat oqsillar

O'simliklar ustida olib borilayotgan biotexnologik tajribalardan asosiy maqsad madaniy o'simliklarning yangi navlarini yaratish hisoblanadi.

Aksariyat oldingi tajribalar o'simliklarni ozuqa qimmatini o'zgartirmagan holda ulardan yuqori hosil olishga qaratilgan edi. O'simliklarga zararkunanda hasharotlarga, virus, gerbisid va noqulay atrof-muhit sharoitlariga chidamli bo'lgan genlar va qarishini sekinlashtiradigan genlar kiritiladi. Bundan tashqari, gullar rangini o'zgartirish va o'simlik mahsulotlarining sifatini yaxshilashga qaratilgan tajribalar ham olib borilmoqda. O'simliklardan "bioreaktorlar" sifatida ham foydalanish yo'lga qo'yilmoqda.

**Parhez - davo xususiyati yaxshilangan o'simliklar yaratish.** Hozirgi vaqtda shubha yo'qki, mevalar, sabzavotlar va donli ekinlar bilan iste'mol qilinadigan ko'pgina mahsulotlar

farmakologik samara berishi va yurak-qon tomir rivojlanishini blokirovka qilib, rak va boshqa kasalliklarni keltirib chiqarishi mumkin. Shunday tabiiy o'simlik birikmalariga brokkolidagi sulforafan, uzumdagi rezvertatrol, soyadagi genistein, yashil choydagi epigallo kalxetin-3-gallat kabilar kiradi.

Oldin deyarli seleksiya yo'li bilan tarkibida yuqori darajada vitamin bo'lgan o'simliklarni olib bo'lmasdi. Lekin o'simlik biokimyosining rivojlanishi bilan vitamin biosintezi uchun qanday metabolik yo'llar kritik ekanligi ma'lum bo'ldi. Masalan, o'simliklarda  $\beta$ -karotinning sintez bo'lishi uchun o'simlikda fitoensitetaza fermenti bo'lishi kerak. Bu ferment 2 ta geranilgeranildifosfat molekulasining kondensatsiyasida ishtirok etadi. Narsissning fitoen-sintetaza geni guruchga yuborilgan va guruchning endospermida ekspressiyalangan. Shu yo'sinda "oltin guruch" navi olindi, bu guruch A vitamini yetishmovchiligi bilan kasallangan 2 mlrd. aholiga yordam berdi. Transgen raps (kanol) o'simligi yaratildi, u fitoen-sintetaza genini ekspressiyalaydi, uning urug'ida karotinoidlarning miqdori ko'paygan bo'ladi. Xuddi shu ferment kartoshka tugunaklarida ham ekspressiyalanadi, bu esa karotinoid va lyuteinlarning miqdori ortishiga olib keladi.

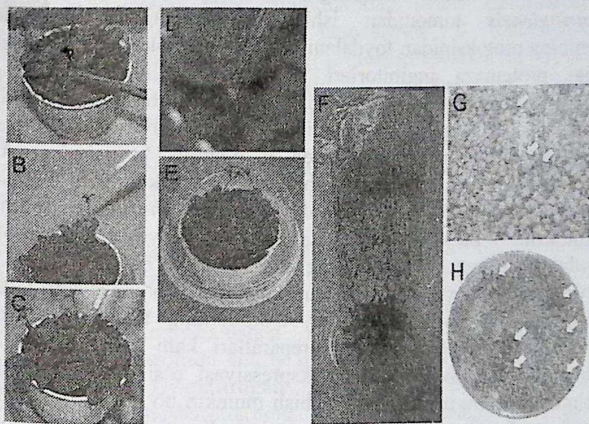
Yaqinda L-askorbin kislotasini ko'p sintez qiladigan transgen qulupnay o'simligi olindi. Bu o'simliklar D-galakturonat-reduktazaga bog'liq bo'lgan NADF genini yuqori darajada ekspressiya qilishi bilan ajralib turadi. Arabidopsida tarkibidagi bakterial gen GTF-siklogidrolaza-1 (EcGCH) hisobiga ekspressiyalanadigan ko'p miqdordagi oralat borligi aniqlandi.

Tamaki va kungaboqar o'simliklarida ekspressiyalangan ilk farmatsevtik ahamiyatga ega bo'lgan oqsil – insondagi o'sish gormoni edi (1986-yil). Shundan so'ng ko'pgina boshqa qimmatbaho oqsillar turli o'simliklardan sintez qilina boshladi.

O'simliklar tomonidan ishlab chiqariladigan rekombinant oqsillarning ichida shunday oqsillar bor, ulardan molekulyar-biologik kuzatishda foydalanildi, qo'shimcha oziqa sifatida foydalaniladigan sut oqsillari va tibbiyot, ishlab chiqarish maqsadlarida foydalaniladigan oqsil – polimerlar mavjud.

Qimmatli biologik faol peptidlarni urug'ining zapas oqsillari tarkibiga kiritib olish mumkin.

Shunday qilib, hayvon leyenkeoral ini kodlaydigan pentapeptid neyrogormonidagi DNK ketma-ketligi *Arabidopsis thaliana* urug'ining zapas oqsilidagi 2S albumin geniga joylashtiriladi. Transformirlangan raps va arabidopsis o'simliklarida ekspressiyalangan bu gen tarkibida yuqori darajadagi rekombinant oqsil bo'lgan urug'larini olish imkonini berdi. Maqsad asosida kiritilgan peptid spetsifik proteolitik ajratilish yordamida rekombinant oqsildan osongina ajratiladi (30-rasm).



**30-rasm.** *Arabidopsis thaliana* o'simligining o'sishi (4-5 hafta) chapda, Agrobakteriyalarning o'sishi va gulli inokulyatsiya transformatsiyasi (3 kun) Transformatsiyalangan urug'larning pishishi (1 oy) o'zgartirilgan Arabidopsis o'simliklarining skriningi (10-14 kun).

Agar bug'doydoshlarni gen muhandisligi yo'li bilan turli insektitsidlarni ishlab chiqaradigan qilib o'zgartirganimizda edi, zararkunanda hasharotlarga chidamli bo'lgan va qimmatbaho, xavfli kimyoviy pestitsidlar qo'llashni talab qilmaydigan kulturalarini olgan bo'lardik (odatda bunday xavfli pestitsidlar vegetatsiya davrida 6–8 marta sepiladi) 1995-yil hisobotlariga qaraganda 4 mlrd\$ li kimyoviy insektitsidlar butun dunyo bo'yicha qo'llangan. Biologik insektitsidlar odatda qat'iy chegaralangan hasharotlar turiga ta'sir etishi mumkin, odam va boshqa hayvonlar uchun zararsiz bo'ladi.

Gen muhandisligi metodlari yordamida zararkunanda hasharotlarga chidamli bo'lgan o'simlikni yaratish uchun turli strategiyalar ishlab chiqarilgan. Ba'zi holatlarda *Bacillus thuringiensis* tomonidan ishlab chiqariladigan insektitsid genining protoksinidan foydalaniladi. Boshqa holatda esa amilaza yoki proteinaza ingibitorlari tipidagi o'simlik oqsillarining genidan foydalaniladi, ular keng miqyosdagi hasharotlar bilan kurashda samarali hisoblanadi. Bu ingibitorlardan birortasi hasharot organizmiga tushganda u o'simlik oziqasini hazm qilolmay qoladi, chunki ingibitorlar o'simlik oqsillari yoki kraxmalning gidroliziga to'sqinlik qiladi. *B. thuringiensis* ning protoksini – bu o'simlikning xavfsiz himoya vositasidir: atrof-muhitga tushgach, u o'zining faolligini yo'qotadi. Afsuski, ko'pgina bug'doydoshlarning zararkunandalari o'simlikning ichki to'qimalari bilan oziqlanadilar, o'simlikning ustki yuzalariga sepiladigan *B. thuringiensis* preparatlari kam samarali bo'lib chiqadi. Agar toksin genlar ekspressiyasi o'simlikning o'zida ta'minlansa, bu muammoni yechish mumkin bo'ladi. Bu holatda insektitsidlarni sepishga hojat qolmaydi va toksinlar atrof-muhitga ham tushmaydi, bundan tashqari chegaralangan vaqt bilan bog'liq bo'lgan muammolar ham yechimini topadi. Biotexnologlarning vazifasi – bakterial insektitsidning faol formasini yetarli miqdorda sintez qilib o'simlikni zararkunandalardan himoya qiladigan transgen o'simlikni yaratishdir. Cry IA(a), cry IA(b) va cry IA(c) genlari – *B. thuringiensis* ssp. *Kurstaki* (*Bacillus thuringiensis* var.

*kurstaki*)da insektisid oqsillarining sinteziga javobgar bo'lib, amaliy jihatdan o'simliklarda ekspressiyalanmaydi. Zararkunanda hasharotlarga chidamli bo'lgan o'simliklarni faoliyatini oshirish uchun bu oqsil katta hajmda sintezlanishi kerak. Bu muammoni yechishga harakat qilib, joylashtirilgan genni o'Ichamini shunday kichraytirishdiki, toksinning faqatgina N oxirgi uchki qismi sintezlanishi va ekspressiya darajasini oshirish uchun uni kuchli o'simlik promotorlari bilan ta'minlashdi, natijada sintezlanadigan toksin soni sezilarli darajada ortdi. Natijada transgen o'simliklar zararkunanda hasharotlarga qarshi ma'lum himoyaga ega bo'ldi.

Keyin toksin faolligini ta'minlaydigan eng kichik nukleoid ketma-ketligining uzunligini topish vazifasi qo'yildi. Turli toksinlarda bir xil domen bormi-yo'qmi buni aniqlash uchun *B. thuringiensis* ning turli shtammlaridan ishlab chiqariladigan aminokislotalar ketma-ketligi taqqoslandi. *B. thuringiensis ssp.kurstaki* turli shtammlarining protoksin molekulari N-uchli qismi yuqori konservativ (98% gomologiya-o'xshashlik) bo'lishligi va S-uchli qismi esa nisbatan kamroq (45% o'xshash) bo'lishligi aniqlandi. So'nggi kuzatishlar shuni ko'rsatdiki, toksinning barcha insektisid faolligi protoksin molekulasining birinchi 646N uchidagi aminokislota qoldig'i bilan ta'minlanadi. Uning umumiy uzunligi 1150 aminokislotalardan iborat. Yuqori konservativ aminokislota ketma-ketligini kodlaydigan protoksin genining bir qismini klonlashdi. Bakteriyalarda ekspressiyalashdi va shu narsa ma'lum bo'ldiki, o'simliklarning tangacha qanotliilar turkumidan himoyalanişda xuddi tabiiy formasi singari laboratoriya sharoitida sun'iy qisqartirilgan oqsil ham samarali foyda berdi. Qisqartirilgan protoksin genini o'simliklarni zararkunanda hasharotlarning himoya qilinishini ta'minlash qobiliyatini o'rganish asosida transgen pomidor o'simligi yaratildi. Qisqartirilgan gen gulkaramning mozaika virusining kuchli konstitutiv 35S promotori bilan ta'minlangan va transkripsiyaning terminatsiya sayti bilan ham ta'minlangan bo'ladi. DNK kointegrativ Ti-plazmida vektorni klonlanadi. Vektor tarkibiga yana:

1) *E. coli* yoki *A. tumefaciens* ga nisbatan tanlov o'tkazishga imkon yaratadigan spektinomisinga chidamli bo'lgan gen – (Spcr);

2) *E. coli* ning replikatsiyasining inisatsiya sayti;

3) Transkripsiya terminatsiyasining sayti va promotorning nazorati ostida bo'lgan neomisinofototransferaza geni.

Bundan tashqari, kointegrativ vektor noopalin Ti-plazmidaning T-DNK sining o'ng tomonidagi ketma-ketlikka ega bo'ladi. Yangi hosil qilingan plazmida bilan *E. coli* transformatsiyalanadi, keyin konyugatsiya yordamida quolsizlantirilgan Ti-plazmidaga ega bo'lgan *A. tumefaciens* ning shtammiga yuboriladi. Protoksinning qisqartirilgan geni *A. tumefaciens* ga kombinatsiya qilingan pomidorning DNK xromosomasiga kiritiladi. Dala tajribalarida protoksinning qisqartirilgan formasini sintez qilgan pomidorning transgen navlari brajnik (*Manducasexta*), sovka, pomidorning ba'zi zararkunandalari (*Heliothiszea*)ga qarshi ba'zi bir himoya xususiyatiga ega bo'lganligi kuzatildi. Nomi

– *E. coli* yoki *A. tumefaciens* ga nisbatan tanlov o'tkazishga imkon yaratadigan spektinomisinga chidamli bo'lgan gen – (Spcr)

– *E. coli* ning replikatsiyasining initsiatsiya sayti;

– Transkripsiya terminatsiyasining sayti va promotorning nazorati ostida bo'lgan neomisinofototransferaza geni. Protoksin genining bir formasi ba'zi o'simliklarga kiritilib, u o'z faoliyatini yurgizmoqda, pomidor, tamaki, kartoshka, sholi, makkajo'xori, olma, baqlajon, lyuserna (beda), yong'oq, topol, archa, klyukva va g'o'za kabi o'simliklarida bu genlar ekspressiyalanmoqda. Kartoshkaning transgen navida *B. thuringiensissp. tenebrionis* inseksid toksini asosida sintetik genning effektiv ekspressiyasi amalga oshirildi. Olingan o'simliklar kartoshkaning asosiy zararkunandasi bo'lgan kolorado qo'ng'iziga yuqori chidamlikka ega. Bugungi kunda AQSHda undan keng miqyosda foydalanishga ruxsat etilgan.

### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligi usullari yordamida o'simliklarning qanday xususiyatlarini o'zgartirish mumkin?
2. Parhez – davo xususiyati yaxshilangan o'simliklar yaratishda qanday usullar qo'llaniladi?
3. O'simliklarda ekspressiyalanadigan rekombinant oqsillar haqida ma'lumot bering.

### Test savoli

**1. Biotexnologik usullar orqali bug'doyning don sifatini yaxshilashga qanday erishish mumkin?**

A)  $\alpha$ -zein geni ketma-ketligiga lizinning qo'shimcha kodlarini kiritish

B) Genlarni to'g'ridan-to'g'ri ko'chirib o'tkazish

C) Hali o'rganilmagan

D) hujayralar devorini parchalab, qayta tiklash

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Gen muhandisligi metodlari yordamida zararkunanda hasharotlarga chidamli bo'lgan o'simliklarni yaratish
2. Davo xususiyatini yaxshilangan o'simliklar yaratish

### 10.6. Gerbitsidlar chidamli bo'lgan o'simliklar

Har yili ishlab chiqarish 100 dan ortiq turli kimyoviy gerbitsidlar uchun 10 mlrd. dollar xarajat qilishga qaramay, ko'pgina yovvoyi o'tlar dastidan o'rtacha 10% hosil yo'qotilmoqda, bundan tashqari, ko'pgina gerbitsidlarning begona o'tlar va qishloq xo'jaligi kulturalariga bir xil ta'sir ko'rsatish mumkin;

– yerga ishlov berish begona o'tlar bo'lgunga qadar olib borilishi kerak, ba'zi bir gerbitsidlar atrof-muhida to'planib qoladi. Shu muammolardan hech bo'lmasa birortasini yechish uchun gerbitsidlar chidamli bo'lgan qishloq xo'jaligi kulturalarini yaratishga harakat qilsa bo'ladi.

Buning uchun:

- o'simlik tomonidan gerbitsidning yutilishini kamaytirish;

– gerbitsidga ta'sirchan bo'lgan oqsil sintezini ta'minlash, uning miqdori gerbitsid bo'lmagan sharoitda funksiyalarini amalga oshirish uchun yetarli bo'lishi kerak;

– gerbitsidga ta'sirchan bo'lgan oqsilning qobiliyatini kamaytirish;

– gerbitsidning o'simlik metabolizmdagi inaktivatsiyasini ta'minlash kerak bo'ladi.

Bulardan oxirgi uchtasi amalga oshirildi.

Glifosfat – gerbitsidga chidamli bo'lgan o'simliklardan olinadi, ular tezda toksik bo'lmagan tarkibda tuproqqa tarqaladi va shuning uchun atrof-muhitga hech qanday salbiy ta'sir ko'rsatmaydi. Glifosfat 5-yenol piruvilshikimat-3-fosfosin tetaza (EPSPS) ferlitinning ingibitori bo'lib, bakteriyalarda ham, o'simlikda ham aromatik aminokislotalarning sintezida muhim rol o'ynaydi. E. colining glifosfat chidamli bo'lgan genidan EPSPS ni kodlaydigan gen ajratib olinib, o'simlik promotori nazorati ostiga joylashtiriladi va unga transkripsiyani terminatsiya sayti ham kiritiladi va bular o'simlik hujayrasiga kiritiladi. Gerbitsid tomonidan ingibirlangan o'simlik fermentining o'rnini bosadigan darajada yetarli miqdorda EPSPS sintezlagan tamaki, petunya, pomidor, kartoshka va g'o'za transgen o'simliklari glifosfatga chidamli bo'lgan va begona o'tlarni kirish jarayonida transgenlar nobud bo'lmagan chidamlilikka ega bo'lishning yana bir yo'li – gerbitsidni inaktivatsiyasi yordamida bo'lib – bromoksinil gerbitsidi uchun ishlab chiqilgan, uni fotosintez ingibirleydi. Bunda chidamli bo'lgan o'simliklarni yaratish uchun ularning genomiga nitrilaza fermentini kodlaydigan bakteriya geni kiritiladi, u ta'sir ko'rsatishni boshlamasdan oq bromoksinilni inaktivatsiya qiladi. Tuproq bakteriyasi *Klebsiella ozacnae* dan nitrilaza geni ajratib olingan va kichik subbirlikdagi ribulozobifosfat – karboksilaza nurga ta'sirchan promotorining nazorati ostiga kiritilib, u tamaki inoliga joylashtirilgan. Transgen tamaki o'simliklari aktiv nitrilazani sintez qila boshlagan va ular bromoksinilga chidamli bo'lib qolgan. *K. ozacnae* nitrilazasi yordamida gerbitsid bromokinilining inaktivatsiyasi mevalar shakli va mazasini o'zgartirish, tashqi ko'rinishini o'zgartirish, terilgan

sabzoavot va mevalarning rangini o'zgartirish, ularning realizatsiyasida ma'lum bir muammolarni keltirib chiqarmoqda.

Oziqa mahsulotlarining tashqi ko'rinishini o'zgartirish bilan bog'liq usullardan biri turli oziqa qo'shimchalaridan biri bo'lmish sulfitlarning xavfsizligi borasida ba'zi ikkilanishlar paydo bo'ldi. Sabzavot va mevalarning rangini o'zgartirish monofenol va odifenollarning o-xinongacha oksidlanishidan boshlanadi. Jarayonda katalizator sifatida polifenoloksidaza ishtirok etadi. Ular yadro DNK sida kodlanadi, taxminan 59000 mol massaga ega, xloroplast va mitoxondriyalarning membranasida lokalizatsiyalanadi. Polifenoloksidazaning ingibirlanishi mevalarning rangini o'zgartirishi mumkinligi haqidagi taxminlar polifenoloksidaza turli k-DNK konstruksiyalarini tutadigan transgen kartoshka o'simligida tekshirildi.

Shunday vektorlar yaratildiki, kartoshkaning fragment yoki to'liq zanjirli kDNK polifenoloksidazasi ma'noli va ma'nosiz qismlar yo'nalishida joylashgan bo'ladi. Ular 3 ta promotor, ya'ni gulkaram mozaika virusining 35S promotori, granula bog'langan kraxmal sintezi genining promotori yoki patatin genining promotorlarining bittasini nazorati ostida bo'ladi. Oxirgi 2 ta promotor kartoshkaning tugunaklari uchun spetsifik hisoblanadi. Kartoshkaning yaxshi sotiladigan navlari bu konstruksiyalar bilan transformirlanganda qora dog'larga yuqori chidamlilikka ega bo'lgan (rangini fermentativ o'zgarishi), chidamlilik darajasi oddiy chatishtirish orqali erishilgan darajadan ancha yuqori bo'lgan. k-DNK polifenoloksidazasini tutadigan transgen o'simliklar oldindan belgilangandek zararlangandan keyin esa ularning qora dog'larga chidamli bo'lib qolishi kuzatilgan.

Kartoshka tugunagida patotin genining faolligi kam hollarda kuzatiladi, polifenoloksidazaning yig'ilib qolishiga esa hech narsa to'sqinlik qilmaydi. Ma'noli konstruksiyani o'zida saqlaydigan barcha o'simliklar katta hajmda polifenoloksidazani sintez qilishgan va nazoratdagilarga qaraganda katta darajada zararlanishga moyil bo'lganlar. Yuqorida aytib o'tilgan tajribalar qiyin o'tishiga qaramay, import qilishda ahamiyatli bo'lgan

o‘simliklarning fermentativ rang o‘zgartirishiga qarshi kurashda katta foyda berishi mumkin.

### Nazorat savollari

1. Gerbitsitlarga chidamli bo‘lgan o‘simliklarni olishda nimalarga e‘tibor berish kerak?
2. Qanday usullar yordamida sabzavot va mevalarning rangini o‘zgartirish mumkin?

### Test savollari

**1. Fitopatogenlarga chidamli transgen o‘simliklar olishda qanday genlardan foydalaniladi?**

- A) xitinaza va glukonazani kodlovchi genlar
- B) peroksidaza, amilazani kodlovchi genlar
- C) oksidoreduktaza, izomeraza genlari
- D) bunday genlar mavjud emas

**2. Qurg‘oqchilikka chidamli transgen o‘simliklar olish uchun in vitro sharoitida qaysi moddadan foydalaniladi?**

- A) polietilenglikol
- B) glitserin
- C) vitaminlar
- D) fitogormonlar

**3. Keskin haroratlarga chidamli o‘simliklar olish uchun qanday tadbir amalga oshiriladi?**

- A) antifriz moddalar akkumulyatsiyasini hosil qilish
- B) antifriz moddalar akkumulyatsiyasini yo‘qotish
- C) bog‘lanmagan suvlar miqdorini ko‘paytirish
- D) zaxira moddalar miqdorini kamaytirish

### 10.7. Mevalarning mazasini o‘zgartirish

Mevalar va sabzavotlar yuqori qimmatga ega bo‘lsa ham ularning ta‘mi yoqimsiz bo‘lsa, xaridorlar talabi sust bo‘ladi. Albatta, oziqa mahsulotlarning ta‘mini tuz, shakar, aromatizatorlar yoki boshqa qo‘shilmalar qo‘shib yaxshilash mumkin, lekin iqtisodiy nuqtayi nazaridan oziqa mahsulotlarining o‘zi turli ta‘m va xususiyatlarga ega bo‘lsa, yanada ishtahali

bo'lib ko'rinsa yaxshiroq bo'lardi. Afrika o'simligi *Dioscorephyllum cumminsii* Diels ning mevasida ekvimolyar miqdordagi saxarozadan o'rtacha 100 000 marta shirinroq bo'lgan monellin oqsili mavjud. Bu oqsil bemalol shakarning o'rinbosari bo'lib xizmat qilishi mumkin, bu bilan u uglevod bo'lmaganligi uchun metabolizmga zararli ta'sir ko'rsatmasa kerak.

Monellin-2 zanjirli dimer bo'lib, A-zanjiri 45 ta aminokislota qoldig'idan, B-zanjiri esa 50 ta aminokislota qoldig'idan tashkil topgan bo'ladi. Zanjirlar o'zaro kuchsiz nokovalent bog'lar bilan bog'langan va bu uni shira beruvchi sifatida qo'llanilishini chegaralaydi, ya'ni ovqat pishirish jarayonida qizdirilganda yoki kislota ta'sirida (masalan, limon yoki sirka kislota) u oson dissosiyalanadi va o'zining ta'm berish xususiyatlarini yo'qotadi. Monellin sintez qila oladigan transgen o'simlik yoki mikroorganizm yaratishdagi asosiy muammo – bu 2 ta alohida genni kodlash va kordinirlagan holda ekspressiyalashdir. Bu muammoni yechish uchun monellin kimyoviy yo'l bilan sintez qilinadi, u A va B zanjirlarni bitta polipeptid kabi kodlaydi.

Ximer oqsilini sintezlaydigan pomidor va salat bargining transgen navlari yaratildi. Buning uchun 2 ta turli promotordan foydalanildi. Pomidor o'simligida bu meva uchun spetsifik bo'lgan Ye-8 promotori qo'llanildi. U pomidor yetilishining boshida faollashadi. Salat bargining geni esa gulkaram mozaika virusining 35S –promotori nazorati ostiga qo'yildi. Ikkala holatda ham transkripsiya terminatsiyasining saytidan foydalanildi. Bu saytda Ti-plazmida tarkibida nopolinsintetaza geni poliadenilirlandi. Monellin sintetik genini Ti-plazmida asosidagi kointegrativ vektor sistemasidan foydalanib, o'simlik hujayrasiga *A.tumefaciens* orqali kiritildi. Bunda monellin moddasi yetuk va qisman yetuk bo'lgan salatning meva va barglaridan topildi. Yashil pomidorlarda esa u topilmadi, lekin o'simlik ingibitor gormoni – etilennning konsentratsiyasining ko'tarilishi oqibatida monellin oqsilining miqdori oshgan. Genetik shirasi kuzatilgan oziqa mahsulotlari bugungi kunda hali to'laligicha yaxshi samara bergani yo'q. Lekin tajribalar ijobiy samara bersa, aytib o'tilgan usul ko'pgina kulturalarning mazasini o'zgartirish uchun qo'llanilishi mumkin.

### Nazorat savollari

1. Gerbitsitlarga chidamli bo'lgan o'simliklarni olishda nimalarga e'tibor berish kerak?
2. Qanday usullar yordamida sabzavot va mevalarning rangini o'zgartirish mumkin?

### Test savoli

**1. Hujayra va to'qimalar kulturasidan foydalanishda muvaffaqiyatga erishish uchun qanday fiziologik jarayonlarni optimallashtirish zarur?**

- A) hujayralarning regeneratsiyasini va hujayralar differensiallanishini
- B) gul va meva hosil bo'lishini
- C) o'simliklarning o'sishi va rivojlanishini
- D) o'g'itlash

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Gerbitsidlarga chidamli bo'lgan o'simliklarning ahamiyati.
2. Mazasi o'zgartirilgan mevalarni olish.
3. Qurg'oqchilikka chidamli o'simliklarni olish.

### 10.8. Transgen hayvonlar olish

Uy hayvonlari va qushlarning samarali zotlarini (sut mahsuldorligi yuqori bo'lgan qora mollar, yaxshi junli qo'ylar, tuxum mahsuldorligi ko'p bo'lgan tovuqlar va h.k.) yaratish uchun ko'plab chatishtirish va seleksiya bosqichlari o'tkaziladi. Natijada, vaqt o'tishi bilan yuqori mahsuldor hayvon zotlarining ko'p yoki kamroq sof liniyalarini olish mumkin. Bugungi kunda chorva mollarining yangi zotlarini ko'paytirishning biologik asoslarining deyarli barcha jihatlarini chatishtirish va seleksiya strategiyasi juda muvaffaqiyatli amalga oshirgan. Biroq, samarali genetik liniyalar olingandan so'ng, chatishtirish va tanlash yo'li bilan yangi xususiyatlarni kiritish tobora qiyinlashib bormoqda. Sababi, yangi "qimmatli" genga ega bo'lgan liniyada "zararli" genlar ham bo'lishi mumkin, Buning natijasida avlodlar unumdorligi past bo'lib, ushbu holat yangi, takomillashtirilgan

liniyalar dastlabki foydali xususiyatlarini saqlab qolish imkonini beradigan yondashuvlarni ishlab chiqishni taqozo etadi.

Sutemizuvchilar hujayralariga begona genlarni kiritish bo'yicha muvaffaqiyatli tajribalar va yadroni embrion hujayradan olib, yadrosi olib tashlangan tuxum hujayraga o'tkazish yo'li bilan genetik jihatdan bir xil hayvonlarni yaratish imkoniyati (yadro ko'chirish, klonlash), individual genlarni yuqori hayvonlarning xromosoma DNKsiga kiritish imkonini berdi. Ushbu tajriba bir necha bosqichni o'z ichiga olib, quyidagicha amalga oshirildi:

- Klonlangan gen urug'langan tuxum hujayra yadrosiga kiritiladi.

- Inokulyatsiya qilingan urug'lantirilgan tuxum hujayralar retsipient (qabul qiluvchi) urg'ochi organizmiga joylashtiriladi (chunki sutemizuvchilarning embrion rivojlanishini muvaffaqiyatli yakunlash boshqa hollarda mumkin emas).

- Barcha hujayralardagi klonlangan genni o'z ichiga olgan implantatsiya qilingan tuxumlardan rivojlangan naslni tanlab olinadi.

- Embriion hujayralardagi klonlangan genni tutuvchi hayvonlar chatishtiriladi va yangi genetik liniya olinadi.

Transgen hayvonlar olishda genlarni hujayraga bevosita kiritish bir necha usullar bilan amalga oshiriladi:

- **Transfeksiya**
- **Mikroinyeksiya**
- **Elektroporatsiya**
- **«Mini-hujayralar»**
- **Liposomalar kiritish**

### **10.9. Transfeksiya usuli**

Transfeksiya usulida DNK kalsiy fosfat kristallariga adsorbsiyalanadi (Gresem Van der Eb, 1973). Kalsiy cho'kmasi hosil bo'ladi. Ular fagotsitoz orqali hujayra tomonidan so'riladi.

Transformatsiya samaradorligini oshirish uchun, seleksiya (tanlov) amalga oshiriladigan genni o'z ichiga olgan spetsifik

xromosomalar bunda eng kam parchalashi mumkin. Bir hujayraga ishlov berish uchun xromosomalar soni cheklangan. Bir retsipient-hujayraga ishlov berish uchun 20 dan ortiq xromosomani ishlatmaslik zarur, chunki suspenziyadagi xromosomalarning yuqori konsentratsiyasida ular agglyutinatsiyalanadi. Retsipient-hujayra donor xromosomalarning fragmentlarini o'z ichiga oladi, ular genomga qo'shilishi mumkin, o'z-o'zidan ko'payishi mumkin. Kiritilgan fragmentlarda ko'pincha bo'linishlar kuzatiladi.

Barcha hujayralar ham genom DNKni yuqori chastotada transformatsiyasiga qodir emas. Inson fibroblastlari plazmid DNKni samarali o'z ichiga oladi, genom DNK ni deyarli yo'q.

### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligida transgen hayvonlar olishda qanday usullardan foydalanish mumkin?
2. Transfeksiya usulida nimalardan foydalaniladi va qanday amalga oshiriladi?

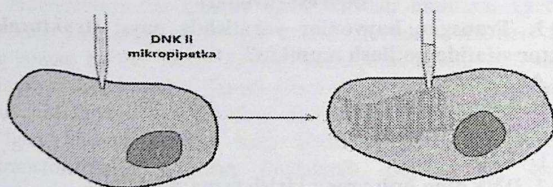
### Test savollari

1. Transgen hayvonlar yaratishda qaysi strukturalarni vektor sifatida qo'llash mumkin?
  - A) Viruslar
  - B) Plazmidalar
  - C) Yadro DNK-si
  - D) RNK
2. DNKning hujayraga kirish samaradorligi:
  - A) Yuqori emas
  - B) Yuqori
  - C) Usulga bog'liq
  - D) Mahoratga bog'liq
3. Transfeksiya jarayonida hujayraga DNK transformatsiya chastotasi:
  - A) Yuqori emas
  - B) Yuqori
  - C) Usulga bog'liq
  - D) Mahoratga bog'liq

### 10.10. Mikroinyeksiya usulida transgen hayvon olish

Sutemizuvchilar hujayralariga DNKni mikroinyeksiya qilish – diametri 0,1–0,5 mkml mikroipetkalar va mikromanipulyator ishlab chiqaradigan qurilma kashf bo‘lishiga asos bo‘ldi. Shunday qilib, timidinkinaza (TK) va pBR322 plazmidlar genini bilan herpes virusining fragmentini o‘z ichiga olgan plazmidlar TK-hujayralarga inyeksiya qilingan. Natijada TK genining yadrolarga kirib borishi va u yerda normal replikasiya bo‘lishi ko‘rsatilgan.

Mikroinyeksiya yordamida DNKni kiritish usuli 70-yillarning boshlarida Anderson va Diakumakos tomonidan ishlab chiqilgan. Asos sifatida, yaxshi jihozlar bilan 500–1000 hujayralarni 1 soatda inyeksiya qilish mumkin, ko‘pgina tajribalarda 50% hujayralarning barqaror integratsiyasi va genlar ekspressiyasi kuzatiladi. Ta’riflangan usulning afzalligi shundaki, u har qanday hujayraga har qanday DNKni kiritish imkonini beradi va hujayralardagi kiritilgan genni saqlab qolish uchun selektiv bosim talab qilinmaydi.



31- rasm. Mikroinyeksiya usulida DNK ni kiritish

#### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligida transgen hayvonlar olishda mikroinyeksiya usullari qachon va kim tomonidan kashf etilgan?
2. Mikroinyeksiya usullarida DNKni hujayraga kiritish qanday amalga oshiriladi?

## Test savollari

1. Mikroinyeksiya usuli kim tomonidan ishlab chiqilgan?

- A) Anderson va Diakumaks
- B) Maksam va Gilbert
- C) Mezelson va Yuan
- D) Sauzern

2. Hujayraning turg'un transformatsiyasi qanday holatda yuqori bo'ladi?

- A) Mikroinyeksiyada
- B) Transfeksiyada
- C) Ikkala holda ham yetarlicha yuqori bo'ladi.
- D) Ikkala holda ham yetarlicha yuqori bo'lmaydi.

3. Hayvon hujayrasida ham, bakteriya hujayrasida ham replikatsiya bo'la olish xususiyatiga ega vektor qaysi javobda berilgan?

- A) Chelnok
- B) Universal
- C) Dual vektor
- D) Dixost

4. Eukariot genlarning prokariot hujayralarga ekspressiyasi uchun ularni qaysi organizm regulyator elementlari nazoratiga qo'yish kerak?

- A) Prokariot
- B) Eukariot
- C) Arxey
- D) Bakterial

5. Qaysi faol modda bakteriya hujayralari uchun nishon belgi sifatida xizmat qiladi?

- A) Antibiotik
- B) Laktoza
- C) Timidinkinaza
- D) Transferaza

6. Hayvon hujayralari uchun marker (nishon) belgi sifatida qanday moddadan foydalaniladi?

- A) Timidinkinaza
- B) Antibiotik

- C) Laktoza
- D) Transferaza

**7. Gibrid DNKlar tuzilishida eng ko'p qo'llaniladigan usul qaysi?**

- A) Restriktaza-ligaza
- B) Konnektor
- C) Linkerlardan foydalanish
- D) Transferaza

**8. Restriktaza-ligaza usulida ma'noga ega bo'lmagan ketma-ketliklar bo'lishi:**

- A) Mumkin emas
- B) Mumkin
- C) Qisman mumkin
- D) Ketma-ketlikka yod gen kirishi mumkin

**9. Restriktazalar tanlab qirqadigan saytlar  $180^{\circ}\text{C}$  ga o'giriliganda:**

- A) Simmetrik
- B) Nosimmetrik
- C) Fragmentlangan
- D) Gomologik

### **10.11. Elektroporatsiya usulida transgen hayvon yaratish**

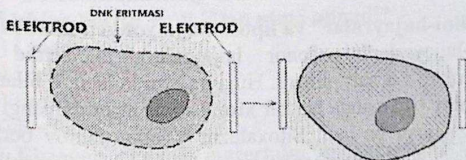
Elektroporatsiya yuqori kuchlanish impulslarining biomembrananing o'tkazuvchanligini qaytar ravishda oshirishiga asoslanadi. Elektroporatsiyani amalga oshirish uchun muhitga hujayralarga kiritilishi kerak bo'lgan hujayralar va DNK fragmentlari qo'shiladi (46-rasm). Muhitdan yuqori kuchlanishli impulslar o'tkaziladi (kuchlanish 200–350V, impuls davomiyligi 54 ms), bu esa sitoplazmatik membranada poralar (teshiklar) paydo bo'lishiga olib keladi (elektroproboy). Natijada DNK kabi makromolekulalarning osmotik kuchlar ta'sirida tashqi muhitdan hujayra ichiga bemalol kirishi ta'minlanadi, buning uchun poralar hajmi va vaqt yetarli bo'ladi, shu bilan birga, hujayraning hajmi ham ortadi.

Hujayralar tomonidan DNKning maksimal darajada o'zlashtirilishi uchun elektr maydonining kuchlanishi, uning ta'sir

qilish muddati, transformatsiyalanuvchi DNK konsentratsiyasi va retsipient-hujayralar har bir hujayra tizimi uchun eksperimental ravishda tanlanadi. Optimal elektroporatsiya sharoitida transformatorlar soni tirik qolgan hujayralarning 80% ga yetishi mumkinligi ko'rsatilgan.

Elektroporatsiya biokimyoviy emas, balki fizik usuldir va bu uning keng qo'llanilishiga sabab bo'ladi. Ko'pgina tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, elektroporatsiya usuli DNK molekulalarini turli hujayralarga kiritish uchun muvaffaqiyatli ishlatilishi mumkin: hayvon hujayralari, protoza, achitqi, bakteriyalar, o'simlik protoplastlari va boshqa hujayralar. Ikki qavatli lipid membranasi yuqori kuchlanishli razryadning elektroporativ ta'siri uning egrilik radiusiga bog'liq. Shuning uchun kichik bakteriya hujayralari yuqori maydon kuchlanishida (10 kV / cm va undan ko'p) yirik hayvon va o'simlik hujayralariga qaraganda DNKni samarali o'zlashtiradi.

Elektroporatsiya DNK molekulalarini hujayralarga kiritishning eng oddiy, samarali va ishonchli usuli hisoblanadi. Biroq, yaqin vaqtgacha bu usul maxsus asboblardan – elektroporatorlardan yo'qligi sababli cheklangan miqdordagi laboratoriyalarda qo'llanilgan. Kelgusi yillarda bunday qurilmalarning paydo bo'lishi va takomillashtirilishi gen muhandisligida bu yondashuvni turli xil hujayralar uchun keng ko'lamda qo'llashga olib keladi.



32-rasm. Elektroporatsiya usuli.

### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligida elektroporatsiya usulining afzallik tomonlari nimalardan iborat?
2. Elektroporatsiya usulini qanday amalga oshirish mumkin va usulning amalga oshishi nimalarga bog'liq?

### Test savollari

**1. Yuqori impulslar berib membrananing o'tkazuvchanligini o'zgartiradigan usul qanday nomlanadi?**

- A) Elektroporatsiya
- B) Mikroinyektsiya
- C) «Bo'laklash»
- D) «Gen zambarak»

**2. Fosfolipidlarning suvli emulsiyalariga ultratovush orqali ishlov berish yo'li bilan nima olinadi?**

- A) liposomalar
- B) Lipidlar
- C) Fosfotidil xolin
- D) Fosfolipidlar ekstrakti

**3. Sitoplazma membranasida poralar hosil qilish usuli qanday ataladi?**

- A) Kimyoviy transformatsiya
- B) Elektro transformatsiya
- C) Gomogenizatsiya
- D) Pinotsitoz

### **10.12. "Mini-hujayralar" va liposomaga yot gen kiritish usuli**

"Mini-hujayralar"ni donor hujayralarni kolsemin bilan mitozda bloklash orqali olinadi. Hujayralarni kolsemin bilan muddat ishlov berilganda har bir xromosoma atrofida yanvar membranasi hosil bo'ladi. Sitoxalazin V bilan ishlov berish sentrifugalash sitoplazmatik membranaga inkapsulyatsiya mikroyadro ko'rinishidagi mini-hujayralarning shakllanishiga keladi.

Olingan mini-hujayralar turli xil ta'sirlarga juda sezgir, shu sababli, ularning sintezi uchun maxsus yumshoq sharoitlar tanlanadi. Usul qiyin, injiq, samaradorligi past –  $10^{-6}$ – $10^{-7}$ .

### 10.13. Liposomalarga kiritish

Liposomalarga kiritish usuli ekzogen genetik materialni restriktazaning zararli ta'sirlaridan himoya qilish uchun ishlatiladi. Liposomalar – fosfolipidlardan tashkil topgan sharsimon qobiqdir. Ular suvli eritma va lipidlar aralashmasini kuchli silkitish orqali olinadi, yoki fosfolipidlarning suvli emulsiyalarini ultratovush bilan ishlov berish orqali olinadi. Fosfatidilserin va xolesterindan iborat liposomalar DNKni hayvon va o'simlik hujayralariga kiritish uchun juda mos keladi. Liposomalar yordamida tizimga kiritish usuli hujayralarga nisbatan kam toksikdir.

#### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligida liposomalar nimalardan tashkil topgan?
2. Liposomalarga kiritish usuli nima uchun ishlatiladi?
3. Gen muhandisligida "Mini - hujayralar" va liposomaga yot gen kiritish usuli nima uchun ishlatiladi?

#### Test savollari

1. Fosfolipidlarning suvli emulsiyalariga ultratovush orqali ishlov berish yo'li bilan nima olinadi?
  - A) Liposomalar
  - B) Lipidlar
  - C) Fosfatidil xolin
  - D) Fosfolipidlar ekstrakti
2. Ekzogen genetik materialni hujayraga kiritishda uni himoya qilish uchun nimadan foydalaniladi?
  - A) Liposoma
  - B) BSA
  - C) PAV
  - D) Polimeraz ingibitorlari

### Mustaqil ta'lim savollari

1. Transgen hayvonlar yaratishning afzalliklari.
2. Transgen hayvonlarga begona genlarni kiritish bo'yicha amalga oshirilgan muvaffaqiyatli tajribalar.
3. Transgen hayvonlar yaratishda qo'llaniladigan tadqiqot usullari.

#### 10.14. Transgen sichqon olish

Transgen texnologiyalar laboratoriya sichqonlarida ishlab chiqilgan va takomillashtirilgan. 1980-yillarning boshidan beri sichqonlarning turli shtammlariga yuzlab genlar kiritilgan. Ushbu tadqiqotlar o'smalarning genlarni tartibga solish va rivojlanishi mexanizmlarini, immunologik o'ziga xoslik xarakterini, o'sish va rivojlanishning molekulyar genetikasini va boshqa fundamental biologik jarayonlarni o'rnatishga katta hissa qo'shdi. Transgen sichqonlar dori vositalarini keng ko'lamli sintez qilish imkoniyatlarini o'rganishda, shuningdek, insonning turli genetik kasalliklarini modellashtirish imkonini beruvchi transgen liniyalarni yaratishda muhim rol o'ynadi.

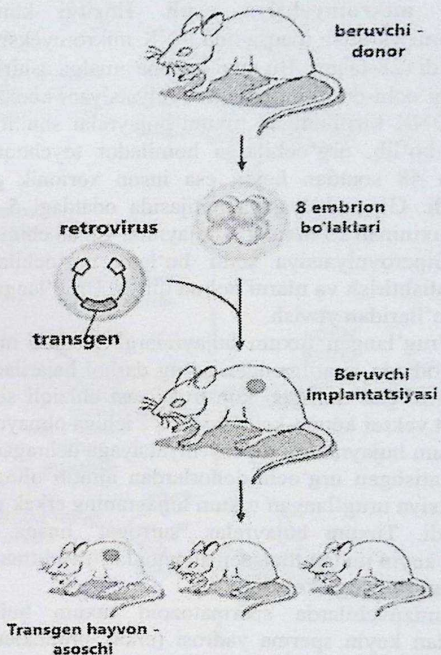
Yot DNKni sichqonlarga kiritish turli usullar bilan amalga oshirilishi mumkin:

1) embrion hujayralarini infisirolovchi retrovirus vektorlar yordamida, bunda rivojlanishning dastlabki bosqichlarida embriolni retsipient-urg'ochiga implantatsiya qilishdan oldin retrovirus vektorlardan foydalaniladi;

2) urug'langan tuxumning kattalashgan sperma yadrosiga (erkak pronukleus) mikroinyeksiya qilish;

3) rivojlanishning dastlabki bosqichida genetik modifikatsiyalangan embrion o'zak hujayralarini oldindan implantatsiya qilingan embrionga kiritish.

**Retrovirus vektorlaridan foydalanish.** Transgenezning boshqa usullariga nisbatan retrovirus vektorlaridan foydalanishga asoslangan usulning afzalligi (33-rasm) uning samaradorligidadir.



**33-rasm. Retrovirus vektorlari yordamida transgen sichqonlar liniyalarini olish.**

Embrion, odatda, 8-hujayra bosqichida, transgenni tashuvchi rekombinant retrovirus bilan kasallangan. "Surrogat" onalar embrioni bilan implantatsiya qilingan urg'ochilar transgen nasl beradi. Murtak hujayralar liniyalarida transgenni tutuvchi sichqonlarni identifikatsiya qilish uchun bir qator chatishtirishlar amalga oshiriladi.

**DNK mikroinyeksiya usuli.** Hozirgi kunda transgen sichqonlarni yaratish maqsadida DNK mikroinyeksiyasi eng ko'p qo'llaniladi (28-rasm). Bu quyidagicha amalga oshiriladi:

1. Urg'ochi-donorlarda giperovulyatsiyani kuchaytirish orqali begona DNK kiritiladigan tuxum hujayralar sonini ko'paytirish. Birinchi bo'lib, urg'ochilarga homilador toychoqning zardobi, taxminan 48 soatdan keyin esa inson xorionik gonadotropini yuboriladi. Giperovulyasiya natijasida odatdagi 5–10 ta tuxum o'rniga taxminan 35 ta tuxum hujayralar ishlab chiqariladi.

2. Giperovulyatsiya sodir bo'lgan urg'ochilarni erkaklari bilan chatishtirish va ularni nobud qilish. Urug'langan tuxumlarni tuxum yo'llaridan yuvish.

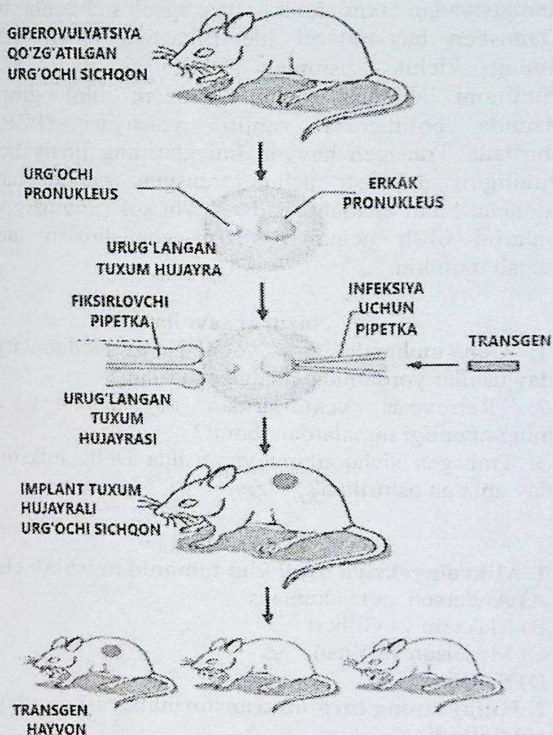
3. Urug'langan tuxum hujayralarga DNKni mikroinyeksiya qilish – odatda ajratilganidan so'ng darhol bajariladi. Ko'pincha ushbu kiritilgan transgen konstruksiyasi chiziqli shaklda bo'lib, prokariot vektor ketma-ketliklarini o'z ichiga olmaydi.

Tuxum hujayralarni giperovulyatsiyaga uchragan va erkaklari bilan chatishgan urg'ochi-donorlardan ajratib olinadi. Transgen konstruksiya urug'langan tuxum hujayraning erkak pronukleusiga yuboriladi. Tuxum hujayralar "surrogat" onaga implantatsiya qilinadi, keyin undan transgen sichqonlar, ya'ni transgen liniyalar asoschilari dunyoga keladi.

Sutemizuvchilarda spermatozoid tuxum hujayraga kirib borganidan keyin sperma yadrosi (erkak pronukleus) va tuxum hujayra yadrosi alohida ajralgan holatda bo'ladi. Ikkinchisi mitotik bo'linishni tugatib, urg'ochi pronukleusga aylangandan so'ng, yadrolar qo'shilishi (kariogamiya) sodir bo'lishi mumkin. Erkak pronukleus odatda urg'ochi pronukleusidan ancha katta bo'lib, uni seksiyali mikroskop bilan aniqlash va unga begona DNKni kiritish oson. Bunday holda, tuxum hujayrani ko'chirish, kerakli joyga to'g'ri yo'naltirish va mikroinyeksiya davomiyligi uchun fiksirlash mumkin. Tajribali eksperimentator kuniga bir necha yuz tuxum hujayrani inokulyatsiya qilishi mumkin.

DNK inyeksiyasidan so'ng, 25–40 tuxum hujayrani mikrojarrohlik yo'li bilan "surrogat" onaga joylashtiriladi va unda

vazektomiya qilingan erkak bilan juftlashishi orqali soxta homiladorlik qo'zg'atiladi.



**34-rasm. Mikroinyektsiya usuli bilan transgen sichqonlarning liniyalarini olish.**

Sichqonlarda juftlashish bachadonni implantatsiyaga tayyorlashning yagona ma'lum usuli hisoblanadi. Vazektomiya qilingan erkak sperma ishlab chiqarmagani uchun surrogat

onaning tuxum hujayralarining hech biri urug'lanmaydi. Embriionlar faqat kiritilgan tuxum hujayralardan rivojlanadi va implantatsiyadan taxminan 3 hafta o'tgach sichqonlar tug'iladi.

Transgen hayvonlarni identifikatsiya qilish uchun ularni dumining kichik qismidan DNK ajratiladi va transgen mavjudligini aniqlash uchun Sauzern blot gibridizatsiyasi yordamida polimeraza zanjiri reaksiyasi (PZR) usulida tekshiriladi. Transgen hayvon liniyalarining jinsiy hujayralarida mavjudligini aniqlash uchun transgen sichqonchani boshqa sichqoncha bilan chatishtiriladi. Keyin sof (gomozigot) transgen liniyalarini olish uchun nasllarni chatishtirish tadqiqotlarini o'tkazish mumkin.

### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligida yot DNKni sichqonlarga kiritish qanday usullar yordamida amalga oshiriladi?
2. Retrovirus vektorlaridan foydalanishga asoslangan usulning afzalligi nimalardan iborat?
3. Transgen sichqonlarni yaratishda DNK mikroinyeksiyasi qanday amalga oshiriladi?

### Test savollari

1. Mikroinyeksiya usuli kim tomonidan ishlab chiqilgan?
  - A) Anderson va Diakumaks
  - B) Maksam va Gilbert
  - C) Mezelson va Yuan
  - D) Sauzern
2. Hujayraning turg'un transformatsiyasi qanday holatda yuqori bo'ladi?
  - A) Mikroinyeksiyada
  - B) Transfeksiyada
  - C) Ikkala holda ham yetarlicha yuqori bo'ladi
  - D) Ikkala holda ham yetarlicha yuqori bo'lmaydi

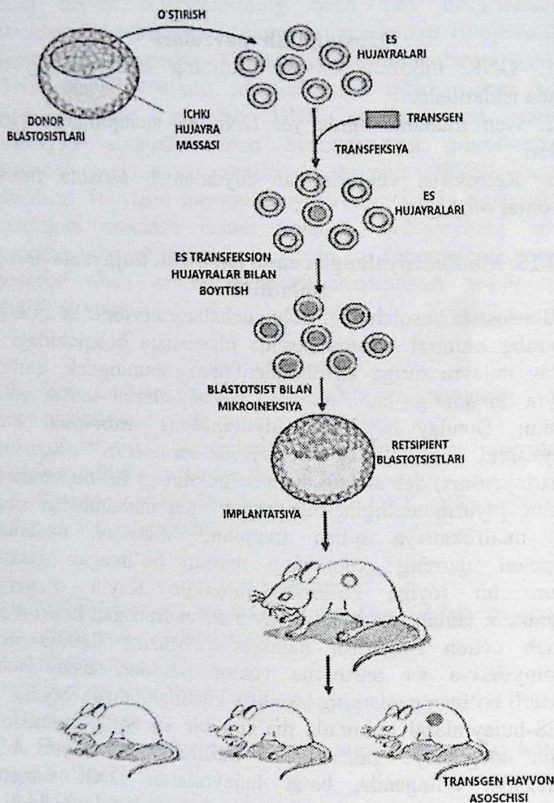
### Mustaqil ish mavzulari

1. DNK mikroinyeksiyasi usulining transgen hayvonlar olishda ishlatilishi.
2. Gen muhandisligida yot DNK ni sichqonlarga kiritish usullari.
3. Retrovirus vektorlaridan foydalanish asosida transgen hayvonlar olish.

#### 10.15. Modifikatsiyalangan embrion o'zak hujayralarining ishlatilishi

Blastosista bosqichidagi sichqonchalar embrionidan ajratilgan hujayralar kultural holatda boshqa blastosista bosqichidagi har qanday hujayra turiga kiritilganida ham, shuningdek, embrion hujayra liniyalariga ham, o'zining xususiyatlarini saqlab qolishi mumkin. Bunday hujayralar **plyuripotent embrional o'zak hujayralari** (ingliz tilidan "*embryonic stem cells*") qisqartmasi **ES-hujayralari**) deb ataladi. Kultura holatidagi ES-hujayralarini, ularning plyuripotentligini buzmasdan, gen muhandisligi orqali oson modifikatsiya qilish mumkin. Masalan, funksional transgeni ularning genomidagi muhim bo'lmagan genning ma'lum bir joyiga kiritilishi mumkin. Keyin o'zgargan hujayralarni tanlab, o'stirib, ko'paytirish va transgen hayvonlarni yaratish uchun ishlatilish mumkin (29-rasm). Ushbu holat mikroinyeksiya va retrovirus vektor tizimlari usuli uchun xarakterli bo'lgan genlarning tasodifiy kiritilishidan saqlaydi.

ES-hujayralarni kulturada ma'lum bir spetsifik xromosoma saytiga integratsiya qilish uchun mo'ljallangan vektor bilan transfeksiya qilinganda, ba'zi hujayralarda DNK tasodifiy joylashib qoladi, boshqalarida esa kerakli saytga joylashadi va ko'pincha ES-hujayralarida integratsiya umuman sodir bo'lmaydi. Birinchi turdagi hujayralar sonini ko'paytirish uchun ijobiy-salbiy (pozitivno-negativ) deb ataladigan selektiv tanlov ishlatiladi. Ushbu strategiya shundan iboratki, bunda kerakli saytga integratsiyalangan vektor DNKga ega hujayralarni ijobiy tanlab olish va tasodifiy saytga integratsiyalangan vektor DNKga ega hujayralarni salbiy tanlashdan iborat.



**35-rasm. Embrion o'zak (ES) hujayralarining genetik modifikatsiyasi usuli yordamida transgen sichqonchani olish.**

ES-hujayralarini sichqoncha blastosistasining ichki hujayra massasidan olinadi. Ular transgenni tutuvchi vektor bilan transfeksiya qilinadi, o'stirib ko'paytiriladi va transfeksiyalangan hujayralarni ijobiy-salbiy tanlov (pozitivno-negativnaya seleksiya) yoki PZR bilan aniqlanadi. Transfeksion hujayralar populyatsiyasini yana qayta o'stiriladi va blastosistlarga kiritiladi, so'ngra ular "surrogat" onalarning bachadoniga joylashtiriladi (implantatsiya qilinadi). Embrion hujayralarida transgen mavjud bo'lgan asoschi-hayvonlarni chatishtirish orqali transgen sichqonlarning liniyalarini olish mumkin.

### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligida o'zak hujayralari qanday hujayralar, ular nima maqsadda ishlatiladi?
2. Transgen sichqonlar olishda modifikatsiyalangan embrion o'zak hujayralarining ishlatilishi qanday amalga oshiriladi?
3. Implantatsiya va implantat deganda nimani tushunasiz?

### Test savoli

**1. Yuqori impulslar berib membraning o'tkazuvchanligini o'zgartiradigan usul qanday nomlanadi?**

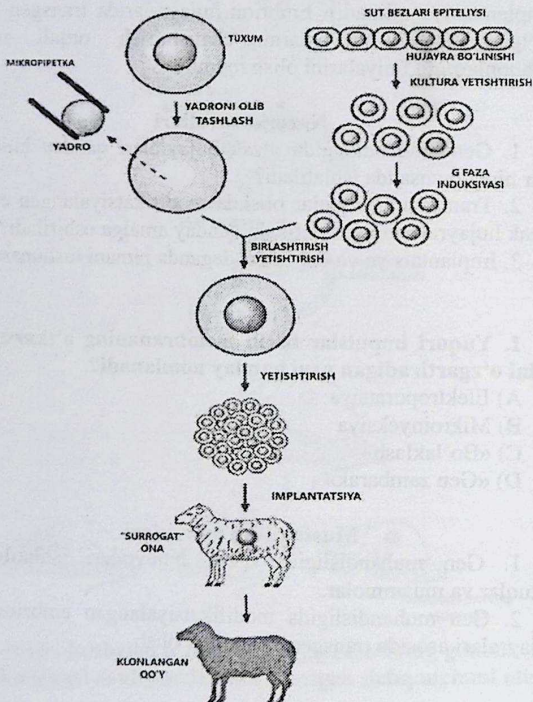
- A) Elektroporatsiya
- B) Mikroinyeksiya
- C) «Bo'laklash»
- D) «Gen zambarak»

### Mustaqil ish mavzulari

1. Gen muhandisligida o'zak hujayralari ishlatilishidagi yutuqlar va muammolar.
2. Gen muhandisligida modifikatsiyalangan embrion o'zak hujayralari asosida transgen sichqonlar olish.

## 10.16. Yadroni ko‘chirib o‘tkazish usulida transgen qo‘yni klonlash

Tekshirilayotgan hujayraning yadrosini yadrosi olib tashlangan tuxum hujayraga ko‘chirib o‘tkazish va undan so‘ng tuxum hujayrada yangi avlodning rivojlanishini va yashovchan avlodni shakllantirish qobiliyatini tekshirish orqali plyuripotentlikni aniqlash mumkin.



36-rasm. Yadrolarni ko‘chirib o‘tkazish usuli yordamida qo‘yni klonlash.

Bir qancha laboratoriyalarda embrional, homila hujayrasi va yetuk organizm hujayralarining plyuripotentligini turli darajadagi muvaffaqiyatlar bilan tekshirib ko'rilgan. Embrion hujayralarining yadrolari – past samaradorlikda bo'lsa ham – rivojlanishni ta'minlashga qodir ekanligi ko'rsatilgan. Masalan, yirik qoramollarning embrion hujayralarini qisqa vaqt davomida o'stirib ko'paytirib, so'ng hujayra yadrolarini ko'chirish usuli yordamida yashovchan organizmlar olingan. Dollni ismli taniqli qo'yni voyaga yetgan qo'yning sut (yelini) hujayrasidan yadro o'tkazish yo'li bilan klonlangan (30-rasm). Shunday qilib, birinchi marta differensiyalangan yetuk organizm (voyaga yetgan) hujayra yadrosining plyuripotentligi isbotlangan. Jumladan, istisno qilib bo'lmaydi, albatta, donor yadro aslida – donor organizmning sut bezlari epiteliysida mavjud bo'lgan differensiyalanmagan hujayralardan olingan.

Dollini differensiyalangan hujayra yadrosidan va boshqa uchta qo'yni embrion hujayralar yadrolaridan klonlash uchun, dam olish bosqichidagi ( $G_0$ ) hujayralardan yadrolarning ko'chirib o'tkazish tufayli erishildi va ehtimol, bu hayvonning embriogenez xususiyatlariga ham bog'liq bo'lishi mumkin.

Gap shundaki, bir necha kun davom etadigan qo'yi zigotasining dastlabki uch bo'linishida faqat DNK replikasiyasi sodir bo'ladi, bunda genlarning hech biri ekspressiyalanmaydi. Taxminlarga ko'ra, bu vaqt ichida kiritilgan DNK hujayra uchun spetsifik bo'lgan regulyator oqsillardan ajralib chiqadi, embrion rivojlanishiga taalluqli genlar esa tuxum hujayra sitoplazmasidagi initsiator embrion oqsil omillari bilan bog'lanadi.

Tuxum hujayra yadrosi mikropipetka bilan chiqariladi. Voyaga yetgan qo'yning sut bezlari epiteliy hujayralari o'stirib ko'paytiriladi va ularning  $G_0$  fazasiga o'tishi induksiya qilinadi.  $G_0$  fazasidagi hujayralar va yadrosi bo'lmagan tuxum hujayralar birlashtiriladi va tiklangan tuxum hujayralar kulturada yoki embriogenezning dastlabki bosqichlarigacha bo'lgan davrda ligatura (ligatura-bog'lam) qo'yilgan tuxum yo'lida o'stiriladi, so'ngra ular keyingi rivojlanishi uchun "surrogat" onaning bachadoniga joylashtiriladi. Uilmot va boshqalar (Wilmot va

boshq.,1997) tomonidan tavsiflangan tajribada 277 ta yadro hujayralarining yadrosi olingan sut bezlari hujayralari bilan birlashtirilgan –  $G_0$ -fazada; 29 ta embriondan faqat bittasi yashovchan homilaga aylangan.

### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligida transgen qo'y olishning qanday usullari mavjud?
2. Yadrolarni ko'chirib o'tkazish usuli yordamida qo'yni klonlash qanday bosqichlardan iborat?

### Test savollari

1. Mikroinyeksiya usuli kim tomonidan ishlab chiqilgan?
  - A) Anderson va Diakumaks
  - B) Maksam va Gilbert
  - C) Mezelson va Yuan
  - D) Sauzern
2. Hujayraning turg'un transformatsiyasi qanday holatda yuqori bo'ladi?
  - A) Mikroinyeksiyada
  - B) Transfeksiyada
  - C) Ikkala holda ham yetarlicha yuqori bo'ladi
  - D) Ikkala holda ham yetarlicha yuqori bo'lmaydi

### Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Transgen hayvonlarni olishda qo'llaniladigan gen muhandisligi usullari.
2. Transgen hayvonlar yaratishda vektor sifatida qo'llash mumkin bo'lgan strukturalar tavsifi.

### 10.17. Transgen qoramol olish

Agar sut bezidan "bioreaktor" sifatida foydalanish ko'zda tutilgan bo'lsa, u holda transgenez uchun eng maqbul hayvon har yili 1 litrda taxminan 35 g oqsil tutuvchi 10 000 litrgacha sut ishlab chiqaradigan qoramol hisoblanadi. Agar sutda shuncha miqdorda rekombinant oqsil bo'lsa, uni tozalash samaradorligi

50% ni tashkil etsa, unday holda yiliga 20 ta transgen sigirdan taxminan 100 kg gacha shunday oqsil olish mumkin. Tasodifan, qonda tromb hosil bo'lishini oldini olish uchun ishlatiladigan C oqsilining har yiliga talab etiladigan miqdori bilan bir xil. Boshqa tomondan, bitta transgen sigir, gemofiliya bilan og'riqan bemorlarga qon ivishini oshirish uchun qo'llaniladigan IX omil (Kristmas faktori), qon ivishining kaskad mexanizmining zarur yillik miqdorini ta'minlash uchun yetarli bo'ladi.

Transgen sigirlarni yaratish uchun DNK mikroinyeksiyasi yordamida sichqonlar transgenozining modifikatsiyalangan sxemasi ishlatilgan (31-rasm).



37-rasm. Transgen qoramol olish.

Jarayon quyidagi asosiy bosqichlarni o'z ichiga oladi:

1. Qora mollardan oositlarni yig'ish.
2. *in vitro* sharoitda oositlarni yetiltirish.
3. *in vitro* sharoitda buqa spermasi bilan urug'lantirish.
4. Oddiy tuxum hujayralarda seksiyali mikroskop yordamida erkak pronukleusni ko'rishga halaqit beradigan tuxum sarig'ini konsratsiyalash uchun urug'lantirilgan tuxum hujayralarni sentrifugalash.
5. DNKni erkak pronukleusga mikroinyeksiya qilish.
6. Embriionlarni invitro rivojlantirish.
7. Estrus davrida urg'ochi retsipientga bitta embriionni jarrohliksiz implantatsiya qilish.
8. Transgen mavjudligini tekshirish uchun nasllarning DNK skrininingini o'tkazish.

Sinov tajribalarida 2470 ta oositli suyuqlikdan ikkita transgen buzoq olingan. Ushbu ma'lumot ta'riflangan yondashuvda ijobiy natija olinganini, lekin ayni paytda uning past samaradorligini ko'rsatadi. Ushbu sohada tadqiqotlar davom etmoqda va transgenoz usullarini yanada takomillashtirish mumkin.

Masalan, tez orada *in vitro* rivojlanayotgan embriiondan bir nechta hujayralarni tanlab olish va ularda transgen borligini tekshirish mumkin bo'ladi; embriion tomonidan hujayralarning bunday yo'qotilishi uning normal rivojlanishiga to'sqinlik qilmaydi. Ushbu test faqat transgen tutuvchi embriionlarni implantatsiya qilish imkonini beradi.

#### Nazorat savollari

1. Gen muhandisligida transgen qoramol olishning afzallik jihatlari nimalardan iborat?
2. Transgen qoramol olish jarayoni qanday bosqichlardan iborat?

#### Test savollari

1. Mikroinyeksiya usuli kim tomonidan ishlab chiqilgan?  
A) Anderson va Diakumaks  
B) Maksam va Gilbert

C) Mezelson va Yuan

D) Sauzern

**2. Hujayraning turg'un transformatsiyasi qanday holatda yuqori bo'ladi?**

A) Mikroinyeksiyada

B) Transfeksiyada

C) Ikkala holda ham yetarlicha yuqori bo'ladi

D) Ikkala holda ham yetarlicha yuqori bo'lmaydi

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Transgen hayvonlarni olishda qo'llaniladigan gen muhandisligi usullari.

2. Transgen hayvonlar yaratishda vektor sifatida qo'llash mumkin bo'lgan strukturalar tavsifi.

### **10.18. Transgen parranda olish**

Qushlarning transgen liniyalarni olish uchun urug'langan parranda tuxum hujayralariga DNKni mikroinyeksiya qilish usulidan foydalaniladi. Bu protsedura oson emas, qushlarning ko'payishi va rivojlanishining ba'zi xususiyatlari bilan bog'liqdir. Sababi, qushlarda, urug'lantirilganda, odatda sutemizuvchilarda bo'lgani kabi, bitta emas, bir vaqtning o'zida bir nechta spermatozoidlar tuxum hujayraga kirib ketishi mumkin va urug'ochi bilan bog'lanadigan erkak pronukleusni identifikatsiya qilishning iloji bo'lmaydi. DNKni sitoplazmaga mikroinyeksiya qilish usuli ham mos kelmaydi, chunki bu holda DNK urug'lantirilgan tuxum hujayra genomiga integratsiya bo'lmaydi. Nihoyat, DNKni yadroga mikroinyeksiya qilishga muvaffaq bo'lsa ham, keyingi jarayonlarni bajarish qiyin bo'ladi, chunki qushlarda urug'lantirilgandan keyin tuxum hujayra tezda albumin qatlami, ichki va tashqi ohakli qatlam bilan qoplangan mustahkam membrana bilan o'raladi.

Biroq, transgenni tuxum qobig'idan oldin hosil bo'ladigan tuxum sarig'i (embrional disk) hududiga kiritish mumkin, bunda tuxum sarig'i ham urug'ochi, ham erkak pronukleusni o'z ichiga olgan bo'lishi kerak. DNK kiritilgandan so'ng, har bir tuxum

hujayra *in vitro* da o'stiriladi va embrion hosil bo'lgach, uni o'stirish uchun surrogat tuxum hujayraga joylashtiriladi. Ushbu usuldan foydalanib, transgen tovuqlarning bir qator liniyalari olingan. Biroq, bu usul hozirda samarasiz va texnik jihatdan oddiy sharoitlarda bajarish qiyin.

Shuningdek, parranda tuxum hujayrasining tashqi ohakli qobig'i qotib qolganida, blastoderma bosqichidagi embrion 40 000 va 80 000 hujayradan iborat ikki qavatdan tashkil topgan bo'ladi. Bunday embrionni bakterial marker genlarini tutuvchi replikatsiyasi buzilgan retrovirus vektorlari bilan inokulyatsiya qilish bo'yicha tajribalar o'tkazilgan. Natijada jinsiy hujayra liniyalarida begona genlarni tutuvchi transgen jo'jalar va oddiy bedanalar olingan. Odatda bunday qushlar erkin virusli zarrachalarni ishlab chiqarmaydi, biroq, retrovirus vektorlaridan hayvonlarga begona genlarning "yetkazib beruvchisi" sifatida foydalanish, keyinchalik esa ularning oziq-ovqat sifatida ishlatilishi muqarrar ravishda ushbu yondashuvning xavfsizligi haqida savollar tug'diradi.

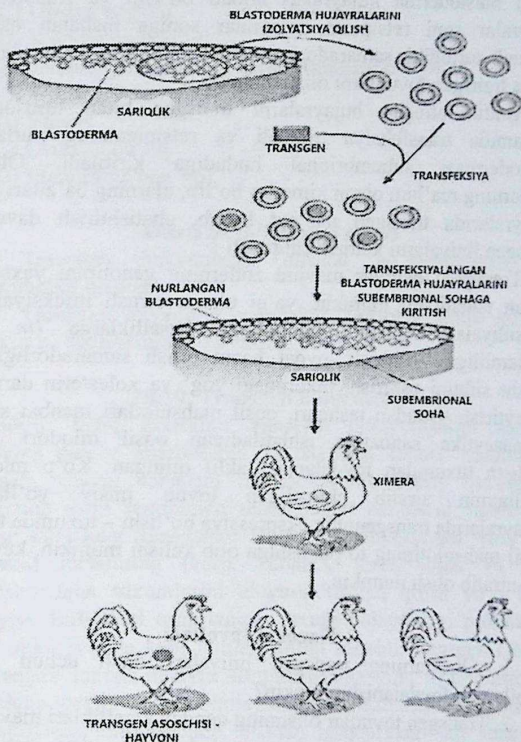
Bundan tashqari, retsipient organizmga kiritiladigan retrovirus vektori tarkibidagi transgenning hajmi ~ 8 t.p.n. (ming juft nukleotid ketma-ketligi)dan oshmaydi, shuningdek, ba'zi hollarda dastlabki saytga integratsiya beqaror bo'lishi mumkin (stabil emas). Bularning barchasi tadqiqotchilarni transgenozning muqobil usullarini izlashga majbur qiladi.

Qushlarga xos bo'lgan spetsifik YeS hujayralari aniqlanmagan, shuning uchun ulardan foydalanishga asoslangan yondashuv qushlarga nisbatan qo'llanilmaydi. Rekombinant embrion hujayralardan foydalanish usuli yanada istiqbolli hisoblanadi.

U quyidagilardan iborat: blastoderma hujayralari tovuq embrionidan ajratib olinadi, transgen DNK bilan bog'langan kationik lipidlar (liposomalar) bilan transfeksiya qilinadi (liposoma transfeksiyasi) va yangi qo'yilgan tuxumlarning subembrion hududiga qayta kiritiladi (38-rasm).

Naslarning ma'lum qismi oz miqdorda donor hujayralarni olib yuradi: bunday hayvonlarni **ximerlar** deyiladi. Ba'zi

ximerlarda transfeksiyon hujayralardan olingan hujayralar jinsiy hujayra liniyalarini hosil qilishi mumkin va bunday ximerlarni bir necha marta chatishtirilgandan so'ng transgen hayvonlar liniyalarini olish mumkin.



**38-rasm. Izolatsiya qilingan blastoderma hujayralarini transfeksiya qilish usuli yordamida transgen tovuqlarni olish.**

Jinsiy hujayralarida begona genlarni tutuvchi ximerlarni yaratish ehtimolini oshirish uchun transfeksion hujayralarni kiritishdan oldin retsipient embrionlarni nurlantirish orqali ximerlardagi donor hujayralar sonini oshirish mumkin (1 soat davomida 540–660 rad). Nurlanish ta'sirida ba'zi (hammasi emas) blastoderma hujayralari nobud bo'ladi va transfeksion hujayralar soni retsipient hujayralar soniga nisbatan oshadi. Ko'rinib turibdiki, samaradorligi nisbatan pastroq bo'lsa-da, shu tarzda transgen tovuqlarni olish mumkin.

Ajratib olingan hujayralarni transgen bilan liposomalar yordamida transfeksiya qilinadi va retsipientning nurlangan blastodermasi subembrional hududiga kiritiladi. Olingan nasllarning ma'lum qismi ximerlar bo'lib, ularning ba'zilari jinsiy hujayralarida transgen mavjud bo'lib, chatishtirish davomida transgen liniyalarni keltirib chiqaradi

Transgen tovuqlar mavjud zotlarning genotipini yaxshilash uchun ishlatilishi mumkin, ya'ni ularga virusli infeksiyalar va koksidiyalar keltirib chiqaradigan kasalliklarga (*in vivo*) chidamliligini oshirish, ovqat hazm qilish samaradorligini va go'sht sifatini oshirish, tuxumdagi yog' va xolesterin darajasini pasaytirish. Bundan tashqari, oqsil mahsulotlari manbai sifatida farmasevtika sanoatida ishlatiladigan oqsil miqdori yuqori bo'lgan tuxumdan foydalanish taklif qilingan. Ko'p miqdorda ovalbumin ajralib chiqadigan tovuq jinsiy yo'llarining hujayralarida transgenning ekspressiya bo'lishi – tuxumda tegishli oqsil mahsulotining to'planishiga olib kelishi mumkin, keyin esa uni ajratib olish mumkin.

### Nazorat savollari

1. Qushlarning transgen liniyalari olish uchun qanday usullardan foydalanish mumkin?
2. Transgen tovuqlar olishning qanday afzalliklari mavjud?
3. Transgen tovuqlarni olishda qanday usullardan foydalaniladi? Bosqichlarini tushuntiring.

## Test savollari

### 1. Transfeksiya jarayonida hujayraga DNK transformatsiya chastotasi:

- A) Yuqori emas
- B) Yuqori
- C) Usulga bog'liq
- D) Mahoratga bog'liq

### 2. DNKning hujayraga kirish samaradorligi:

- A) Yuqori emas
- B) Yuqori
- C) Usulga bog'liq
- D) Mahoratga bog'liq

## Mustaqil ta'lim mavzulari

1. Transgen hayvonlarni olishda qo'llaniladigan gen muhandisligi usullari.

2. Transgen hayvonlar yaratishda vektor sifatida qo'llash mumkin bo'lgan strukturalar tavsifi.

## 10.19. Transgen baliq olish

Tabiiy baliq zaxiralari kamayib borayotganligi sababli, baliqlarni sun'iy sharoitlarda ko'paytirish tobora muhim rol o'ynaydi. Ushbu sohadagi tadqiqotlarning asosiy maqsadi – transgenoz usuli yordamida rekombinant baliqlarni yaratishdir. Hozirgi kungacha transgenlar DNK mikroinyeksiyasi, yoki turli xil baliq turlarining (karp, zubatka, forel, losos va h.k.) urug'lantirilgan tuxumlarini elektroporatsiya qilish yo'li bilan kiritilgan. Baliqdagi urug'langan tuxum hujayradagi pronukleus oddiy mikroskopda kam farqlanganligi sababli, transgen DNKni urug'langan tuxum hujayra sitoplazmasiga yoki to'rt blastomer bosqichiga yetgan embrion hujayralar sitoplazmasiga kiritiladi.

Baliqlarda embriogenez tanadan tashqaridagi suv muhitida sodir bo'ladi, shuning uchun implantatsiyaga ehtiyoj yo'q. Barcha keyingi jarayonlar haroratni nazorat qiluvchi rezervuarlarda amalga oshirilishi mumkin. Mikroinyeksiyadan keyin baliq embrionlarining yashovchanlik darajasi ancha yuqori, 35 dan 80%

gacha, transgen nasllarning ulushi esa 10 dan 70% gacha ko'rsatkichni tashkil etadi. Transgenni embrion eritrosit preparatlari yoki umumiy DNK orqali PZR yordamida aniqlash mumkin. Transgen baliqlarni chatishtirish orqali transgen liniyalarni yaratish mumkin.

### **Nazorat savollari**

1. Transgen baliqlar olishning qanday afzalliklari bor?
2. Baliqlarda embriogenez jarayoni qayerda sodir bo'ladi?

### **Test savollari**

**1. Yuqori impuls berib membrananing o'tkazuvchanligini o'zgartiradigan usul qanday nomlanadi?**

- A) Elektroporatsiya
- B) Mikroinyeksiya
- C) «Bo'laklash»
- D) «Gen zambarak»

**2. Baliqlarda embriogenez qayerda sodir bo'ladi?**

- A) hulayra ichida
- B) suvli muhitda
- C) hujayra tashqarida
- D) sun'iy sharoitda

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Transgen baliqlarni olishda qo'llaniladigan gen muhandisligi usullari.

2. Transgen baliqlar yaratishda xorijiy tadqiqotlar yangiliklari.

## XI BOB. HUYAYRA MUHANDISLIGI. SUPER PRODUKTSENTLAR YARATISH

Necha ming yillardan beri inson uchun zarur bo'lgan oziq-ovqat mahsulotlarini olishda an'anaviy biotexnologiyadan foydalanib kelingan. Hozirgi vaqtda rivojlanib borayotgan biotexnologiyaning yangi bosqichining mukammallashib borishi bilangina emas, balki yangilashgan paydo bo'lishi bilan ham bog'liqlikdir. Hayvon, o'simlik va mikroorganizmlarning organ, to'qima va hujayralarining o'stirilishi yangi biotexnologiyaning obyekti bo'lib qoldi.

Hujayra biotexnologiyasi hujayra, to'qima va protoplastlarning kulturalaridan foydalanishga asoslangan. Hujayralarning manipulyatsiyasi uchun, ularni o'simliklardan ajratib olib, o'simlik organizmidan tashqarida yashab ko'payishi uchun zarur sharoit yaratish lozim.

Ajratilgan hujayra va to'qimalarni sun'iy ozuqa muhitlarda steril sharoitda o'stirish usuli ajratilgan *in vitro* to'qimalar **kulturas**i deb ataladi.

Ajratilgan hujayra va to'qimalar kulturasi biotexnologiyadagi ahamiyatini uchta yo'nalishda ko'rish mumkin:

– birinchi yo'nalish o'simlik hujayralarining tibbiyot, parfyumeriya va kosmetika uchun zarur bo'lgan mahsulotlar, xalq xo'jaligining boshqa tarmoqlari uchun ikkilamchi sintez moddalar, steroidlar, glikozidlar, gormonlar, efir yog'larini ishlab chiqarish (ikkilamchi moddalar ozuqa muhitlarda stirilgan kallus to'qimalaridan olinadi);

– ikkinchi yo'nalish – ajratilgan to'qima kulturalarini ko'paytirish;

– uchinchi yo'nalish virusdan xoli ekish materiali olishda foydalaniladi. Bu usul o'simliklarni *klonal mikroko'paytirish* deyiladi, bir yilda bitta meristemadan minglab o'simliklar olish imkoniyatini beradi.

Hujayra muhandisligining asosiy maqsadi tana (somatik) hujayralarni gibridizatsiya qilish, ya'ni jinssiz hujayralarning qo'shilishidan yangi organizmning hosil bo'lishidir. Somatik

hujayralarning qo‘shilishi to‘liq yoki retsipient hujayraga donor hujayradan bir qismi, ya‘ni sitoplazma, mitoxondriya, xloroplastlar, genomlar yadrosini yoki uning bir bo‘lagini qo‘yilishi mumkin. Somatik gibrilizatsiya filogenetik jihatdan alohida bo‘lgan organizmlarni chatishtirishda muhim ahamiyatga ega.

Gibrid hujayralarni olish etaplari: hujayralarning qo‘shilishi plazmatik membranalarining o‘zaro mustahkam aloqada bo‘lishi. Bunday aloqada bo‘lishga tabiiy membrananing tashqi tomondagi zaryadlar to‘sqinlik qiladi, ya‘ni manfiy zaryadga ega bo‘lgan oqsil va genlar guruhlari. O‘zgaruvchan elektr toki magnit maydoni bilan membranani depolyarizatsiya qilinsa, membranadagi manfiy zaryadlar neytrallanib, kationlar yordamida hujayraga qo‘shilishga sharoit yaratiladi. Amaliyotda kalsiy  $Ca^{2+}$  va xloriromazin ionlar ko‘p qo‘llaniladi. Polietilenglikol effektiv "kuyiluvchi" (slivayushim) agent sifatida qo‘llaniladi. Hayvonlarda hujayralarning qo‘shilishida virus ishtirok etadi, ya‘ni sitoplazmatik membranadagi oqsilni gidrolizlaydi. Virusning – bir qismidagi subyedinisalar proteolitik aktivlikka ega. O‘simliklar, zamburug‘lar va bakteriyalarning hujayralari qo‘shilishidan oldin, hujayra devoridan ajraladi, bu bilan protoplastlar hosil bo‘ladi. Protoplast – tirik hujayra tanasi. Hujayra qobig‘i fermentlar yordamida gidrolizlanadi – bakteriyalar hujayrasiga lizosimlar, zamburug hujayrasi uchun zimoliyazalar, o‘simlik uchun – selluloza kompleksi, gemiselluloza va piktinaz zamburug‘ produtsientlari ishlatiladi. Protoplastlarning ajratib olinishi ancha murakkab jarayondir.

### **11.1. Organ, to‘qima va protoplastni sun‘iy ozuqa muhitlarida o‘stirish**

Keyingi 20 yil mobaynida organ, to‘qima va protoplastlarni sun‘iy sharoitda o‘stirish uslublari ishlab chiqildi va takomillashtirildi. Shu yo‘sinda o‘stirilgan kallus kulturalaridan bir qancha transgen formalar olindi va hozirgi kunda xalq xo‘jaligida keng ko‘lamda ishlatilmoqda. Bu jarayonni amalga

o'shinish uchun amaliyotchi avvalambor tajriba manbaini va ishlatiladigan asbob-uskunalarni to'la sterillashga erishish lozim.

Biologik materialni yoki tajriba idishlarini sterillashning 5 ta usuli mavjud:

**1. Namlik, issiqlik yoki issiq suv bug'i yo'li bilan sterillash.** Bunda o'suvchi (vegetativ) hujayralar 60–70°C haroratda 5–10 daqiqa davomida sterillansa, sporalarni yo'qotish uchun esa 120–130°C 30 daqiqa, 1 atmosfera bosim bilan ta'sir etish kerak bo'ladi. Bunday sterillash maxsus qurilma avtoklavda bajariladi. Bu usul yordamida tajriba idishlari, tayyorlanadigan ozuqa muhitlari sterillanadi.

**2. Quruq issiqlik ta'sirida sterillash,** Bunday sterillash quritish shkaflarida amalga oshiriladi. Bunda 160°C haroratda 2 soat (bu haroratda paxta yoki qog'oz kuymaydi) yoki 180°C haroratda 30 daqiqada sterillanadi.

**3. Filtratsiya yo'li bilan sterillash.** Termik ishlovga chidamsiz biologik faol moddalarni sterillash, filtrlash usuli yordamida amalga oshiriladi. Bunda asosan bakteriya va virus zarrachalarini ushlab qoluvchi filtrlardan foydalaniladi.

**4. Nur ta'sirida sterillash** (ultrabinafsha va radioaktiv nurlar).

**5. Kimyoviy sterillashga** etilen oksidi, b-propolaktan, dietilpirokarbonat, spirt, AgO<sub>3</sub>, kalsiy gipoxlorid, kislotalar bilan sterillash kiradi.

**Organ, to'qima va protoplastni sun'iy ozuqa muhitlarida o'stirish.**

O'simlikdan ajratilgan hujayra va to'qimalar o'stiriladigan ozuqa muhitida o'simliklarni o'sishi uchun kerakli bo'ladigan hamma makroelementlardan: azot, fosfor, kaliy, kalsiy, oltingugurt, magniy, temir, mikroelementlardan: bor, rux, mis, kobalt, marganes, yod molibden, shuningdek, vitaminlar, uglevodlar, fitogormonlar bo'lishi kerak.

Ba'zi ozuqa muhitlari tarkibida esa kazein gidrolizati va ba'zi aminokislotalar bo'lishi kerak. Bundan tashqari, ozuqa muhit tarkibiga, hujayralarning temirga bo'lgan talabini turli pH ko'rsatkichlarida qoldirish uchun EDTA (etilendiamin-tetrasirka

kislota) yoki uning natriyli tuzi kiritilishi kerak. Ajratilgan hujayra va to'qimalar o'stiriladigan ozuqa muhitining asosiy tarkibiy kismini uglevodlar tashkil qiladi, chunki hujayra va to'qimalar avtotrof ozuqalanish qobiliyatiga ega emas. Ko'pincha uglevod manbai sifatida saxaroza yoki glukozaning 20–40g/l miqdori qo'llaniladi. Uglevodli ozuqa manbai sifatida polisaxaridlar ishlatilmaydi, chunki ba'zi to'qimalar asosan o'smalar aktiv gidrolitik fermentlar (amilaza va boshqalar)ga ega bo'lib, kraxmal eritmasi bor ozuqa muhitlarida o'sishi mumkin.

O'sish regulyatorlari hujayralar differensirovkasi va hujayra to'qimalari induksiyasi uchun zarurdir.

Shuning uchun kallusli to'qimalar olishda ozuqa muhitlari tarkibiga auksin (hujayra differensirovkasini yuzaga keltiruvchilar) va sitokininni (differensiallangan hujayralarning bo'linishini induksiyalovchi) kiritish kerak. Poya morfogenezi induksiyasida ozuqa muhiti tarkibida, auksinning miqdori kamroq bo'lishi yoki umuman bo'lmasligi mumkin. Ikkala gormonlarga yoki ularning bittasiga nisbatan avtonomlik, shu hujayralarning gormon ishlab chiqarish qobiliyatiga bog'liq. Auksin manbai sifatida ozuqa muhitlarda 2,4 dixlorfenolsirka kislotasi (2,4-D) % 1–10 mg/ml; indolilsirka kislota (ISK)-1-30 mg/l,  $\alpha$ -naftilsirka kislotasi (NSK)-0,1-2,0 mg/l, kabilar ishlatiladi. Ko'pincha 2,4-D ishlatiladi, (NSK) 2,4-D ga nisbatan 30 marta kam aktivlikka egadir. Kallusning rivojlanishi uchun, ko'pincha, auksinning yuqori miqdori ishlatiladi, to'qima keyingi qayta ekilganida auksinning miqdori bir necha marta kam bo'lganda ham to'qima o'sishi davom etaveradi. Sun'iy ozuqa muhitlarida sitokinin manbai sifatida kinetin, 6-benzil aminopurin (6-BAP) va zeatin (0,001–10 mg/l) qo'llaniladi. Ajratilgan to'qimalarning o'sishida va organogenez induksiyasida 6-BAP kinetinga nisbatan yuqori aktivlikni namoyon qiladi. Ba'zi ozuqa muhitlari tarkibiga adenin kiradi.

Auksin va sitokininlardan tashqari ba'zi ozuqa muhitlari tarkibida gibberil kislota (GK) tutadi. Ozuqa muhitida GK ning bo'lishi shart bo'lmasa ham, ba'zi hollarda u izolatsiyalangan to'qimalarning o'sishini tezlashtiradi. Birlamchi kallus

induksiyasini va uning o'sishi faoliyatini tezlashtirish uchun ozuqa muhitiga o'simlik ekstraktlari yoki sharbatlari qo'shiladi. Kokos suti – kokos yong'og'i suyuq endospermi o'sish tezligini oshirish xususiyatiga ega. Qattiq ozuqa muhitini tayyorlashda dengiz suv o'tlaridan olinadigan polisaxarid agar-agardan foydalaniladi. "Bacto agar" va o'zimizda ishlab chiqariladigan bakterial agarda keraksiz qo'shimchalarning miqdori kamroq bo'ladi. Bunday agarlarni qattiq ozuqa muhiti tayyorlashda tozalamasdan ishlatish mumkin. Odatda qattiq ozuqa muhiti tayyorlashda 5–7 % agardan foydalaniladi. Vaqtdan umumli foydalanish uchun makro- va mikro tuzlar hamda vitaminlar eritmaları yuqori miqdordagi boshlang'ich eritmalarini tayyorlab, ularni ko'p marta suyultirib ishlatish mumkin. Konsentrlangan eritmalar muzlatgichda saqlanadi, vitaminli eritmalar minusli haroratda saqlanadi. Makrotuzlar eritmaları 10–20 marta ko'p miqdorda, mikrotuzlar eritmaları 100–1000 marta ko'p miqdorda, vitaminlar eritmaları esa 1000 marta ko'p darajali miqdorda tayyorlanadi.

Har xil turlarga mansub o'simliklar hujayralari, to'qimalari va organlarini o'stirishda turli tarkibdagi ozuqa muhitlaridan foydalaniladi. Ko'pincha Murasige-Skuga, Uayt; Gamborga (V-5) ozuqa muhitlari ishlatiladi. Murasige-Skuga ozuqa muhitlaridan turlicha modifikatsiyalar bilan apikal meristemalar o'stirishda va o'simlikni mikro ko'paytirishda foydalaniladi.

### Nazorat savollari

1. Hujayra muhandisligining maqsad va vazifalari nimalardan iborat?
2. Biologik materialni sterillashning qanday usullari mavjud?
3. Sun'iy ozuqa muhitlari uchun muhim bo'lgan makro va mikroelementlarga nimalar kiradi?
4. Kallusli to'qimalar olishda ozuqa muhitlari tarkibida qanday gormonlar bo'lishi kerak?
5. Organ, to'qima va protoplastni sun'iy ozuqa muhitlarida o'stirishda nimalarga katta e'tibor berish kerak?

## Test savollari

1. Agar steril sharoitlarda ekish uchun mo'ljallangan eksplanda ichki infeksiya mavjud bo'lsa, qanday chora ko'riladi?

- A) antibiotiklar bilan ishlov beriladi
- B) sovunli suvda ishqalab yuviladi
- C) distillangan suvda yuviladi
- D) natriy gipoxlorid eritmasi bilan ishlov beriladi

2. Sun'iy ozuqa muhitlarida sitokinin manbai sifatida quyida berilganlarning qaysi biridan foydalaniladi?

- A) kinetin, zeatin
- B) 2,4 -D kinetin
- C) zeatin
- D) ISK

### 11.2. Ajratilgan to'qimalar kulturasi

Ajratilgan to'qimalar kulturasi deganda, odatda, kallus to'qimasi yoki shish to'qimasi tasavvur etiladi.

Kallus bu differensiyalangan hujayralardan iborat takomillashmagan massa. Kallusning hosil bo'lishi va o'sishi auksin hamda sitokinin guruhlariga mansub bo'lgan fitogormonlar tomonidan nazorat qilinadi. Ixtisoslashgan to'qimaning differensiyalangan hujayralari auksin ta'sirida differensirovkani yengadi, sitokininlar ta'sirida esa aktiv bo'linishga o'tib, kallusli to'qima hosil qiladi. Ikki pallali o'simliklar kalluslari, fitogormon tutuvchi turli sun'iy ozuqa muhitlarida turli organlar eksplantlarida: aseptik usuvchi uruglarda, poya va ildiz bo'laklarida, izolatsiyalangan parenxima bo'laklarida, tuganak to'qimalarda, izolatsiyalangan poya murtagida, bargda oson hosil bo'ladi.

*In vitro* kallus to'qimasi asosan oq yoki sarg'ish rangda bo'ladi. Kallus qariy boshlaganda fenol birikmalari to'planishi natijasida qo'ng'ir rangga kira boshlaydi.

Kallus to'qimasi amorf bo'lib, aniq anatomik tuzilishga ega emas. Lekin kelib chiqishiga, o'sish sharoitiga bog'liq holda u:

- 1) alohida mayda agregatlarga tez parchalanuvchi;

2) o'рта zichlikdagi, meristematik markazi yaxshi ko'rinadigan;

3) zich, kambiy, elementlari differensiyalanayotgan va sistemaga tushayotgan holatda bo'ladi.

O'simlik hujayrasining differensirovkasi va kallusga aylanish uchun ozuqa muhit tarkibida fitogormonlar: auksin va sitokinenlar ishtirok etishi lozim. Auksin hujayra differensirovkasi jarayonini yuzaga keltirib, bo'linishga tayyorlaydi, sitokinin esa differensiyalangan hujayralarni bo'linishga olib keladi. Agar gormonsiz ozuqa muhitlarga differensiyalangan o'simlik eksplanti joylashtirilsa (poya, barg, ildiz bo'lagi) hujayra bo'linishi ketmaydi va kallus hosil bo'lmaydi. Bu differensiyalangan hujayralarning bo'linish xususiyatiga ega emasligini ko'rsatadi. Har bir hujayra o'sishning bo'linish, cho'zilish, differensirovka fazalarini o'tashi kerak. Differensiyalangan hujayralarning bo'linishi natijada kallus hosil bo'ladi.

Hujayralarning *in vitro* differensiyalangan holatdan differensiyalangan holatga o'tishi va hujayralarning aktiv bo'linishi genlarning aktivligining o'zgarishi bilan bog'liq. Ba'zi genlarning faollashuvi ba'zilarining passivlashuvi hujayraning oqsil tarkibining o'zgarishiga olib keladi. Kallus hujayralarida spetsifik oqsillar paydo bo'ladi va bir vaqtning o'zida bargning fotosinteziga taalluqli oqsillar kamayadi yoki umuman yo'qolib ketadi. Hujayralar differensiyalanib kallus hosil qilish jarayonida hujayrada biokimyoviy va sitologik o'zgarishlar ro'y beradi. Differensirovka zaxira moddalar sarflanib hujayra organellalarining parchalanishidan boshlanadi. Differensirovka induksiyasidan 6–12 soat o'tganidan so'ng hujayra qobig'i po'kaklashadi va shishadi, erkin ribosomalar soni ortadi, golji apparati elementlarining soni ko'payadi, yadrochalarning o'lchami kattalashadi va soni oshadi.

## Nazorat savollari

1. Ajratilgan to‘qimalar kulturasi deganda nimani tushunasiz?
2. Kallus to‘qimasini o‘stirish uchun ozuqa muhitlari tarkibida qanday moddalar bo‘lishi muhim?

## Test savollari

### 1. Somatik embriogeneznining organogenezdan farqi nimada?

- A) ildiz va poya mersitemasiga ega bo‘lgan kurtaklar hosil bo‘ladi
- B) dastlab alohida organlar regeneratsiyalanadi
- C) dastlab alohida somatik hujayralar hosil bo‘ladi
- D) yaxlit organizm paydo bo‘lmaydi

### 2. O‘simliklarda termoterapiya usulini qo‘llashdan ko‘zlangan maqsad nimadan iborat?

- A) virussiz o‘simliklarni yaratish
- B) o‘simliklarni zamburug‘lardan xoli qilish
- C) o‘simliklarni patogen bakteriyalardan holi qilish
- D) o‘simliklarni turli xil kasalliklardan himoya qilish

### 3. Somatik hujayralarni duragaylash nima?

- A) somatik hujayralar protoplastlarini bir-biriga qo‘shishi
- B) jinsiy hujayralarni in vitro sharoitida qo‘shish
- C) somatik hujayralarni bir-biridan ajratish
- D) hujayralar devorini parchalab, qayta tiklash

### 11.3. Kallus to‘qimasini olish, protoplastlarni olish

Kallus hujayralari qarib, bo‘linish xususiyatlarini yo‘qotmasliklari uchun eksplantida paydo bo‘lgan birlamchi kallus 4–6 haftadan so‘ng yangi ozuqa muhitiga o‘tkaziladi. Bu muolajani **passirlash** deyiladi. Doimiy passirlash yo‘li bilan hujayralarning bo‘linish qobiliyatini o‘n yillab saqlab turish mumkin.

Kallus hujayralarining o‘shish egri chizigi S-simon shaklga ega. Bunday o‘shishni kallus hujayralarining suspenziya kulturalarida oson ko‘rish mumkin. O‘shish egri chizig‘i 5 ta fazani o‘z ichiga oladi:

1. Latent yoki lag-faza davri bo'lib bunda hujayralarning massasi va soni ko'paymaydi, lekin hujayralar bo'linishga tayyorlanadi.

2. Logarifmik yoki eksponensial o'sishi fazasi bo'lib, hujayralarning mitotik faolligi ortadi, kallas kulturasiining vazni kattalashadi va hujayraning o'sish tezligi oshadi.

3. Liniyal faza bo'lib, bunda o'sish tezligi doimiy yoki bir xil bo'ladi.

4. O'sishning sekinlashish fazasi bo'lib bunda, hujayraning mitotik aktivligi birdaniga pasayadi.

5. O'sish egri chizig'i – yuqori nuqtaga chiqadi. Shu davrdan boshlab hujayralarning parchalanishi boshlanadi, lekin hujayralar bo'linishi hisobiga ularning soni o'sishi bilan xali tenglashayotgan bo'ladi, umuman olganda hujayra massasiining o'sish tezligi nolga teng. Statsionar fazadan so'ng hujayraning o'lish davri boshlanadi, bunda tirik hujayralar soni kamayadi.

**Kallas hujayralarning o'ziga xosligi.** Kallas hujayralari *in vitro* o'simlik organizmi normal ota-ona hujayralarga xos bo'lgan fiziologik, biokimyaviy xususiyatlarga ega bo'ladi. Ular ikkilamchi metabolitik sintez qilish qobiliyatini saqlab qoladi. Kallas to'qimalarining yuqori haroratga, osmotik aktiv moddalarga chidamliligi xususiyatlari bilan normal o'simliklarga o'xshashdir. Ularning normal o'simliklardan farq qiladigan tomoni, ularda spetsifik oqsillarning paydo bo'lishi va bargning fotosintez qiluvchi hujayralariga xos bo'lgan oqsillar miqdorining kamayishi yoki yo'qolib ketishi bilan xarakterlanadi.

**Kallas hujayrasining genetikasi.** Uzoq vaqtgacha kallas hujayralari genetik bir xil deb hisoblanardi. Lekin 60-yillarda kallas hujayralarining genetik geterogenligi ma'lum bo'ldi. Kallas hujayralari xromosomalar soni bilan farq qiladi. Meristematik to'qimalar *in vitro* genetik turg'un bo'ladi. Kallas va suspenziya kulturalarida boshlang'ich o'simlikga xos diploid hujayralar to'plamini 3; 4; 5 va undan ko'proq xromosomalar to'plamini poli-ploid hujayralarni uchratish mumkin. Undan tashqari kallas to'qimalari kulturalarida aneuploidni ham kuzatish mumkin. Kallas hujayralari qancha uzoq vaqt o'stirilsa ular

poliploidligi bilan shunchalik ko'p farq qiladi. Tamaki kallus to'qimasini 4 yil o'stirilgandan so'ng diploid hujayralar umuman qolmaydi, hamma hujayralar **poleploid** yoki aneuploid bo'ladi.

**Protoplast olish.** 1892-yili Dj Klerk tomonidan birinchi marta plazmolizni (sitoplazmani hujayra devoriga yaqin qavatini hujayraning qattiq qobig'idan ajratilgani) o'rganish maqsadida protoplast ajratib olgan. U suv o'simligi telofereznish barg to'qimalarini plazmolizlagan. Bunda protoplast hosil bo'lgan. Protoplast olishning bir necha usullari mavjud:

**Protoplastlarni mexanik tarzda ajratish.** Masalan: piyoz epidermisini yupqa qatlamini 0,1 m saxarozaga solib qo'yiladi, so'ngra ustara yordamida kesiladi. O'simlik protoplastlarini ajratish sohasida olib borilgan izlanishlar natijasida mexanik usulni takomillashtirib yangi usulblarning vujudga kelishiga sabab bo'ldi. Bunga fermentlar yordamida hujayra devorini parchalashni misol qilib keltirish mumkin. Bakteriyalar hujayra devorini *lizosim fermenti* yordamida parchalash mumkin. Ye. Kokin yuqori o'simliklardan fermentlar ishtirokida protoplast olishni yo'lga qo'ydi.

Fermentlar yordamida protoplast olishning mexanik tarzda protoplast olishdan ustunlik tomoni shundaki:

- 1) bir vaqtning o'zida ko'p miqdorda protoplast ajratish mumkin;
- 2) protoplastlarni kuchli osmotik siqishning hojati yo'q;
- 3) hujayra toza va zararlanmagan bo'ladi;
- 4) uslub nisbatan tezroq bajariladi.

Hujayra devorini parchalash uchun uch xil selluloza, gemiselluloza va pektinaza fermentlaridan foydalaniladi. Bu fermentlarning ta'siri hujayra devori komponentlarini parchalashga yo'naltirilgan bo'ladi. Bu komponentlarga selluloza, gemiselluloza va pektin moddalar kiradi.

Protoplastlarni ajratishda hujayralarning tuzilish xususiyatlariga qarab ferment preparatlari tanlanadi. Masalan, mevalardan protoplast olish uchun hujayradagi pektinning miqdori yuqori bo'lganligi sababi pektinaza fermentidan

foydalaniladi. Mevalardan protoplast olish uchta jarayonni o'z ichiga oladi:

- 1) fermentlar bilan ishlov berish;
- 2) protoplastlarni olish;
- 3) hujayra qobiqlaridan intakt protoplastlarni ajratish.

Bargdan protoplast olishda barg to'qimalari epidermisdan xoli etiladi, pektinaza ferment bilan birgalikda selluloza fermenti (hujayra devorining sellulozali komponentlarini parchalaydi) bilan ishlov beriladi.

I. Takebe asosan tamaki bargi uchun protoplastlarni ajratish uslubini ishlab chiqdi. 50-70 kunlik sog'lom o'simlikdan to'la shakllangan barg olinib, 70% li etanolga solinib, so'ng 15-20 daqiqaga 10% li kalsiy gipoxlorid eritmasiga solinadi va distillangan suv bilan bir necha marta yuviladi. Pinset yordamida bargdan epidermis olinib, skalpel bilan 4 cm<sup>2</sup> kattalikdagi bo'laklarga bo'linadi.

Epidermisdan tozalangan barg to'qimalariga birinchi bosqichda pektinaza fermenti ikkinchi bosqichda sellulaza fermenti bilan ishlov beriladi.

Optimal sharoitlar protoplastlarni olishda turli to'qimalar individual tanlanadi. Yashashga moslashgan, nativ protoplastlar olishda osmotik stabilizatorlarni tanlash muhim omillardan hisoblanadi, bu o'simliklarning fiziologik holatiga qarab tanlanadi.

Protoplastlar qorong'u yoki yarim qorong'i joylarda ajratiladi, bunda pH 5,4-6,2 bo'lishi kerak. Protoplastlarning turg'unligi CaCl<sub>2</sub> va MgCl<sub>2</sub> ning yuqori miqdori bilan ushlab turiladi.

Protoplastlarni olishda, shuningdek, hujayra suspenziyasi va kallus kulturalaridan ham foydalanish mumkin.

Bunda metil ko'ki yoki Evaks ko'ki bo'yog'idan foydalaniladi. Bunda tirik hujayralar bo'yalmaydi, nobud bo'lgan hujayralar ko'k rangga bo'yaladi. Genetik va fiziologik izlanishlar uchun, shuningdek, hujayra seleksiyasida foydalanish uchun alohida hujayralarni o'stirish katta ahamiyatga ega. Alohida hujayralardan olingan klon-avlodlar genetik bir xil emaslikning sabablarini bilishda yordam berdi. Ajratilgan protoplastdan

olingan yakka gibrid hujayra keyingi bo'linishida gibrid hujayralardan iborat klon olish imkoniyatini beradi. Alohida hujayralar o'simlik to'qimasi hujayra suspenziyasidan fermentlar bilan maseratsiyalanganidan so'ng, ajratilgan protoplastlardan hujayra devori tiklanganidan so'ng ajratib olinadi. Bir hujayrali fraksiyalar olish uchun, kolbadagi suspenziyani tindirib quyib, ustki suyuq qismidan olsa bo'ladi. Bunda yirik agregatlar kolba tagiga cho'kadi. Bundan tashqari alohida hujayralarni maseratsiyalovchi fermentlardan foydalanib, saxaroza gradientida sentrifugalab yoki metall elakdan filtrlab olish mumkin.

### Nazorat savollari

1. Kallus hujayralarning o'sishi qanday fazalarni o'z ichiga oladi?
2. Kallus hujayralarning o'ziga xosligi nimalardan iborat?
3. Kallus hujayralarning genetik geterogenligi deganda nimani tushunasiz?
4. Protoplast qachon va kim tomonidan kashf etilgan?
5. Fermentlar yordamida protoplast olishning afzallik tomonlari nimalardan iborat?
6. Mevalardan protoplast olish uchun qanday bosqichlardan iborat?

### Test savollari

1. Kallus hujayralaridan fitopatogenlarga chidamli, mahsuldorligi yuqori hujayralar olishga imkon beradigan omil nima?
  - A) hujayralarining genetik xilma-xilligi
  - B) kallus hujayralarining genetik bir xilligi
  - C) kallus hujayralarining didefferensiallanishi
  - D) hujayralarining poliploidiyasi
2. Kallus to'qimalari qachon regeneratsiyalanish qobiliyatini yo'qotadi?
  - A) to'rtinchi marta qayta ekilganda, qariganda
  - B) umuman yo'qotmaydi
  - C) sabablari hali to'liq aniqlanmagan
  - D) yuqori haroratda

#### 11.4. Hujayralarning qo‘shilish uslublari

Hujayralarning qo‘shilish uslublari quyidagilardan iborat:

1. Filogenetik jihatdan uzoq bo‘lgan tirik hujayralarning qo‘shilishi (birlashishi) Hujayralarning qo‘shilishi natijasida hosildor o‘simliklar olingan. Turlararo qo‘shilish natijasida tamaki, kartofel, karam va hosildor turlar olingan.

2. Assimetrik gibridlarni olish. Bu uslubda bitta hujayraning to‘liq genlari, ikkinchi hujayraning bir qism genlari bilan qo‘shiladi. Assimetrik gibridlar, simmetrik gibridga nisbatan chidamli bo‘ladi. Simmetrik gibridlarda ota-ona genlari to‘liq bo‘ladi.

3. Uch va undan ortiq ota-onalar hujayralarning qo‘shilishidan gibridlar olish. Yangi genetik usullarning paydo bo‘lishi bilan irsiyatni organizm darajasida qayta tuzish imkoniyati tug‘ildi. Dj. Gordon birinchi bo‘lib, voyaga yetmagan baqaning (dumli davrida) epiteliya hujayrasi yadrosini, yadrosi olingan baqaning tuxum hujayrasiga ko‘chirib o‘tkazdi. Bunday tuxum hujayradan embrion rivojlanib, yosh dumli baqa hosil bo‘ldi. U esa voyaga yetgan baqaga aylanib, ko‘paya boshladi. Yadrosiz tuxum hujayraga shu organizmning somatik hujayra yadrosini ko‘chirib o‘tkazish bilan genotipi bir xil bo‘lgan organizmlarni olish mumkinligi isbotlandi.

Agar shu usulni sutemizuvchilarda o‘tkazilsa, juda katta moddiy foydaga erishish mumkin. Chunki, qoramollar, qo‘ylar va boshqa qishloq xo‘jalik hayvonlari orasida sersut, seryog‘, serjun, go‘shtdorlari uchraydi. Jinsiy ko‘payish paytida ushbu samarali belgilar yuzaga chiqmasligi mumkin. Sermahsul hisoblangan bitta hayvon somatik hujayrasidan olingan diploid yadroni ko‘plab yadrosiz tuxum hujayralarga o‘tkazib, sermahsul hayvonlar sonini ko‘paytirish mumkin.

Hujayraga genni yoki xromosomani o‘tkazish 1970-yillarda liposomalar (lipid pufakchalari)ning sintez qilinishi bilan amalga oshirila boshladi. Liposomalar ikkita lipid qavatidan iborat bo‘lib, har xil moddalarni hujayraga kiritishda keng ishlatila boshlandi. Liposomalar ichidagi moddalar, shu jumladan, xromosomalar uzoq saqlanishi mumkin. Liposoma membranasi harorat ta‘sirida

o'z holatini o'zgartiradi va ichidagi xromosomani hujayraga chiqaradi. Alohida genlarni ajratib o'tkazishdan ko'ra xromosomani hujayraga o'tkazish osonroq.

1978-yilda liposomalar yordamida odamning xromosomasi sichqon hujayrasiga o'tkazildi. Buning uchun odam somatik hujayrasining bitta xromosomasi liposomaga kiritildi va bu lipoxromosomani gipoksantin guanin fosforilbozil transferaza (GGFT) fermenti bo'lmagan va sun'iy o'stirilayotgan sichqon hujayralari bilan aralashtirildi. Vaqt o'tishi bilan sichqon hujayrasi yadrosida odam xromosomasining paydo bo'lganligi kuzatildi. Odam xromosomasidagi genlar ta'sirining yuzaga chiqqanligi GGFT fermenti bo'lmagan sichqon hujayralarida GGFT fermentning paydo bo'lishi bilan isbotlandi.

O'simliklarning o'suvchi (meristema) qismidagi hujayralar ajratib olingan. Ajratib olingan o'simlik hujayrasidan yangi o'simlik yaratish uchun protoplast holatiga olib kelinadi. Protoplast o'simlikni birinchi marotaba 1971-yilda I.Tokebe olgan. O'simlik hujayrasini protoplast holatiga olib kelish uchun, hujayra qobig'i maxsus fermentlar yordamida eritiladi. Hujayra qobig'ini eritish uchun 3 xil fermentlar ishlatiladi – sellulaza, gemisellulaza va pektinaza. Ajratib olingan hujayra maxsus joyda optimal sharoit yaratilgan holatda saqlanadi. Ularga qo'yilgan fermentlarning ta'siri yo'qolishi bilan protoplastlarda qobiq hosil bo'la boshlaydi.

O'simliklarning hujayrasini ajratib olish uchun uning yosh o'suvchi bargi olinib, u izolatsiya qilinadi. Izolatsiya qilingan barg sterilizatsiya qilinib, barg parchalanadi. Parchalangan barg hujayralari pektinaza fermenti bilan ishlanib, ularning qobig'i eritiladi va protoplast holatiga olib kelinadi. Protoplastlar ma'lum vaqt o'tishi bilan oziqaviy muhitda qobiq hosil qila boshlaydi. Undan keyingi bosqichda hujayralarda bo'linish boshlanadi, ya'ni differensiatsiyalangan hujayradan differensiatsiyalanmagan vakuolashgan hujayralar hosil bo'lib, ularning tartibsiz ko'payishi natijasida hujayra massasi hosil bo'ladi. Bunga **kallus** deb ataladi.

Kallus holatdagi hujayralar bir necha marotaba qayta ekilishi natijasida, ulardan ildiz va barg hosil bo'la boshlaydi hamda

yangi o'simlik paydo bo'ladi. Protoplastlardan to'liq o'simlik olish barcha o'simliklarda ham sodir bo'lavermaydi. Protoplastlardan 50 yaqin o'simliklar olingan, ayniqsa, kartoshka, tamaki, rapsa, petuniya, daturlar va boshqalar. Protoplastlar yo'li bilan olingan o'simliklar ildiz chirish kasalliklariga, gerbisidlariga hamda har xil zaharli moddalarga chidamli bo'ladi. Protoplast holatidagi hujayralar sterillangan sharoitda, ular o'zaro qo'shiladi. Qo'shilish natijasida membrana orqali bir-biriga hujayra ichkarasidagi organoidlarning ma'lum qismi o'ta boshlaydi (qo'yiladi).

Protoplastlarning qo'yilishi to'g'risida juda ko'p ilmiy-tadqiqot ishlar olib borilgan va natijada yangi gibridlar olingan. Misol uchun, seleksiya yo'li bilan olingan kartoshka *Solanum megistacrolobum* protoplast uslubi bilan yovvoyiy holdagi, virus kasalligiga chidamli bo'lgan *S. etuberosa* bilan qo'shib, yangi gibrid olingan. Olingan gibridda ikkala turga mansub bo'lgan belgilar qayd qilingan. Protoplast holatidagi hujayralar, filogenetik jihatdan uzoq bo'lgan organizmlar bilan chatishtirilgan. O'simliklararo chatishtirishdan yangi gibridlar olingan. Kartoshkalarni, karamlarni, tamakini turnepsom bilan qo'shib, turlararo gibridlar olingan. Zamburug'lar bilan bakteriyalarni qo'shib, yangi gibridlar olingan. O'simliklar hujayrasi bilan hayvonlar hujayralari qo'shilganda ancha qiyinchilik holatlari kuzatilgan. Qurbaqa hujayrasi bilan sabzi hujayrasi qo'shilganda, bu hujayralar o'zlariga qobiq hosil qilib, faqat o'simlik hujayrasi ko'payishi kuzatilgan. Qurbaqa hujayrasidagi yadro o'z faolligini yo'qotgan.

Asimmetrik gibridlar olishda bitta ota-ona hujayrasidagi to'liq genlar, ikkinchi ota-ona hujayrasidagi genlarning yarmi bilan chatishtiriladi. Bunday holda bitta xromosoma tarkibidagi genlar o'z faolligini yo'qori, ikkinchisidan, toza gibrid olinadi. Bu gibrid tashqi muhitga chidamli, hosildor, kasallikka kam uchraydigan bo'ladi. Sitoplazmalarning o'zaro qo'shilishi hamda xloroplastlarning o'zaro qo'shilishidan gibridlar hosil bo'lishi isbotlangan. Uchta va undan ortiq ota-ona hujayralarining qo'shilish natijasida gibridlar olingan. Gibridizatsiya yo'li bilan

olingan hujayralar yuqori molekulari fiziologik faol moddalarni sintez qilib beradi. Bu hujayralarni cheksiz va doimiy ishlashi uchun yangi texnologiya yaratildi. Buni gibridom texnologiyasi deb ataladi.

Gibridomlarni olish hozirgi vaqtda hujayra injeneriyasida eng muhim yo'nalishdir. Gibridom texnologiyaning asosiy maqsadi yuqori molekulari moddalarni sintez qiluvchi gibrid hujayralarni o'lmas «obessmertit» hujayraga aylantirishdir. Buning uchun shish (rak) hujayrasi, gibrid yo'li bilan olingan hujayralar o'zaro qo'shilib, gibridom olinadi. Ma'lumki, shish hujayrasi chegarasiz va doimiy tezlik bilan ko'payadi. Gibrid hujayralar esa sekinlik bilan ko'payadi. Ikkalasing qo'shilishidan olingan gibridomdan xohlagan cha moddalarni sintez qilish mumkin.

Odam va hayvon organizmiga tashqaridan kirgan antigenlar – bakteriyalar, viruslar, begona hujayra yoki zaharli moddalar, shu paytdan boshlab, limfositlar ularni yo'qota boshlaydi. Organizmda antigen ta'sirida maxsus hujayralarda har bir antigenning uch o'lchamdagi fazoviy strukturasi aniq taniydigan neytrallovchi oqsil – antitela molekulari sintez qilinadi. Bu jarayon immun reaksiya deb ataladi. Immun reaksiya antitelo sintez qiluvchi maxsus lifosit hujayralar membranasiga antigen ta'sir etishi bilan boshlanadi. Limfotsitlar ikki populyatsiyaga bo'linadi. Ular T-limfositlar va B-limfositlar deb ataladi. Antigen ta'sirida T-limfositlardan limfoblast hujayralar, B-limfositdan esa plazmatik hujayralar rivojlanadi. Limfoblast hujayralarida sintez qilingan antitela molekulari hujayra ichida qoladi va hujayra immunitetini ta'minlaydi.

Plazmatik hujayralarda sintez bo'lgan antitela molekulari hujayra tashqarisiga sekretiya qilinadi va qon tarkibidagi antigen molekularini bog'laydi. 1975-yilda ingliz olimlari Keller va Milshteyn sun'iy sharoitda antitela sinezlovchi limfosit hujayrasi bilan cheksiz bo'linuvchi rak hujayrasini bir-biriga qo'shish natijasida tabiatda uchramaydigan gibrid hujayra yaratdilar. Bunday gibrid hujayrani gibridoma deb atadilar.

Gibridom hujayrasini nafaqat limfosit va rak hujayralarini qo'shish natijasida, balki maqsadga muvofiq har qanday hayvon

yoki odam to'qimasidan olingan hujayrani shish (rak) hujayrasi bilan qo'shib hosil qilish mumkin. Shunday qilib, biotexnologiyaning yo'nalishlaridan biri bo'lgan hujayra muhandisligidan foydalanib, organ, to'qima va hujayralarni sun'iy ozuqa muhitlarida o'stirib, ulardan tibbiyot va xalq xo'jaligining boshqa tarmoqlari uchun faol moddalar, viruslarsiz o'simliklar olish, tashqi noqulay sharoitga chidamli tez rivojlanadigan yangi o'simlik navini yaratish mumkin. Kallus to'qimalaridan transgen organizm yaratish, hozirgi kunda xalq xo'jaligida keng ishlatilmoqda. Kallus to'qimalaridan hujayralar suspenziyasi olinib, dorivor moddalarga bo'lgan ikkilamchi metabolitlar olishda, hujayralar biomassasini o'stirishda, hujayra seleksiyasida keng qo'llanilmoqda.

### **Nazorat savollari**

1. Hujayralarning qo'shilish uslublari qanday bosqichlardan iborat?
2. Hujayralarning qo'shilish uslublari qanday afzalliklari mavjud?
3. Gibridom texnologiyasi deganda nimani tushunasiz?
4. Gibridom texnologiyaning asosiy maqsadi nimadan iborat?

### **Test savollari**

**1. Maxsus hujayralarni bir differentsiatsiya bosqichidan boshqasiga o'tishi;**

- A) dedifferentsiatsiya
- B) differentsiatsiya
- C) redifferentsiatsiya
- D) differensirovka

**2. Hujayrlar suspenziyasida tirik hujayralarni o'lik hujayralardan qanday farqlash mumkin?**

- A) tirik hujayralarni bo'yoq bilan bo'yalmasligiga ko'ra
- B) tirik hujayralarni o'sish tezligiga nisbatan hisoblash
- C) tirik hujayralarni hisob kamerasida sanash orqali
- D) tirik hujayralarning ko'k rangga bo'yalishiga ko'ra

### **Mustaqil ta'lim mavzulari**

1. Hujayra kulturasi usullarini rivojlanish davrlari.
2. Hujayra muhandisligida birlamchi kallus to'qimasining ishlatilishi.
3. O'simlik protoplastini ajratib olish usullari.
4. Hujayra muhandisligi sohasida Respublikamizda amalga oshirilgan tadqiqotlar.

## GLOSSARIY

**Fermentlar muhandisligi** – fermentlar asosidagi texnologik jarayon.

**Biospesifik** – sorbentlar o‘ziga xos tashuvchilar.

**Immobilangan fermentlar** – qattiq tashuvchiga bog‘langan enzim.

**Fermentlar ishtirokidagi texnologik jarayonlar** – Fermentlar ishtirokidagi muhandislik.

**Glukoza-fruktozali shinni olish** – monouglevodlar asosida mahsulot olish.

**Aminokislotalar ratsemik aralashmasi** – D, L aminokislota aralashmasi ratsemik aralashma hisoblanadi.

**Laktozasiz sut olish** – dietik sut olish.

**Sut zardobidan shakarsimon moddalar olish** – zardobdan laktoza olish.

**Selluloza gidrolizi** – sellulozaning parchalanishi.

**Gen muhandisligi** – yot genlarni boshqa organizmga kiritish.

**Ekspressiyaning boshqarilishi** – yot genni kiritish.

**Intronlar** – genni kodlamaydigan qismi.

**Transpozonlar** – ko‘chib yuruvchi genetik elementlar.

**Plazmidalar** – halqa shaklidagi DNK molekulari.

**Praymerlar** – sintetik oligonukleotidlar.

**Rekombinat DNK-lar** – yot gen kiritilgan DNK molekulasi.

**Vektorlar** – yot genni tutgan genetik konstruksiya.

**Ti-plazmida** – tuproq bakteriyasidagi plazmida.

**Kallus to‘qima** – meristema asosida olingan to‘qima.

**O‘simlik gibridlari** – 2 xil genetik ma‘lumot asosida yaratilgan o‘simlik.

**Transgen hujayralarni saralash** – yot gen tutgan hujayra.

**Liposomal** – yog‘ qatlamlaridan iborat vizikula.

**Embrional o‘zak hujayralar** – ixtisoslashmagan hujayralar.

**PSR** – polimeraza zanjir reaksiyasi.

**Pozitiv-negativ seleksiya** – yot gen tutgan hujayralarni saralash usullari.

**Hujayra muhandisligi** – hujayralar asosidagi texnologik jarayonlar.

**Birlamchi metabolitlar** – mikroorganizm ishlab chiqaruvchi mahsulot.

**Ikkilamchi metabolitlar** – mikroorganizmda ishlab chiqaradigan organizm.

**Superprodusent shtammlar** – zamonaviy usulda gen muhandisligi asosida yaratilgan shtamm.

**Immobilangan mikroorganizmlar** – tashuvchiga mahkamlangan mikroorganizmlar hujayrasi.

**Hujayra kulturalari** – ozuqa muhitidagi mikroorganizmlar.

**Vaksinalar** – Yarim to'ldirilgan mikroorganizm.

**Gormonlar** – biologik regulyatorlar.

**Monoklonal antitelolar** – spetsifikligi o'ta yuqori glekoproteid.

**Gibridomalar** – gibrid hujayra yoki organizm.

## FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR RO'YXATI

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология: принципы и применение. –М.: Мир, 2002.
2. Альбертс. Молекулярная биология клетки. –М.: Мир, 1994.
3. Введение в прикладную энзимологию. Под ред. Березина И.В. Мартинека К.М. –М.: МГУ, 1997.
4. Мирзарахметова Д.Т. Основы биологической специфичности. Услубий кўлланма. –Тошкент: УзМУ, 2006. 112 с.
5. Мирзарахметова Д.Т., Щербак Е.Ю., Садыкова К.А. Методические рекомендации по проведению большого практикума курса «Биотехнология». –Тошкент: УзМУ, 2007. 56 б.
6. Кадилова З.А., Ташмухамедова. Биологик спецификлик асослари. –Тошкент, 2022. 192 б.
7. Коростелева Н.И. Биотехнология: учебное пособие / Н.И. Коростелева, Т.В. Громова, И.Г. Жукова. – Барнаул: изд-во агау, 2006. – 127 с.
8. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. Т.1-2, М.: Мир, 1998.
9. Komilov X.M., Raximov M.M., Odilbekova D.Yu. Biotexnologiya asoslari. –Toshkent: Extremum press, 2010.
10. Mirzaraxmetova D.T., Raximov M.M. «Fermentlar muxandisligi» fanidan amaliy mashg'ulotlar o'tkazish bo'yicha uslubiy qo'llanma. –Toshkent: UzMU, 2007.
11. Gene correction. Methods and protocols. Series: methods in molecular biology, vol. 1114 storici, francesca (ed.), 2014.
12. Smyth J.E., Biotechnology. Cambridge: Cambridge university press, 2009.
13. Kimball nill. Glossary of biotechnology terms. New york:crc press llc., 2002.

14. Glick B.R., Pasternak J.J., Patten G.L. Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant dna. Washington:asm press. 2010.

15. Nair A.J. Introduction to biotechnology and genetic engineering. New delhi: infinity science press llc, 2007.

16. Biotechnology of fruit and nut crops. 2005. 749 str.

17. Thomas Gaj, Charles A. Gersbach, Carlos F. Barbas (2013) zfn, talen, and crispr/cas-based methods for genome engineering. Trends in biotechnology, 31(7), 397-405.

### **Internet manbalari**

1.<http://www.natlib.uz/uz/>

2.<http://ek.uzmu.uz/>

3.<http://www.lib.mn/>

4.<http://www.molbiol.ru>

5.[http:// www.zyio.net](http://www.zyio.net)

## MUNDARIJA

BIOTEXNOLOGIYA (DARSLIK).....	3
I BOB. KIRISH. BIOTEXNOLOGIYANING ASOSIY VAZIFALARI VA DOLZARB MUAMMOLARI. FERMENTLAR MUHANDISLIGI .....	4
1.1. Fermentlar muhandisligi. Fermentlar va ularning xossalari.....	5
II BOB. FERMENTLARNI AJRATISH, TOZALASH TEKNOLOGIYALARI .....	11
2.1. Ionalmashinuv xromatografiya usuli .....	15
2.2. Affinli (biospetsifik) xromatografiya usuli .....	16
2.3. Gel xromatografiya usuli .....	18
2.4. Biologik faol moddalarni organik erituvchilar yordamida cho'ktirish.....	20
III BOB. FERMENTLARNI IMMOBILLASH USULLARI VA IMMOBILLASHGA TA'SIR ETUVCHI FAKTORLAR.....	24
3.1. Fermentlarni immobillashda (barqarorlashda) ishlatiladigan tashuvchilar.....	24
3.2. Fermentlarni fizikaviy usulda immobillash.....	26
3.3. Adsorbsion immobillizatsiya qilish usullari .....	31
3.4. Fermentlar adsorbsiyasiga ta'sir etuvchi omillar .....	33
3.5. Fermentni tashuvchi bilan bog'lanish kuchini oshiruvchi usullar .....	36
3.6. Modifikatsiya qilingan fermentlarni immobilizatsiya qilish .....	38
3.7. Fermentlarni gel ichiga kiritish yo'li bilan immobilizatsiya qilish .....	41
3.8. Faol moddalarni yarim o'tkazgich membranalar va mikrokapsullash asosida immobilizatsiya qilish .....	43
3.9. Fermentlarni emulgirash asosida immobillash.....	45
3.10. Fermentlarni kimyoviy immobillash .....	46
IV BOB. FERMENTLAR YORDAMIDA SELLULOLITIK CHIQINDILARDAN QANDLI MODDALAR OLISH .....	57
4.1. Sellulolitik fermentlar. Ularning funksiyalari va xususiyatlari .....	57
4.2. Sellulozali chiqindilar gidrolizi .....	61
4.3. Kristall fruktoza olish texnologiyasi.....	64
4.4. Kristall glukoza olish texnologiyasi .....	67
4.5. Glukoza-fruktozali sirop olish.....	71

4.6. L va D aminokislotalar olish texnologiyasi.....	75
4.7. Enzimatik sintez.....	80
4.8. Mikrobiologik sintez.....	83
4.9. Lizin olish texnologiyasi.....	87
4.10. L-lizinni enzimatik sintezi va qo'llanilishi.....	91
4.11. Fermentlarning analitik kimyoda qo'llanilishi.....	93
<b>V BOB. FERMENTLARNI TEZKOR USULLARDA</b>	
<b>QO'LLASH.....</b>	<b>98</b>
5.1. Antigen va antitana tuzilishi, xossalari.....	98
5.2. Immunoferment tahlil usullari.....	107
<b>VI BOB. FERMENTLAR YORDAMIDA ORGANIK</b>	
<b>MODDALAR OLIISH. BIOSENSORLAR VA ULARNING</b>	
<b>AHAMIYATI, QO'LLANILISHI.....</b>	<b>118</b>
6.1. Fermentlar yordamida organik kislotalarning olinishi.....	118
6.2. Biosensornlarning qo'llanilishi.....	126
<b>VII BOB. CHIQUINDISIZ TEXNOLOGIYA YARATISH.</b>	
<b>BIOO'G'ITLAR OLIISH.....</b>	<b>136</b>
7.1. Biogaz olish texnologiyasining tarixi.....	136
7.2. Azot yutuvchi mikroorganizmlar asosida tayyorlangan preparatlar.....	138
<b>VIII BOB. GEN MUHANDISLIGI.GENLAR BANKINI</b>	
<b>YARATISH. TRANSLATSIYA VA INISIATSIYA. O'SIMLIK</b>	
<b>GEN MUHANDISLIGI.....</b>	<b>142</b>
8.1. Viruslar, faglar, kosmidlar, fazmidlar.....	145
8.2. Transpozonlar.....	149
<b>IX BOB. GEN MUHANDISLIGIDA ISHLATILADIGAN</b>	
<b>FERMENTLAR BA ULARNI QO'LLASH. PLAZMIDALAR</b>	
<b>VA ULAR ASOSIDAGI VEKTORLAR.....</b>	<b>152</b>
9.1. Restriktazalar.....	155
9.2. Polimerazalar.....	157
9.3. Teskari transkriptaza.....	159
9.4. Ligazalar.....	162
9.5. Terminal transferaza va poli-A - polimeraza.....	164
9.6. Restrikt endonukleazalar klassifikatsiyasi.....	166
9.7. Restriktazalarning nomenklaturasi va xususiyatlari.....	169
9.8. Rekombinant DNKning konstruksiyasi.....	171
9.9. "Yopishqoq" uchlilar bilan tikish (restriktaza - ligaza usuli).....	172
9.10. "To'mtoq" uchlari bilan tikish (konnektor usuli).....	174

9.11. Turli xil yopishqoq uchlari bo'lgan fragmentlarni o'zaro tikish (linker usuli).....	177
9.12. Rekombinant DNK texnologiyasi .....	178
9.13. Selektiv va reportyor genlar.....	181
Mustaqil ta'lim mavzulari.....	182
<b>X BOB. TRANSGEN O'SIMLIK OLISH. HAYVON GEN MUHANDISLIGI .....</b>	<b>183</b>
10.1. Gen muhandisligida ishlatiladigan vektorlar .....	186
10.2. Agrobakteriya plazmidlari .....	190
10.3. Transgen o'simlik olish usullari .....	201
10.4. Marker genlarni tutmagan transgen o'simliklar olish .....	205
10.5. O'simliklarda ekspressiyalanadigan rekombinat oqsillar .....	207
10.6. Gerbitsidlarga chidamli bo'lgan o'simliklar .....	213
10.7. Mevalarning mazasini o'zgartirish .....	216
10.8. Transgen hayvonlar olish.....	218
10.9. Transfeksiya usuli .....	219
10.10. Mikroinyeksiya usulida transgen hayvon olish .....	222
10.11. Elektroporatsiya usulida transgen hayvon yaratish .....	224
10.12. "Mini-hujayralar" va liposomaga yot gen kiritish usuli ....	226
10.13. Liposomalarga kiritish .....	227
10.14. Transgen sichqon olish .....	228
10.15. Modifikatsiyalangan embrion o'zak hujayralarining ishlatilishi .....	233
10.16. Yadroni ko'chirib o'tkazish usulida transgen qo'yni klonlash .....	236
10.17. Transgen qoramol olish .....	238
10.18. Transgen parranda olish.....	241
10.19. Transgen baliq olish.....	245
<b>XI BOB. HUYAYRA MUHANDISLIGI. SUPER PRODUTSENTLAR YARATISH .....</b>	<b>247</b>
11.1. Organ, to'qima va protoplastni sun'iy ozuqa muhitlarida o'stirish .....	248
11.2. Ajratilgan to'qimalar kulturasi .....	252
11.3. Kallus to'qimasini olish, protoplastlarni olish.....	254
11.4. Hujayralarning qo'shilish uslublari .....	259
GLOSSARIY .....	265
FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR RO'YXATI .....	267

SH.S. TASHMUXAMEDOVA, Z.A. KADIROVA

# BIOTEXNOLOGIYA

«Mehr-nuri nashriyoti», 2024.

**Muharrir:** H. Zakirova  
**Tex. muharrir:** Yu. O‘rinov  
**Musahhiha:** D. Beknazarova  
**Saxifalovchi:** F. Qo‘ziyev  
**Dizayner:** B. Xaydarov



**Nash.lits. Tasdiqnom** № 314003, 06.07.2024 y.

Terishga 15.08.2024-yilda berildi. Bosishga 25.08.2024-yilda ruxsat etildi. Bichimi: 60x84 1/16. Ofset bosma. «Times New Roman» garniturasida. Shartli b.t. 17.0. Nashr b.t. 15.81.

Adadi 300 nusxa. Buyurtma № O-07.

Bahosi shartnoma asosida.

“Mehr-nuri nashriyoti”, 100095, Toshkent shahri,  
Olmazor tumani, Talabalar ko‘chasi, 5-uy.  
e-mail: mehr\_nuri@internet.ru

“Mehr-nuri nashriyoti” UK bosmaxonasida chop etildi.  
Toshkent shahri, Olmazor tumani, Talabalar ko‘chasi, 5-uy.  
Telefon: (+99890) 000-33-39, (+99833) 002-33-93



ISBN 978-9910-8801-6-2



9 789910 880162