

ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

ГУЛИСТОН ДАВЛАТ УНИВЕРСИТЕТИ

Табиий фанлар факультети

**Биология кафедраси катта ўқитувчиси
Каромат Исмоилованинг Биотехнология
асослари фанидан тайёрлаган
маъруза матни**

Гулистон-2017

КИРИШ

Режа:

1. Биотехнологиянинг ривожланиш тарихи
2. Биотехнологиянинг предмети ва вазифалари
3. Биотехнологиянинг замонавий йўналишлари
4. Биотехнологиянинг саноат, соғлиқни сақлаш ва қишлоқ хўжалигидаги аҳамияти
5. Биотехнологияда қўлланиладиган асосий методлар.
6. Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланиши

Таянч сўзлар: биотехнология, ривожланиши, унинг йўналишлари, вазифалари, қўлланиладиган методлар.

Адабиётлар: 1,2, 3, 4, 13.

Маълумки, биологияга бошқа табиий фанлар – физика, химия, математика каби фанларнинг татбиқ қилиниши натижасида замонавий биология ривожланди. XX асрнинг иккинчи ярмида биохимия, молекуляр генетика ва молекуляр биология соҳаларида эришилган фундаментал тадқиқотларнинг ютуқлари хужайра фаолиятини турли механизмлар ёрдамида бошқариш имконини берди. Биология соҳасида яратилган оламшумул янгиликлар ва ишланмалар замонавий биотехнологияни ривожланишига туртки бўлди ва улар қуйидагилардир:

- Биологик системалардаги ирсий ахборотни сақланиши ва авлоддан-авлодга узатилишида нуклеин кислоталар ролини исботланиши;
- Барча тирик организмлар учун универсал ҳисобланган генетик код тузилишини аниқланиши;
- Организмлар бир авлодининг ҳаёти жараёнида генлар фаолиятини бошқариш механизмларини очиб берилиши;
- Микроорганизмлар, ўсимлик ва ҳайвон хужайралари культурасини олишнинг маълум бўлган технологияларни мукамаллаштириш ва янги технологияларини яратилиши;
- Генетик ва хужайра инженерияси методларини ривожланиши ва улар ёрдамида саноат миқёсида ишлатиладиган организмларнинг юқори маҳсулдор шаклларини яратиш.

“Биотехнология” терминини 1917 йилда венгер инженери Карл Эреки киритган. Унинг таърифига кўра “**биотехнология** – бу тирик организмлар ёрдамида хом ашёдан у ёки бу маҳсулот олинадиган ишларнинг барча туридир”, яъни биотехнологик жараёнларнинг схемаси қуйидагичадир:

Хом ашё



Бошланғич ишлов бериш



Ферментация ва биотрансформация



Охирги ишлов бериш



Маҳсулот

Биотехнологияни 3 та асосий қисмга бўлиш мумкин:

1. Саноат биотехнологияси. Бунда биотехнологик жараёнлар амалга ошишининг умумий тамойиллари ўрганилади, биотехнологиянинг асосий объектлари ва уни қўллаш мумкин бўлган соҳалар, микроорганизмлар ишлатиладиган бир қатор кўп масштабни саноат биотехнологияси билан танишилади.

2. Хужайра инженерлиги. Бу қисмнинг асосий мақсади – хужайра культурасини олиш ва бу объектлардан амалиётда фойдаланиш билан таништиришдир. Бунда ҳайвон ва ўсимлик хужайралари культурасини олиш усуллари билан таништирилади. Хужайра биотехнологияси ёрдамида селекцияда чидамли, маҳсулдорлик ва сифатли ўсимлик ва хужайраларнинг муҳим формалари ва линияларини олиш, қимматли генотипларни кўпайтириш, озик овқат, ем ва тиббиётда ишлатиладиган қимматли биологик фаол моддаларни олиш тезлашди.

3. Ген инженерияси. Замонавий биотехнологиянинг асосий ютуғи генетик трансформация, яъни бегона ген ва бошқа ирсий белгиларни ташувчи материалларни микроорганизмлар, ўсимлик ва ҳайвон хужайраларига ўтказиш, янги белги ва хусусиятли трансген организмларни олишдир.

Биотехнологиянинг вазифалари:

- Керакли маҳсулотларни ишлаб чиқариш учун биологик объектлар, система ва жараёнлардан фойдаланиш;
- Микроорганизмлар, хужайра культуралари ва уларнинг алоҳида компонентларидан ишлаб чиқаришда фойдаланиш мақсадида биохимик, микробиологик ва инженерлик билимларини комплекс қўллаш;
- Турли типдаги фойдали маҳсулотларни олиш ва кўпайтириш учун биологик жараёнлардан фойдаланиш;
- Керакли маҳсулотлар олиш ёки сервис технологиясини яратиш мақсадида биологик агентлар ёрдамида ишлов бериш учун илмий ва инженерлик принциплардан фойдаланиш.

Биотехнология сўзи грекча сўзлар йиғиндиси бўлиб, «биос» - ҳаёт, «техне» - санъат, техника ва «логос» – тушунча, таълимот маъноларини билдиради.

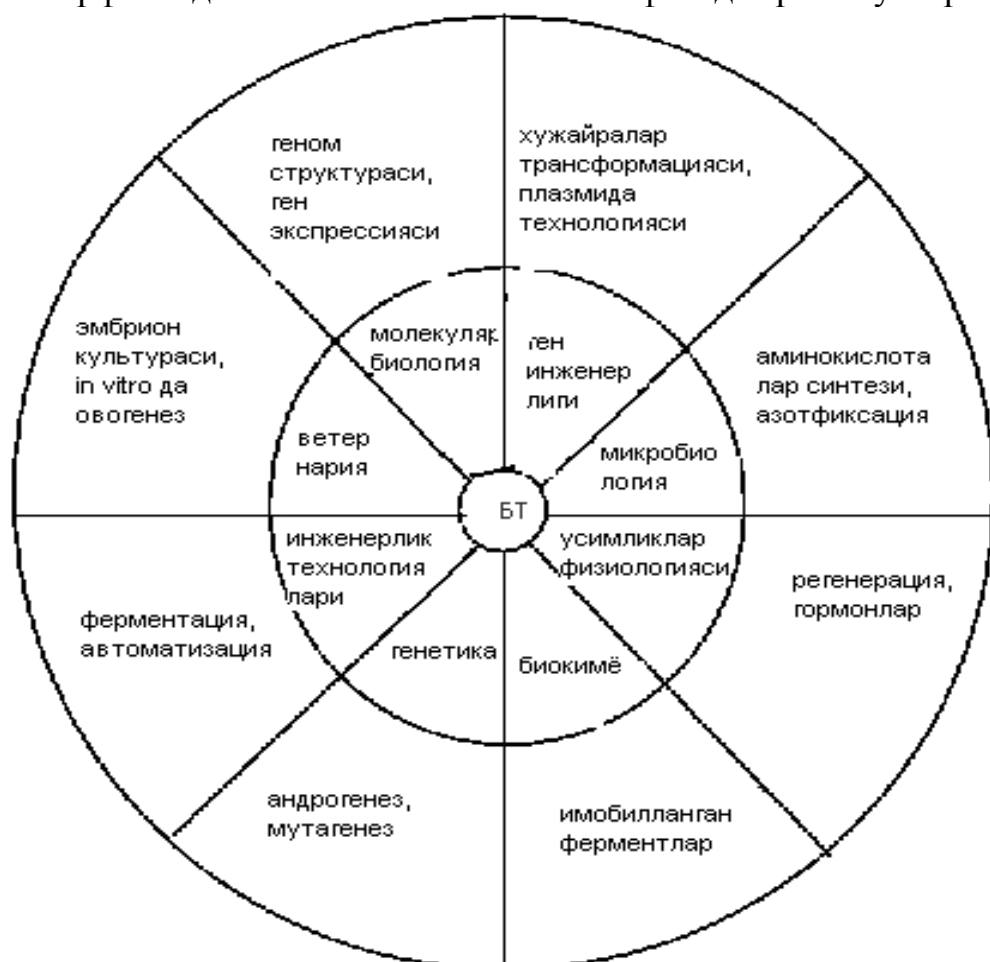
Биотехнология йўналишларининг вазифалари қуйидагилардир:

- Соғлиқни сақлаш соҳасида турли касалликларни даволаш, диагностикаси ва профилактикаси учун янги биологик актив моддалар ва доривор препаратларни яратиш;
- Қишлоқ хўжалиги ўсимликларини касаллик қўзғатувчилар ва зараркунандалардан ҳимоялашнинг биологик воситаларини, бактериал ўғитлар ва ўсимлик ва ҳайвонларнинг ўсиш регуляторларини; ноқулай атроф-муҳит омилларига чидамли янги ўсимлик навларини ҳамда фойдали хусусиятга эга бўлган янги ҳайвон зотларини (трансген ҳайвонлар)ни яратиш;
- Қишлоқ хўжалиги ҳайвонларининг маҳсулдорлигини ошириш учун қимматли озуқа қўшилмаларини (озуқавий оқсил, аминокислоталар,

витами́нлар, озуқаларни ҳазм қилишга ёрдам берувчи ферментлар ва б.) яратиш;

- Қишлоқ хўжалиги ва ветеринарияда турли мақсадларда қўлланадиган юқори самарали препаратларни биоинженерлик методлари ёрдамида яратиш;
- Озиқ-овқат, кимёвий ва микробиологик саноат учун қимматли маҳсулотларни яратиш ва уларни олишнинг янги технологияларини яратиш;
- Қишлоқ хўжалиги, саноат ва маиший чиқиндиларидан келгусида фойдаланиш мумкин бўлган маҳсулот олиш учун қайта ишлашнинг янги технологияларини яратиш ва уларни амалда қўллашдир.

Демак, **биотехнология** – илмий-техникавий прогресснинг предметлараро соҳаси бўлиб, у биологик, кимёвий ва техник билимлар тўқнашувида вужудга келган бўлиб, у янги биотехнологик жараёнларни яратишга қаратилгандир. Бу жараёнлар аксарият ҳолларда паст температурада амалга ошади, кам миқдорда энергия сарфланади ва бошланғич хомашё сифатида арзон субстратлар ишлатилади.



Биотехнология азалдан маълум бўлган инсонлар ишлатиб келаётган анъанавий жараёнлар, яъни пиво, вино тайёрлаш, пишлоқ ишлаб чиқариш, шарқ ширинликларини тайёрлаш, ҳамда чиқиндиларни қайта ишлаш каби жараёнларни ўз ичига олади. Бу жараёнларнинг барчасида биологик объектлар қатнашади.

Биотехнологияда янги ишланмаларни яратиш, ривожлантириш ва жараёнлардан оптимал фойдаланиш мақсадида кимё, микробиология, биокимё, молекуляр

биология, кимёвий технология ва компьютер техникаси методларидан кенг фойдаланилади.

Молекуляр биотехнологиянинг ривожланиш тарихи

Сана	Воқеалар
1917	Карл Эреки «биотехнология» терминини киритган
1943	Саноат миқёсида пенициллин ишлаб чиқарилган
1944	Эвери, Мак Леод ва Мак Картилар генетик материал ДНКдан тузилганлигини кўрсатиб беришган
1953	Уотсон ва Крик ДНК молекуласининг тузилишини аниқлашган
1961	“Биотехнология ва биоинженерия” журнали таъсис этилган
1961-1966	Генетик код расшифрован
1970	Биринчи рестрикцион эндонуклеаза ажратиб олинган
1972	Тўлиқ ҳажмли тРНК гени синтез қилинган
1973	Рекомбинант ДНК технологиясига асос солинган
1975	Моноклонал антитела олинган
1976	Рекомбинант ДНКни олиш бўйича йўриқнома ишланган
1976	ДНКнинг нуклеотид кетма-кетлигини аниқлаш методи ишлаб чиқилган
1978	<i>E. coli</i> ёрдамида инсон инсулини ишлаб чиқилган
1982	Рекомбинант ДНК технологияси бўйича олинган 1 вакцинани ҳайвонларда қўллашга рухсат берилган
1983	Гибрид Тi–плазмидадан фойдаланиб ўсимликлар трансформацияланган
1988	Полимеразанинг занжир реакцияси методи яратилган
1990	Инсоннинг соматик хужайрасидан фойдаланиб ген терапияси синаш режаси тасдиқланди
1990	“Инсон геноми” лойиҳаси бўйича ишлар бошланди
1994-1995	Инсон хромосомасининг генетик ва физик харитаси чоп этилди
1996	Рекомбинант ДНК катта миқдорда сотилди
1997	Соматик хужайрадан сут эмизувчи клонлаштирилди

Ўзбекистонда биотехнологияни фан сифатида икки йўналишини кўриш мумкин:

1. Ҳозирги замон биотехнологияси.
2. Классик биотехнология.

Ҳозирги замон биотехнологияси ген ва хужайра инженерлиги усуллари генетик трансформация қилнган объектларни яратиш технологиялари, улар орасида турли маҳсулотларни ишлаб чиқаришдир.

Классик биотехнология эса табиий биологик объектлардан фойдаланган ҳолда турли моддаларни ишлаб чиқариш усуллари ва технологияларидир (нон пишириш, пиво, вино, сирка, катик тайёрлаш).

Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланиши ва шаклланишини ЎЗР ФА акад. О.С.Содиқов номидаги биоорганик Кимё институти ташкил этилганидан билишимиз мумкин. Ушбу институт 1977 йилда Ўзбекистон Республикаси ФА таркибидаги биоорганик кимё бўлими (1973 й.) негизда ташкил этилган. Институтнинг асосий илмий йўналиши ҳайвон ва ўсимликлар организмидаги биоорганик кимё жараёнларини, яъни юқори ва қуйи молекуляр табиатга эга бўлган биологик фаол моддаларнинг тузилиши, функцияси ўрганилиб, уларни синтетик усулда олиш йўллари ишлаб чиқилди. Табиий биологик фаол модда – госсиполнинг полиморф модификацияси комплекс ҳосил қилиши биринчи бўлиб исботланди ва унинг асосида йигирмадан ортиқ янги дорилар, биологик моддалар асосида эса 30 дан ортиқ дори препаратлари олинди. Булардан вирусларга қарши ишлатиладиган 3%ли госсипол линименти, иммуномодулятор - тимоптин, қон тўхтатувчи “Лагоден”, хламидияга қарши қўлланиладиган доривор восита “Полиниль” ва биоорганика институтининг тажриба синов базасида ишлаб чиқарилмоқда ва амалиётда қўлланилмоқда. Жаҳон андозаларига мос келадиган пахта мойини ва кам госсиполли пахта кунжарасини олиш технологияси ишлаб чиқилиб, Ўзбекистон Республикасининг кўпчилик ёғ-мой экстракция заводларида лицензия асосида қўлланилмоқда.

Биотехнология соҳасида Ўзбекистон асосан Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг микробиология институтида, генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтида ҳамда Республика Кимё бирлашмасига қарашли бир қатор заводларда ишлар олиб борилмоқда. Биотехнология ихтисослиги биринчи ўзбек академики А.Г.Холмуродов (1939-1996) фузалиум авлодига мансуб замбуруғлардан НАД структура-функционал боғлиқлигини ўрганиш ҳайвон ва ўсимликлардан ажратиб олинган иккиламчи маҳсулотларни қайта ишлашнинг жаҳон стандартларига мос келадиган янги технологияларини ҳамда ўсимликларни ҳимоя қилувчи экологик тоза воситаларни олиш устида тадқиқотлар олиб боришдан иборат. Институтда олиб борилган юқори ва қуйи молекуляр биорегуляторларни комплекс тадқиқ этиш натижасида захарли жониворлар захаридан 50 дан ортиқ биологик фаол оқсил ва пептидлар ажратиб олинди. Улардан 15 дан ортигининг кимёвий тузилиши ва таъсир механизми ўрганилди. Ғўзадан фитогормонларнинг рецепторлари ажратиб олинди ва физик-кимёвий хоссалари ўрганилди, уларнинг пахта баргини тўқишдаги регуляторлик роли исботланди. Натижада ғўза дефолиациясида рўй берадиган жараённинг молекуляр механизми кўрсатилди ва дефолиацияловчи ҳамда ўсишни тезлаштирувчи фаолликка эга бўлган бирикмаларни танлаш кўрсаткичлари ишлаб чиқилди. Ғўза ўсиши жараёнида организм фермент системаларининг пахта толаси ҳосил бўлишидаги роли ўрганилди ва целлюлоза биосинтези жараёнининг молекуляр механизми исботланди. Ўсимликлар зараркунанда ҳашоротлари феро коферменти ва витаминлар комплекси (В гуруҳига кирувчи витаминлар, витамин РР, А ва ҳ.к.) тайёрлаш технологиясини яратди.

Профессор К.Д.Давронов томонидан ёғ парчаловчи фермент-липаза тайёрлаш технологиясини «Ер малҳами» биопрепаратини яратди. Бу препарат азот ютувчи микроорганизмлар асосида тайёрланган бўлиб, мамлакатимиз қишлоқ хўжалигида қўлланилмоқда. Бундан ташқари К.Д.Давронов раҳбарлигида целлюлоза лигнин биокаркасини (ғўзапоя, сомон, каноп пояси, қиринди ва б.) махсус тайёрланган

базидиомецитларнинг ферментлари иштирокида табиий целлюлоза – лигнин бирикмалари парчаланиши амалиётда кўрсатиб берилди.

Академик М.И.Мавлоний Ўзбекистонда учрайдиган ачитки замбуруғларни таҳлил қилиб, уларни новвойчилик, виночилик ва чорвачиликка қўл келадиган турларини олди ва улар асосида махсус хамиртурушлар ва виночилик учун ачитки тайёрлаш технологияларини яратди.

Микробиология институти олими Ж.Тошпўлатов сомон ва ғўзапояни парчалашда «Триходерма ҳарзнанум» замбуруғи ферментларидан фойдаланиш мумкинлигини илмий асослаб берди. Бу технология қўлланилганда сомонда шакар миқдори 6-7% га етгани, витаминлар, аминокислоталар пайдо бўлиб, сомонни озуқа бирлиги бир неча баробар ошганлиги исботлаб берилган.

2-МАЪРУЗА.

БИОТЕХНОЛОГИЯНИНГ ОБЪЕКТЛАРИ. МИКРООРГАНИЗМЛАР ВА УЛАР ЁРДАМИДА ФОЙДАЛИ МОДДАЛАРНИ ОЛИНИШИ.

Режа:

1. Биотехнологиянинг объектлари
2. Микробли синтез
3. Бирламчи метаболитларни олиниши
4. Иккиламчи метаболитларни олиниши
5. Селекция.
6. Индуцирланган мутагенез.
7. Фермент индукцияси

Таянч сўзлар: биотехнологиянинг объектлари, микроорганизмлар, хужайралар, микробли синтез, бирламчи ва иккиламчи метаболитлар, фермент, индукция, мутагенез.

Адабиётлар: 1,2,3,5,6,13.

Биотехнологиянинг объектлари – микроорганизмлар, ҳайвон ва ўсимлик хужайралари, трансген ҳайвон ва ўсимликлар, ҳамда хужайралардаги кўп компонентли фермент системалари ва алоҳида ферментлардир.

Кўпгина замонавий биотехнологик ишлаб чиқаришнинг асоси **микробли синтез**, яъни турли биологик актив моддаларни микроорганизмлар ёрдамида синтезлаш ҳисобланади. Бир қанча сабабларга кўра ўсимлик ва ҳайвон объектларидан кенг қўлланилмайди.

Объектнинг табиатидан қатъий назар, исталган биотехнологик жараённинг 1-босқичи организмлар (микроблар бўлса), хужайра ёки тўқималарнинг (ўсимлик ёки ҳайвонлар бўлса) тоза культурасини олиш ҳисобланади. Микроб хужайралари культураси, ўсимлик ва ҳайвон тўқималари культуралари методик нуқтаи назардан микроорганизм культураларидан фарқ қилмайди.

Ҳозирда микроорганизмларнинг 100 000 ортиқ турига тавсиф берилган. Булар прокариотлар (бактериялар, актиномицетлар, риккетсиялар, цианобактериялар) ва эукариотларнинг бир қисми (ачиткилар, ипсимон кўзикаринлар, айрим

сувўтлари)дир. Микроорганизмлар турли-туман бўлишига қарамай, қайси маҳсулот олиниши кераклигига қараб уларни тўғри танлай билиш керак. Энг кўп ва чуқур ўрганилган микроорганизмлар - ичак таёқчаси (*E. coli*), пичан таёқчаси (*Bac. subtilis*) ва хамиртурушлар (*S.cerevisiae*)дир.

Биотехнологик объектни танлашда (масалан, микроорганизм-продуцент) яхлит маҳсулотни синтезлаш хусусияти асосий мезон саналади. Бунда микроорганизмлар куйидаги хусусиятларга эга бўлиши керак:

- Тез ўсиш суръатига эга;
- Ўзининг ҳаёт фаолияти учун арзон субстратларни сарфлаши;
- Ташқи микрофлорага нисбатан чидамли, яъни рақобатбардош бўлиши.

Буларнинг барчаси яхлит маҳсулот олишга кетадиган сарф-ҳаражатларни камайтиради. Табиатда барча талабларга жавоб берадиган организмлар учрамайди. Масалан:

1. Бир хужайрали организмлар юқори организмларга нисбатан тез ўсади ва уларда синтетик жараёнлар тез кетади. Лекин бу барча микроорганизмларга тегишли эмас. Масалан, олиготрофлар жуда секин ўсишига қарамай, кўплаб қимматли маҳсулотларни олиш учун қулай.
2. Ҳаёти фаолияти давомида куёш нури энергиясидан фойдаланувчи фотосинтезловчи микроорганизмлар. Уларнинг бир қисми (цианобактериялар ва фотосинтезловчи эукариотлар) углерод манбаи сифатида CO_2 ни сарфлайди, цианобактерияларнинг айримлари эса атмосфера азотини ютади. Фотосинтезловчи микроорганизмлар аммиак, водород, оксил ва бир қанча органик бирикмалар учун продуцент ҳисобланади. Лекин уларнинг генетик тузилиши ва ҳаёт фаолиятининг молекуляр-биологик механизмлари яхши ўрганилмаган.
3. $60-80^{\circ}C$ да ўсадиган термофил микроорганизмларнинг хусусияти ташқи микрофлорани ўсишига тўсқинлик қилади. Булар спиртлар, аминокислоталар, ферментлар, молекуляр водороднинг продуценти ҳисобланади.

Термофиллар синтезлайдиган ферментлар иссиқлик, айрим оксидловчилар, детергентлар, органик эритувчилар ва бошқа ноқулай омилларга нисбатан анча чидамли ҳисобланади. Оддий температурада эса улар ҳам фаол. Масалан, айрим термофил микроорганизмлардан олинадиган протеазалар $75^{\circ}C$ дагига нисбатан $20^{\circ}C$ да 100 марта кам фаолдир. Унинг бу хусусияти айрим ишлаб чиқариш саноатида муҳим аҳамиятга эга. Масалан, *Thermus aquaticus* - термофил бактериясининг Тақ-полимераза ферменти ген инженериясида кенг ишлатилади.

Бирламчи метаболитларнинг олиниши.

Бирламчи метаболитлар – микробларнинг ўсиши учун зарур бўлган, мол.массаси 1500 дальтондан кам бўлмаган паст молекуляр бирикмалардир. Уларнинг баъзилари макромолекулаларнинг қурилиш блоки, бошқалари эса коферментлар синтезида қатнашади. Саноатдаги энг муҳим метаболитлар – аминокислоталар, органик кислоталар, пурин ва пиримидин нуклеотидлари, эритувчилар ва витаминлар. Микроб хужайралари, бошқа тирик организмлар сингари кўп миқдорда бирламчи метаболитларни ишлаб чиқармайди.

Аутотрофлар ишлаб чиқарадиган кўплаб аминокислоталар ва нуклеотидлар ферментация жараёнида ишдаб чиқарилади. *Brevibacterium flavum* ва

Corynebacterium glutamicum штаммлари озуқа муҳити таркибидаги қандларни 1/3 қисмини лизинга айлантиради. Шу йўл билан 1 л муҳитда 74 г лизин олинади. Лизин – метаболитик йўлнинг охирги маҳсулоти бўлиб, у метионин ва треонинни ҳосил бўлишига олиб келади. Лизин ва треонин ушбу йўлнинг биринчи ферменти аспартаткиназа билан ўзаро боғланиб уни бошқаради. Иккала аминокислотанинг йиғилиши аспартаткиназа ферментининг фаоллигини ингибирлайди. Гендаги биринчи тип мутация ушбу ферментнинг фаоллигини бузади ва треонин ва метионин синтезини блоклайди. Натижада ушбу ферментлар ингибиторларидан бири (треонин) йўқолади. Сўнгра бундай ауксотроф мутант таркибида треонин ва метионин бўлган муҳитга эқилади. Лекин мавжуд бўлган треонин лизин биосинтезини тўхтатиш учун етарли бўлмайди ва у тўплана бошлайди. 2-тип мутациялар аспартаткиназани ўзгартиради. Натижада у лизин билан ўзаро таъсирлашмайди ва ушбу аминокислота ингибирланишига сезгир бўлмайди.

21 та аминокислотадан ташкил топган оксилларнинг 8таси алмашмайдиган оксиллар бўлиб, улар организмга озик билан бирга тушитиши керак. Булардан энг муҳимлари метионин ва лизиндир. Метионин синтетик йўл билан, 80% лизин эса ферментация йўли биосинтетик усулда олинади. Аминокислоталарни микробиологик синтезлашнинг аҳамиятли томони шундаки, бу жараён натижасида биологик фаол изомерлар ҳам олинади.

Натрий тузи кўринишида зиравор сифатида ишлатиладиган глютамин кислотаси *Brevibacterium flavum* ва *Corynebacterium glutamicum* культураларидан олинади.

Саноатда кенг ишлатиладиган органик кислоталардан сирка кислотаси ҳисобланади. У резина, пластмасса, ацетат толалари, фармацевтик препаратлар, инсектицидлар ишлаб чиқаришда ишлатилади. Японияда сирка кислота аминокислота ишлаб чиқаришдаги ферментацияда субстрат сифатида ишлатилади.

Сут кислотаси бижғиш йўли билан олинган биринчи органик кислотадир. У озик овқат саноатида оксидловчи сифатида, галваностегияда ва пластмасса ишлаб чиқаришда кенг ишлатилади.

Иккиламчи метаболитларнинг олинishi.

Иккиламчи метаболитлар (идиолитлар ҳам дейилади) – тоза культурода ўсиш учун зарур бўлмаган паст молекуляр бирикмалардир. Уларни чегараланган таксономик гуруҳлар ишлаб чиқаради. Иккиламчи метаболитларга антибиотиклар, алкалоидлар, фитогормонлар ва токсинлар киради.

Иккиламчи метаболитларни ишлаб чиқарадиган микроорганизмлар биринчи босқичда тез ўсади, сўнг тропофаза босқичини ўтайди. Бу босқичда кам миқдорда иккиламчи моддалар синтезланади. Микроорганизмлар ўстириляётган озуқа муҳитида битта ёки бир нечта озуқа моддаларини камайиши ҳисобига идиофазага ўтилади. Айнан шунда идиолитлар ишлаб чиқарилади. Антибиотиклар олинаётганда микроорганизмлар кўпинча тропофаза вақтида ўзининг шахсий антибиотикларига сезгир бўлиб қолади. Идиофазада эса уларга нисбатан чидамли бўлади. Антибиотик ишлаб чиқарувчи микроорганизмларни ўз-ўзини йўқ қилишини олдини олиш мақсадида тезда идиофазага ўтиб олиш керак. Сўнгра микроорганизмни ушбу фазада ўстириш мумкин.

Антибиотиклар – микроблар синтезлайдиган фармацевтик бирикмаларнинг энг катта синфидир. Бу синфга замбуруғларга қарши дорилар, ўсмага қарши дорилар ва алкалоидлар киради.

Филаментоз замбуруғларнинг 6 тури (хусусан, цефалоспоринлар --- *Cephalosporium* ва пенициллинлар – *Penicillium*) 1000 га яқин турли антибиотикларни, нофиламентоз бактерияларнинг 2 тури 500 антибиотикларни, актиномицетларнинг 3 та тури 3000 га яқин антибиотикларни ишлаб чиқаради.

Ўсма камалликларига қарши моддаларнинг сони чекланган. Токио институтида *Streptomyces verticillus* культурасидан ажратиб олинган блеомицин – гликопептид табиатига эга бўлиб, ўсма хужайраларнинг ДНКсини кесиб, ДНК ва РНК репликациясини бузиш хусусиятига эга. Иккинчи гуруҳ ўсмага қарши реагентлар аминогликозид бирлик ва антрациклин молекуласининг комбинациясига асосланиб яратилган. Бу препаратларнинг камчилиги улар юрак учун хавфлидир.

Қимматли ва фаол продуцентларни яратиш жараёнининг ажралмас қисми бўлиб **селекция** ҳисобланади. Селекциянинг асосий йўли керакли продуцентни танлаб олишнинг ҳар бир босқичида геномларни конструкция қилишдир. Микробли технология методларида асосан босқичли селекция ишлатилади, яъни танлашнинг ҳар бир босқичида микроорганизм популяциясидан кўпроқ фаол бўлган вариантлар танлаб олинади (спонтан мутантлар), кейинги босқичларда янги, нисбатан самарали штаммлар танлаб олинади ва шу тариқа давом эттирилади.

Самарали продуцентларнинг селекция жараёни **индуцирланган мутагенез методини** қўллаш билан тезлаштирилади.

Мутаген таъсирлар сифатида УФ, рентген ва гамма-нурланишлар, маълум бир кимёвий моддалардан фойдаланилади ва бу таъсирлар натижасида ДНКнинг бирламчи тузилиши бузилади.

Бу усул билан селекция қилганда ҳам босқичма-босқич, микроорганизм клонлари (хужайра ёки микроорганизмлар тўплами) биокимёвий текширувдан ўтказилади ва энг фаоллари ажратиб олиниб, мутагенлапр билан қайта таъсир этилади. Бу жараён кўзда тутилган мақсадга эришгунга қадар давом эттирилади.

Микробиологик саноат учун микроорганизмлар селекцияси ва янги штаммларни яратиш уларнинг маҳсулдорлик хусусиятига, яъни у ёки бу маҳсулотни ҳосил қилишига қаратилгандир. Бу масалалар хужайрадаги бошқарув жараёнларни ўзгартириш билан амалга оширилади. Шунинг учун бактериал хужайраларни биокимёвий фаоллигини бошқаришни яхши тушуниш керак.

Маълумки, бактериялардаги биокимёвий реакцияларни 2 йўл билан амалга ошириш мумкин. Биринчиси жуда тез (секунд ёки минут ичида) бўлиб, ферментнинг индивидуал молекуласининг каталитик фаоллигини ўзгартиришга асосланган. Иккинчиси, нисбатан секинроқ кечади (бир неча минут давомида) ва бунда ферментлар синтезининг тезлиги ўзгартирилади. Иккала механизмда ҳам системаларни бошқаришнинг ягона принципи – қайта боғланиш принципи ишлатилади.

Исталган метаболитик йўлини бошқаришнинг энг оддий усули субстрат осон олиндиган ёки ферментнинг бор-йўқлигига асосланади. Дарҳақиқат, субстрат миқдорининг камайиши (муҳитда паст концентрацияда бўлиши) мазкур метаболитик йўл орқали аниқ бр модданинг ўтиш тезлигини камайтиради. Бошқа томондан, субстрат концентрациясининг ошиши метаболитик йўлнинг барқарорлашишига олиб келади.

Худди шундай эффект фермент кеонцентрациясини ошириш натижасида ҳам рўй беради. Масалан, тегишли фермент синтезини назорат қилувчи генларни

амплификациялаш билан амалга оширилади. Хужайрада метаболитик реакциялар фаоллигини бошқаришнинг энг кенг тарқалган усули ретроингибирлаш типи бўйича бошқариш ҳисобланади.

Ўсаётган хужайралар синтезлайдиган минглаб ферментларнинг баъзилари доимо ва озуқа муҳитига боғлиқ бўлмаган ҳолда ҳосил бўлади, бошқалари эса уларга таъсир қилувчи субстрат мавжуд бўлгандагина ҳосил бўлади. Биринчилари конститутив ферментлар (гликолиз ферментлари ва б.) иккинчилари эса адаптив ёки индуцибел ферментларга киради. Масалан, глюкозали муҳитда ўсаётган *E.coli* хужайралари оз миқдордаги лактоза метаболизми ферментларининг, ҳамда Ушбу микроорганизм хужайралари ўзлаштира оладиган углероднинг бошқа манбаларини тутати. Бу ферментлар лактозали муҳитга ўтказилса, 1-2 минутдан сўнг лактоза утилизациясининг асосий ферменти β -галактозидазанинг фаоллигини ошади. Бу фермент лактозани глюкоза ва галактозага гидролизлайди. Кейинги қисқа вақт ичида β -галактозидазанинг фаоллиги бошланғич даражага нисбатан 1000 марта ортади. Бошқача айтганда, бу ерда фермент индукцияси ўрин тутати.

Фермент индукцияси – культура муҳитида маълум бир кимёвий бирикманинг (индуктор)нинг пайдо бўлишига фермент синтезининг жавобидир. Кўп ҳолларда субстратларнинг сарфланмаган аналоглари индуктор бўлиб ҳисобланади. Масалан, β -галактозидаза учун лактозанинг метаболизмда қатнашмайдиган изопропил β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) индуктор саналади. Бошқа томондан, субстрат ҳар доим ҳам ўзига тегишли фермент синтезининг индуктори ҳисобланавермайди. Лактоза, индуктор бўлиши учун аввал ўзининг изомери аллолактозага айланиши керак.

1961 йили F.Jacob ва J.Monod *E.coli* бактериялари томонидан лактозанинг утилизация жараёнини генетик ва биокимёвий ўрганишлари натижасида “оперон модели” номли концепцияни ишлаб чиққанлар. Бу моделга кўра, бошқаришнинг ушбу системаси 4 та компонентдан иборатдир: **структурали генлар, ген-регулятор, оператор ва промотор**. Ген-регулятор оператор билан боғлана оладиган оксил-репрессор структурасини аниқлайди. Бу ўз навбатида унинг ёнидаги структурали генлар фаолиятини назорат қилади. Промотор транскрипция ферменти - РНК-полимераза билан боғланадиган қисми ташкил қилади. Агар оксил-репрессор оператор билан боғланган бўлса, у ҳолда РНК-полимераза промоторга жойлаша олмайди ва информация РНК синтезланмайди. Бунинг натижаси эса тегишл ферментлар синтезининг рўй бермаслигидир. Биринчи марта қамровли ўрганилган оперон ичак таёқчасининг лактозали оперонидир. Муаллифларнинг фикрича, репрессор 2 та ўзига хос марказга эга бўлган аллостерик оксил ҳисобланади. Улардан бири операторнинг нуклеотид кетма-кетлигига, иккинчиси эса индуктор молекуласига ўхшашдир. Индуктор билан репрессорнинг ўзаро таъсири репрессорни операторга ўхшашлигини камайтиради, натижада оператор ажралади. Лас-оперони репрессори тоза ҳорлда ажратиб олинган ва 4 та бир хил субъбирликдан тузилган (умумий мол. Массаси 150 000 Д). Ҳар бир субъбирлик индукторнинг 1 та молекуласи билан ўзаро таъсирлашади, яъни репрессор инактивлаш учун индукторнинг 4 та молекуласи керак бўлади. Репрессор тоза ҳолда операторга жуда ўхшайди ва *in vitro* шароитида Лас-операторнинг нуклеотид кетма-кетлиги билан боғланади. Индуктор бу боғланишни бузади. Ушбу натижалар F.Jacob ва J.Monod гипотезасини тўлиқ исботлайди.

Исталган опероннинг бошқарувчи элементи бўлиб промотор деб номланувчи ДНКнинг қисми ҳисобланади. Опероннинг ушбу қисми транскрипцияни бошлаш учун РНК-полимераза билан бирлашади. Транскрипциянинг бориши промоторнинг хусусиятига боғлиқдир. Промотор қисмидаги мутация унинг фаоллигини ўзгартириб оперон экспрессиясини ошириши ёки камайтириши мумкин. Промоторнинг ушбу хусусиятидан нисбатан фаол продуцентларни яратишда фойдаланилади.

3- МАЪРУЗА.

ГЕН ИНЖЕНЕРЛИГИНИНГ МОДДИЙ АСОСЛАРИ

Режа:

1. Хужайрани кўпайтириш тизими.
2. Генетик ахборот ташилишига масъул молекуляр механизмлар.
3. Транскрипция ва трансляция.
4. ДНК синтези.
5. Генларнинг тузилиши: интронлар ва экзонлар

Таянч сўзлар: ДНКнинг тузилиши, ДНК синтези, репликация, трансляция, транскрипция, полимеразалар, генларнинг тузилиши.

Адабиётлар: 1,2, 3, 5,6,7,12.

Ген инженерлигининг мақсади лаборатория усуллари билан ирсий хусусиятлари комбинацияланган янги организмларни яратишдир.

Америкалик олимлар Уотсон ва Крик 1953 йилда ўзларининг оламшумул янгиликлари, яъни ДНКнинг иккиламчи структурасини аниқлашлари ва матрица синтезини тушунтириб беришлари билан ген инженерлигини алоҳида фан сифатида ривожланишига асос солдилар.

ДНКнинг кўш спирали репликация давомида ДНК иплари бўйлаб иккига ажралади, махсус фермент-полимерлар она ДНКнинг аниқ нусхасини кўчирадилар. Натижада хужайра бўлиниши олдидан 2 та бир хил ДНК молекулалари ҳосил бўлади ва улардан бири хужайра бўлингандан сўнг қиз хужайрага ўтади. Қиз хужайра она хужайра ташиган ахборотни ташийди ва у бажарган функцияларни бажаради. Шундай қилиб тирик организм хужайраларида ўзига хос реакция – **матрица синтези** рўй беради. Молекулаларнинг бири – матрица, иккинчиси эса шу матрица асосида тузилади. ДНК репликацияси, барча турдаги РНК ва иРНК структурасига мос равишда оксил молекулаларининг тўпланиши, буларнинг барчаси матрица синтезининг вариантлари бўлиб, доимо нуклеин кислоталар иштирокида амалга ошади.

Худди шу механизм билан РНКнинг йиғилиши амалга ошади, фақатгина 2 та спирал эмас, балки битта спиралники. Бу жараён **транскрипция** дейилади. Демак, хужайрадаги ахборот оқимини матрица синтезининг реакциялари амалга оширади, яъни, **ДНК репликацияси** (ирсий ахборотни қиз хужайраларга узатиш учун керак), **транскрипция** (хужайра ядросида и-РНКни синтези) ва **трансляция** (рибосомалар ёрдамида и-РНКда оксил занжирларини йиғилиши).

Организмнинг ирсий хусусиятларини ўзгартириш билан трансген ўсимлик ва ҳайвонлар яратиш ва уларни клонлаш имкони туғилган.

Эукариотлар хужайраларидаги генларни тузилишини ўрганиш клонлаш ва ДНКни бирлаштириш методларига асос солган. Олимлар томонидан

овальбуминнинг 386 та аминокислотадан тузилган информацион РНКси ажратиб олинган ва ушбу РНКнинг 1872та нуклеотиддан 1158 тасигина оқсилнинг 386та аминокислотасини кодлаши, шу билан бирга 5'-учдаги 64 та нуклеотид ва 3'-учдаги 650 та нуклеотид трансляцияланмаслигини аниқланган. и-РНКдан овальбумин генига мос келувчи ДНК нусхасини олиб уни плазмидага жойлаштирганлар ва уни *E.coli* хужайрасида клонлаштирганлар. Франциялик олимлар эса ДНК нусхасини рестриктазалар ёрдамида парчаланмаслигини аниқлаганлар, чунки улар ушбу ферментлар танийдиган 6 та нуклеотидли ДНК кетма-кетлигини ўзида тутмаганлар. 1977 йили франциялик олимлар овальбуминнинг информацион РНКси билан транскрибцияланмайдиган ДНК геномида и-РНКда учрамайдиган қисмлар бор деб фараз қилганлар. Геннинг узлукли тузилиши кейинчалик бошқа генларда ҳам кузатилган.

Кейинчалик Шамбон ва Курильскини кўрсатишларича, овальбумин генининг ДНКси и-РНК билан қисман бирлашади: ДНКнинг 7 та участкаси РНК билан гибридланмайди ва мРНКда учрамайдиган геннинг ушбу участкалари **интронлар** деб аталади. Интронлар овальбуминни кодлайдиган ДНК кетма-кетлигини 8 та фрагмент - **экзонларга** ажратади.

Интронлар геннинг маълум бир қисмида учрайди, ҳажми катта бўлиб 100 дан бир неча минг нуклеотидлар жуфтдан иборатдир. Ўртача ҳисоблаганда интронлар экзонлардан узунроқдир.

Ҳозиргача ўрганилган сут эмизувчилар, қушлар ва амфибияларнинг гени тузилиши яхлит кўринишда эмаслиги аниқланган, яъни улар экзонлар ва интронлардан тузилгандир. Фақатгина гистон ва интерферонларнинг генлари бундан мустаснодир. Яхлит бўлмаган генлар булардан ташқари ҳашоротлар ва ачитқиларда, ҳамда ДНКси мавжуд ва эукариот хужайралар ядросида кўпаядиган вирусларда топилган.

4-МАЪРУЗА.

ГЕН ИНЖЕНЕРЛИГИНИНГ ФЕРМЕНТЛАРИ

Режа:

1. Рестриктазалар ва уларнинг таснифи.
2. Қайтар транскриптазалар
3. Лигазалар.

Таянч сўзлар: ДНК фрагментлари, ген инженерлигининг ферментлари, микроорганизмлардан ажратиб олинган ферментлар, ингибиторлар, маркерлар, изошимеразалар.

Адабиётлар: 1,2,3,4,13.

Ген инженерлигида рекомбинант ДНКларни конструкциялашда ишлатиладиган ферментлар қуйидаги гуруҳларга бўлинади:

- ДНК фрагментини олиш учун ишлатиладиган ферментлар (рестриктазалар);

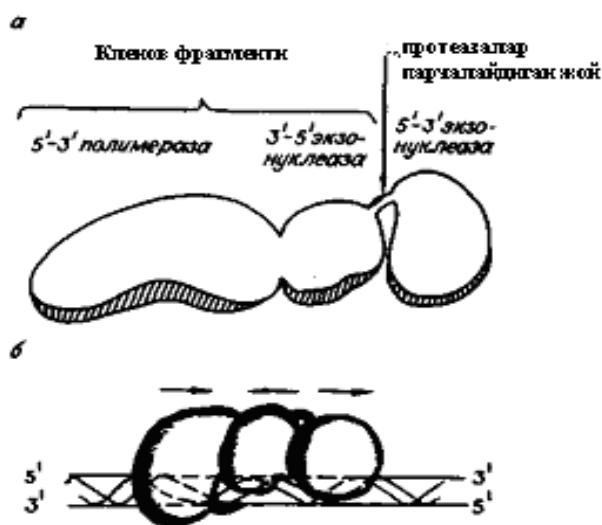
- ДНК матрицасида ДНКни (полимеразалар) ва РНКни (қайтар транскриптазалар) синтезловчи ферментлар;
- ДНК фрагментларини бирлаштирувчи ферментлар (лигазалар);
- ДНК фрагменти учлари структурасини ўзгартирувчи ферментлар.

Рестриктазалар (рестрикцияловчи эндонуклеазалар) – ДНК молекуласида маълум бир нуклеотидлар кетма-кетлиги (рестрикция сайтлари)ни таниб уларга «хужум қилувчи» ферментлардир.

Рестрикция ва модификация системалари бактерияларда кенг тарқалган: улар резидент ДНКни бегона нуклеотидларни киришидан химоя қилади. 1968 йили Мезельсон ва Юанлар метилланмаган ДНКни парчаловчи рестриктазани ажратиб олишган. 1970 йили эса Смит ва Вилькокс *Haemophilus influenzae* дан ДНКнинг аниқ бир кетма-кетлигини парчаловчи биринчи рестриктаза (*Hind III*)ни ажратиб олишган. Турли бактериялар шзининг ДНКсини турлича белгилаганлиги сабабли, рестриктазалар ҳам турли кетма-кетликларни таниши керак. Шундан бери, рестрикциянинг 150 та сайтини танийдиган рестрикциялар ажратиб олинган.

Бактерияларнинг барча рестрицион эндонуклеазалари ўзига хос, қисқа ДНК кетма-кетлигини танийди ва улар билан боғланади. Бу жараёнда ДНК молекуласи таниш сайтида кесилади. Бактерия штамми рестрицион фаолликка эга бўлиши бирга ДНКни метиллаш хусусиятга эга.

Рестриктазаларни 3 синфга бўлиш мумкин: 1, 2 ва 3.



Барча рестриктазалар ДНКнинг қўш спиралида қатъий бир кетма-кетликни танийди, лекин 1-синф рестриктазалари ДНК молекуласининг ихтиёрий нуқтасини кесади, 2- ва 3-синф рестриктазалари эса таниш сайтининг ичидаги қатъий бир нуқталарни парчалайди.

1 ва 3 типдаги ферментлар мураккаб субъбирликдаги тузилишга эга бўлиб, 2 типдаги, яъни метилловчи ва АТФга боғлиқ эндонуклеазали фаолликка эгадир.

2-синф ферментлари 2 та алоҳида оқсиллардан: рестрикцияловчи эндонуклеаза ва модификацияловчи метилазалардан ташкил топган. Шунинг учун ген

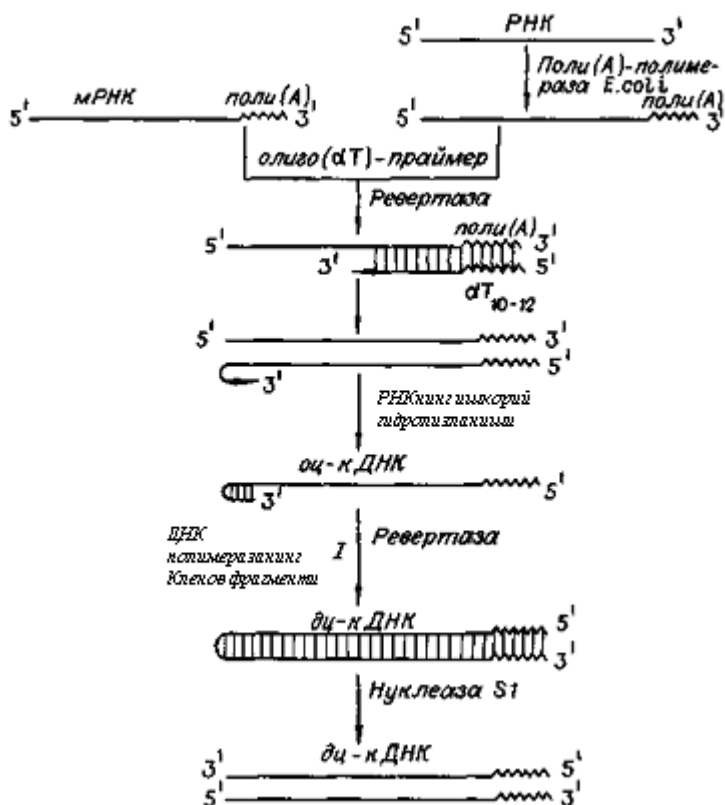
инженериясида асосан 2- синф ферментлари ишлатилади. Булар учун кофактор сифатида магний ионлари зарурдир.

Ҳозирга келиб 500 дан ортиқ 2- синф рестриктазалари ажратиб олинган. Шунга қарамай турли микроорганизмлардан ажратиб олинган ферментлар ичида ДНКни муайян бир кетма-кетлигини танийдиган ферментлар учрайди. Бундай жуфтликлар ёки гуруҳлар **изошизомералар** деб аталади. Агар ферментлар ДНКни муайян бир кетма-кетлигини таниса ва ДНК муайян бир нуктада кесадиган бўлса ҳақиқий изошизомералар, ҳамда ДНКнинг битта сайтини таниб, лекин ўша сайтнинг турли нукталарини кесадиган бўлса, сохта изошизомералар дейилади.

Қайтар транскриптаза м-РНКни ДНКнинг комплементар занжирига транскрипциялаш учун ишлатилади. Геноми бир занжирли РНК молекулаларидан иборат бўлган ретровируслар ўрганилганда ретровирус ички хужайравий ривожланиши жараёнида хужайра хўжайин хромосомасига 2 занжирли ДНК кўринишида ўз геномининг интеграция босқичини босиб ўтиши аниқланган. 1964 йили Темин РНК-матрицада комплементар ДНКни синтезловчи фермент борлигини аниқлаган. Ушбу РНКга боғлиқ **ДНК-полимераза** қайтар транскриптаза ёки ревертаза деб номланган.

Қайтар транскриптаза реакциясини РНК фаолликка эга бўлган кучли ингибиторлардан фойдаланган ҳолда махсус шароитларда олиб борилади. Бунда РНК молекулаларининг тўлиқ ҳажмли ДНК-нусхалари олинади. Праймер сифатида поли (А)-тутувчи мРНК нинг қайтар транскрипциясида олиго (dT), 3'-поли (А) учига эга бўлмаган РНК молекулалари учун эса кимёвий синтезланган олигонуклеотидлар ишлатилади. мРНКда ДНКнинг комплементар занжири синтезлангандан ва РНК бузилгандан кейин ДНКнинг 2 занжири синтезланади.

Матрица сифатида кДНКнинг биринчи занжири бўлиши мумкин. Бу реакция ревертаза сингари *E. Coli*нинг ДНК-полимеразаси ёрдамида катализланиши мумкин. Синтез тугагандан сўнг кДНКнинг 1- ва 2-занжирлари шпилька тугуни билан ковалент боғланган ҳолда қолади. Бу тугун эндонуклеаза S1 билан парчаланади. Ҳосил бўлган икки занжирли ДНКни клонланаётган векторларга киритиш, ДНКнинг гибрид молекулалари таркибида кўпайтириш ва кейинги тадқиқотларда ишлатиш мумкин.



РНК молекуласининг икки занжирли ДНК- нусхасини синтезлаш схемаси.

Лигазалар. 1961 йили Мезельсон ва Вейгл фаг 1 мисолида рекомбинациянинг моҳияти ДНК молекулаларининг кесилиши ва кейинчалик бирлашишидан иборатлигини кўрсатганлар. Бу ДНК фрагментларини тикилишида қатнашадиган ферментларни топишга сабаб бўлган. 1967 йили бундай фермент топилган ва улар ДНК-лигазалар деб номланган. Бу фермент нуклеин кислотанинг 2 занжирли молекуласидаги фосфодиэфир боғни катализлайди. Бошқача айтганда, ДНК-лигазалар ёнма-ён жойлашган нуклеотидларни қанд қолдиқлари аро боғ ҳосил қилиб бирлаштиради. ДНК-лигазалар ДНК репарацияси жараёнларида, репликацияда жуда керакдир.

ДНК-лигазалар кофакторга бўлган зарурияти ва таъсир қилиш хусусиятига қараб 2 типга ажратилади. *E. coli* нинг ДНК-лигазаси кофактор сифатида дифосфопиридиннуклеотид, T4- фагининг лигазаси эса Mg^{2+} иштирокида АТФ ни ишлатади.

5-МАЪРУЗА.

РЕКОМБИНАНТ ДНК ҲОСИЛ ҚИЛИШ МЕТОДЛАРИ

Режа:

1. *In vitro* шароитида генетик рекомбинацияни амалга ошириш
2. Бактерия хужайраларига ДНКни киритиш методлари
3. Бактерия хужайрасига рекомбинант ДНКни экспрессия қилиниши.
4. Ичак таёқчаси хужайраларида инсон инсулинини биосинтезлаш.
5. Ичак таёқчаси хужайраларида инсон ўсиш гормонини биосинтезлаш.

Таянч сўзлар: рекомбинация, гибрид молекулалар, векторлар, плазмидалар, бактериофаглар, генлар экспрессияси, соматотропин, интерферон, инсулин.

Адабиётлар: 1,2,3,7,11.

Генетик рекомбинация – икки хромосомалараро генларнинг алмашинувидир. Понтекорвонинг 1958 йилда берган таърифига кўра, рекомбинация – 2 ёки ундан ортиқ детерминант ирсий белгиларга эга бўлган хужайра ёки организмларнинг ҳосил бўлишга олиб келадиган жараёнidir. Бундай рекомбинация сут эмизувчиларда жинсий хужайраларнинг ҳосил бўлишида албатта рўй беради. Мейоз вақтида гомологик хромосомалар генлар билан алмашинади (кроссинговер); айнан ана шу алмашинув орқали ирсий белгиларни авлоддан-авлодга ўтишини тушунтириш мумкин. Вирус ва бактерияларда генетик рекомбинация ҳайвонларга нисбатан камроқ бўлади. Генетик материалнинг алмашинуви, ундан кейин содир бўладиган рекомбинация бир ёки бир-бирига яқин турларда рўй беради.

Барча тирик организмларда рестрикция эндонуклеазалар мавжуд бўлиб, улар организмга кирган ёт ДНКни танийди ва уни парчалайди.

Генлар алмашинуви ёки генни хужайрага киритиш *In vitro* шароитидаги генетик рекомбинация орқали амалга оширилиши мумкин. Бу усул бактерияларда, хусусан, ичак таёқчаси хужайраларига ҳайвон ва одам генлари киритилиб, улар репликацияланишига эришиш натижасида ишлаб чиқилган.

In vitro шароитида генетик рекомбинацияни амалга оширишнинг моҳияти турли турлардан ДНКни ажратиш, ДНКнинг гибрид молекулаларини олиш ва ҳосил бўлган рекомбинант молекулаларни янги белги, масалан, ўзига хос оксилни синтезини ҳосил қилиш мақсадида тирик хужайраларга киритишдан иборатдир (расм)

Генни ажаратиб олиш учун биокимёвий методлардан фойдаланилади. Ҳайвон хужайраларида мРНК транскрипцияси хужайра ядросида содир бўлади: мРНК молекулалари информацияни ядродан цитоплазмага ташийти, (бунда улар оксиллар трансляцияси учун ишлатилади). Бактерия хужайраларида эса транскрипция ва трансляция бир вақтда ва уйғунлашган ҳолда рўй беради: мРНК рибосомалар билан боғланган. Рибосомалар трансляция жараёнида ва ҳайвон хужайраларида муҳим рол ўйнайди.

ДНК молекуласи оксил структураси ҳақидаги ахборотдан ташқари бир қатор бошқарувчи сигналларга ҳам эга. Бу сигналлар транскрипция ва трансляция учун бошланғич нуқта ҳисобланади. Ҳайвон хужайраларида оксил структураси тўғрисидаги ахборот ДНКнинг бир нечта сегментида, яъни ДНК қисмлари билан ажралган сегментларида (интронлар деб номланади) кодланиши мумкин.

Бактерия хужайраларига ДНКни киритиш 2 усулда амалга оширилади:

1. Вектор сифатида плазмидадан фойдаланиш
2. Вектор сифатида бактериофагдан фойдаланиш.

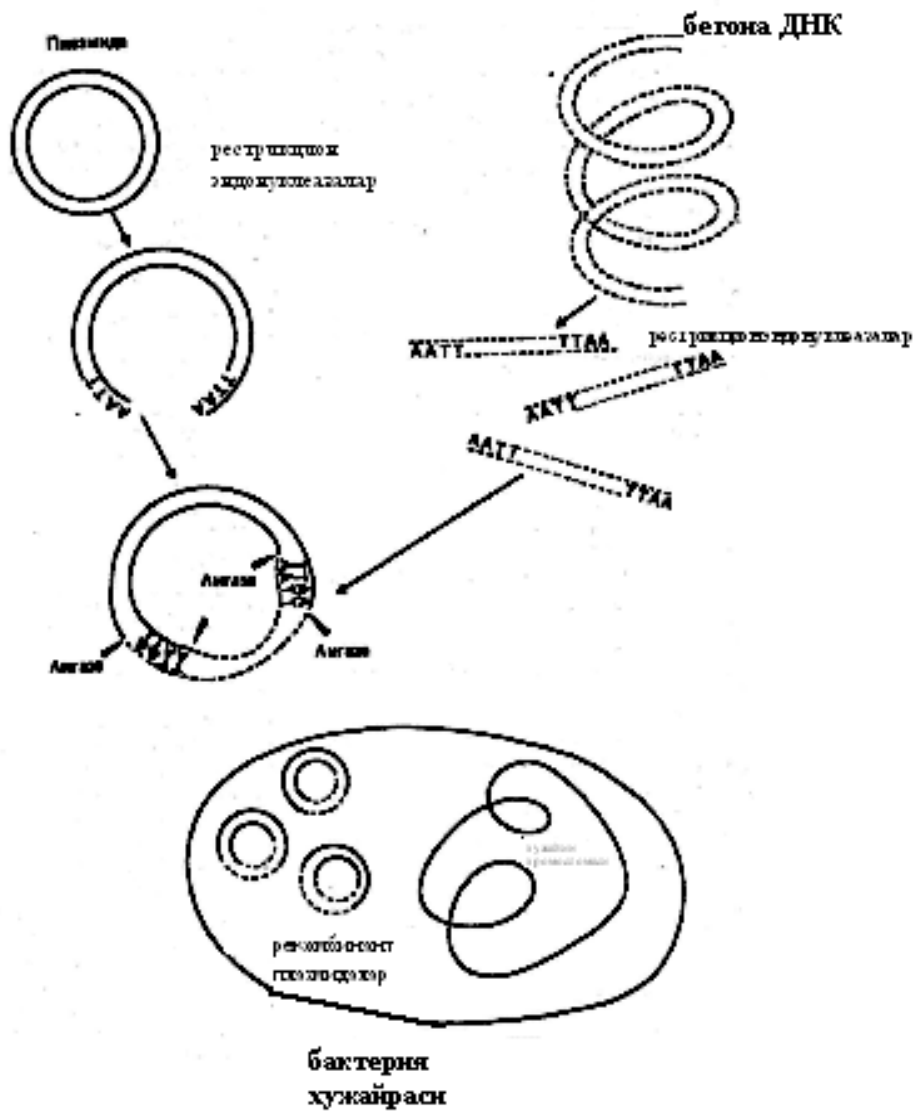
1950 йилнинг бошларида Ледерберг *E.coli* да конъюгация жараёни рўй беришини кўрсатиб бергандан сўнг бактерия хужайраларининг “қўшилиши” генетик белгиланган ва бу генетик информация ота типидagi хужайрадан она типидagi хужайрага ёки реципиент хужайрага ўтиши аниқланган. Конъюгация пайтида хужайраларнинг донорлик қилиши (ёки F -ҳосилдорлик омили) бошқа исталган генетик белгига нисбатан кам учрайди. F-омил донор хужайранинг исталган маълум генидан мустақил равишда узатила олади. Ледерберг ушбу F-омил юқори

организмлар цитоплазмасида учрайдиган хромосомадан ташқари генетик элементга ўхшашлигини таъкидлайди. 1952 йилда хромосомадан алоҳида жойлашган генетик системаларни умумий ном – **плазмидалар** деб аташ қабул қилинган.

Плазмидалар бактерияларнинг деярли барча турларида учрайди. Плазмидали штамм плазмидасиз вариантларни тиклайди. Бундай ҳолатларда плазмида бутунлай йўқолади ва ҳужайра уни регенерация қила олмайди. Буни фақатгина бошқа бактериянинг ҳужайрасидан олиш мумкин.

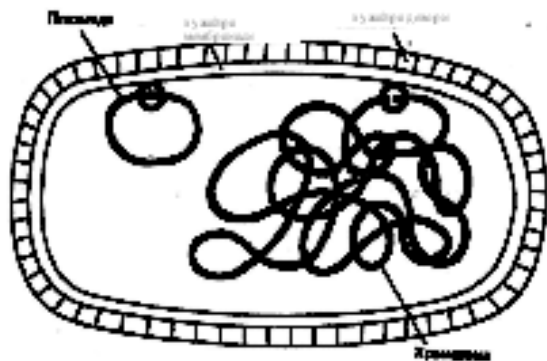
Плазмидалар ДНКнинг ҳалқасимон молекулалари бўлиб, бактерия ҳужайралари геномини 1-3 %ини ташкил қилади. Ирсий аппаратнинг шу кам қисмининг ўзи одатда бактериал хромосома кодламайдиган муҳим генетик белгиларни кодлайди. Масалан, улар бактерия ҳужайраларини конъюгациялаш учун керакли информацияни сақлайди. Улар ҳужайранинг озуқа манбаи сифатида кўплаб мураккаб бирикмаларни сарфлаши учун ёрдам беради, ҳамда турли токсик агентларга нисбатан, айниқса антибиотикларга, чидамлилигини таъминлайди. Масалан, стафилококк плазмидалари пенициллин, летал ҳолатга келувчи симоб ва бир қатор оғир металларга чидамли генларни ташиydi. *E.coli*нинг R-плазмидалари таркибида ҳам оғир металларга чидамли генлар топилган. *Bacillus thuringiensis* ҳужайраларида инсектицид синтезини бошқаради. Бактерия ҳужайраларига бегона генларни плазмидалар ёрдамида киритиш 1975 йилдан бошлаб уларнинг структураси ва репликация ҳарактерини аниқлаш учун туртки бўлди.

Ҳужайрада плазмидалар сони 1 ва 100 ортиқ бўлиши мумкин, плазмида қанчалик катта бўлса, унинг ҳужайрадаги нусхаси шунчалик кам бўлади.



Одатда плазмиданинг репликацияси хромосома репликациясига боғлиқ бўлмайди.

Бактерия хужайраларининг конъюгацияланиши вақтида хромосомадаги генлари билан алмашина олмайдиган икки бактериялараро плазмидалар алмашилиши мумкин. Бундай алмашинув ўсиш ва конкуренция давомида плазмидадаги генларнинг ўзаро алмашинувиغا олиб келади. Натижада реципиент хужайралар донор хужайралар ҳисобига тирик қолади.



Вектор сифатида бактериофагдан фойдаланиб генни киритиш методида ген вирус геномига жойлаштирилади ва у бактерия хужайрасида вирус геномини кўпайиши давомида ген вируси билан бирга репликацияланади.

Бактерия хужайрасига рекомбинант ДНКни экспрессия қилиниши.

Бактерия хромосомасининг узунлиги 1 мм атрофида бўлиб, у тахминан 3 млн нуклеотидлардан иборат ДНК молекуласидан тузилгандир; у хужайрада бир неча минг марта зич жойлашган ва 1 мкм майдонни эгаллайди. Инсон хужайраси ДНКси 46 та хромосомада тузилган, уларнинг ҳар бирининг узунлиги тахминан 4 см, нуклеотидлар сони эса 3 млрдга яқиндир. Рестрикция эндоуклеазалар ДНК молекуласини маълум бир нукталарда парчалайди, натижада бир неча юздан бир неча минггача нуклеотидли фрагментлар ҳосил бўлади. Ҳар бир рестриктазалар ДНКни ўзига хос равишда парчалайди.

Бактерия хужайрасига генларни экспрессия қилиш учун ҳайвонларнинг ўзига хос оқсил (масалан, инсулин) ишлаб чиқарадиган махсус хужайрасидан ушбу оқсилни кодлайдиган мРНК ажратиб олинади. Сўнг қайтар транскриптаза ёрдамида мРНКга комплементар ДНК ипи синтезланади. ДНК нусхасига комплементар бўлган иккинчи ип ДНК-полимеразалар ёрдамида ажратилади. Кейинги босқичда кўш ипли ДНКнусхаси трансфераза ферменти иштирокида плазмидага киритилади. Трансфераза ДНК учларида нуклеотидларнинг қисқа кетма-кетлигини тиклайди. Сўнг плазмиданинг махсус жойи рестрикция эндоуклеаза билан парчаланаяди. Плазида парчалангандан кейин унинг учлари трансфераза ёрдамида гуанин қолдиғи бўлган 4 та нуклеотид жойлаштирилади. Шундан сўнг ҳосил бўлган 2 та ДНК молекулаларининг учлари нуклеотидлар кетма-кетлиги ўзаро таъсирлашиши ҳисобига бирикади; бактериал фермент – ДНК-лигаза ёрдамида киритилаётган ДНК ва плазида ДНКси тикилади. Ҳосил бўлган янги ҳалқасимон плазида рекомбинант ДНКга эга бўлади.

Маълумки, ҳозирги пайтда инсонлар орасида диабет касаллиги кўп учрайди ва унинг бир неча кўринишлари мавжуддир. Инсулин ёрдамида даволанадиган формаси ушбу гормонни синтезлайдиган хужайраларнинг танлаб нобуд бўлиши билан боғлиқдир. Диабетнинг инсулин талаб қилинмайдиган кўриниши эса тегишли диета ёрдамида даволанади.

1921 йили Торонтода Бантинг ва Бест итнинг ошқозон ости безидан гормон ажратиб олишган ва унинг антидиабетик хусусияти борлигини айтиб ўтишган. 1922 йили ҳайвондан ажратиб олинган инсулин касалланган ёш болага юборилган ва

кутилган натижага эришилган. Шундан сўнг инсулин кўп миқдорда ишлаб чиқарила бошланган.

Инсулиннинг биринчи кристаллари 1952 йилда олинган, кейинчалик уни тозалаш методлари такомиллаштирилиб, бошқа гормонал моддалар (масалан, глюкогон – инсулин ва соматотропин антогонисти) ҳам олина бошланган. Гилберт ва унинг шогирдлари инсулин мРНКсини каламуш ошқозон ости безидаги β -хужайрасининг ўсмаларидан ажратиб олишган. Бунинг учун мРНКнинг ДНКнусхасини рBR322 *E.coli* плазмидасига геннинг ўрта қисмига пенициллиназа жойлаштирилади. Ҳосил бўлган ДНКнинг кетма-кетлиги аниқланганда, унинг рекомбинант плазмидаси проинсулин структура тўғрисидаги ахборотга эгаллиги маълум бўлган. Ичак таёқчаси хужайраларида мРНК трансляцияси жараёнида пенициллаза ва проинсулин кетма-кетлигини тутган гибрид оксил синтезланган. Оксил таркибидан трипсин ёрдамида гормон ажратиб олинган. Ушбу йўл билан олинган молекулалар ҳам ошқозон ости безидан ажратиб олинган гормон сингари қанд алмашинувига таъсир қилган.

Инсоннинг ўсиш гормони ёки соматотропин, гипофизнинг олд бўлмасидан секрецияланади. Бу гормоннинг етишмаслиги натижасида инсонда гипофизар паканалик келиб чиқади. 4-5 ёшли болаларга гормонни инъекциялаш билан касалликни тузатиш мумкин. Илк марта соматотропин мурдадан олинган ва уни етарлича олиш имкони бўлмаган.

Махсус конструкцияланган бактерия хужайраларида синтезланадиган ўсиш гормонини бир неча афзалликларга эгадир, яъни бу йўл билан гормонни кўп миқдорда олиш мумкин, унинг препаратлари биохимик тоза ва вируслардан ҳолидир.

Соматотропинни (191 та аминокислота қолдиғидан иборат) олиш учун биринчи босқичда мРНК кўшиқли ДНК нусхаси клонланади ва рестрикция эндонуклеазалар ёрдамида парчаланиб гормоннинг биринчи 23 та аминокислотасидан ташқари барча аминокислоталарни кодлайдиган кетма-кетлик ҳосил қилинади. Сўнг 1 дан 23 гача аминокислотага мос келадиган синтетик полинуклеотид клонланади. 2 та фрагмент бир-бири билан бирлаштирилади ва рибосомаларни бирлашадиган участкасига жойлаштирилади. Олинадиган гормон миқдори 1 мл культурага 2,4 мкг тўғри келади. Бактерияларда синтезланган гормон керакли молекуляр массага эга бўлади ва бошқа бактериал оксиллардан холи бўлади.

Қон хужайралари ва фибриобластларда интерфероннинг ҳосил бўлиши. Культураларда ўстирилувчи ва интерферон ҳосил қилувчи хужайраларнинг барча типи учун интерферон олиш жараёни деярли бир хил. Хужайралар Сендай вирусини билан зарарлантирилади ва 24 соатдан сўнг центрифугаланади: чўкма усти суюқлигидан интерфероннинг “дағал” препарати олинади ва тозаланади. 2 л қон қайта ишланганда 4 млн бирликдаги интерферон олинади. Деярли ўтган 10 йил давомида интерферон ишлаб чиқаришнинг катта қисми Хельсинкидаги соғломлаштириш маркази лабораториясига тўғри келиб, бу ерда Канделл соғлом донорлар қони лейкоцитларидан интерферон олиш методини такомиллаштирди. Бу лаборатория лейкоцитар интерферон ишлаб чиқариш бўйича лидер бўлиб, йилига 400 млрд интерферон ишлаб чиқарилган.

1960 йилнинг бошларидан бошлаб, Шани соғломлаштириш ва медицина илмий текшириш миллий институти, INSERM, Париждаги Сент-Винсент-де-Поль клиникаси) Пастер Институти билан ҳамкорликда интерферон олишнинг ярим масштабда ишлаб чиқаришни йўлга қўйди. 1980 йилнинг мартада ушбу муаммо илмий текшириш институтларининг миллий марказлари, INSERM, Пастер институти ва университетларининг олимлари томонидан конференцияда муҳокама қилинди. ИП фирмаси ва қон қуйиш маркази (лейкоцитлар билан таъминлайди) интерфероннинг ишлаб чиқариш методини такомиллаштирди ва интерферонни кўп миқдорда ҳосил бўлиш йўллари аниқлади. Ярим йил ичида ИП 26000 донордан олинган қондан 48 млрд бирлик интерферон олишга эришилган ва Франция, Европада интерферон ишлаб чиқариш бўйича 2-ўринни эгаллади. 1980 йил охирига келиб, ИП ва соғлиқни сақлаш вазирлиги ўртасида интерферонни синаш бўйича шартнома тузилиб, унга кўра интерфероннинг вирусларга ва ўсмаларга қаршилик хусусияти текширилиб кўрилди ва уни кўп миқдорда ишлаб чиқариш йўлга қўйилиши белгиланди. Интерфероннинг ишлаб чиқарилиши йилига 100 млрд бирликгача орттирилиб (200 касални даволашга етарли), унинг 80 млрд бирлиги клиникаларнинг марказий дорихоналари томонидан сотиб олинган, қолган қисми эса илмий-текшириш институтларига юборилган.

1982 йилнинг июлида интерфероннинг захираси 70 млрдгача борган бўлиб, ундан фақат 20 млрд ишлатилган. ИП ва қон қуйиш маркази институти ишлаб чиқаришни тўхтатишга мажбур бўлди, чунки маҳсулот сарфланмай қолди ва уни экспорт қилиш зарурати туғилди. Ойига 2 млрд лейкоцитар интерферон ишлатилади. Бироқ соғлиқни сақлаш вазирлигининг 1982 йил июл ойидаги қарори препарат ишлаб чиқаришни тўхтатиш вақтинчалик эканлиги аниқланди.

6- МАЪРУЗА.

ЎСИМЛИКЛАР ВА ҲАЙВОНЛАР ГЕН ИНЖЕНЕРЛИГИ

Режа:

1. Ўсимлик ҳужайраларига генларни киритиш.
2. Трансген ўсимликларга генетик материалларни экспрессияси.
3. Трансген ўсимликларнинг яратилиши ва аҳамияти.
4. Ҳайвонлар ген инженерлиги.
5. Вирус генларини жойлаштириш ва кўчириш

Таянч сўзлар: агробактериялар, микрозаррачалар, векторлар, ген экспрессияси, плазмидалар, протопластлар, регенерация, ретровируслар, ҳайвон ҳужайралари.

Адабиётлар: 1,2,3,7, 8, 9, 10,11.

Ўсимлик ҳужайраларига генларни киритиш

Ўсимлик ҳужайраларига генлар турли усул билан киритилади:

Икки паллали ўсимликлар учун табиий вектор, яъни агробактериялар плазмидаси мавжуддир. Бир паллали ўсимликлар учун ҳам ушбу усулдан фойдаланилади, лекин бу усул озроқ қийинчиликлар туғдиради.

Агробактерияларга нисбатан чидамли бўлган ўсимликларда эса генлар бевосита физик йўл билан киритилади. Булар: микрозаррачалар билан «хужум» қилиш ёки балластик метод; электропорация, полиэтиленгликол билан ишлов бериш; ДНКни липосома таркибида ўтказиш ва б.

Энг қулай метод микрозаррачалар билан «хужум» қилиш методи ҳисобланади. Юқори тезликда заррачалар ядрога бевосита кириб, трансформация самарадорлигини оширади. Шу усул билан ДНКга эга бўлган хужайранинг бошқа органеллалари – хлоропластлар ва митохондрияларни ҳам трансформациялаш мумкин.

Охирги вақтларда комбинацияланган трансформация методи – агролистик методи ҳам яратилиб, амалда қўлланилмоқда. Бунда бегона ДНК тўқимага бирор-бир физик йул, масалан баллистик йўл билан киритилади. Киритилаётган ДНК да Т-ДНК вектор ва маркер гени, ҳамда вирудентликнинг агробактериал гени бўлиши керак. Ўсимлик хужайрасида вирулентлик генини вақтинчалик экспрессияси оқсиллар синтезига олиб келади. Бу оқсиллар плазмидадан Т-ДНКни тўғри кесиб, уни агробактериал трансформациядаги сингари хужайин геномига жойлаштиради. Сўнг *in vitro* да таркибида хужайраларнинг кўпайиши учун зарур бўлган фитогормонли озуқа муҳитига экилади. Озуқа муҳитида одатда трансген ўсимликлар чидамликка эришиши учун селектив маркер бўлиши керак.

Регенерация кўпроқ каллус босқичидан сўнг рўй беради. Сўнгра муҳит тўғри танлай олинса органогенез бошланади. Униб чиққан куртаклар илдиз бериши учун бошқа муҳитга ўтказилади.

Трансген ўсимликларга генетик материалларни экспрессияси.

Олимлар ўсимлик хужайрасига бегона генларни киритишда бўйича олиб борган тадқиқотларида янги ҳодисаларга гувоҳ бўлганлар. Аниқланишича, бир тажрибанинг ўзида бир хил ДНК конструкцияси билан трансформацияланган трансген клонлар киритилаётган ген экспрессияси бўйича фарқланар экан. Экспрессия даражаси кўпгина омилларга боғлиқ бўлиб, у айниқса киритилаётган геннинг ядро хроматинини қайси қисмига тушишига боғлиқ экан. Бундан ташқари, ядро геномига ДНК конструкцияланганда бир қанча ўзгаришларга учрайди (дубликация, инверсия ва б.) ва бу экспрессиянинг пасайишига олиб келади. Яна аниқланишича, қўлланилаётган трансформация процедуралари хужайин геноми учун ҳам бефарқ эмасдир.

Биринчидан, трансгенни жойлашиши қайсидир хужайин генини бирламчи структурасини бузиши билан биргаликда уни инактивациялайди.

Иккинчидан, ўсимлик геномига генлар агробактериал ёки физик ўтказилганда турли кўринишдаги қайта тузилишлар, ҳатто хромосома фрагментларининг транслокациясигача кузатилади. Буларнинг барчаси ўсимлик геномини нормал фаолият кўрсатишини ўзгартиради.

Ўсимликка керакли генни тутувчи *Ti*-плазида кетма-кетлигини киритишнинг 2 хил методи яратилган:

1-метод — «оралиқ векторлар» методи (коинтегрив векторлар) — pBR 322 ичак таёқчасидан фойдаланишга асосланган (расм).

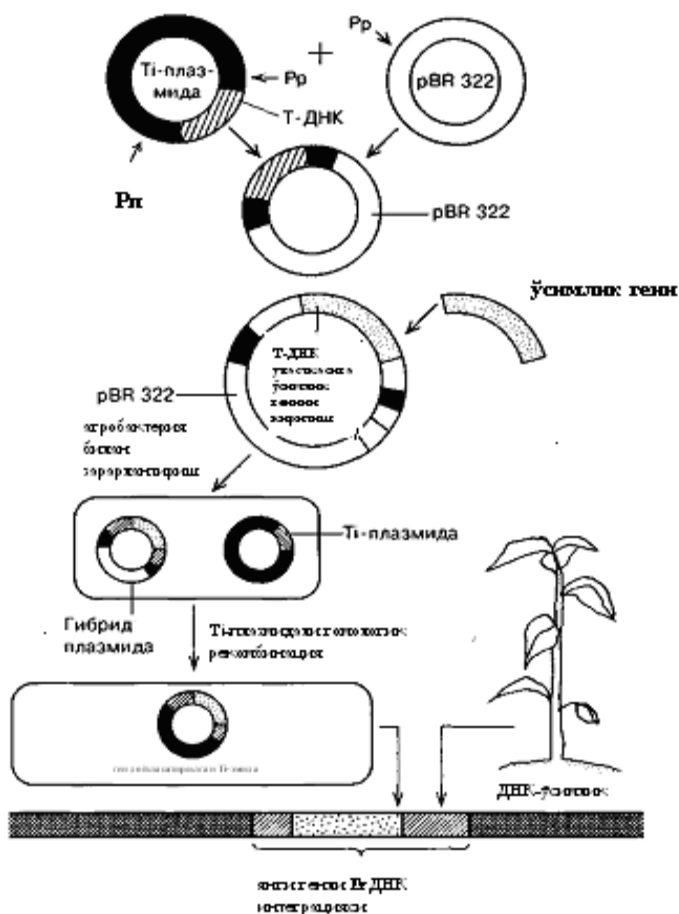
Ti-плазмидадан Т-ДНК рестриктазалар ёрдамида кесилади ва *E. coli* да клонлаш учун pBR 322 плазмидасига жойлаштирилади. Т-ДНК плазмидали бактериялар кўпайтирилади ва плазида ажратиб олинади. Сўнгра клонланган Т-ДНКга рестриктаза ёрдамида керакли ген жойлаштирилади. Ҳосил булган Т-ДНКли рекомбинант молекула яна бир бор катта миқдорда кўпайтирилади, яъни ичак таёқчасида клонланади. Шундан кейин конъюгация ёрдамида тўлиқ *Ti*-плазмидани

ташувчи агробактерия хужайрасига киритилади. Натив Тi-плазмидасининг Т-сегментлари ва оралиқ векторлар ўртасида гомологик рекомбинация рўй беради. Бунинг натижасида ген жойлаштирилган Т-ДНК нормал ДНК ўрнига натив Тi-плазмидага киради. Т-сегментга керакли генлар жойлашган Тi-плазмидани ташувчи *A. Tumefaciens* хужайралари ҳосил бўлади. Уларнинг навбатдаги кўчирилиши агробактерияларга хос бўлган оддий йўл билан амалга оширилади.

Иккинчи метод бинар (кўш) векторлар системасини яратишга асосланган.

Охириги тадқиқотлардан маълум бўлишича, зарарлаш ва трансформация учун яхлит Тi-плазмида керак эмас, балки Т-ДНК нинг чекка участкаси ва Тi-плазмиданинг вирулентликка жавобгар бир участкасининг ўзи етарлидир. Бу иккала участка бир плазмидада бўлиши ҳам шарт эмас. Агар агробактерияда *vir* сегментли Тi-плазмида ва Т-ДНКли бошқа плазмида бўлса, бу бактериялар ўсимлик хужайрасини трансформациялаши мумкин. Бундай ҳолда исталган ген жойлаштирилган Т-ДНК ўсимлик геноми билан интеграцияланади. Бунинг учун бактерия хужайраларида гомологик рекомбинация содир бўлиши керак эмас. Бегона генлар экспрессияси учун Т-ДНКнинг махсус промотори, масалан нопалинсинтетаза промотори керакдир.

Ўсимлик хужайрасига конструкцияланган Тi-плазмидани киритишнинг бир нечта методлари бор. Булардан энг оддий табиий усул –



Расм. Тi-плазмида асосида коинтегратив векторни яратилиши. Rp - рестриктаза I рдамида парчаланиш

конструкцияланган штаммларни ўсимликнинг зарарланган қисмига киритишдир. Бошқа метод – протопластларни агробактериялар билан кокультивациялаш йўли билан трансформациялаш. Агробактериялар янги ажратиб олинган ёки бир кунлик протопластларга қўшилса, бактериялар бирлашмайди ҳам, трансформацияланмайди ҳам. Трансформациялаш учун 3 кунлик протопластларда хужайра девори қайтадан ҳосил бўлган бўлиши керак. Бу ҳол хужайра деворини ҳосил қилувчи ва бактерияларни бирлаштирувчи ингибиторларни қўшиш билан исботланган. Кокультивациялаш даври (бу даврда протопластлар агробактериялар билан агрегацияланади), яъни бир суткадан ортиқ вақтдан сўнг бирлашмаган бактериялар қайта ювиш билан олиб ташланади. Сўнг ўсимлик хужайралари гормонлар қўшилган муҳитда ўстирилади. 3-4 ҳафтадан сўнг колониялар гормонсиз муҳитга ўтказилади. Бу муҳитда фақатгина трансформацияланган хужайраларнинг колониялари ўсади.

Шундай усул билан тамаки ва петуниннинг трансформацияланган ўсимлик-регенерантлари олинган.

Охирги 10 йил мобайнида ташқи бозорда янги хусусиятларга эга бўлган **трансген ўсимликлар** чиқа бошлади. 1996 йили АҚШда трансген ўсимликлар эгаллаган майдон 3 млн. акр бўлса, 2002 йилга бу майдон 80 млн акрга етди. Асосий трансген ўсимликлар: жўҳори, соя, гербицид ва ҳашоротларга чидамли ғўзалардир.

Кундан-кунга аҳоли сони ортиб бораётгани сабабли инсоният олдида муҳим бир муаммо, озиқ-овқат маҳсулотларини ишлаб чиқариш масаласи турибди. Яна бир муаммо, бу тиббий даволашдир. Буларни трансген ўсимликлар яратиш билан ҳал қилиш мумкин.

Ген инженерлиги ёрдамида қишлоқ хўжалиги учун қуйидаги ўсимликлар яратиш учун таклифлар киритилган:

1. Ҳашоротларга чидамли ўсимликларни яратиш. Уларни яратиш учун ўсимликларнинг геномига *Basillus thuringiensis* (бу микроорганизм ҳашоротлар организмида ривожланиб тангақанотлиларда касаллик келтириб чиқаради, одамларга таъсир қилмайди)дан ажратиб олинган токсин гени киритилади. Токсинни синтез қиладиган ўсимликлар айрим зараркунандаларга нисбатан чидамли бўлади. Буларнинг бари далаларда пестицидларни ишлатишни ва атроф-муҳит ифлосланишини камайтиради.

2. Озиқ-овқат маҳсулотларини сифатини яхшилаш. Маълумки, қишлоқ хўжалиги экинларининг ҳаммасининг таркибида ҳам алмашмайдиган аминокислоталар ва витаминлар етарли миқдорда бўлмайди. Буларнинг ўрнини тўлдириш учун ўсимликларга витамин ёки аминокислоталарни синтезлайдиган генлар киритилади. Ҳозирда таркибида каратиноид кўп бўлган трансген гуруч ва оқсилга бой соя ўсимлиги олинган.

3. Товар сифатини яхшилаш. Гулларга пигмент синтезловчи генлар киритилиб ажойиб рангли гуллар ёки оқсилларни флуоресценцияловчи генларни киритиб қоронғуда нур берувчи декоратив ўсимликлар олинган.

4. Гербицидларга чидамли ўсимликларни яратиш.

5. Ўсимликларнинг чидамлилигини ошириш. Маълумки, айрим балиқ ва ҳашоротлар гидрофил оқсиллар ажратади. Бу оқсиллар гени иссиқсевар ўсимликларни совуққа чидамли қилиш учун уларга киритилади.

Ҳайвонлар ген инженерлиги

Ген инженерлиги методларининг яратилишига қадар, 2 та соматик ҳужайраларни кўшиш йўли билан генлар кўчирилган. Агар ҳужайраларнинг 2 та линиясини биргаликда полиэтиленгликол ёки инактивланган Сендай вируси иштирокида инкубация қилинса, бу 2 та ҳужайра линияларининг ядролари кўшилади. Ҳосил бўлган гибрид ҳужайраларни селектив муҳитда ажратиб олиш мумкин. Бунда маълум бир белгилар ва маълум бир хромосомалар ўртасидаги мувофиқликни аниқлаб янгидан-янги генлар харитасини тузиш мумкин бўлади. Гибрид ҳужайра кўпайиши давомида битта ёки иккала она ҳужайраларни хромосомаларини йўқотиши, ҳамда йиллар давомида репрессияланган генлар экспрессияланиши мумкин. Баъзи ҳолларда она ҳужайра линиясида «ишламаган» ген, гибрид ҳужайраларда «ишлаши» мумкин.

Вирус генларини жойлаштириш ва кўчириш

1976 йили Ениш сичқон ҳужайраларига бегона генларни киритиш ва бу белгиларни наслдан-наслга ўтишини амалга оширган. Лекин рекомбинация ва клонлаш методи ўша вақтда унчалик ривожланмаганлиги сабабли генларни киритишда вируслардан вектор сифатидагина фойдаланилган.

Сичқон лейкози вируси кирадиган синф вирусларига олимлар томонидан генларни кўчириш учун самарали вектор сифатида қараганлар. Ушбу ретровирусларнинг генлари яқка ипли РНКнинг 2 та молекуласидан тузилган: ҳужайра бу вирус билан зарарланганда қайтар транскриптаза ДНК молекуласини, комплементар РНКни синтезлайди. Ҳосил бўлган ДНК-нусха ҳужайра ДНКсига «провирус» кўринишида жойлашади. Провирус барқарор ҳолда қолиши ёки ҳужайра ДНКсидан ажралиб янги вирус заррачалари ўсишига манба бўлади.

7-МАЪРУЗА.

ҲУЖАЙРА ИНЖЕНЕРЛИГИ

Режа:

1. Каллус ҳужайралари культураларини олиш
2. Протопластларни ажратиб олиш
3. Протопластлар культурасини олиш
4. Протопластларни кўшилиши
5. Соматик ҳужайралар гибридизацияси

Таянч сўзлар: каллус, каллусогенез, ҳужайра ва тўқима культуралари, протопластлар, гибридомалар, озуқа муҳити, унинг компонентлари, эксплант, культура ўстириш технологиялари.

Адабиётлар: 1,2,3,4,5,13.

Биотехнологиянинг янги босқичи ноанъанавий объектлар – кўп ҳужайрали юқори организмларнинг тўқима ва ҳужайралари культураси, ҳамда микроорганизмларнинг культурасини олиш имконини берди. Микроорганизмлар культурасига нисбатан юқори организмлар культуралари биотехнологиянинг **янги объекти** ҳисобланади. Ўсимликлар культурасини олиш методи XX асрнинг 70-йилларида яратилган.

Ўсимлик хужайраларини культурасини олишнинг асосий типи каллус тўқимасини, баъзида эса ўсимликларнинг ўсма хужайралари культураси олишдир. Ўсма хужайралари культураси чуқур ва юзаки экилганда кўринишидан ва морфологик жиҳатдан деярли фарқ қилмайди. Уларнинг асосий фарқи шундаки, ўсма хужайралари гормонга боғлиқ эмас, шунинг учун уларнинг озуқа муҳитига фитогормонлар кўшиш керак эмас. Ундан ташқари ўсма хужайралардан органогенез жараёнида илдиз ёки куртаклар унмайди. Каллус хужайралари культураси эса тўсатдан гормонга боғлиқ бўлмай қолиш хусусиятига эга. Каллус хужайралари бўлиниши натижасида (юқори ўсимликларга хос бўлган хужайра дифференциациясининг бир типи) **каллус тўқималари** ёки каллус ҳосил бўлади.

Каллус хужайралари культурасини олиш учун юқори ўсимликларнинг турли органлари (эксплантлар)дан бир қисм (фрагмент) олиб стериллик қоидаларини сақлаган ҳолда уни пробирка, колба ёки Петри чашкасидаги сунъий озуқа муҳитига экилади.

Эксплант хужайраларининг дедифференцияланиши ва **каллусогенез** жараёнининг хусусиятлари олинган тўқиманинг хусусиятларига боғлиқдир. Ўсимликларнинг махсус тўқималари (паренхима, илдиз ва поя, барг мезофили ва б.) нинг хужайралари озуқа муҳитида ўзига хос функцияларининг йўқотиб дедифференциялашиши ва фаол бўлинадиган хужайра ҳолатига келиши керак.

Ўсимлик хужайра ва тўқималари культуралари ўстириладиган **озуқа муҳит таркибида** минерал тузлар (макро ва микроэлементлар), углерод манбаи (сахароза ёки глюкоза), витаминлар ва ўсиш регуляторлари бўлиши керак. Зарур ҳолларда озуқа муҳитига турли комплекс бирикмалар (казеин гидролизати, аминокислоталар аралашмаси, ачитки экстракти, турли ўсимлик экстрактлари) кўшилади. Янги объект билан ишлаётганда озуқа муҳитларининг оптимал таркибини танлай билиш керак.

Юза усулда экилган каллус тўқималари ранги оқ, сарғиш, яшил, қизил, аниқ бир анатомик структурага эга бўлмаган аморф массага эга бўлиб, консистенцияси жиҳатидан ҳам фарқланади.

Суюқ озуқа муҳитида ўстирилган ўсимлик хужайралари культуралари **суспензион культуралар** дейилади. Суюқ озуқа муҳитида ўстирилган ўсимлик хужайралари культуралари каллус культураларининг юза экиш усулидан афзалликка эга. Суюқ муҳитда метаболизм ва хужайра популяцияси ўсишига турли экзоген омиллар билан таъсир этиш мумкин. Суспензион культуралар биокимёвий ва молекуляр-биологик тажрибалар – ферментлар индукцияси, генларни экспрессияси, мутантларни яратиш ва уларни тавсифлаш учун қулай.

Суспензион культуралар учун хужайралар каллус тўқималаридан олинади. Сўнг улар доим аралаштириб турган ҳолда суюқ озуқа муҳитига ўтказилади. Суспензион культураларни ўсимлик тўқималаридан ҳам олиш мумкин, фақат бу усул кўп вақт талаб қилади. Бунинг учун эксплант хужайраси аввал бирламчи ҳосил қилиши керак, сўнгра эса озуқа муҳитида кўпайиб, суспензия кўринишида ўсадиган хужайра линиялари учун манба бўлиб ҳисобланади.

Хужайра культураларида ўсимликлар учун хос бўлган бирикмалар: алкалоидлар, гликозидлар, полисахаридлар, эфир мойлари, пигментлар ва б. мавжуддир. Ўсимлик хужайраларидан фермент препаратларини ишлаб чиқариш

мақсадида фойдаланиш табиий ёки сунъий манбардан қимматли маҳсулотларни олиш имконини беради.

Мутант, гибрид ёки трансформацияланган ҳужайраларни клонал селекциясида изолирланган ҳужайралар ва регенерацияланган протопластларни ўстириш методи орқали амалга оширилади.

Ўсимлик протопластлари – мембрана билан чегараланган, ички ҳужайравий органеллалари таркиби сақланган структуравий тузилмадир.

Протопластлар 2 усулда ажратиб олинади:

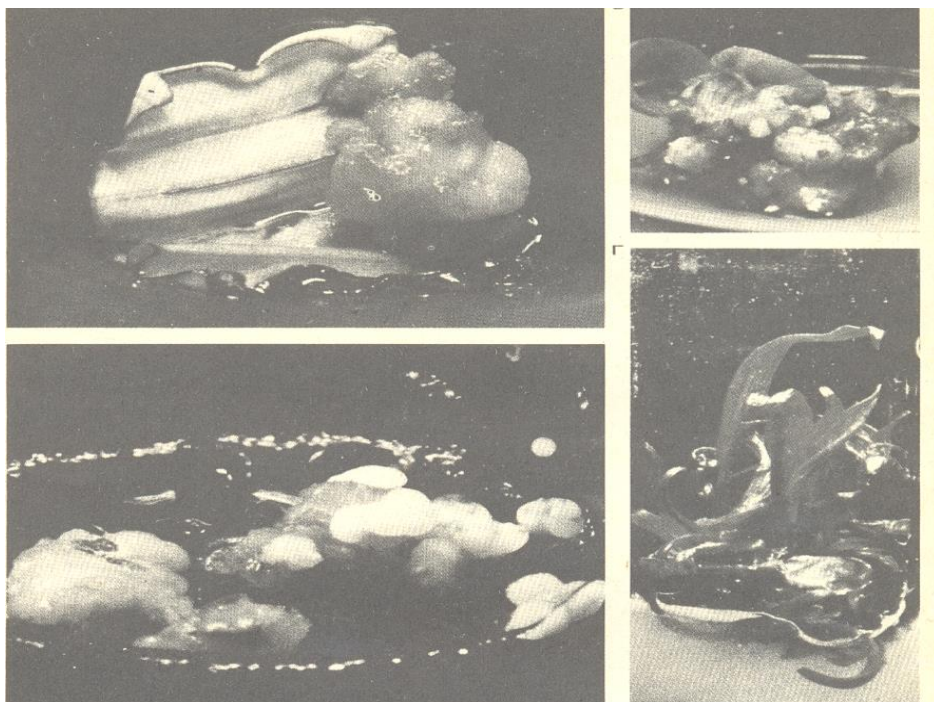
1. **Механик усул.** Биринчи бор ўсимлик ҳужайраси протопластлари 1892 йили телорез сув ўсимлиги ҳужайрасида плазмолиз ходисасини ўрганиш жараёнида ажратиб олинган. Бунинг учун ўсимлик тўқимасидан кесма олинади ва 0,1 М ли сахароза эритмасига солинади. Протопластлар “бужмайиб” ҳужайра деворидан ажралади, сўнг скапель ёрдамида кесма кесилади ва протопластлар муҳитга ажралади.

2. **Ферментатив усулда** ҳужайра девори ферментлар ёрдамида йўқотилади. Бунда 3 хил тип ферментлар - целлюлаза, гемицеллюлаза ва пектиназадан фойдаланилади.

Протопластлар культурасини олиш учун 2 хил ёндошилади: суюқ муҳит томчиларида инкубация қилинади ва агарли қатламга ўтказилади.

Изолирланган протопластлар ҳужайра деворини тиклагунга қадар қисқа вақт ичида бир-бири билан қўшилиши мумкин. Бу жараён нафақат бир типдаги ўсимлик протопластлариаро, балки гетеролик протопластлараро бўлиши ҳам мумкин. Шу усул билан 2 турдаги тамаки ўсимлигини протопластларини қўшиб регенерацияланган ўсимлик олинган. 1978 йили эса картофель ва тоmat ўсимликларининг протопластлари қўшилган. Бунинг натижасида томатнинг касалликларга чидамли факторлари картофелга кўчирилган.

Соматик гибридизация – ўсимликларни гибридини яратишнинг янги методи бўлиб, бунда гибридланаётган ҳужайралар сифатида гаметалар (репродуктив ҳужайралар) эмас, балки протопластлар олиндиган ўсимлик танасининг ҳужайралари (соматик) қатнашади. Протопластларни қўшиш билан ҳужайра геномидан ташқари 2 та турли цитоплазмалар ҳам қўшилади. Кўпгина ҳолларда юқори ўсимликларни протопластларини қўшиш



Расм. *in vitro* тажрибаларида пальмани (*Elaeis guineensis*) клонлаш. Пальманинг ёш барглари бўлакларидан каллуслар олиниб экмага эқилади. Иккинчи муҳитда улар кўпаяди ва учинчи муҳитда каллуслар эмбрионидлар ҳосил қилади. Бундай соматик эмбрионегенездан сўнг эмбриодлар ривожланиб, улардан аввал кластер, кейинроқ ёш ниҳоллар унади.



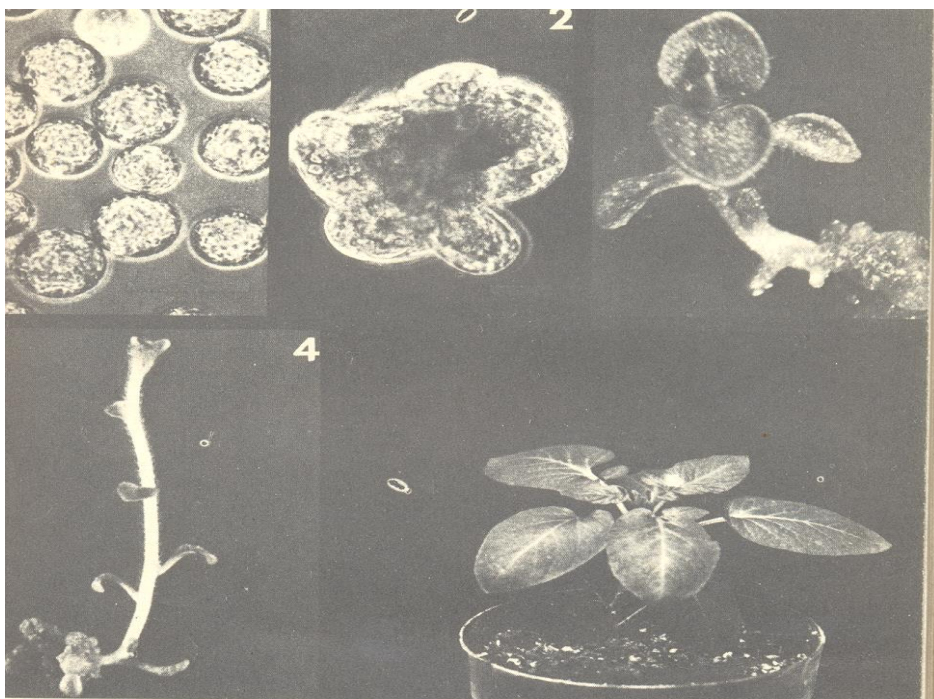
Протопластларни қўшилиши.

Картофель баргидан олинган алыобинос протопласт ва томат баргининг соғлом протопласти қўшилган. Бундан мақсад томат генларининг касалликларга чидамли геномларини картофел геномига киритишдир.

натижасида ёки гибрид ёки цибрид ҳосил бўлади. Цибрид ўсимликда иккала ўсимликнинг цитоплазмаси, ядро эса фақат биттасиники бўлади.

Гетерологик протопластларни қўшаётганда мос келадиган маркерни танлаш керак. Бундай маркер сифатида пластидалар ёки хлоропластлар бўлиши мумкин. Пластидалардан ташқари биокимёвий ёки генетик маркерлар: масалан, изоэнзимли таркиб, нуклеин кислоталарнинг хусусиятлари, маълум бир моддаларга чидамлилиқ ва хромосомалар ёки хужайра кариотиплари сони ҳам бўлиши мумкин.

Протопластлар лабиль тузилмалар бўлгани учун соматик гибридизациялаш йўли билан хужайрага бегона материалларни, ҳамда уларга изолирланган ДНК ёки бошқа хужайраларнинг органелларини киритиш мумкин. Ҳозирда ядро, хлоропластлар трансплантация қилинган.



Расм. Барг протопластидан (1) олинган каллусдан (2) картофелнинг регенерацияланиши (3-5)

Ўсимлик ва ҳайвон хужайраси культураларини ўстириш технологиялари.

Биотехнологик мақсадлар учун организмларнинг ёппасига культурасини олиш технологиялари бактериялар, ачитқилар ва мицелиал замбуруғлар учун ишлаб чиқилгандир. Яқин вақтларга келиб ўсимлик ва ҳайвон хужайралари культурасини яратиш бўйича ишлар бошланди. Ўсимлик хужайраларини культурасини олиш техникаси ёрдамида кўплаб мамлакатларда маълум бир ўсимликларни учун экиш материали бўлиб келмоқда. Ушбу методлар органогенез ва ниҳолларни амплификациялаш, сўнгра уларни тупроққа экиш бўйича қилинган ишлар натижасида такомиллаштирилмоқда. Лекин, кўплаб ўсимликлар хужайраларининг суспензион культураларини яхлит ўсимликка хос бўлган маҳсулотларни олиш (никотин, алкалоид, женьшень) мақсадида экиш кенг миқёсда ишлаб чиқилган ва у қўлланиб келинмоқда. Дигиталис, ясмин, ялпиз, кодеин каби қимматбаҳо препаратларни ишлаб чиқариш самарали ҳисобланади. Ўсимлик хужайралари суяқ доимо аралаштирилган муҳитда культурасини олишда ишлатиладиган

ферментацион методлар микробиология технологиясига хосдир. Ўсимлик ҳужайралари бактерияларга нисбатан секин ўсишига қарамай, уларнинг ҳарактеристикаси бир-бирига яқиндир.

Шунга қарамай, муҳим органик бирикмаларни фақат ўсимлик ёки ҳайвон ҳужайралари синтезлайди. Бу эса ўз навбатида янги технологияларни яратишни талаб қилади.

Ҳайвон ҳужайралари ё суспензия кўринишида ёки қаттиқ субстратга бириктирилган ҳолда ўстирилади. Бундай ҳужайралар, масалан, HeLa (инсон ўсмаси ҳужайраси) иккала ҳолатда ҳам ўсиши мумкин; лимфобластом ҳужайралар суспензион культурада, нормал диплоид ҳужайралар эса қаттиқ субстратга бириктирилган ҳолда ўсади.

Охирги пайтларда ҳужайра ўсишини назорат қилувчи системалар «бухта» кўринишида ўралган, газни ўтказувчан тефлон трубккаларга асосланган. Бундай шароитларда кўплаб ҳужайраларни культурасини олиш мумкин. Яна бир самарали метод, бу ҳужайраларнинг унча катта бўлмаган маржонлар (шарчалар, микроташувчилар)га бириктирилишига асосланган усулдир. Шарчалар сефадекдан ясалиб, юзаси $7 \text{ см}^2/\text{мг}$ бўлиши мумкин. Шарчалар суспензион ҳолатда суза олади ва уларда турли типдаги ҳужайралар ўсиши мумкин. Бу усул ёрдамида инсон интерферони олинмоқда.

8-МАЪРУЗА.

ФЕРМЕНТЛАР ИНЖЕНЕРЛИГИ

Режа:

1. Ферментлар инженерлигининг асосий вазифаси.
2. Микроорганизмлардан фермент препаратларини ажратиб олиш усуллари
3. Тозаланмаган, комплекс фермент препаратларининг олиниши.
4. Чўктириш усуллари ва унинг назарияси.
5. Ферментларни тозалаш усуллари.

Таянч сўзлар: фермент препаратлари, чўктириш, тузлар, тозалаш методлари, органик эритувчилар, диализ, баромембрана.

Адабиётлар: 1,2,3,4,13

Ферментлар инженерлигининг асосий вазифаси – биологик система ёки тирик ҳужайралардан ажратиб олинган ферментларнинг каталитик хусусиятларидан фойдаланган ҳолда биотехнологик жараёнларни яратишдир. У янги маҳсулотларни олиш, уларнинг сифатини яхшилаш ва иқтисодий кўрсаткичларини кўтариш билан боғлиқ бўлган масалаларни ечади. Ҳозирги кунда амалиётда ферментлар кенг қўлланади.

Маълумки, ферментлардан органик синтезларни катализатори сифатида фойдаланилади. Шунга қарамай, ферментларнинг “нозик” томони ҳам бордир, яъни уларнинг бузилишидир. Улар кам чидамли моддалар бўлиб, нозик макромолекуляр структурали оксиллардир. Улар ташқи таъсир остида осонгина ўз хоссасини йўқотади.

Ферментлар катализаторлигида кечадиган реакциялар мураккаб механизмга эга. Уларнинг активлигини ташқи муҳитнинг ўзгариши, унинг кислоталилиги, уларни активлаштирувчи ёки сусайтирувчи қўшимча моддалар қўшиш билан бошқариш мумкин.

Ферментлар манбаи турли ҳайвон, ўсимликларнинг тўқималари, микроорганизмлар бўлиши мумкин. Ферментлар қайси бири кераклиги ва қайси бирини олиш қулайлигига қараб танланади.

Яқин даврларгача амалий мақсадларда ҳайвон ва ўсимлик ферментларидан фойдаланиб келинган. Ҳайвонлардан олинадиган ферментлар гўшт саноатининг йўлдош маҳсулотлари ҳисобланади. Барча тўқима ва ҳужайралар ичида ферментларга бой орган ошқозон ости безидир. Ундан таркибида бир қатор гидролитик ферментлар (амилаза, протеаза, липаза ва б.) тутган комплекс препаратлар олинади. Масалан, ошқозон ости безидан панкреатин - қуритилган экстракт олинади.

Ҳайвон хомашёларидан айрим ферментларнинг тозаланган препаратлари - пепсин, трипсин, химотрипсин, реннин (химозин), рибонуклеаза, ДНКаза, липаза, гиалуронидаза, каталаза ҳам ажратиб олинади.

Ўсимликлардан саноат миқёсида протеолитик ферментларнинг айрим препаратлари - папаин (қовун дарахти мевасининг шарбатидан), фицин (анжир барги ва *Ficus* оиласига мансуб ўсимликлардан) ажратиб олинади.

Шу билан бирга ўсимликлардан фермент ажратиб олиш иқтисодий жиҳатдан самарали эмас, чунки сарфланадиган ўсимликка нисбатан олинадиган маҳсулот кам миқдорда бўлади. Ундан ташқари ҳар доим ҳам исталган минтақада керакли ўсимликни ўстириш имкони йўқ.

Ҳайвонлардан ферментларни ажратиб олишда ҳам айрим қийинчиликлар туғилади. Шунинг учун ҳозирда ферментлар манбаи сифатида микроорганизмлардан кенг фойдаланилмоқда.

Микроорганизмлар – фермент олиш учун жуда қулай манба ҳисобланади, чунки уларнинг ҳужайрадаги концентрациясини микроорганизм ўсишини тезлатиш ёки генетик манипуляция ҳисобига ошириш мумкин. Микроорганизмлар тез ўсади, арзон муҳитларда ўсади ва турли ферментларга бойдир.

Микроб ферментлари ҳозирда ўсимлик ва ҳайвон ферментлари ўрнини босмоқда. Қатор ферментлар медицина диагностикасида ҳам ўзига хос ўрин эгаллаб келмоқда. Масалан, холестериноксидаза қон зардобидаги холестерин, уреаза эса сийдик кислотаси миқдорини миқдорини ўлчашда ишлатилади. Ген инженерлиги тадқиқотларида эса рестриктацион эндонуклеазалар ва лигазалар ишлатилади.

Микробиологик усулда олинган ферментлар пластмасса ишлаб чиқаришда ҳам ўрин эгаллайди.

Қаттиқ ёки суяқ озуқа муҳитларида ўстирилган микроорганизмларнинг культураси ва уларнинг культурал суяқликлари таркибида жуда кўп миқдорда балласт моддалар бордир. Ферментларни ажратиш ва тозалаш - кўп меҳнат ва ҳаражат талаб қилувчи жараён дир, агарда фермент препарати микроорганизм культураси кўринишида ишлатилса, у тозаланмайди. Спирт ва терини ошлаш тармоқларида тозаланмаган микроорганизмлар культурасини ишлатиш мақсадга мувофиқ дир ва худди шундай микроорганизмларни қишлоқ хўжалигида ем-хашак тайёрлашда ёки фермаларда емларни қайта ишлашда қўллаш мумкин.

Озиқ-овқат саноатининг бир қанча тармоқларида (нон, пиво, вино, пишлоқ, крахмал ва шарбат экстракция қилувчи), ҳамда текстил, мўйна ва микробиологик саноатларда, шу жумладан тиббиётда балласт моддалардан қисман ёки тўлиқ тозаланган, яъни фақат тоза фермент препаратлари ишлатилади.

Тоза фермент препаратларини олишнинг бошланғич материали бўлиб филтрланган культурал суюқлик, продуцентнинг биомассаси ёки қаттиқ озуқа муҳитда ўстирилган культуранинг сувли экстракти хизмат қилади. Фермент препаратлари кукун ёки суюқ концентрат кўринишида олиниши мумкин. Ажратиш жараёнида препаратнинг умумий массасида фаол оқсилнинг нисбий улуши, яъни унинг улуший фаоллиги ортади.

Тозаланмаган, комплекс фермент препаратларининг олиниши. Тозаланмаган фермент препарати - микроорганизм культурасини мўътадил шароитда намлиги 8-12% га олиб келинган ва бутун озуқа муҳити қолдиқлари билан биргаликдаги массасидир.

Тозаланмаган фермент препарати культурани қаттиқ ёки суюқ озуқа муҳитида ўстириш йўли билан олиниши мумкин. Суюқ муҳитда ўсган культура қуритишдан олдин биомассаси ва озуқа муҳити қолдиқларидан қисман тозаланган ёки шундайлигича қуритилган бўлади.

Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизм культураси одатда 35 дан 58 % гача намликка эга бўлади. Бундай маҳсулот чидамсиз бўлганлиги сабабли уни тезда ишлаб чиқаришга жорий қилиш ёки намлигини 10-12% гача қуритиб олиш керак. Қуритиш жараёнидан олдин, ўстириш хонасидан олинган микроорганизм майдаланади ва кейин қуритилади.

Микроорганизм культураларини қуритиш учун тасмали, тоннелли, шахтали, барабанли, жавонли (шкафли) ва тебранувчан қуритгичлардан фойдаланиш мумкин. Ишлаб чиқаришда, юқорида қайд қилинганларига нисбатан кўпроқ тўғри йўналтирилган барабан типдаги қуритгичлар ишлатилади. Бунда хўл культура иссиқлик берувчи қурилма билан биргаликда 80-85°C да қуритгичга тушади. Бундай юқори ҳароратда қуритилувчи хўл микроорганизмларнинг майда бўлақларидаги намни буғланиши ҳисобига қаттиқ қизиб кетиш ҳолати кузатилмайди ва ундаги ферментларнинг фаоллиги тўлиқ сақланади. Кўпчилик барабанли қуритгичларнинг ички томонида парраксимон куракчалар мавжуд бўлиб, барабан 6-8 мин⁻¹ тезликда айланиши ҳисобига қуритилаётган материални бир текисда тарқалишини ва қуритилишини таъминлайди. Шунинг учун бундай типдаги қуритгичда қуритилган маҳсулот бутун массаси бўйлаб бир хил намликка эга бўлади. Ушбу қуритгичда микроорганизм бўлақчалари 3-7 мин. давомида қуритилади, берилаётган иссиқлик тезлиги 2-3 м/с, 80-85°C ҳароратда ҳамда чиқишда эса 60-65°C бўлади ва қуритилаётган материал ҳарорати 40°C дир. Қуритиш жараёнида атиги 3-10% гача фермент фаоллиги йўқотилиши мумкин.

Микроорганизмларни қуритишда ишлатиладиган қуритгичларнинг яна бир тури – герметик берк бўлган лентали буғ конвейерли қуритгичдир. Бундай қурилмаларда ферментнинг фаоллиги кўп йўқотилади, лекин улар ихчам ва юқори самарадорликка эга.

Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмларни қуритиш учун ҳар хил конструкцияли қуритгичлардан фойдаланиш мумкин, қайсики маҳсулотнинг фаоллиги пасайишини минимумгача туширишни, унинг қуритгичда 5-8 мин. давомида бўлиши ва чиқишида 40-42°C дан пастда бўлишини таъминлайди.

Тайёр қуруқ микроорганизмлар махсус қоплаш машиналарида 25-40 кг қилиб қопланади ва тайёр маҳсулотлар омборига юборилади.

Кўпчилик продуцентлар синтез қилган ферментларнинг асосий қисмини суяқ озуқа муҳитига чиқарадилар ва тўплайдилар. Тоза фермент препаратларини продуцентнинг биомассаси билан биргаликда фильтрларда, центрифугаларда ёки сепараторларда ажратилади.

Микробиология саноатида асосан ташқи томони билан фильтрловчи ячейкали-барабанли тўхтовсиз ишловчи вакуум фильтрлар ишлатилади. Бу фильтрлар юқори даражада механизациялаштирилган бўлиб, ҳар хил суспензияларни бир хил тезликда филтрлаш имконини беради. Барабаннинг сирти тўрсимон бўлиб, бўз ёки фильтрловчи сунъий газлама билан ўралган ва у филтрланувчи суяқликка чўктирилган бўлади. Фильтрловчи сиртда тўпланган ҳар хил эримаган компонент ва биомасса махсус пичоқ ёрдамида тозаланади.

Барабан фильтрлар биомассани ажратиш учун жуда қулай, лекин улар паст самарадорлиги, кўполлиги ва асептика шароитларини таъминлай олмаслиги билан ажралиб туради.

Фермент саноатида кўпинча рамали фильтр-пресс ҳам ишлатилади. Маҳсулот кўл ишига асосланган ҳолда олинади. Рамали фильтр-прессларнинг фильтрловчи ҳажми кичик бўлганлиги сабабли барабанли вакуум-филтрга нисбатан ҳам кам самарадордир. Рамали филтрда филтрлаш жараёни 0,6-0,4 Мпа босим остида олиб борилади. Одатда филтратнинг биринчи қисми тиниқ бўлмайди ва у қайта филтрланади.

Фильтр-пресснинг камчиликлари горизонтал камерали типдаги ФПАКМ да бирмунча бартараф этилган. У устма-уст жойлашган фильтрловчи плиталар ва фильтрловчи газламадан иборат. Ушбу ускунанинг иши автоматлаштирилган ва иш юзаси 2,5 дан 50 м² ҳажмга зга. Нисбий самарадорлиги бошқаларига нисбатан 6-8 марта юқори ва фермент фаоллиги 4-5% атрофида йўқотилади. Уларни ишлаб чиқаришга жорий қилиш жуда истиқболли ва бактериялар культурал суяқлигини филтрлашда жуда кўл келади.

Фермент саноатида 8СМ типдаги сепараторлар ҳам кенг қўлланилади. Улар ичига барабан ўрнатилган идиш кўринишида бўлади. Барабанларнинг ичида цилиндрик тўсиқлар ўрнатилган бўлиб, юқори тезликдаги марказдан қочма куч ҳисобига унинг тагида чўкма ҳолида биомасса ва бошқа компонентлар чўқади. Сепараторнинг самарадорлиги юқори бўлиб, 2000-5000 л/с гача етади. Бизда АСЭ-3, АСИ, АСЭ-Б типдаги сепараторлар ҳамда "Альфа-Лаваль" (Швеция) фирмасининг соплони сепараторлари ишлатилади.

Биомассани филтрлаш самараси ишлатилаётган ускуна типига, озуқа муҳит таркибига, ажратилаётган бўлакчалар катта-кичиклигига, эримаган фракциялар миқдорига, фильтрловчи материалнинг физик-кимёвий хусусиятларига, ҳарорат режимига ва бошқа омилларга узвий боғлиқдир. Фильтрлаш жараёнини яхшилаш мақсадида культурал муҳит кимёвий қайта ишланади, яъни ишқорийлиги рН 8-8,5 га келтириб 0,1%ли СаСl эритмаси ва ҳар хил кизелгурлар (диатомит, радиолит, микрозил, кларгель ва х.к.) кўшилади. Бу тўлдирувчилар филтрлаш самарасини оширади, лекин фермент фаоллигига салбий таъсир қилади. Олинган биомасса (биошрот) стерилизация қилинади ва қуритилиб чорва молларига ем сифатида ишлатилади. Культурал суяқлик филтрати эса тоза фермент препарати олиш учун қайта ишлашга юборилади.

Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлардан ферментларни экстракция қилиш. Барча ферментлар асосан сувда эрувчандир. Шунинг учун энг яхши экстрагент бўлиб сув ҳисобланади. Микроорганизмлардан ферментларни олиш учун улар майда қилиниб ҳужайра деворлари механик ёки автоматик ҳолда бузилиб, экстракция жараёнига жалб этилади. Бу усулда ҳам хўл ҳолдаги, ҳам куруқ ҳолдаги микроорганизмдан фермент эритмасини олиш мумкин. Биомассадан фермент экстракциясини тўлиқ амалга ошириш учун ҳарорат, рН, жараён давомийлиги, экстракция ускунасининг конструктив хусусиятлари, ажратилаётган фермент табиати ва бошқа бир қанча омилларга боғлиқ. Бу омиллар ҳар бир продуцент мисолида алоҳида тадқиқотлар ёрдамида аниқланади ва тавсия этилади. Масалан, ҳарорат экстракция жараёнига катта таъсир кўрсатади, яъни жуда кўп ферментлар термолабил бўлиб, ҳаттоки 35-40°C да инактивацияга учрайди. Шунинг учун завод шароитида иложи бориша сувнинг ҳарорати 22-25°C да ушлаб турилади ва ҳар бир микрофлора ўсмаслиги учун антисептиклардан (формалин, бензол, толуол, хлороформ ва х.к.дан фойдаланилади. Кўпчилик ҳолатларда ферментларни рН 5-7 кўрсаткичида тўлиқ ажратиб олиш мумкин.

Биошрот билан ферментларни кам исрофгарчилиги асосида қуюқлаштирилган экстрактлар олиш учун махсус экстракция ускуналарини ишлатиш керак. Бу қурилмада экстракция қилинаётган микроорганизм ферменти нисбатан кўп фаолликни йўқотади ва қўл ишига асосланади.

Вакуум-буғлантириш усулида фермент эритмаларини қуюқлаштириш. Қаттиқ ва суюқ озуқа муҳитларида ўстирилган микроорганизмларнинг экстрактлари сақлаш учун чидамсиздир. Тайёр техник препарат формаларини (П2х ва Г2х) олиш ва уларни қуюқлаштириш керак. Куруқ техник ёки тоза фермент препаратларини вакуум-буғлантириш усули ҳам бир босқич бўлиб ҳисобланади.

Одатда ферментлар буғлантириш ҳароратига жуда таъсирчан бўлади. Шунинг учун қуюқлаштиришнинг асосий шarti паст ҳароратда қайнатиш ва жараённи қисқа муддатда олиб бориш билан бирга, буғлантирилаётган суюқликни қизиб кетиши ва ферментлар инактивацияга учрашини олдини олишдир. Агарда қуюқлаштирилаётган эритма қанчалик тоза бўлса, шунчалик кам миқдорда ҳар хил моддаларни кам тутати ва ундаги фермент юқори ҳароратга жуда ҳам таъсирчан бўлади. Қаттиқ озуқа муҳитида ўстирилган организм экстрактида жуда кўп миқдорда ҳимояловчи бирикмалар бўлади ва улар қуюқлаштириш жараёнида фермент инактивациясини олдини олади, лекин культурал суюқликни қуюқлаштиришда бунинг аксини кузатиш мумкин, яъни фермент кўп миқдорда фаоллигини йўқотади. Қуюқлаштириш жараёнида фермент эритмаларидаги моддаларнинг миқдори ва минерал таркиби бирмунча ўзгаради, куруқ модда ҳисобига эса 11-20 %га камади ва қуюқлашган экстрактнинг рН кўрсаткичи ҳам ўзгаради. Продуцентнинг турига қараб уларнинг культурал суюқликлари ҳам ҳар хил кимёвий таркибга ва ферментлар комплексига эга бўлганлиги учун, вакуум-буғлантиришнинг ҳарорат режимлари тадқиқот йўли билан аниқланади.

Фермент фаоллигини қуюқлаштириш жараёнида йўқотилиши нафақат уни олиб борилиш режимига, балки ускуна ёки қурилманинг конструкциясига ҳам боғлиқдир. Кейинги йилларда вакуум-буғлантириш ускуналари анча такомиллаштирилмоқда. Ушбу ускуналар трубка шаклида (горизонтал, вертикал ва қия) бўлиб, жараённи ўтиш муддатини 10 мартабага яқин қисқартирди ва

ферментни фаоллигини йўқолишини бир мунча камайтирди. Булар жумласига «Альфа-Лаваль» (Швеция), «Единство» (Югославия), «Люва» (Швейцария), «APV» (Франция) ва б. бир қанча фирмалар ускуналарини киритиш мумкин ва уларнинг самарадорлиги 200 дан 20000 л/с ни ташкил қилади ҳамда ферментни фаоллиги 10% атрофида йўқотилади.

Фермент эритмаларини мембраналар ёрдамида тозалаш Мембранали тозалаш усулига диализ ва электродиализ, баромембранали усулга эса қайтарилувчи осмос, ультрафилтрация, микрофилтрация ва нозик филтрация кабилар киради.

Эритмадаги моддаларни диализ усулида ажратиш – мембранани модда массасига қараб танлаб ўтказувчанлик хусусиятига асосланган. Бу жараён учун яримўтказгич мембрананинг ҳар икки томонида эритмалар концентрациясини фарқи вужудга келиши керак. Диализ жараёнини ушбу тенглик билан ифодалаш мумин:

$$Q = DdS\Delta C$$

Бунда, Q – маълум вақт ичида мембранадан ўтган модда миқдори, Dd – диализ коэффициент, S – мембрана сиртининг юзаси, ΔC – мембрананинг ҳар икки томонидаги моддаларнинг концентрацияси фарқи.

Диализдан фермент препаратларини кичик молекулали моддалардан тозалашда фойдаланилади. Масалан, фермент эритмаларини шакар, аминокислоталар, минерал тузлар ва бошқалардан 60-100% гача бўлган миқдорда тозалашга эришиш мумкин. Айниқса, ферментлар юқори концентрацияли тузлар билан чўктирилганда диализдан ва электродиализдан унумли фойдаланиш керак. Лекин тўртламчи структурага эга бўлган ферментларни ва металлоферментларни ажратишда электродиализдан фойдаланиш мумкин эмас, яъни фермент ушбу жараёнда ўз фаоллигини йўқотади.

Диализ жараёни жуда секин ўтувчи жараёндир, ҳамда эритманинг миқдори кўп бўлганда, жуда кўп миқдорда мембрана сарфланади. Диализда куйидаги ҳар хил кўринишдаги яримўтказгич мембраналар ишлатилади, пергамент, целлофаннинг ҳар хил турлари, ультрафилтрацияда ишлатиладиган мембраналар ва бошқалардир. Диализ усули бир қанча камчиликларга эга бўлганлиги сабабли ҳозирги кунда ишлаб чиқаришда ишлатилмайди. Баъзан илмий лабораторияларда ферментларни юқори тозаликда олиш учун ишлатилиши мумкин.

Баромембрана усули ишлатиладиган мембраналар тирқишларининг катта-кичиклигига қараб синфланади. Масалан, қайтарилувчан осмос ($\approx 3 \times 10^{-4}$ мкм); гелфилтрация (15x10,5 мкм); микрофилтрация (0,2 мкм) ва нозик филтрация (10 мкм) дир.

Қуюқлаштириш ва тозалашнинг қайтарилувчан осмос ва ультрафилтрация усуллари кимё, нефтни қайта ишлаш, озиқ-овқат, фармацевтика ва фермент саноатларида жуда кенг тарқалган. Энг асосийси, жараёни жуда ҳам кам ҳаражатлар ва энергия эвазига олиб борилишидир. Ультрафилтрация жараёнида ферментларни ҳарорат таъсиридаги инактивацияси умуман бартараф қилинган бўлиб, бирваракайига эритма бир қанча балласт бирикмалардан хона ҳароратида тозаланади. Ушбу жараён юқори босим остида ўтганлиги учун самарадорлиги ҳам юқоридир. Бу усулнинг ҳам асосий элементи бўлиб мембраналар ҳисобланади. Ҳозирги кунда целлофандан, каучукдан, полиэтилендан, полистеролдан, целлюлозадан ва б. бир неча хил материаллардан тайёрланган мембраналар ишлатилмоқда.

Мембраналар хусусиятига қараб 0,05-0,2 мкм ли бир қаватли – изотроп ва икки қаватли – анизотроп турларига бўлинади.

Чўктириш усуллари ва унинг назарияси. Саноат учун зарур бўлган кўпчилик ферментлар сувда эрувчан оксиллардир. Фермент эритмалари олиниш манбаларига қараб микроорганизмлар лизатлари, экстрактлари, культурал суюқлик филтратлари, ўсимлик ёки ҳайвон тўқималари гомогенатлари булиши мумкин. Бу фермент эритмалари таркиби жуда мураккаб системага эга. Унда ферментлардн ташқари коллоид табиатига эга бўлган ҳар хил бирикма ва моддалар ҳам учрайди. Бундай мураккаб системалардан ферментларни ажратиб олиш мушкул вазифадир.

Маълумки, оксилнинг гидрофоб гуруҳлари оксил молекуласи ичида тўпланиб ҳаракат жойлашади. Оксилнинг ҳар хил эритувчиларда эриш даражаси молекула сиртида гидрофоб ва гидрофил қолдиқларнинг тарқалиши билан белгиланади. Оксилларни асосий эритувчиси бўлган сувнинг баъзи хусусиятларини (ҳарорат, рН, ион кучи, нейтрал тузлар, органик эритувчиларни ёки инерт бирикмаларни қўшиш йўли билан) ўзгартириш ҳисобига оксил молекуласининг гидрат ёки сольват қатламига таъсир қилиб агрегацияга учратиш ва чўкмага тушириш мумкин. Саноатда асосан органик эритувчилар ёки тузлар билан чўктиришдан фойдаланилади. Бу усуллар бир-биридан чўктириш механизми билан фарқланади.

Нейтрал тузлар ёрдамида чўктириш. Бу жараён асосан оксил молекуласининг гидрофоблиги даражасига боғлиқ. Типик оксил молекуласи сиртида бир қатор аминокислоталар (тирозин, триптофан, лейцин, изолейцин, метионин, валин ва фенилаланин) занжири шаклида ёпишган гидрофоб қисмларга эга. Оксил молекуласининг гидрофоб қисми сув билан тўқнашганда сув молекулалари билан ориентирланган қават ҳосил бўлади ва шу жойлар «музлатилган» ҳолатда бўлади. Бундай тартибли структуралар термодинамик жиҳатдан чидамли эмасдир. Агар сув молекулаларини оксил табиатига ўхшамаган моддалар билан иммобилизация қилинса, оксил молекулалари ўзаро таъсирлашиб агрегатлар ҳосил қила бошлайди. Маълумки, тузларнинг ионлари гидратланади. Агар оксил эритмасига маълум миқдорда сув қўшилса у сув билан боғланади ва сувдан бўшаган оксил молекулалари агрегат ҳосил қилади. Туз ионлари қанча кўп бўлса, оксилларнинг агрегатланиши ҳам шунча кучаяди ва чўкмага тушиши ортади.

Тузлар билан чўктириш жараёни таъсирига кўра ҳар хил оксилларга ҳар хил бўлади. Бу биринчидан, оксил молекуласи сиртидаги гидрофоб қисмларнинг миқдори ва размерига боғлиқ. Қанча шундай қисмлар кўп бўлса, оксил шунча тез чўкмага тушади. Баъзи оксиллар борки, тузларнинг энг юқори концентрацияларида чўкмага тушмайди. Чўктириш жараёнида оксиллар ёнида турган бошқа оксиллар билан ҳам агрегат ҳосил қилиб чўкмага тушиши мумкин. Бунда бир қанча ферментлар комплексини олиш мумкин. Лекин фракцияларга бўлиб чўктирилса бир мунча юқори натижага эришиш мумкин.

Оксилларни тузли эритмаларда эрувчанлиги Коннинг эмпирик тенгламасига бўйсунди:

$$\lg S = \lg S_0 - k_s \mu$$

бунда S , S_0 - оксилнинг тузли эритма ва тоза сувдаги эрувчанлиги; k_s – тузлаш константаси, μ – эритманинг ион кучи.

Тузлар билан чўктириш жараёнини унумли ўтказиш учун $k_s \mu$ кўрсаткичи иложи борича катта бўлиши керак. k_s кўрсаткичи тузнинг табиатига боғлиқ бўлиб,

водород ионлари концентрациясига боғлиқ эмас. Ушбу жараён гидрофоб ўзаро таъсирга асосланган бўлсада унинг боришига таъсир қилувчи бошқа омиллар ҳам мавжуддир. Улар: муҳит рН и, ҳарорат. Фермент эритмаси тозалиги даражаси, жараёни ўтказиш муддати ва бошқалардир.

Туз билан чўктиришда асосан ишқорий металлларнинг нейтрал тузлари ишлатилади. Ҳар хил ионларнинг чўктириш эффекти уларнинг ион кучига боғлиқ. Натрий тузлари анионларини тузлаш таъсири кучига қараб қуйидагича жойлаштириш мумкин: $\text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{CNS}^-$, ҳамда катионларни эса қуйидагича $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > (\text{NH}_4)^+$.

Фермент препаратларини туз ёрдамида чўктирилганда уларнинг таркибида 60-85% гача ҳар хил балласт қўшимча моддалар учраши мумкин. Ушбу жараёнинг энг қийин босқичи, бу - тузни қўшиш ва уни эритишдир. Эритмада тузнинг локал концентрациясини ошириб юбормаслик учун у аввал майдаланиб, секин асталик билан маълум бир қисмдан қўшиб борилади ва тинмай аралаштириб турилади. Аралаштириш давомида кўпик ҳосил бўлишига йўл қўймаслик керак. Жараён эриган на агрегатланган оксилларнинг мувозанати ҳосил бўлгунча 20-40 мин, баъзида бир неча соат давом этади.

Туз билан чўктириш жуда ҳам кўп омилларга боғлиқ бўлган мураккаб технологик жараёндир. Шунинг эса тутиш керакки, туз ҳеч қачон ферментни бутунлай чўктирмайди, балки унинг эрувчанлигини пасайтиради, холос. Агар эритмада 1 мг/мл оксил бўлса унинг 90%и чўкмага тушиши мумкин, лекин эритмада бор-йўғи 0,1 мг/мл оксил бўлса ҳеч қандай фермент препаратини олишнинг иложи бўлмайди.

Нейтрал тузлар билан оксилларни чўктириб фермент препаратларини олиш усуллари асосан чет элларда кенг тарқалган.

Органик эритувчилар ёрдамида чўктириш. Ферментларни сувда эрувчан органик эритувчилар билан чўктириш усуллари саноат миқёсида кенг қўламда қўлланилади. Оксилларни чўктириш самараси органик эритувчилар таъсирида сувнинг фаоллигини камайиши билан узвий боғлиқдир. Эритувчининг концентрацияси ортиши билан ферментнинг зарядланган гидрофил молекулаларини сув таъсирида солватланиш қобилияти пасаяди. Оксилнинг гидрофоб қисмидаги сув молекулалари органик эритувчи томонига ўта бошлайди ва натижада ферментнинг эрувчанлиги пасаяди. Оқибатда оксил молекулалари агрегатланади ва чўкмага тушади.

Оксилларни агрегатланиши электростатик ва Ван-дер-Ваальс кучлари таъсирида, алоҳида жойлашган оксил молекулалари ўртасида юзага келади.

Оксилларни агрегатланиши жараёни ва чўкма ҳосил бўлиши чўктиришнинг бир қанча омилларига боғлиқдир. Шулардан бири оксил молекуласининг размеридир. Чўктириш жараёнида оксил молекуласининг размери қанчалик катта бўлса, эритувчининг салбий таъсир қилувчи концентрацияси шунчалик паст бўлади. Бу боғлиқликка молекуланинг гидрофоблик даражаси, солват қаватига чидамлилиги на бошқа омиллар таъсир қилиши мумкин.

Чўктириш учун ишлатиладиган органик эритувчи сув билан тўлиқ аралашини ва фермент билан эса алоқада бўлмаслиги керак. Асосан бу жараён учун этил спирти, ацетон ва изопропил спирти кенг қўлланилса, метанол, н-пропанол, диоксан, 2-метоксиэтанол ва бошқа спиртлар, кетонлар, эфирлар ва уларнинг аралашмалари

камроқ ишлатилади. Эритувчиларни танлашда уларнинг токсиклигига, портлаш хавфидан холислигига ва регенерация бўлиш қобилиятига эътибор бериш керак. Ишлаб чиқариш учун энг яроқлилари бўлиб этил спирти ва изопропанол ҳисобланса, ацетоннинг кўрсаткичлари эса сал пастроқдир. Булар орасида энг истиқболлиси изопропанолдир. Бу эритувчилар ёрдамида ферментларни комплексларга ажратиш ёки фракциялар ҳолида чўктириб олиш мумкин.

Фермент препаратларини чўктириш учун нафақат эритувчининг табиати ва концентрацияси, балки электролитларнинг иштироки, чўктириш ҳарорати, муҳит рН кўрсаткичи, қуруқ моддаларнинг таркиби на миқдори каби бир қанча омилларга эътибор бериш керак. Чўктириш эритмасида баъзи ионларнинг учраши фермент мўътадиллигига таъсир қилиши мумкин. Масалан, Ca^{2+} ионлари а-амилаза, протеиназа, глюкоамилаза ферментлари фаоллигига ижобий таъсир қилса, магний, марганец, кобальт каби металл ионлари ҳимоя вазифасини бажаради. Шулар билан биргаликда баъзи металлларнинг (Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Hg^{+} ва х.к.) ионлари салбий таъсир кўрсатади ва уларнинг эритмада бўлиши мақсадга мувофиқ эмасдир. Эритмада электролитларнинг бўлиши эритувчи сарфини камайтиришга ва чўкма структурасини яхшилашга хизмат қилади.

Фермент эритмаси ва эритувчининг ҳарорати фермент чўктириш жараёнида паст бўлишига ҳаракат қилиш керак. Спирт ва ферментнинг сувли эритмаси аралаштирилганда иссиқлик ажралиб чиқиши ва аралашма ҳарорати 5-10⁰С га кўтарилади. Агарда спирт олдиндан совутилган бўлмаса ферментларнинг инактивациясини кузатиш мумкин. Бу ҳодиса нафақат термоинактивацияга, ҳаттоки фермент молекуласини денатурациягача олиб келади.

Фермент препаратларини чўктиришда рН кўрсаткичи жуда катта аҳамиятга эга. Бир хил фермент эритмасидан ҳар хил рН кўрсаткичи таъсирида бир-биридан чўкмаси миқдори ва фермент фаоллиги билан фарқ қилувчи препаратлар олиш мумкин. Маълумки, ферментлар ўзларининг изоэлектрик нуқталарида оқсил агрегатлари ҳосил қилиб тўлиқ чўкмага тушадилар. Оқсилларни изоэлектрик нуқталарида чўктирувчи реагентлар ишлатмай чўктириш жараёни изоэлектрик чўктириш дейилади. Органик чўктирувчиларни изоэлектрик нуқта рНга яқини рН да қўллаш ферментларни осон чўктириш ва эритувчини кам миқдорда сарфлаш учун хизмат қилади. рН кўрсаткичи изоэлектрик нуқтадан четга чиқса чўкма унуми ва фермент фаоллиги 30-50% гача йўқотилади.

Фаол ферментни препарат ёки мўътадил структурали чўкма ҳолида олиш учун эритмада 10-12% атрофида қуруқ модда миқдори бўлиши керак. Кўп тадқиқотлардан маълумки, ферментларни чўктиришда, айниқса протеолитик ферментларни, қуруқ модданинг энг оптимал миқдори 10% бўлиши керак.

Юқорида қайд қилинган омиллар қаторида фермент эритмаларини эритувчи билан алоқада бўлиш муддати ҳам катта аҳамиятга эга. Фермент саноатида тўхтовсиз ишлайдиган чўктирувчиларда ушбу вақтни жуда ҳам қисқартиришга эришилгандир, бу албатга фермент фаоллигини камайишини олдини олади.

Органик эритувчилар билан чўктириш самарадорлиги шу жараёнга мўлжалланган ускунага ҳам узвий боғлиқдир. Бундай ускуналар асосан фермент эритмаларини қабул қилгич, тўхтовсиз аралаштиргич, фермент эритмаси ва эритувчини тўхтовсиз равишда узатувчи контурлар, сепаратор ва автоматизация тизимларидан тузилган бўлади. Цилиндр шаклидаги аралаштиргичдан фермент

эритмаси ва эритувчи мураккаб ҳаракат йўналиши бўйлаб қисқа вақт ичида аралашиб ўтади ва натижада ҳосил бўлган аралашма сепаратор қисмига узатилади. Сепараторда чўкмага тушган оксил молекулалари ажратиб олинади. Бундай курилмада фермент билан эритувчининг алоқа муддати ўн маротабагача қисқартирилади. Бунда ферментнинг чўкмага тушиш унуми 15-20% гача ортади. Сепараторда ажратилган чўкма ҳар хил усуллар билан мўътадил шароитда қуриштириб олинади. Чўкма тепасида қолган суюқлик таркибида 50-75% гача эритувчи улуши бўлади ва ректификация бўлимида регенерация қилишга юборилади.

Органик эритувчилар билан чўктириш унуми продуцент ўстирилган озуқа муҳити таркибига ва фермент препаратини қуюқлаштирилганлик даражасига ҳам боғлиқдир.

Ферментларни тозалаш усуллари.

Ферментлар ва бошқа оксил моддалари ҳар хил эримайдиган адсорбция (сурилиш) қобилиятига эга. Бу хусусият оксил аралашмаларини бирикмаларга ажратишда ва айниқса ферментларни лаборатория шароитида тозалашда, ҳамда гомоген бўлган фермент препаратларини олишда ишлатилади. Адсорбция усули, шу билан бирга колонкали хроматография усуллари ферментларни юқори даражада тоза ва кўп миқдорда олиш имконини беради.

Оксилларнинг муҳим адсорбентлари бўлиб, ҳар хил ионалмашувчилар, яъни кальций фосфат, алюминий гидроксид геллари ва маълум типдаги ферментлар учун махсус бўлган ҳар хил аффин адсорбентлар ҳисобланади. Ферментларни тозалаш ва оксилларни ажратиш технологияси қандай типдаги усулда бўлишига қарамай қуйидагиларга асосланади. Фермент маҳсулотини ўз таркибига олган оксиллар аралашмаси маъқул бўлган эритувчида (буферда) эритилади ва шу эритувчи билан мувозанатланган колонкага юборилади. Кейин шу колонкадан маълум таркибга эга бўлган буферни ёки концентрацияси ўсиб боровчи градиентли ювиш эритмаси, ёки бўлмаса ушбу фермент учун махсус бўлган боғловчи (лиганд) ёрдамида оксил босқичма-босқич ювиб олинади. Колонкадан ювиб олинган фермент препаратлари фракциялар тўпламида йиғилади ва ферментни тоза препаратини олиш учун бошланғич материал бўлиб хизмат қилади.

Ионалмашув хроматография усули. *Бу усулда оксиллар электростатик куч ёрдамида боғланадилар, яъни бу ҳодиса зарядланган оксил сиртлари ва зарядланган ионалмашув бирикма гуруҳларининг зич қатлами ўртасида юзага келади. Типик ионалмашувчи сифатида бўктирилган диэтиламиноэтил (ДЭАЭ-) ёки карбоксиметил (КМ) целлюлозани кўрсатиш мумкин. Улар бўктирилган ҳолатда зарядли гуруҳларнинг 0,5 М концентрациясига зга бўлади. Бу зарядлар колонкада қарама-қарши бўлган ионларни (металл ионлари, хлор ионлари, буфер ва ҳ.к. нейтраллайди. Одатда оксилнинг умумий заряд белгиси ион алмашувчига ўтирган ион белгиси билан бир хил бўлади ва колонкадан ўтиш жараёнида айнан уни сиқиб чиқаради. Шунинг учун ҳам бу жараён хусусиятига қараб "ион алмашув" жумласи қўлланилади.*

Колонкада адсорбцияланган керакли оксилни ювиш учун аффин усулидан ташқари икки усулдан фойдаланилади. Биринчи усул - буфернинг рН кўрсаткичини маълум даражага ўзгартириш билан ион кучини ошириб, адсорбент ва оксил ўртасидаги электростатик ўзаро таъсирни камайтиришдир. Бу усул умуман яхши натижа бермайди. Чунки буфер ҳажмини кичик бўлганлиги учун рН

кўрсаткичини бирданига ўзгар-тириш оксил аралашмаларига ва бошқа бирикмаларнинг ёмон ажралишига сабаб бўлади. Кейинги йилларда бу усул Л.Л.Слюйтерман ва бошқалар (1981) томонидан хроматофокус усулига ўтказиш йўли билан такомиллаштирилмоқда. Бунда ювиш жараёнида амфолит типига буфер ҳажми юқори бўлган буферлардан фойдаланилади ва шу усул кейинчалик саноат миқёсида ўз ўрнини топиши мумкин.

Иккинчи усул кенг миқёсда фойдаланилаётган калий ёки натрий хлорид тузлари ёрдамида градиент тузишга асосланган. Туз ионлари иштирокида мустақил оксил на адсорбентлар ўртасидаги ўзаро тортиш кучи камаяди. Туз ионлари концентрациясини ошириш билан адсорбентга боғланган оксиллар ўз ўринларини уларга бўшатадилар ва ўзлари колонкадан ювилиб чиқа бошлайдилар. Шу билан бирга туз ионлари таъсирида адсорбентлар ўзаро яқинлашиб оксил ҳаракати учун тор йўлчалар ҳосил қилади ва бу ҳодиса ферментларни колонкадан чиқишида фракцияларга ажратиш олиш имконини беради.

Ион алмашувчига боғланган ферментни аффинли ювиш ёрдамида ажратиш мумкин. Бунинг учун колонкага оксил билан боғланадиган махсус лиганд юборилади. Бунда оксил лиганд билан биргаликда тезда колонкадан ювилиб чиқади. Лекин керакли оксилни танийдиган ва уни сорбентдан ажратиш оладиган лигандни топиш жуда мушкул вазифадир. Шу билан бирга лигандни қандай зарядланганлиги ва концентрациясига алоҳида эътибор бериш керак. Бўлмаса қарама-қарши ҳолатда лиганд ўзи ионалмашувчига боғланиб қолиши мумкин.

Аффинли хроматография усули. Бу усул оксил ва ферментларни тозалаш ва ажратишнинг адсорбция ҳодисасига асосланган усуллари ичида алоҳида ўринни эгаллайди. Кўпинча уни аффинли хроматография ёки биоаффинли ёки бўлмаса биоспецифик хроматография дейилади.

Маълумки, барча биологик фаол бирикмалар, хусусан ферментлар ҳам лигандлар ёки аффинли лигандлар деб номланадиган бирикмаларга махсус боғланиш хусусиятларига эгадир. Агарда шундай лигандларни инерт матрицага ковалент боғласа фақат керакли ферментни ушловчи ва қолган оксил ва моддаларни ўтказиб юборувчи махсус адсорбентни олиш мумкин.

Махсус ювувчилардан ёки жараён шароитлари фарқи асосида лигандни ферментга бўлган хусусиятини ўзгартириш йўли билан оксилни десорбцияга учратиш, тозалаш натижасида битта юқори тозаликка эга бўлган ферментни олиш мумкиндир. Лекин лиганд ва уни ушлаб турувчини танлаш жуда қийин вазифадир. Кўпчилик ҳолларда аффинли адсорбентларни синтез қилишда тозаланаётган ферментнинг хусусиятларини эътиборга олиш керак. Аффинли хроматография учун ҳар хил турдаги эримайдиган сорбентлардан фойдаланади, лекин энг кўп тарқалгани кўндаланг қилиб уланган агароза доначаларидир. Улар юқори босимда ўз шаклини сақлайди ва буферларни ҳамда эритувчиларни алмаштиришга бардошлидир.

Лигандлар эса матрицага шундай боғланган бўлиши керакки, оксиллар ҳеч қийинчиликсиз уларга келиб боғланиши ва бунинг учун матрица билан лиганд ўртасида кўприкча бўлиши керак. Булардан ташқари лиганд бошқа бирикмалар билан ўзаро боғланмаслиги, фақат матрицага боғланган ва ювиш, регенерация жараёнларига чидамли бўлиши шартдир.

Гельхроматография усули. Гельфилтрация жараёнини амалга ошириш учун декстран асосида олинган геллардан фойдаланилади ва улар ёрдамида размерига

қараб ҳар хил макромолекулаларни тез ажратиш мумкин. Гель очик ҳолдаги кўндаланг тикилган уч ўлчамли молекула тури бўлиб, колонкаларни осон тўлдириш учун юмалоқ доначалар (гранула) кўринишида бўлади. Доначаларда кичик тешикчалари бўлиб, уларга фақат жуда кичик молекулали бирикмалар киради ва йирик молекулалар эса кирмайди. Бу усул гелларнинг айнан шу хусусиятига асослангандир.

Бу усул ферментларни тозалаш ва ажратишда нафақат лаборатория, балки саноат миқёсида ҳам кенг қўлланилади. Гельфилтрация учун кўндаланг тикилган декстран (сефадекслар ва сефакриллар) гелларидан, кўндаланг тикилган полиакриламид гелларидан (биогеллар), акриламид полимер занжири ёпиштирилган агароза геллардан (ультрагеллар) ва б. агароза гелларидан фойдаланилади.

Колонкада фермент эритмасининг бир қисми гел доначалар орасида ва бир қисми эса доначаларнинг тешикчалари ичида жойлашади. Гельфилтрация – бу тарқалувчан хроматографиянинг бир шакли бўлиб, эритилган моддалар эритманинг бир мунча юзада жойлашган ҳаракатчан ва ички томонида жойлашган кам ҳаракатли қисмларида тарқалган бўлади. Колонкада эритилган модданинг ушлаб қолиниш даражаси унинг гел тешикчаларига кира олиш қобилиятига боғлиқдир. Шунинг учун гельфилтрация жараёнида колонкадан аввал юқори молекулали моддалар ва кейин эса кичик молекулалари бирин-кетин чиқа бошлайди. Бунда гель молекуляр тўр вазифасини бажаради Бу жараён идеал равишда олиб борилиши учун гел тайёрланган материал эриган бирикмалар таъсирига жуда ҳам инерт бўлиши керак. Афсуски бугунги кунда ишлатилаётган барча геллар инерт эмас ва баъзан маълум рН кўрсаткичида улар суриш қобилиятини намоён қилиши мумкин, масалан, шундай гелларга сефакрилларни киритиш мумкин. Гельфилтрация усули билан майда гел доначаларида юқори босим остида жуда кўп ҳар хил моддаларнинг, шу жумладан оксилларнинг аралашмалари ажратилмоқда. Бу янги юқори босим остида суюқ хроматография услуби қисқа вақт ичида юқори даражали ажратиш имконини беради ва у ферментларни тозалашнинг охириги босқичларида жуда ҳам унумлидир.

9-МАЪРУЗА.

ФЕРМЕНТЛАРНИ ИММОБИЛЛАШ ВА БАРҚАРОРЛАШ ТЕХНОЛОГИЯСИ

Режа:

1. Имобилланган ферментлар.
2. Ферментларни имобиллашда ишлатиладиган полимерлар.
3. Полимерларга қўйиладиган талаблар.
4. Ферментларни физикавий имобиллаш.
5. Ферментларни кимёвий имобиллаш.
6. Микроорганизм хужайраларини имобиллаш.
7. Ўсимлик хужайраларини имобиллаш.

Таянч сўзлар: имобиллаш, унинг методлари, ташувчилар, уларнинг таснифи, адсорбция, геллар, яримўтказгич мембраналар, ДЭАЭ-целлюлоза, субстрат.

Адабиётлар: 1,2,3,4,13.

Охириги 15-20 йиллар мобайнида кимёвий энзимологиянинг ривожланиши натижасида биологик катализаторларнинг янги типи – **имобилланган ферментлар** яратилди. Маълумки тоза ферментлар, биринчидан, узоқ вақт сақланмайди, ҳамда турли таъсирларга, айниқса иссиқликка чидамсиз, ҳамда

иккинчидан, уларни қайтадан ишлатиш имкони йўқ. Имобилланган ферментларнинг яратилиши билан саноат ишлаб чиқаришида тоза ферментлар фойдаланишда юзага келадиган қийинчиликлар бартараф этилди.

Имобилланган ферментлар ферментатив жараёни узлуксиз ўтказиш ва реакция тезлигини бошқариш имконини беради. Ферментларни имобиллаш билан ташувчининг хусусиятини ўзгартириш ҳисобига уларнинг каталитик фаоллиги бошқарилади.

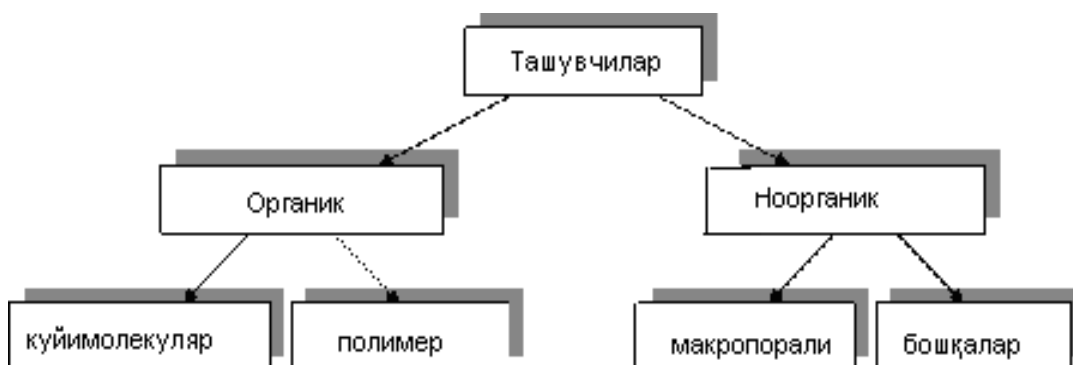
“Имобилланган ферментлар” атамаси фазода оксил молекулари ҳаракатланиш эркинлигини исталган чекланишини англатади.

Ферментларни имобиллашда ишлатиладиган ташувчилар.

Ферментларни имобиллаш учун органик ва ноорганик ташувчилар ишлатилади. Уларга қўйиладиган асосий талаблар:

- юқори кимёвий ва биологик турғунлик;
- юқори кимёвий мустаҳкамлик;
- фермент ва субстратлар учун етарли даражада ўтказувчан, ғоваклилиги, солиштирма сирти юқори бўлиши;
- технологик жиҳатдан қулай шаклларда олиниши (гранулалар, мембраналар);
- осон активланиши;
- юқори гидрофиллик;
- арзон нархда бўлишидир.

Қуйидаги расмда ташувчиларнинг классификациясининг схематик кўриниши келтирилган:



Органик (паст ва куйимолекуляр) ташувчилар табиий ёки синтетик бўлиши мумкин. Табиий полимер органик ташувчилар ўз навбатида биокимёвий классификациясига кўра 3 гуруҳга бўлинади: полисахаридли, оксилли ва липидли.

Синтетик полимерларни макромолекуласининг асосий занжирини кимёвий тузилишига кўра полиметиленли, полиамидли, полиэфирли гуруҳларга бўлиш мумкин.

Ферментларни имобиллаш учун табиий полисахаридлар ва полиметил типидagi синтетик ташувчилар кўпроқ ишлатилади. Бунинг сабаби уларда кимёвий реакцияларга осон кириша оладиган реакция хусусиятли функционал гуруҳлари мавжуд, ҳамда уларнинг гидрофиллигидир. Камчилиги эса микроорганизмларнинг таъсирига чидамсиз ва қимматроқдир.

Полисахаридли ташувчилардан целлюлоза, декстран, агароза ва уларнинг ҳосилалари ишлатилади. Целлюлоза гидрофил хоссали, унда гидроксил гуруҳи кўп

бўлиб, шу гуруҳ хисобига уни модификациялайди. Целлюлозани қисман гидролизлаб (бунда аморф участкалари бузилади) гранула холига келтирилади ва натижада унинг механик мустаҳкамлиги оширилади. Уларнинг ўрнига ғоваклилигини сақлаб қолиш мақсадида кристалл участкалари орасига кимёвий чок киритилади. Гранулаланган целлюлозани ДЭАЭ-целлюлоза, КМЦ ва б. сингари турли ионалмашувчиларнинг ҳосилаларига айлантириш мумкин.

Декстран асосида ишлаб чиқилган "Сефадекслар" деб номланувчи ташувчилар ҳам кенг ишлатилади. Куритилганда улар осон сиқилади, сувда кучли шишади. Ушбу ташувчилардаги поранинг размери "чоклилик" даражаси билан бошқарилади. Декстранларнинг мазкур гуруҳига крахмал ҳам киради. Кимёвий модификацияланган крахмал агентлар билан "тикилади", масалан формальдегид билан. Шундай йўл билан гидролизга, ферментларга нисбатан чидамли бўлган ғовак крахмал олинган. Декстран асосида яратилган сувда эрувчан препаратлар тиббиётда доривор воситалар ташувчи сифатида ишлатилади.

Агар ҳам яхши ташувчи ҳисобланади. Уни диэпоксид бирикмалар билан кимёвий тикиб хоссасини ошириш мумкин. Бундай агар иссиқликка чидамли, пишиқ ва осон модификацияланади.

Оксиллар ташувчи сифатида бир қанча афзалликларга эгадир: сиғимли, биодеградацияга учрайди, юпка мембрана (қалинлиги 80 мкм) сифатида фойдаланиш мумкин. Оксиллар фундаментал биологик тадқиқотларда, тиббиётда ишлатилади. Камчилиги эса юқори иммуногенликка эгалигидир. Иммобиллаш учун кўпроқ структурали (кератин, фибрин, коллаген), ҳаракатчан (миозин) ва ташувчи (альбумин) оксиллардан фойдаланилади.

Синтетик полимер ташувчилар ферментларни ковалент ва сорбционной иммобиллашда, гел ва микрокапсулаларни олишда ишлатилади. Сорбцион иммобиллашда стирол асосидаги полимерлар ишлатилади. Улар макропорали, изопорали структура, ҳамда гетеропорали структурага эга бўлади. Полимер гидрофиль ташувчилар олиш учун акрил кислотасининг ҳосиласи – акриламиддан олинади.

Фермент ва ҳужайраларни фазовий тўрли структурали полиакриламид гелга киритиш методи ҳозирда кенг қўлланилмоқда. Полиакриламид гели кимёвий таъсиротларга чидамлидир. Полиамид ташувчи гуруҳи ҳам кизиқарлидир. Бу амид гуруҳи (-C(O)-NH-) қайтарилиб келадиган турли гетерозанжирли полимерлар гуруҳидир. Масалан, N-винилпирролидон асосидаги полимерлар организмда секин парчаланадиган ферментларни иммобиллаш учун ишлатилади. Бундан ташқари улар биологик инерт бўлганлиги учун тиббиётда ҳам ишлатилади. Камчилиги эса унинг организмда тўпланиб қолишидир. Бу жиҳатдан ферментлар таъсирида гидролизланадиган табиий полимерлар аҳамиятлидир. Шунинг учун длори воситаларига декстран, синтетик ташувчилардан N-винилпирролидон асосида полимерлар қўшилади.

Ферментларни иммобиллаш методлари.

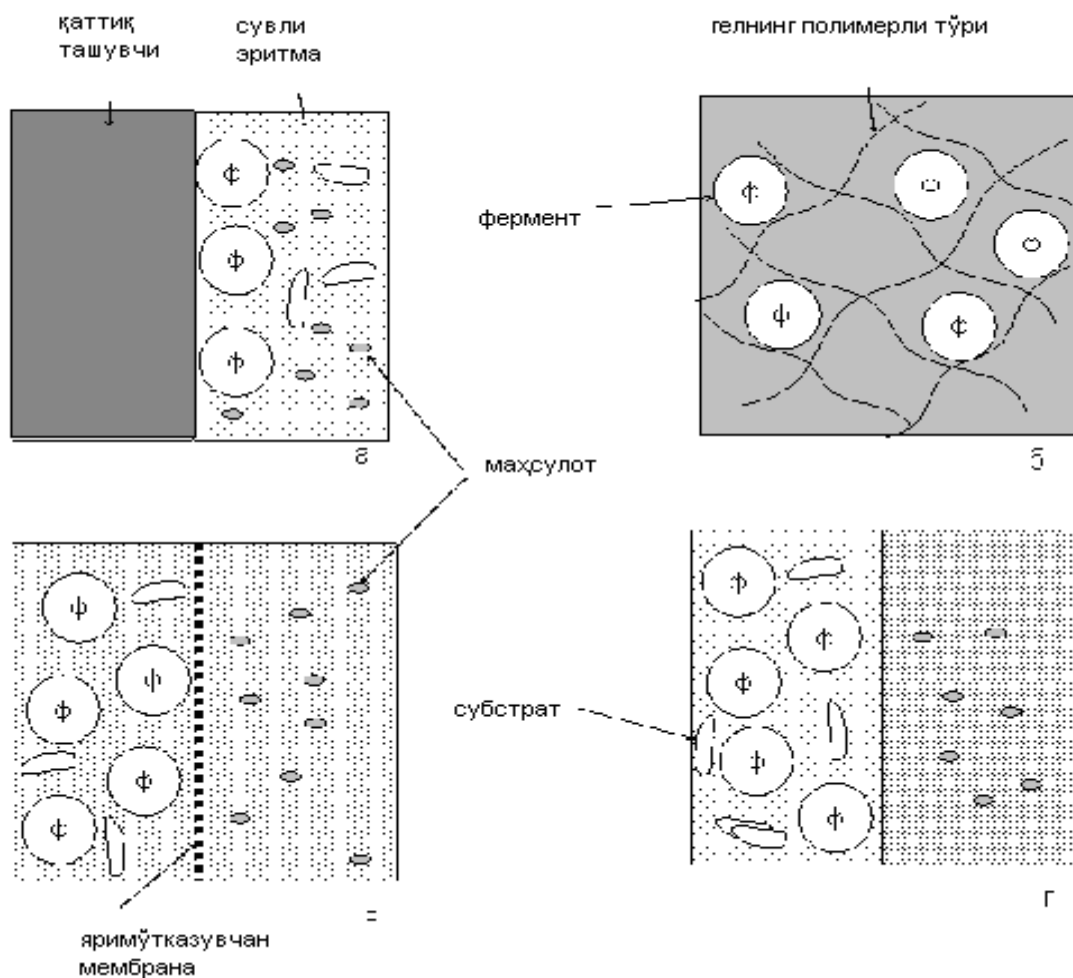
Ферментларни иммобиллаш икки хил метод билан амалга оширилади: физикавий ва кимёвий.

Ферментларни физикавий иммобиллаш – бу ферментни шундай бир муҳитга жойлаштириш бўлиб, бунда фермент умумий хажмининг бир қисмигина кира олади.

Физикавий иммобиллашда фермент билан ташувчи ковалент боғ билан боғланмайди. Ферментларни боғлашни 4 типи маълум:

- эримайдиган ташувчиларда адсорбцияланиш;
- гель порасига киритиш;
- яримўтказгич мембрана ёрдамида ферментни реакцион системанинг қолган хажмидан фазовий ажратиш;
- икки фазали муҳитга ўтказиш, бу ерда фермент эрийди ва фазалардан биридагина жойлашиши мумкин.

Бу усуллар қуйидаги расмларда келтирилган.



Расм. Ферментларни иммобиллаш усуллари: а - эримайдиган ташувчиларда адсорбцияланиш; б - гел порасига киритиш; в - яримўтказгич мембрана ёрдамида ферментни реакцион системанинг қолган хажмидан фазовий ажратиш; г - икки фазали муҳитга ўтказиш, бу ерда фермент эрийди ва фазалардан биридагина жойлашиши мумкин.

Адсорбцион иммобилизация ферментларни иммобиллашнинг қадимги усули бўлиб, унга 1916 йили асос солинган. Бу усул жуда осон ва у ферментнинг сувли эритмаси билан ташувчи орасидаги контакт ҳисобига амалга ошади. Адсорбцияланмаган оксил ювиб ташлангандан сўнг фермент ишлатишга тайёр бўлади. Ташувчининг юзасида ферментнинг адсорбцияланган молекуласи ташувчи ва оксилнинг юзаки гуруҳларининг Ван-дер-ваальс ўзаро таъсирлашуви, водород

боғлари, электростатик ва гидрофоб ўзаро таъсирлашувлар ҳисобига ушланиши мумкин. Ҳар бир боғланиш ташувчининг кимёвий табиати ва фермент молекуласининг юзасидаги функционал гуруҳларга боғлиқдир.

Ташувчи билан фермент ўртасидаги таъсир кучли бўлиб, биокатализаторнинг сорбцияси унинг структурасини бузиши мумкин. Масалан, баъзи ўсимлик ҳужайраларини цитодекс гранулаларида адсорбцияланишида ҳужайра девори ташувчи заррачаси юзасининг рельефени такрорлаб деформацияланиши мумкин. Адсорбцион иммобилизациянинг афзаллиги унинг қулайлиги ва сорбентларнинг арзонлигидадир. Уларга исталган конфигурацияни бериш ва керакли даражада ғовак қилиш имконияти мавжуд. Энг муҳими - бу методнинг оддийлигидир. Адсорбцион боғланишда ферментни тозалаш ҳам мумкин. Ушбу методнинг камчилиги ташувчи, ҳамда аниқ бир ферментни иммобиллаш учун оптимал шароитни тўғри танлай имконини берадиган умумий йўриқноманинг йўқлигидир.

Кўрсатилган камчиликларни иммобилланган ферментларни гелга киритиш билан бартараф қилиш мумкин. Ушбу методнинг мақсади – фермент молекуласини полимер занжирларидан тўқилган 3 фазали тўрға (гелга) ўтказишдир. Гелдаги қўшни занжирлар орасидаги ўртача масофа киритилган фермент молекуласининг размеридан кичикдир. Шунинг учун у полимер матрицани тарк этолмайди ва атрофдаги эритмага чиқолмайди, яъни иммобилланган ҳолатга бўла олмайди.

Ферментларни гелда иммобиллашнинг 2 та асосий усули маълум. Биринчисида фермент мономернинг сувли эритмасига солинади, кейин полимеризацияланади. Натижада полимерли гел ҳосил бўлади. Реакцион аралашмада кўпинча полимерга уч ўлчамли тўр структурасини берувчи бифункционал (молекуласида 2 та қўш боғи бор бўлган) агентлар қўшилади. Иккинчи ҳолатда фермент тайёр полимер эритмасига солинади ва унга гелсифат ҳолатга ўтказилади. Ферментларни полимер гелга киритиш билан иммобиллаш препаратга исталган геометрия конфигурация бериш билан бирга ташувчида биокатализаторларни текис тақсимлаш мумкин. Метод универсал ҳисобланади, деярли барча ферментлар, полифермент системалар, ҳужайра фрагментлари ва ҳужайраларни иммобиллаш учун қулай. Гелга киритилган фермент бактериялар билан зарарланишдан ҳимояланган.

Мембраналар ёрдамида ферментларни иммобиллашнинг моҳияти шундаки, бунда ферментнинг сувли эритмаси субстратнинг сувли эритмасидан яримўтказувчан мембрана ёрдамида ажратилади. Яримўтказувчан мембрана субстратнинг кичик молекулаларини осон ўтказиши, катта молекулаларни эса ўтказмайди.

Мембрана типидagi системадан фойдаланиш таркибида кўп миқдорда фермент бўлган иммобилланган препаратларни олиш имконини беради. Бу метод ҳам универсал ва қулай.

Икки фазали муҳит ёрдамида ферментни иммобиллашда фермент системанинг бир фазасидагина эрийди. Субстрат ва маҳсулот қайси фазада эришига қараб иккала фазааро тақсимланади. Фазаларнинг табиати маҳсулот қайси фазада тўпланиши ва у ерда фермент бўлмаслигига кўра танланади. реакция яқунлангандан сўнг бу фазани ажратиб ундан маҳсулот ажратиб олинади. Ферментли фазани эса навбатдаги жараёнда қайта ишлатиш мумкин.

Кимёвий метод билан иммобиллашда фермент молекуласи, хусусан оқсил, билан ташувчи ўртасида янги ковалент боғ ҳосил бўлади. Ушбу йўл билан

иммобилланган ферментларнинг препаратлари 2 та муҳим ютуққа эга. Биринчидан, ташувчи билан фермент ўртасидаги ковалент боғ ҳосил бўлган конъюгатнинг мустаҳкам бўлишини таъминлайди, ташқи муҳит омиллари, масалан рН, ҳарорат ўзгарганда фермент ташувчидан десорбцияланмайди, олинаётган маҳсулотларни ифлослантормайди. Бу эса тиббиёт ва озиқ овқатга мўлжалланган жараёнларни амалга оширишда жуда муҳим. Иккинчидан, ферментларни кимёвий модификациялаб уларнинг каталитик фаоллиги, барқарорлиги каби хоссасини ўзгартириш мумкин. Бунда ферментнинг фаол марказини иложи борича сақлаб қолиш керак.

10-МАЪРУЗА.

ҲУЖАЙРАЛАРНИ ИММОБИЛЛАШ

Режа:

1. Микроорганизм ҳужайраларини иммобиллаш
2. Ўсимлик ҳужайраларини иммобиллаш

Таянч сўзлар: ковалент боғлар, полифермент системалар, адсорбция, агрегация, метаболитлар, ферментатив фаоллик, инерт субстратлар.

Адабиётлар: 1,2, 5,6,7,10,11.

Микроорганизм ҳужайраларини иммобиллаш

Микроорганизмларнинг иммобилланган ҳужайралари ҳақидаги илк мақолалар XX асрнинг 70-йилларида пайдо бўлди, саноатда эса улар 1974 йили Японияда қўлланила бошланди. Микроорганизмларнинг иммобилланган ҳужайраларидан аспарагин кислотаси олинган.

Иммобилланган ҳужайралар иммобилланган ферментлар, ҳамда эркин ҳужайралардан ҳам бир қатор афзалликларга эгадир. Булар қуйидагилардир:

- ферментларни ажратиш ва тозалашга кетадиган ҳаражат сарфланмайди;
- реакция маҳсулотларини ажратиш ва тозалашга кетадиган сарф-ҳаражатларни камайтиради;
- нисбатан юқори фаоллик ва барқарорликка эга;
- узлуксиз ва ярим узлуксиз автоматлаштирилган жараёнларни яратиш имкони туғилади;
- экзоген кофакторларсиз полифермент системалар узоқ фаолият кўрсатиш хусусиятига эга бўлади.

Иммобилизациялаш учун турли ҳолатдаги, яъни тирик ва турли даражада зарарланган ҳужайралар ишлатилиши мумкин. Бир босқичли реакцияларни иккала ҳолатдаги ҳужайралар амалга ошира оладилар. Полиферментли реакцияларни эса тирик ҳужайраларни қўллаш билан амалга оширилади, бундай ҳужайралар узоқ вақт давомида АТФ ва коферментларни (НАДФ, НАД) ренегенерациялай олиши керак.

Иммобилланган микроорганизмларнинг ферментатив фаоллигидан фойдаланиш узоқ вақтларга бориб тақалади. Бундан 150 йил аввал сиркани тез олиш усули ёғоч қипиғига адсорбцияланган микроорганизмларга асосланган эди. Ҳужайраларни иммобиллаш ферментларни иммобиллаш методи билан жуда яқин.

Кимёвий иммобиллаш методи фаоллаштирилган ташувчи билан ковалент боғлар ҳосил қилишга асосланган.

Физикавий методлардан адсорбция ва агрегациядир.

Ҳужайраларни турли геллар, мембраналар, толаларга киритиш йўли билан иммобиллаш кимёвий ва физикавий ўзаро таъсирлашишларга асосланган. Кимёвий

методлар бошқа методларга нисбатан кам ишлатилади. Хужайралар кўпроқ геллар, мембраналар ва толаларга киритилади. Бундай иммобилланганда хужайралар узок вақт хаёт фаолиятини сақлаб қолади ва озука муҳитида кўпая олади. Иммобилланган хужайраларнинг биокаталитик фаоллиги ҳозирги вақтда фан ва техниканинг турли тармоқларида ишлатилади:

- аминокислотлар, органик кислоталар, антибиотиклар, стероидлар, углеводлар, углеводородлар, нуклеотидлар ва нуклеозидлар каби бирикмаларнинг биосинтези ва трансформацияда;
- пиво ва вино ишлаб чиқаришда;
- оқава ва табиий сув ҳавзаларини тозалашда;
- оқава сувларни металллардан тозалашда;
- қуёш энергиясининг ассимиляциясида;
- водородли қуёш элементларини тайёрлашда;
- азотфиксацияда;
- аналитик мақсадларда электродларни тайёрлашда.

Микроорганизм хужайраларини иммобиллаш, айниқса, аминокислоталар, органик кислоталар ва антибиотикларни синтезлаш бўйича япон олимлари томонидан кўплаб ишлар қилинган. Москва давлат университетида аспарагин кислотасини олиш методи яратилган. Полиакриламид гелга киритилган *E.coli* хужайралари аспарагин кислотасини олиш учун жуда қулайдир.

Микроорганизмлардан ташқари, физиологик фаол бирикмаларни синтезлаш мақсадида ўсимлик ва ҳайвон хужайраларини ҳам иммобиллаш мумкин.

Хужайра органелларини ҳам иммобиллаш билан ҳозирда катта имкониятлар очилмоқда. Бу эса, биотехнологиянинг иммобилланган хужайраларни қўллаш билан боғлиқ йўналишининг истикболли эканлигини исботлайди.

Ўсимлик хужайраларини иммобиллаш. Ўсимликларнинг тўқима ва хужайра культуралари иккиламчи метаболитларни олиш учун асосий манба ҳисобланади. Иккиламчи метаболитларни кўплаб миқдорда олиш учун ўсимлик тўқима ва хужайраларини иммобиллаш методи ишлаб чиқилган. 1966 йилда Мосбах *Umbilicaria pustulata* лишайнигининг хужайраларини полиакриламидли гелга киритган. Бир йилдан сўнг ван Вецель ДЭАЭ микрошарчаларида ҳайвон эмбриони хужайраларини иммобиллаган. Кейинчалик хужайралар, асосан микроорганизм хужайралари турли субстратларда иммобиллана бошланди. Хужайраларни иммобиллашнинг 4 хил методи бор:

1. Хужайра ёки хужайра органелларини инерт субстратда (*Catharanthus roseus* хужайралари, Digit ДЭАЭ, агарозали шарчалар, желатин ва б.) иммобиллаш.

2. Хужайраларни инерт субстратларда адсорбциялаш. Хужайралар альгинат, полистирол ва полиакриламид билан зарядланган шарчаларга ёпиштирилади. Бу метод билан ҳайвон хужайралари ва *Saccharomyces uvarum*, *S. cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *E. Coli* хужайралари иммобилланган.

3. Хужайраларни биологик макромолекулалар (масалан, лектин) ёрдамида инерт субстратда адсорбциялаш. Кам ишлатиладиган методдир.

4. КМЦ типигаги бошқа инерт ташувчи билан ковалент боғлаш. Бу метод ҳам кам ишлатилади.

Кейинги пайтларда ўсимлик ҳужайраларини иммобиллашга қизиқиш ортган. Бунинг сабаби, суспензион ёки каллус культураларига нисбатан иммобилланган ҳужайралар ёрдамида иккиламчи метаболитлар кўплаб олинади.

Иммобилланган ҳужайралар бир қанча афзалликка эга:

1. Инерт субстратларда иммобилланган ҳужайралар суяқ суспензион культурада ўсувчи ҳужайраларга нисбатан биомассани секинроқ ҳосил қилади. Бу ердаги ўсиш ва метаболизм ўртасидаги боғлиқлик 2 типдаги механизм орқали амалга ошади. 1-механизм бўйича ўсиш иккиламчи метаболитлар синтезига билвосита таъсир этиб ҳужайранинг агрегацияланиш даражасини белгилаб беришига асосланган. 2-механизм эса ўсиш тезлигининг кинетикаси билан боғлиқдир. Бунда метаболизмнинг биринчи ва иккинчи йўллари турлича рақобатлашади. Муҳит шароити тез ўсиш учун қулай бўлса, биринчи навбатда иккиламчи метаболитлар синтезлана бошлайди. Тез ўсиш блокланган ҳолда эса биринчи навбатда бирламчи метаболитлар синтезланади. Шундай қилиб, иммобилланган ҳужайраларнинг ўсиш тезлигининг паст бўлиши метаболитларни ҳосил бўлишини орттиради.

2. Иммобилланган ҳужайралар секин ўсишидан ташқари бир-бири билан физик контактда ўсади ва бу кимёвий контактларда ўз аксини топади.

3. Атроф-муҳитнинг кимёвий таркибини ўзгартириш билан иккиламчи метаболитларни ҳосил бўлишини бошқариш мумкин.

4. Каллус ва суспензион культуралар ўстириляётган муҳитни ўзгартиришда уларни зарарлаш ёки культурани ифлослантириш мумкин. Бу қийинчиликларни физик жиҳатдан ҳаракатсиз ҳужайралар атрофидаги катта ҳажмдаги озуқа муҳитини циркуляция қилиш билан бартараф этилади.

5. Айрим ҳолларда идиоцитларни ажратиш билан боғлиқ муаммолар келиб чиқади.

Иммобилланган ҳужайралардан фойдаланганда керакли маҳсулотларни ажратувчи кимёвий моддалар билан ишлаш мумкин. Айрим ўсимликларнинг, масалан *Capsicum frutescens* ўсимлиги ҳужайрасининг культураси иккиламчи метаболитларни атроф-муҳитга ажратади. Иммобилланган ҳужайралар системаси эса культурани зарарламасдан маҳсулотни олиш имконини беради. Демак, ҳужайраларни иммобиллаш идиоцитларни осон изоляциялаш имконини беради.

Иммобилланган ҳужайралар культурасини олиш 2 хил системада амалга оширилади:

1. Ясси асосли культура системасида ҳужайралар идишга горизонтал идишда ўстирилади.

2. Колонкали культура системасида ҳужайралар вертикал идишда ўстирилади.

Иккала системада ҳам суяқ муҳит ҳаракатсиз ҳужайралар атрофини циркуляциялайди.

11-МАЪРУЗА

АТРОФ-МУҲИТНИ МУҲОФАЗА ҚИЛИШДА ЎСИМЛИК ВА МИКРООРГАНИЗМЛАРНИНГ РОЛИ

Режа:

1. Чиқиндиларнинг табиати ва миқдори

2. Микробли деградация ва биоконверсия

3. Саноат микробиологияси ва генетика

Таянч сўзлар: биомасса, чиқиндилар, биоконверсия, микробли деградация, амплификация.

Адабиётлар: 1,2,3,8,9,10,,12, 13.

Қишлоқ хўжалиги, ўрмон ва озиқ-овқат саноати чиқиндиларидан турли мақсадларда, хусусан, биомассани ошириш, ҳамда ундан энергия олиш ва шу йўл билан атроф-муҳит ифлосланишини камайтиришда ишлатилади. Уларни микроорганизмлар ёрдамида бижғидиган бирикмаларгача парчалаш ёки уларни оксилларга айлантириш мумкин. Оқава сувларда сув ўтларини культурасини кўпайтириб, нафақат сувларни тозалаш, балки оксил ва микроэлементларга бой биомасса олиш мумкин.

Кўплаб чиқинди ва йўлдош маҳсулотларни қайта ишлаш мумкин. Маълумотларга кўра турли бошоқли ўсимликлардан тахминан 1700 млн. т. сомон чиқади ва буларнинг кўп қисми ишлатилмайди. Ёки ананасни консервациялашда унинг 20%игина ишлатилади, асосий қисми эса чиқиндига чиқади. Унинг меваси, пўсти ва бошқа чиқиндилари шарбат олиш учун эзилади, куритилган қолдиқлари эса молларга ем сифатида берилади. Спиртли бижғитиш билан ушбу заводлардан оқизиладиган чиқиндиларни камайтириш мумкин.

Бижғиш давомида турли органик моддаларни алмашилиши билан боғлиқ бўлган биотехнологик жараёнлар атроф-муҳитни ҳам кимёвий ҳам биологик жиҳатдан ифлослантиради. 1970 йилларнинг бошларида ўтказилган тадқиқотларга кўра фармацевтикада ишлатиладиган ферментация – бу **ифлосланишнинг асосий манбаидир**. Масалан, бу антибиотиклар олинадиган ишлаб чиқаришга хосдир. Ферментациянинг чиқиндилари маълум бир метаболитик маҳсулотларнинг микробли хужайралари ва озуқа муҳитининг ишлатилмаган компонентлари ҳисобланади.

Таркибида углевод бўлган чиқинди ва йўлдош маҳсулотларни анъанавий микробли бижғиш ёки биотехнологик жараёнлар йўли билан қайта ишлаш мумкин. Масалан, сахарозани кристаллаш учун бошланғич сироп ҳисобланган ва технологик циклдан чиқариб ташланадиган **меласса** – шакар олишдаги йўлдош маҳсулот ҳисобланади. Унинг таркибида шакардан ташқари сульфитлар, карбонатлар ва кальций, магний тузлари мавжуд. Мелассани бижғиш давомида қолган шакарнинг ҳаммаси ҳам ишлатилмайди.

Крахмал донларнинг, картофель ва маниокнинг куруқ массасини 50%ини ташкил этади. Бу маҳсулот жўҳори ва маниокдан олинади. У кислотали ёки ферментатив гидролизга осон учрайди ва ундан декстрин ва глбкоза олинади. Ушбу гексозалардан спирт ва фруктозали сироп олишда фойдаланилади.

Целлюлоза ва гемицеллюлозани микробли деградация ва конверсияга учратиб этил спирти ёки кимёвий саноат учун хомашё олиш мумкин. *Clostridium thermosellum* таркибидаги целлюлаза ва гемицеллюлаза генларини *lostridium* нинг бошқа турларига ўтказиб целлюлоза ва гемицеллюлозани этил спирти, ацетон, сирка ва сут кислотасига айлантириш мумкин.

Биоконверсия – метаболитларни микроб хужайралари ёрдамида ўзига яқин бўлган бирикмаларга айланишидир. Шу билан бирга микроорганизмлар кимёвий

синтезнинг муҳим ва мураккаб жараёнларнинг маълум бир босқичига таъсир қилади.

Биоконверсиянинг қадимги тури – сирка олиш жараёнида этил спиртини сирка кислотага айланишидир.

Биоконверсия бир типдаги реакция ва маълум бир структура (стереоспецификлик) билан боғлиқлиги сабабли ўзига хосдир. Биоконверсияда изопропанол ацетонга, глицерин дигидроацетонга, L-тирозин L-диоксифенилаланинга, глюкоза глюкон кислотага ва охирида 2-кетоглюкон ёки 5-кетоглюкон кислотага ва сорбит L-сорбозага айланади. Сорбитнинг сорбозага биоконверсияси кимёвий саноатдаги ягона биологик реакциядир.

Биоконверсияга асосланган методлар ёрдамида стероид гормонлар синтез қилинган. 1930 йилнинг бошларида Кендалл ва Райхштейн буйрак ости безидан ревматоид артритни даволашда ишлатиладиган кортизон ажратиб олишган. Кортизон синтезининг биринчи оралиқ маҳсулоти прогесторондир. Биоконверсия 37⁰С ҳароратда сувли муҳитда ва атмосфера босимида олиб борилади. Ҳозирги кунга келиб стероид ядросининг углерод атомини маълум бир микроорганизмлар ёрдамида гидроксиллаш ва керакли стероидни олиш мумкин.

Микроорганизмлар стероидларни олиш учун хомашёни (масалан, стеринлар) ишлаб чиқаришда ҳам ишлатилади.

Баъзи ҳолларда биоконверсияни амалга ошириш учун аралаш культуралар ёки микроб штаммларини кетма-кет қўшиш керак бўлади. Буларнинг ҳар бири биоконверсиянинг ўзига хос босқичини амалга оширади. Имобилланган ҳужайралардан фойдаланиш ферментларга нисбатан биоконверсия самарадорлигини оширади ва унинг сарф-ҳаражати камайтиради.

Микроорганизмларнинг саноатда ишлатиладиган штаммларини қўллаш учун 2 усулдан фойдаланилади: штаммларни скрининги ва ажратиб олишда юзага келадиган қийинчиликларни бартараф этиш учун ДНКнинг махсус участкаларида **мутацияларни индукциялаш**; ген инженерияси ва табиий жинсий жараёни кенгайтириш учун **протопластларни қўшилиши**; табиий генларни ўтказиш ва янги генларни реконструкция қилиш учун **рекомбинант ДНКни қўллаш**.

Микроб ҳужайраларида маълум бир ген нусхаси сонини кўпайтириш **генларни амплификациялаш** орқали амалга оширилади ва натижада ушбу геном кодлайдиган маҳсулот ишлаб чиқариш кескин ортади. Бундай техник ёндашув ҳужайрада плазмидалар сонини кўпайтириш билан боғлиқдир. Одатда битта ҳужайрага 1-30 та нусха тўғри келади ва 2-250 ген мавжуд. Шу билан бирга ҳужайрада плазида генлари 3000 нусхагача оширилган. Генларни амплификациялаш *E.coli*нинг учун кенг ишлатилган. Ҳозирга келиб исталган хромосома гени ёки генлар гуруҳини плазидага ўтказиш, сўнгра плазмидани амплификациялаш учун ичак таёқчасига ўтказишга эришилган. Ундан ташқари бир ҳужайрадан бошқасига полиэтиленгликол иштирокида трансформациялаш йўли билан *Basillus* плазмидаси ўтказилган. *Pseudomonas* плазмидаларини эса бошқа грамманфий бактерияларга ўтказилган. Шу йўл билан антибиотиклар кўп миқдорда олинади.

12-МАЪРУЗА.

СУВНИ БИОЛОГИК ТОЗАЛАШ

Режа:

1. Микроорганизмлар атроф-муҳит ифлосланишининг назоратчиси сифатида
2. Ген инженерлиги ёрдамида микроб штамmlарини яратиш.

Таянч сўзлар: аэроб ва анаэроб микроорганизмлар, микроб штамmlари, детоксификация.

Адабиётлар: 1,2,3,4,13.

Аэроб ва анаэроб микроорганизмлар оқава сувларда учрайдиган органик материаллардан тозалаш хусусиятига эга. Ачитқи, нефтни қайта ишлаш заводи, сут ва пишлоқ ишлаб чиқарувчи корхоналар, картофель ва крахмални қайта ишловчи заводлардан чиқадиган чиқиндиларни анаэроб жараён ёрдамида тозалаш бўйича катта муваффақиятларга эришилган. Бу жараёнда фаол биологик компонентлар қайта ишлатилади, қолдиқ маҳсулотлар камаяди, сезиларли даражада нохуш ҳидлар тарқалиши камайтиради. Энг муҳими метан ҳосил бўлади.

Булардан ташқари кимёвий зарарланиш (биоцидларнинг деструкцияланиши каби)нинг назорат қилиш учун микроб штамmlаридан фойдаланилади.

Pseudomonas турига мансуб бактерияларда оксиредуктаза ёки гидроксилазалар бўлиб, улар юкори токсик, углеводородлар ва ароматик бирикмаларни парчалаш хусусиятига эгадир. *Pseudomonas* нинг айрим штамmlари таркибида ушбу ферментларни кодловчи генлар плазмида таркибида учрайди. Бундай плазмидаларнинг 4 хили мавжуд: OCT (октан ва ва деканни парчаланиши), ХУL (ксиллол ва толуолни парчаланиши), САМ (камфорани парчаланиши) ва НАН (нафталинни парчаланиши). САМ ва НАН плазмидалари бактериал хужайраларни чатиштириб ўзининг ўтказувчанлигини таъминлайди, қолган плазмидалар эса бактерияга бошқа плазмидалар киритилгандагина ўтказилиши мумкин.

Кейинчалик бу штамmlарнинг гибрид плазмидалари олинган бўлиб, улар тозаланмаган нефтда бошқа штамmlарга нисбатан углеводородларни метаболитлаш хусусиятига эгадир. Улар ёрдамида ҳарорат ва бошқа омилларни назорат қилган ҳолда оқар сувларни тозалаш мумкин.

Айрим микроблар молекулаларни шундай ўзгартириш хоссасига эгаки, уларнинг ўзи бошқа микроблар таъсирида парчаланади. Бундай «кометаболизм»ни Дафтон ва Хси (Калифорния университети) кучли токсик паратион инсектицидини *Pseudomonas*нинг 2 та штамми таъсирида парчаланишини кўрсатиб беришган.

Токсик молекуланинг кимёвий ўзгаришининг натижаси тўлиқ парчаланиш эмас, балки детоксификациядир: фосфорилланиш, метилланиш, ацетилланиш ва б.лардир. Детоксификацияни катализловчи ферментлар плазмида таркибидаги генлар билан кодланади. Олимлар кучли ва кўп ишлатиладиган гербицид – 2,4,5-Т (2,4,5-трихлорфеноксисирка кислотаси)ни метаболитловчи микроб культурасини олишга эришганлар. Улар тозалаш станцияларидан бир нечта микроорганизмларни ажратиб олиб уларни органик бирикмаларни плазмидаси таркибида парчаловчи ферментларни кодлайдиган гени бўлган бошқа бактериал штамmlар билан аралаштирганлар. Сўнг аралашма фақатгина 2,4,4-Тда хемостатда ўстирилган. 10 ойдан сўнг бактерияларнинг ўсиш суръати 2,4,5-Тнинг бактерияларнинг ўсиши учун ишлатилиши ҳисобига тезлашган.

Ген инженерлиги методлари асосида бундай натижаларга эришиш кўзда тутилмоқда. Бу кўплаб бирикмаларни (кимёвий саноатда ажраладиган ва

биопарчаланмайдиган) бузиш хусусияти ва ассимиляция қилувчи микроб штаммларини конструкциялаш муаммосини ечишга хизмат қилади.

13-МАЪРУЗА.

МИКРООРГАНИЗМЛАР ЁРДАМИДА БИОМАССАДАН ЭНЕРГИЯ ОЛИШ: БИОЭНЕРГИЯ

Режа:

1. Биомасса ва энергия.
2. Этил спиртининг олиниши
3. Биометаногенез
4. Биоэнергия

Таянч сўзлар: биомасса, метаногенез, ацидогенез, этил спирти, фотолиз, хлорофиллар/

Адабиётлар: 1,2,3,4,5,6.

Ер шарининг ўсимлик қатлами 1800 млрд.т. куруқ моддани (энергетик жиҳатдан 30×10^{21} Дж га эквивалент) ташкил қилади. Бу кўрсаткич фойдали қазилмаларнинг энергия захираларига мос келади. Маълумки, биомассанинг энергетик потенциалининг аксарият қисми инсон томонидан ишлатилади.

Куруқ модда учун биомассанинг энергияга айланишининг энг оддий усули ёниш бўлиб, бунинг натижасида у иссиқлик билан таъминлайди, у ўз навбатида механик ёки электрик энергияга айланади. Нам моддага келсак, унинг қадимги ва самарали усули биогаз (метан) олинишидир.

Булардан ташқари энергияни махсус ўстирилган кишлок хўжалиги ўсимликларидан ҳам олиш мумкин. Булар тез ўсувчи дарахтлар плантацияси ҳамда углеводга бой ўсимликлардир. Бундай ўсимликлар таркибидаги углеводлар гидролизланиб гексозага, бу ўз навбатида спиртли бижғишга учрайди.

Этил спиртини олиниши. Этил спиртини бундай ўсимлик биомассасидан олиш учун аввал улар экстракция қилинади ва микробли бижғиш йўли билан унинг захирасидаги углеводлар микроорганизмлар ёрдамида гидролизланади.

Этил спирти 2 усул билан, яъни **кимёвий синтезлаш** ва **ферментатив** усулда олинади.

Кимёвий синтезда этилен (нефть ёки табиий газдан олинади) юқори температурада сув ва катализаторлар иштирокида конвертацияланади. XX аср бошларида этанол бижғиш йўли билан олинади.

Этил спирти олиндиган ўсимликлар қаторига маниок, бошоқли ўсимликлар, айникса жўхори (углевод захираси крахмал) ва ернок (углевод захираси инулин) киради. Булардан ташқари шакар қамиш, ананас, қанд лавлаги ва сорго (углевод захираси сахароза) ишлатилади. Бу ўсимликларнинг культураси ҳозирда кенг миқёсда ўстирилмоқда.

Этанол ишлаб чиқаришни мукаммаллаштириш тўхтовсиз бижғиш технологиясини яратишга қаратилгандир.

Метанли “бижғиш” ёки **биометаногенез** 1776 й. Вольт томонидан очилган бўлиб, у биринчи марта ботқоқ газ таркибида метан борлигини аниқлаган. Ушбу жараён давомида олинадиган биогаз таркибида 65% метан, 30% CO₂, 1% H₂S ва кам миқдорда азот, кислород, водород мавжуд. У кўк рангда ёнади ва ҳидсиз. 28 м³ биогазда йиғилган биогаз 16,8 м³ табиий газ, 20,8 л нефть ёки 18,4 л дизель ёқилғисига эквивалентдир.

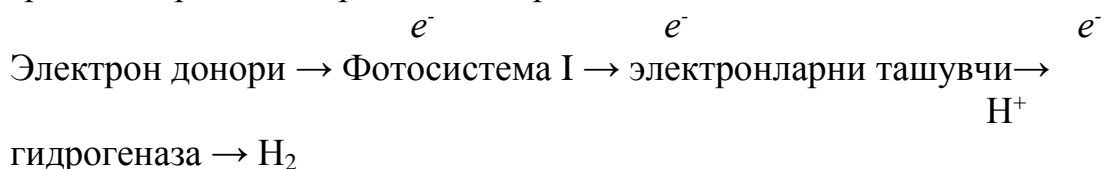
Биометаногенез 3 босқичда амалга оширилади: органик бирикмаларни эритиш ва гидролизлаш, ацидогенез ва метаногенез. Бу жараёнда 3 та гуруҳ бактериялар иштирок этади. 1 гуруҳ бактериялар мураккаб органик субстратларни мой, пропион ва суг кислотасига айлантиради; иккинчилари, бу органик кислоталарни сирка кислота, водород ва CO₂, сўнг метан ҳосил қилувчи бактериялар водородни ютиб CO₂ ни метанга айлантирадилар.

Биокимёвий нуқтаи назардан биометаногенез анаэроб нафас олишнинг ўзидир. Бу жараёнда ҳам электронлар органик моддалардан CO₂га берилади, сўнг у метанга айланади.

Биометаногенез сув ўтказмайдиган цилиндрик цистерналар (дайджестерлар)да олиб борилади. Бундай йўл билан биогаз олиниши Ҳиндистон, Хитой каби мамлакатларда кенг қўлланилади.

Ўзбекистонда кенг майдонни ғўза, каноп, тамаки, кунгабоқар ўсимликлари эгаллайди. Ғўза поясидан ҳозиргача спирт, қоғоз олинган бўлса, бошқа ўсимликлар шунчаки ёқиб юборилган. Ўзбекистон олимлари Ушбу чиқиндилардан экологик иссиқликни яхши сақлаш хусусиятига эга бўлган тоза қурилиш материалларини олиш технологияларини ишлаб чиқилган.

Қуёш нурининг энергияга айланиши. 1960-йиларнинг бошларида исмалоқ баргидан ажратиб олинган хлоропластлар электронларнинг сунъий донори ва бактериал экстракт иштирокида водород ҳосил қилиши аниқланган.



Кейинчалик эса исмалоқ экстракти ва таркибида гидрогеназа бўлган бактериал экстрактлар кўринадиган нур билан нурлантирилганда водород ажратиши мумкинлиги аниқланган. Бундай ҳолда хлоропластнинг I ва II фотохимик системалари иштирок этади. *Clostridium* дан ажратиб олинган гидрогеназа кислородга нисбатан сезгирдир ва сув фотолизи натижасида ажраладиган кислородни йўқотиш учун реакция азотга реоксидловчилари қўшилган атмосферада олиб борилади.

Бу йўл билан энергия олиш бир қанча афзалликларга эга:

- Фотолиз субстрат кўп миқдорда эканлиги;
- Энергия манбаи чекланмаган (қуёш энергияси);
- Маҳсулот (водород)ни атмосферани ифлослантормасдан сақлаш мумкин;
- Жараёни тиклаш мумкин;

- Оралиқ токсик маҳсулотлар ҳосил бўлмайди ва номал температурада олиб борилади.

Кислородни кўп миқдорда олиш учун кислородга нисбатан кам сезгир бўлган гидрогеназани танлаб олиш керак. *Alcaligenes* бактериясидан олинган гидрогеназалар аралашмадан водороднинг секин ҳосил бўлишини катализлайди.

Фойдаланилган адабиётлар:

1. Альбер Сассон. Биотехнология: свершения и надежды. Издательство «Мир», 1987.
2. А.Н.Евтушенков, Ю.К.Фомичев. Введение в биотехнологию. Курс лекций. Минск, БГУ, 2002
3. Кузьмина Н.А. Основы биотехнологии.
4. Рахимов М.М., Реут Е.Н., Садыкова К.А. Методические указания по проведению практических занятий по курсу «Инженерная энзимология». НУУ им.М.Улугбека, Ташкент, 2003
5. <http://www.study.online.ks.ua/>
6. <http://journal.issep.rssi.ru>
7. Лещинская И.Б. Генетическая инженерия // СОЖ, 1996, № 1
8. Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений // СОЖ, 1998, № 6
9. Лтова Л.А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды // СОЖ, 2000, № 10
10. Семенова М.Л. Зачем нужны трансгенные животные // СОЖ, 2001, № 4
11. Корочкин Л.И. Клонирование животных // СОЖ, 1999, № 4
12. Абелев Г.И. Моноклональные антитела // СОЖ, 1998, № 1
13. Лещинская. Современная промышленная микробиология // СОЖ, 2000, № 4

1-МАЪРУЗА. КИРИШ

1. Биотехнологиянинг ривожланиш тарихи
2. Биотехнологиянинг предмети ва вазифалари
3. Биотехнологиянинг замонавий йўналишлари
4. Биотехнологиянинг саноат, соғлиқни сақлаш ва қишлоқ хўжалигидаги аҳамияти
5. Биотехнологияда қўлланиладиган асосий методлар.
6. Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланиши

2-МАЪРУЗА. БИОТЕХНОЛОГИЯНИНГ ОБЪЕКТЛАРИ. МИКРООРГАНИЗМЛАР ВА УЛАР ЁРДАМИДА ФОЙДАЛИ МОДДАЛАРНИ ОЛИНИШИ.

1. Биотехнологиянинг объектлари
2. Микробли синтез
3. Бирламчи метаболитларни олиниши
4. Иккиламчи метаболитларни олиниши
5. Селекция.
6. Индуцирланган мутагенез.
7. Фермент индукцияси

3- МАЪРУЗА. ГЕН ИНЖЕНЕРЛИГИНИНГ МОДДИЙ АСОСЛАРИ

1. Хужайрани кўпайтириш тизими.
2. Генетик ахборот ташилишига масъул молекуляр механизмлар.
3. Транскрипция ва трансляция.
4. ДНК синтези.
5. Генларнинг тузилиши: интронлар ва экзонлар

4-МАЪРУЗА. ГЕН ИНЖЕНЕРЛИГИНИНГ ФЕРМЕНТЛАРИ

1. Рестриктазалар ва уларнинг таснифи.
2. Қайтар транскриптазалар
3. Лигазалар.

5-МАЪРУЗА. РЕКОМБИНАНТ ДНК ҲОСИЛ ҚИЛИШ МЕТОДЛАРИ

1. *In vitro* шароитида генетик рекомбинацияни амалга ошириш
2. Бактерия хужайраларига ДНКни киритиш методлари
3. Бактерия хужайрасига рекомбинант ДНКни экспрессия қилиниши.
4. Ичак таёқчаси хужайраларида инсон инсулинини биосинтезлаш.
5. Ичак таёқчаси хужайраларида инсон ўсиш гормонини биосинтезлаш.

6- МАЪРУЗА. ЎСИМЛИКЛАР ВА ҲАЙВОНЛАР ГЕН ИНЖЕНЕРЛИГИ

1. Ўсимлик хужайраларига генларни киритиш.
2. Трансген ўсимликларга генетик материалларни экспрессияси.
3. Трансген ўсимликларнинг яратилиши ва аҳамияти.
4. Ҳайвонлар ген инженерлиги.
5. Вирус генларини жойлаштириш ва кўчириш

7-МАЪРУЗА. ҲУЖАЙРА ИНЖЕНЕРЛИГИ

1. Каллус хужайралари культураларини олиш
2. Протопластларни ажратиш олиш
3. Протопластлар культурасини олиш
4. Протопластларни қўшилиши

5. Соматик ҳужайралар гибридизацияси

8-МАЪРУЗА. ФЕРМЕНТЛАР ИНЖЕНЕРЛИГИ

1. Ферментлар инженерлигининг асосий вазифаси.
2. Микроорганизмлардан фермент препаратларини ажратиб олиш усуллари
3. Тозаланмаган, комплекс фермент препаратларининг олиниши.
4. Чўктириш усуллари ва унинг назарияси.
5. Ферментларни тозалаш усуллари.

9-МАЪРУЗА. ФЕРМЕНТЛАРНИ ИММОБИЛЛАШ ВА БАРҚАРОРЛАШ ТЕХНОЛОГИЯСИ

1. Имобилланган ферментлар.
2. Ферментларни имобиллашда ишлатиладиган полимерлар.
3. Полимерларга қўйиладиган талаблар.
4. Ферментларни физикавий имобиллаш.
5. Ферментларни кимёвий имобиллаш.
6. Микроорганизм ҳужайраларини имобиллаш.
7. Ўсимлик ҳужайраларини имобиллаш.

10-МАЪРУЗА. ҲУЖАЙРАЛАРНИ ИММОБИЛЛАШ

1. Микроорганизм ҳужайраларини имобиллаш
2. Ўсимлик ҳужайраларини имобиллаш

11-МАЪРУЗА. АТРОФ-МУҲИТНИ МУҲОФАЗА ҚИЛИШДА ЎСИМЛИК ВА МИКРООРГАНИЗМЛАРНИНГ РОЛИ

1. Чиқиндиларнинг табиати ва миқдори
2. Микробли деградация ва биоконверсия
3. Саноат микробиологияси ва генетика

12-МАЪРУЗА. СУВНИ БИОЛОГИК ТОЗАЛАШ

1. Микроорганизмлар атроф-муҳит ифлосланишининг назоратчиси сифатида
2. Ген инженерлиги ёрдамида микроб штамmlарини яратиш.

13-МАЪРУЗА. МИКРООРГАНИЗМЛАР ЁРДАМИДА БИОМАССАДАН ЭНЕРГИЯ ОЛИШ: БИОЭНЕРГИЯ

1. Биомасса ва энергия.
2. Этил спиртининг олиниши
3. Биометаногенез
4. Биоэнергия