

**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY VA O‘RTA MAXSUS
TA‘LIM VAZIRLIGI**

**ISLOM KARIMOV NOMIDAGI TOSHKENT DAVLAT TEXNIKA
UNIVERSITETI**

BIOTEXNOLOGIYA ASOSLARI

fanidan laboratoriya ishlarini bajarish uchun

USLUBIY QO‘LLANMA

Toshkent 2019

Biotexnologiya asoslari fanidan laboratoriya ishlarini bajarish uchun uslubiy qo‘llanma / Sattarov M.E., Parpiyev Z.T. – Toshkent.: ToshDTU, 2019. – 46 b.

Biotexnologiya asoslari fanidan laboratoriya ishlarini bajarish uchun tayyorlangan ushbu uslubiy qo‘llanma 5320500-biotexnologiya (oziq-ovqat, ozuqa, kimyo va qishloq xo‘jaligi) yo‘nalishida tahsil olayotgan bakalavriat talabalari uchun mo‘ljallangan.

Islom Karimov nomidagi Toshkent davlat texnika universiteti ilmiy-uslubiy kengashi qaroriga asosan chop etildi

Taqrizchilar:

Bekmuxamedova N.K. – O‘zR FA Mikrobiologiya instituti ilmiy kotibi, biologiya fanlari nomzodi, katta ilmiy xodim.

Nazarov K.K. – ToshDTU “Biotexnologiya” kafedrasi mudiri, biologiya fanlari nomzodi, dotsent.

Kirish. Biotexnologiya haqida umumiy tushunchalar

O'zbekiston respublikasi mustaqillikka erishgandan so'ng qishloq xo'jaligi, farmatsevtika, to'qimachilik, maishiy vositalar va oziq-ovqat ishlab chiqarish sohasiga bo'lgan munosabat tubdan o'zgardi. Chunki ekologik toza, arzon, tabiat va inson organizmi uchun xavfsiz mahsulotlarni yaratish, ularni ishlab chiqarish bugunning eng muhim masalalari qatoriga kirmoqda. Shu boisdan qishloq xo'jaligi, farmatsevtika, to'qimachilik, oziq-ovqat mahsulotlari va boshqa ishlab chiqarish sohasi mutaxassisleri jahon xalq xo'jaligida keng ko'lamda qo'llanilayotgan biotexnologiya fanining zamonaviy ko'rinishlari, jumladan gen muhandisligi usullarini mukammal egallashlari va amaliyotga tatbiq eta olishlari lozimligini davrning o'zi taqazo etmoqda.

Biotexnologiya – yoki biologik jarayonlar texnologiyasi – biologik agentlar yoki ularning majmualaridan (mikroorganizmlar, o'simliklar va hayvon hujayralari, ularning komponentlaridan) kerakli mahsulotlar ishlab chiqarish maqsadida sanoatda foydalanish degan ma'noni beradi.

Adabiyotlarda "Biotexnologiya" atamasiga mutaxassis olimlar tomonidan turli xil ta'riflar berib kelinmoqdaki, fanning hozirgi rivojlangan davrida ham birorta aniq to'xtamga kelinmagan. Quyida biotexnologiya sohasining yetuk olimlari tomonidan ushbu terminga berilgan ta'riflarga to'xtalib o'tamiz.

a) Anbash, A. Xemferi, N. Millislarning (1975) fikriga ko'ra "Biotexnologiya" – yangi biokimyoviy ishlab chiqarishlar mahsulidir (vitaminlar, antibiotiklar).

b) "Biotexnologiya" moddalarni biosintez usuli orqali oziq olish fanining bo'limi bo'lib, u "bioinjeneriya" sohasi bilan bog'liqdir.

v) A. Xasting (1983) fikri bo'yicha "Biotexnologiya" – pivo, vino, pishloq, vitaminlarni sanoat asosida olish jarayonidir.

g) 1980 yil Yevropa Federatsiyasi Kengashi muhokamasida "Biotexnologiya" – biologik tizimlarni sanoat asosidagi jarayon deb qaralgan.

d) 1983 yil Bratislavada bo'lib o'tgan kengashda "Biotexnologiya" – moddalarni katta miqdordagi sanoat asosida (biokatalizatorlar orqali) olish va atrof-muhitni himoya qiladigan fan deb ta'riflangan.

e) A.A. Baeyev (1986), Yu.A. Ovchinnikov (1982) "Biotexnologiya" biologik jarayonlarni ishlab chiqarishga joriy etish to'g'risidagi fan deb ta'riflashgan.

Biotexnologiya jarayonlaridan mikroorganizmlar, o'simlik va hayvon hujayralari, ulardan ajratilgan fermentlar, hujayra organellalari, ularni o'rab turgan membranalar sof yoki immobillashgan holatda oqsil, organik kislotalar, aminokislotalar, spirtlar, dorivor moddalar, fermentlar, gormonlar va boshqa moddalar ishlab chiqarishda yoki ba'zi bir organik moddalarni (masalan, biogaz) ishlab chiqarish, sof holda metall ajratish, oqova suvlarni va qishloq xo'jalik yoki sanoat chiqindilarini qayta ishlashda keng foydalaniladi.

Gen muhandisligi – biotexnologiya fanining ushbu bo'limi imkoniyatlaridan foydalanib, hozirgi vaqtda qaysi produtsent organizmdan foydalangan holda foydali mahsulotlar olish mumkinligini aniq ko'rsatib berish mumkin. Agarda bunday produtsent bo'lmasa, qay tariqada va qanday sharoitda yuqori darajada istalgan turdagi mahsulotni olish xususiyatini namoyon qiluvchi produtsentni yaratish mumkinligini oldindan aytib berish imkoniyatlari mavjuddir. Biotexnologik ishlab chiqarishda bugungi kunda mikroorganizmlarni minglab shtammlaridan foydalanilmoqda.

Biotexnologiyada gen muhandisligi sohasini o'rganishdan maqsad, tirik organizmlar irsiy belgilari haqidagi axborot joylashgan DNK molekulasi tuzilishi va roli, gen molekulyar biologiyasi; genetik muhandislikning moddiy asoslari: transformatsiya, transduksiya, ko'chib yuruvchi genetik elementlar – transpozonlar, plazmidlar, viruslar, bakteriofaglar, restriktazalar, rekombinant DNK olish, genlarni klonlash, hujayra muhandisligi, hujayra va to'qimalarni sun'iy sharoitda o'stirish texnologiyasi; genetik muhandislikning o'simliklar seleksiyasida qo'llanilishi; gen muhandisligiga asoslangan biotexnologiya agrar sanoatdagi ilmiy-texnik taraqqiyotni tezlashtirishdagi roli; gibridomalar olish texnologiyasi va uning qishloq xo'jaligida va chorvachilikda qo'llanilishi hamda genetik muhandislikning istiqbollari haqidagi aniq bilimlarni o'rganishdan iborat.

Tirik organizmlar irsiy axborotini sun'iy yo'l bilan ma'lum maqsadga muvofiq o'zgartirish jarayoni genetik muhandislik fanining asosiy qurilmasi hisoblanadi.

Genetik muhandislik hujayra, xromosoma va gen darajasida amalga oshiriladi:

1. Hujayra darajasidagi genetik muhandislik ikki hujayrani o'zaro qo'shish yo'li bilan amalga oshiriladi.

2. Xromosoma darajasidagi genetik muhandislik hujayra yadrosiga qo'shimcha xromosomalar kiritish orqali amalga oshiriladi.

3. Gen darajasidagi genetik muhandislik yoki gen muhandisligi eng murakkab bo'lib, quyidagi bosqichlar asosida amalga oshiriladi:

4. Qimmatli xo'jalik ahamiyati kasb etadigan gen funksiyasi orqali qidirib topiladi, ajratib olinadi, klonlanadi va tuzilishi o'rganiladi.

5. Ajratib olingan gen xromosoma DNK si bilan rekombinatsiyalanuvchi biror fag genomi, transpozon yoki plazmid DNK si bilan biriktirilib vektor konstruktsiya yaratiladi.

6. Vektor konstruktsiya transformatsiya usuli bilan hujayraga kiritiladi va transgen hujayra olinadi.

Hujayra biotexnologiyasi – hujayra, to'qima va protoplastlarni ishlatishga asoslanadi. Hujayralarni manipulyatsiya (faoliyatiga qandaydir o'zgarishlar kiritish) qilish uchun, ularni o'simlikdan ajratib olish o'simlik organizmidan tashqarida yashashi va ko'payishi uchun sharoit tug'dirib berish lozim. Ajratib olingan hujayra va to'qimalarni sun'iy oziq muhitida, steril sharoitda (*in vitro*) o'stirish, usuli ajratilgan to'qimalar kulturasida deb nom oldi va ularni biotexnologiyada ishlatish mumkinligi sababli, katta ahamiyat kasb etdi.

Biotexnologiya uzoq – uzoqlardan ma'lum bo'lsada, alohida amaliy fan sifatida o'tgan asrni ikkinchi yarmidan boshlab, insoniyat eng avvalo o'zi uchun o'ta zarur bo'lgan ya'ni oziq-ovqat, energetika, zaxira (resurs), atrof – muhitni muhofazasi va h.k. muammolarni tubdan yangi asosda yichishi zarurligini sezganidan keyin mujassamlana boshlandi. Biotexnologik jarayonlar sun'iy oziq muhitida o'stirilgan mikroorganizmlar, o'simlik va hayvon to'qimalari, hujayralari va organlaridan foydalanishga asoslanadi.

Hozirgi vaqtda dunyoning ko'plab mamlakatlarida biotexnologiyani rivojlanishiga alohida e'tibor berilmoqda. Bunga asosiy sabab, biotexnologiyani boshqa texnologiyalarga nisbatan bir qator ustunlikka egaligidir. Masalan, biotexnologik jarayonlar juda kam energiya talab qiladi, deyarli chiqindisiz, ekologik toza va h.k. Shuning bilan bir qatorda, biotexnologiya standart jihozlardan va preparatlardan foydalanadi va iqlim sharoitiga qaramasdan hamda ko'p maydon egallamagan holda jarayonlarni yil bo'yi o'tkazishga asoslanadi. Aytib o'tilgan ustunliklar, o'simliklarni va hayvonlarni hujayralari, to'qimalari va organlariga ham tegishlidir.

Ajratib olingan hujayralar va to'qimalarni biotexnologiyadagi rolini uch yo'nalishda ko'rish mumkin:

Birinchi yo'nalish – ajratib olingan o'simlik hujayrasini tibbiyot, veterinariya, kosmetika va boshqa sohalar uchun zarur bo'lgan ikkilamchi metabolitlar: alkaloidlar, steroidlar, glyukozidlar, gormonlar, efir moylari va boshqa biologik faol moddalar sintez qilish imkoniyati bilan bog'liq. Ma'lumki, ikkilamchi metabolitlar qattiq (agarli) yoki suyuq oziq muhitida o'stirilgan kallus to'qimalardan olinadi. Hujayra texnologiyasi asosida diosgenin – dioskore hujayrasidan; aymolin – ilon rasvolfi hujayrasidan; umumiy kuch beruvchi moddalar – jenshen hujayrasidan; va h.k. ajratib olinadi va tibbiyot hamda parfyumeriyada ishlatiladi. Shuni e'tiborga olish kerakki, o'stiriladigan hujayralarni hosildorligi, butun o'simlikni hosildorligidan ancha baland. Bunday usul bilan ikkilamchi metabolitlar ajratib olishni yana bir ustunlik tomoni shundaki, muayyan sharoitda o'simlikni o'zini o'stirish imkoniyati bo'lmagan sharoitda (sovuq yoki issiq iqlimli mintaqalarda), ularni hujayralarini butun yil maboyinida o'strish mumkin.

Ikkinchi yo'nalish – ajratib olingan hujayralarni, o'simliklar seleksiyasida ishlatish va shu orqali tez rivojlanuvchi, har xil tashqi muhit ta'siriga chidamli (issiqqa, sovuqqa, sho'rlanishga, og'ir metallarga, qurg'oqchilikka, kasallikka va h.k.) o'simliklar yaratishdan iborat. Shuning bilan birga bu yo'nalish, ajratilgan protoplastlarni qo'shilishi orqali yangi o'simliklar yaratish hamda nojinsiy (somatik) gibridlar olishni ham o'z ichiga oladi. Ajratib olingan protoplastlarga gen muhandisligi metodlari yordamida begona genlarni kiritishi, keyinchalik yangi, meros qoladigan xossalarga ega bo'lgan o'simlik yaratishga ham olib keladi. Ajratib olingan changdon va urug'kurtakni sun'iy oziq muhitida o'stirish, gaploidlar olish imkonini bersa, murtaklarni o'stirish – o'sa olmaydigan (endospermasi yomon rivojlangan) o'simliklardan gibrid urug'lar yetishtirish imkonini beradi.

Uchinchi yo'nalish – ajratib olingan to'qimalarni ko'paytirish va ekuv materiallarini viruslar va boshqa patogenlardan sog'lomlashtirish maqsadida ishlatish. Bu usul, o'simliklarni klonal mikroko'paytirish deyiladi va bitta meristemadan yiliga yuz minglab o'simlik olish imkonini beradi.

Sinov savollari:

1. Biotexnologiya nima?
2. Gen muhandisligi qanday darajalarda amalga oshiriladi?

3. Umumiy kuch beruvchi moddalar qaysi o'simlikdan olinadi?
4. O'simliklarni klonal mikroko'paytirish deganda nima tushuniladi?

1-laboratoriya ishi

Biotexnologiya laboratoriyasiga qo'yiladigan asosiy talablar va asbob-uskunalar bilan ishlash tartibini o'rganish

Ishdan maqsad: maxsus laboratoriya yoki o'quv laboratoriyasida ishlash tartibi va asosiy uskunalar bilan tanishish hamda foydalanishni o'zlashtirish.

Laboratoriyaga qo'yiladigan asosiy talablar:

Hujayra organoidlari bilan ishlashda asosan quyidagilar talab etiladi:

1. Oziq muhiti tayyorlash uchun maxsus joy;
2. Steril holatda ekishni amalga oshirish uchun steril bo'lgan laminar-boks yoki maxsus germetik xona;
3. Kallus kulturalarni o'stirish uchun doimo harorati bir xil ushlab turiladigan maxsus xona yoki termostat.
4. Suspenzion hujayra kulturasi uchun mikrobiologik chayqalatgich (chayqatgich).

Ko'pchilik tadqiqotchilar oziqa muhiti tayyorlash uchun alohida xonalar bo'lishi zarurligini ta'kidlashadi. Mobodo buning imkoni bo'lmagan hollarda, chinni va shisha idishlarning sterilligini ta'minlash zarur. Ya'ni xonadagi ba'zi bir asbob-uskunalarda changlar va turli xil moddalar bo'lmashligi, masalan: Petri likopchasi ustki qismida, tarozilar yoki pH-metr elektrodlarida kimyoviy moddalar qoldiqlari oziqa muhitga tushmasligiga imkon yaratish zarur.

Ekish amalga oshiriladigan xonalar va asbob-uskunalarining tozaligi, sterilligi tajriba ishlarini amalga oshirishda eng zarur manba hisoblanadi. Ya'ni yaxshi steril, toza ishchi joyida tajriba ishlarini olib borish, maxsus asbob uskunalar izlashdan ko'ra qulayroqdir.

Laminar-boks hozirgi vaqtda to'qima kulturalari bilan ishlashda, yani steril ekishlarni amalga oshirishda eng qulay va keng qo'llanilayotgan uskuna hisoblanadi.

Bazi bir laminar-bokslarda maxsus ultrabinafsha chiroqlari mavjudki, uni ichki yuzasini steril saqlash uchun kechasi bilan yoqib qo'yish mumkin. Ammo, shunday sterilizatsiyadan keyin ham ishchi yuzasini imkoni boricha etanol yoki 20% li fenolning suvli eritmasida artib olish maqsadga muvofiqdir (bunda albatta qo'lqoplardan foydalaniladi).

Laminar-boks bo'lmagan hollarda unchalik katta bo'lmagan izolyatsiyalangan xonalarda ishni amalga oshirish mumkin. Bunday hollarda ishchi yuza qism tez va oson sterillanadigan bo'lishi zarur va u yer ham (masalan: kimyoviy tajribalar stoli) spirt yoki 20% li fenol bilan sterillanadi. Bundan tashqari, ish boshlanguncha, ish davomida va ish tugagandan so'ng ham ishchi yuzaning (stolning) ikki chekasida Bunzen gorelkasida olov yonib turishi lozim.

Yuqorida keltirilgan talablarga javob beradigan steril xona tashkil etilsagina laminar-bokslardagidek steril ekishni muvaffaqiyatli amalga oshirish mumkin.

O'simliklar hujayra kulturasini o'stirish va saqlab turish uchun talab etiladigan asosiy fizik omillardan biri doimiy harorat hisoblanadi. Ko'p sonli bo'lmagan kallusli kulturalar uchun ishchi rejimi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ bo'lgan standart mikrobiologik termostat maqsadga muvofiq bo'ladi.

Ko'pchilik tadqiqotchilar kulturalarni qorong'u joylarda ham o'stirishadi, ammo bunday hollarda oddiy elektr chiroqlaridan ham yorug'lik sifatida foydalanish mumkin. Ko'p sonli kallusli kulturalar to'plami uchun esa termostat holiga keltirilgan harorati 25°C ni tashkil etadigan xonalar talab etiladi.

O'stirish uchun eng qulay bo'lgani bu egiluvchan va trubkasimon lyuminessent chiroqlardir. Uni kulturalar qo'yilgan qatorning qulay joyiga joylashtirish mumkin. Ya'ni uni ilib qo'yish yoki pastki tomondan yopishtirib qo'ysa ham bo'ladi. Bunday tizim kulturalarni o'stirishda har qanday yorug'lik rejimidan foydalanishda qulay. Kulturalarni qorong'ulikda o'stirish talab etilganda ushbu xonada o'stirish mumkin, ammo qorong'u shkaflar ichida o'stirish mumkin emas.

Suspension kulturalarni almashtirish va aeratsiya uchun eng arzon va qulay tizim aylanma harakatlanadigan chayqatgich hisoblanadi. Bunday chayqatgichlar yuzasidan turli xil diametrli kolbalarni joylashtirish, ularni harorati bir xil bo'lgan va yorug'lik bilan yetarli darajada ta'minlangan xonalarga o'rnatish mumkin.

O'stirish sharoitini qat'iy nazorat qilish uchun esa yopiq termostatlarda aylanma harakatlanadigan chayqatgichlar qulaydir. Bunday chayqatgichlarda kunduzgi yorug'likni beruvchi chiroqlar, maxsus buramali qopqoq va boshqarish dastaklari bo'lib yorug'lik davomiyligini turli xil boshqarish imkonini beradi.

O'simlik hujayra kulturalari bilan ishlaganda chayqatgichda maqsadli sovutish tizimining mo'tadil ishlashi asosiy rol o'ynaydi.

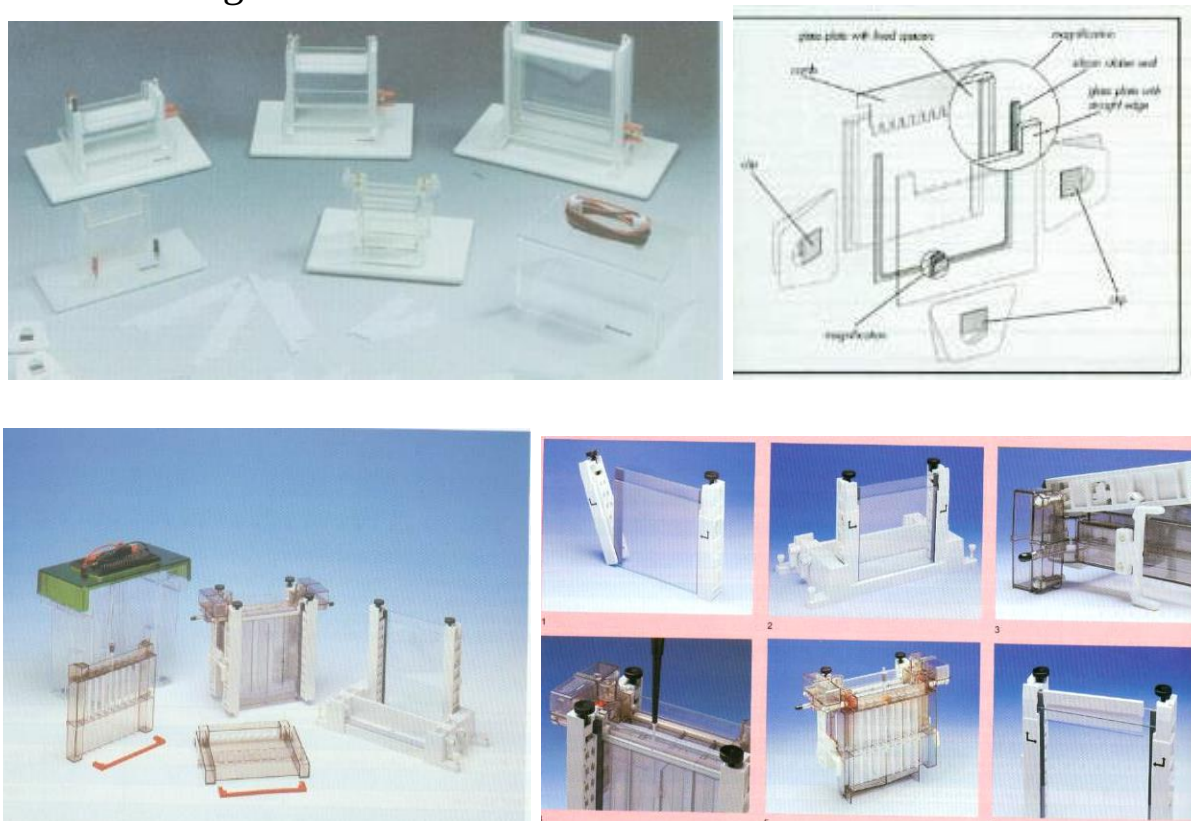
Chunki, chayqatgich motorining qizishi natijasida kamida ichida harorat keskin oshib ketishi mumkin.

Kallusli kulturalar plastinkasimon Petri likopchasida, shisha probirka zich yopiladigan qopqoqli plastmassali idishlardan to'qima kulturasini uchun esa bankalardan fodalaniladi. Suspensiyon kulturalar odatda aylanasiimon tubli shisha kolbalarida o'stiriladi.

Kichik darajadagi biotexnologik jarayonlarni amalga oshirish uchun foydalaniladigan asbob-uskunalar va qurilmalarning asosiylari quyidagilar hisoblanadi: termostat, quritish shkafi, laminar-boks, fermentyor, mikrobiologik chayqatgich, pH-metr, analitik tarozilar, fotokolorimetr, sentrifuga, elektroforez uskunasi va h.k.

Ularning ba'zilarining rasmlari quyida keltirilgan bo'lib, ular haqida qisqacha to'xtalib o'tamiz, batafsil ma'lumotlar esa murabbiy tomonidan izohlab beriladi.

Elektroforez uskunasi. 1-rasmda turli xil o'lchamdagi elektroforez uskunasi aks ettirilgan bo'lib, u asosan agarozali gelda ishlashga ixtisoslashtirilgan.



1-rasm. Turli xil hajmli elektroforez uskunalari va uning tuzilish chizmasi

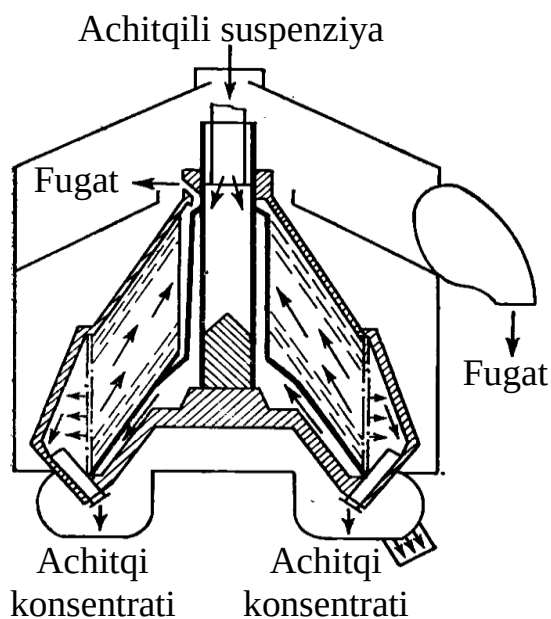
Ushbu uskunadan foydalanib, oqsillar molekulyar massasini aniqlash, ularni turli xil fraksiyalarga ajratish va alohida fraksiyalarni toza holda ajratib olish ishlarini amalga oshirish mumkin. Hozirgi vaqtda elektroforezning gorizontal va vertikal tuzilishli shakllari kengroq ishlatiladi. Zamonaviy jihozlangan laboratoriyalarda kapilyar elektroforezlar qo'llaniladi. Buning qulaylik tomoni o'rganilayotgan moddalarning miqdori juda kam bo'lgan hollarda ham yetarli darajadagi ishlarni amalga oshirish mumkin.

Ushbu elektroforezlardan foydalanib DNK ning turli xil formalarining molekulyar og'irliklarini aniqlash va ularni ajratib olishni tashkillashtirish mumkin. Elektroforezda agarozali gelda (ko'pincha, SDS, tris, NaCl ishtirokida) masalan, oqsillarni molekulyar og'irlikka nisbatan bo'lish va ajratish parchalangan oqsillarning izoelektrik nuqtasi va molekulyar og'irligiga asoslaniladi. Elektroforez uskunasi foydalanib asosan o'simlik, hayvon yoki mikroorganizmlarning metabolitik moddalarini toza holda ajratib olish mumkin, ammo miqdor jihatidan ko'proq bo'lgan massani olish imkoniyatlari cheklanganligi uchun undan asosan ilmiy tadqiqot ishlariga mo'ljallangan moddalar ajratish uchun qo'llaniladi.

Sentrifuga. Sentrifugalar asosan suyuqlikdan maqsaddagi moddalarni yoki komponentlarni cho'ktirib olish uchun qo'llaniladi. Ishlash prinsipi markazdan qochuvchi kuch hisobiga asoslanadi. Sentrifugalarning turli xil tiplari aylanish tezligiga, hajmiga, ish maxsuldorligi kabi ko'rsatkichlariga bog'liq holda farqlanadi. Hozirgi vaqtda analitik ya'ni ultrasentrifugalar ham qo'llanilmoqdaki, ularning aylanish tezligi 20, 30, 60 va hattoki 200 ming martoba tezlikni tashkil etadi.



2-rasm. Turli xil tipdagi stol sentrifugalari



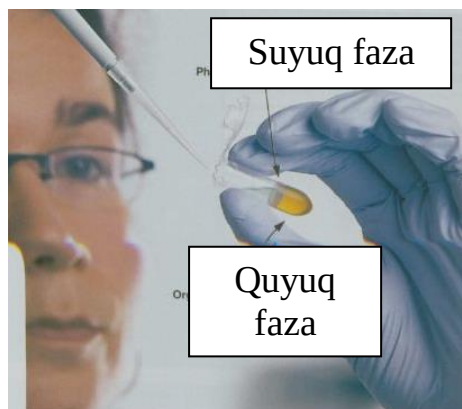
3-rasm. Achitqi separatori

Masalan, 2-rasmdagidek, kichik epindorflar shaklidagi idishlarni bir necha o'n ming marotaba tezlikda aylantirish imkoniyatiga ega bo'lgan sentrifugalar asosan laboratoriya tekshirishlari uchun oqsillar, antitellalar, plazmidalar, DNK va RNK kabi manbalarni ajratish uchun qo'llaniladi. Shuningdek, 100, 200, 300 yoki undan katta miqdordagi suyuqliklar joy bo'ladigan maxsus stakanlarni aylantiradigan sentrifugalar (bularni ishlash prinsipiga ko'ra ishlab chiqarish sanoati separatorlar ham deb ataladi) ham borki, ularning aylanish tezligi bir necha minggacha bo'lishi mumkin (3-rasm.). Bunday sentrifugalardan ishlab chiqarish korxonalarida jumladan achitqilar, insektisid moddalar kabi ishlab chiqarish jarayonlarida biomassa to'plash uchun qo'llaniladi.

Avtomat-samplerlar (pipetkalar) – biotexnologik tajribalarda asosiy ish quollaridan biri bo'lib, foydalanilayotgan moddalar yoki komponentlarning juda kam o'lchamlarini ham avtomat tarzda aniq o'lchamlarini olish va quyish vazifasini o'tashga ixtisoslashtirilgan bo'lib, ilmiy tadqiqot ishlarida qo'llaniladi. Ular o'lchamlari va shakllariga ko'ra farqlanadi. Ushbu rasmda avtosampler yordamida epindorf idishida fraksiyalarga ajratilgan komponentni olishda foydalanish aks ettirilgan (4-rasm).



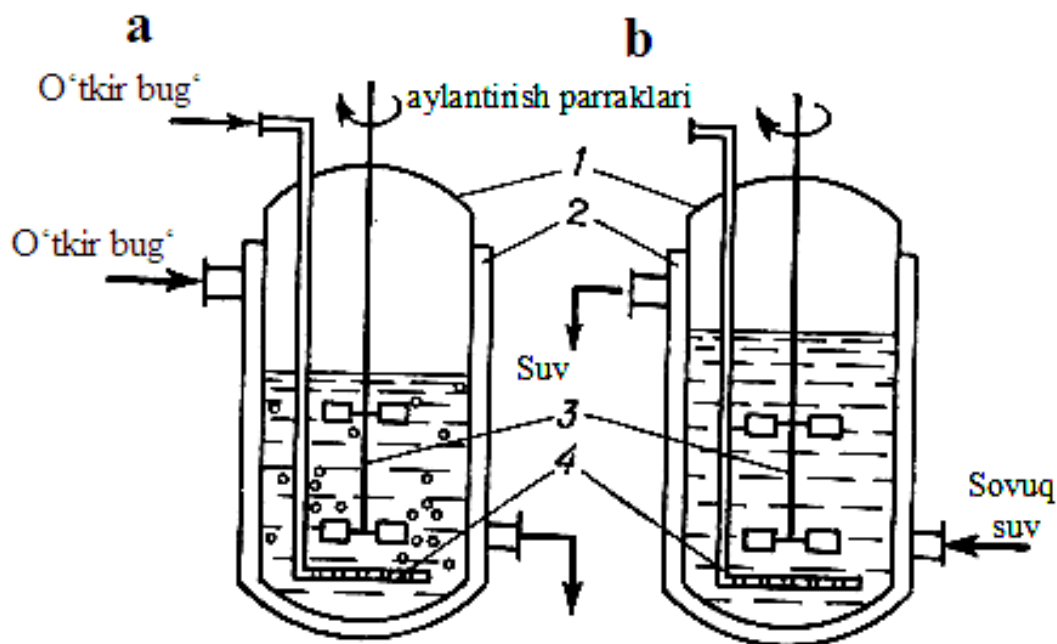
a.



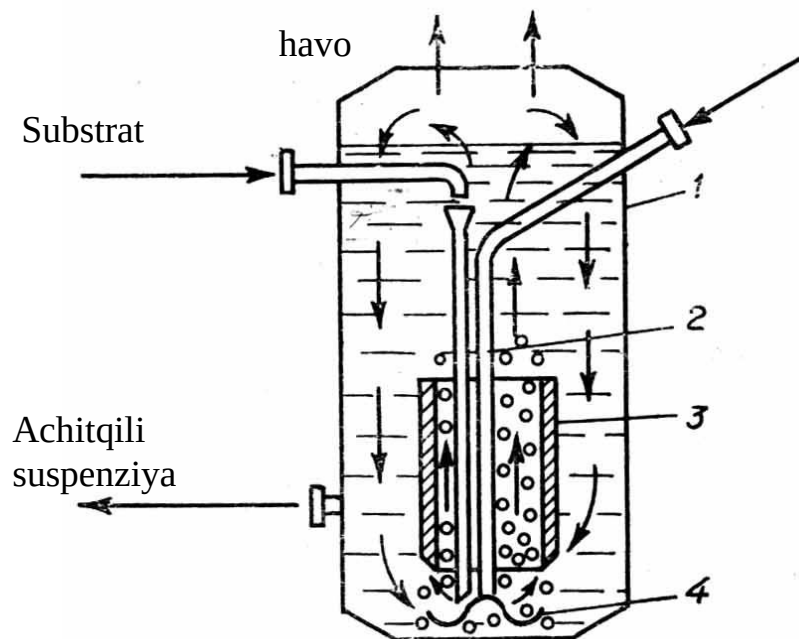
b.

4-rasm. Avtopipetkalar (samplerlar) va undan foydalanish

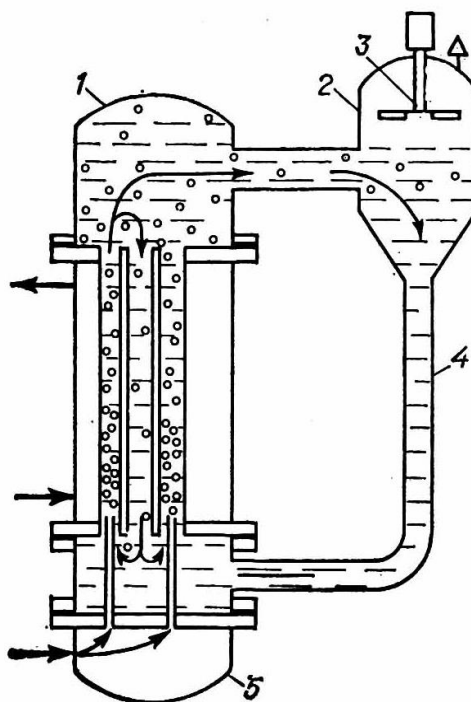
Fermentyor – asosan biologik obyektlarni suyuqlikda o‘stirishga mo‘ljallangan, barcha zarur ko‘rsatkichlarni avtomat ta‘minlab beruvchi o‘lchovchi asbob-uskunalar bilan ta‘minlangan bo‘ladi. Ushbu holatning ba‘zi birlarining texnologik chizmasi 5,6,7.8-rasmlarda aks ettirilgan.



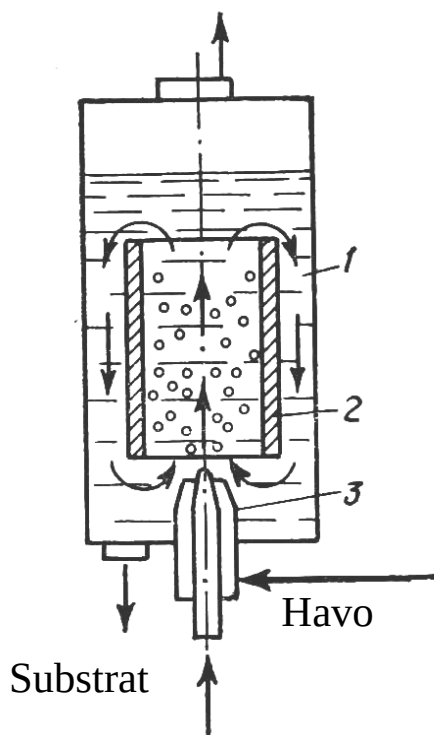
5-rasm. Oziqa muhitini sterilizatsiyalashda fermentyorning qizdirilish (a) va sovutilish (b) chizmasi
1-fermentyorning korpusi; 2-qoplami; 3-aralashtirgich; 4-barboter.



6-rasm. Lefransua tizimli fermentator
1-uskuna korpusi; 2- havo uzatuvchi; 3- diffuzor; 4- kyuveta.



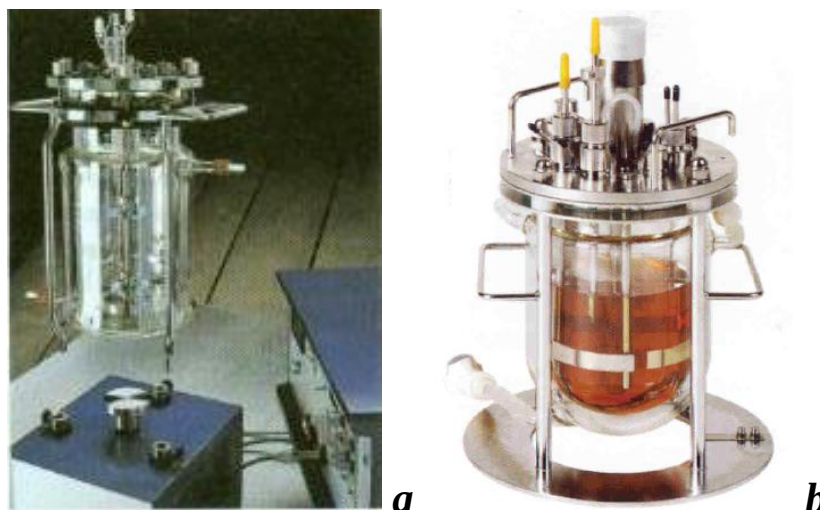
7-rasm. Gazliftli fermentator
1 – qoplamali quvur reaktor; 2 – separator; 3 – mexanik ko‘pik bosuvchi; 4 – sirkulyasion truba; 5 – havo kamerasi.



8-rasm. Forsunkali havo taqsimlagichli fermentator
1 – uskuna korpusi; 2 – diffuzor; 3 – forsunka.

Fermentyorlar ishlash tipiga ko‘ra uzluksiz va davriy o‘stirishga mo‘ljallangan turlari mavjud bo‘lib, o‘stirilayotgan obyektning xususiyatlariga ko‘ra tanlanadi.

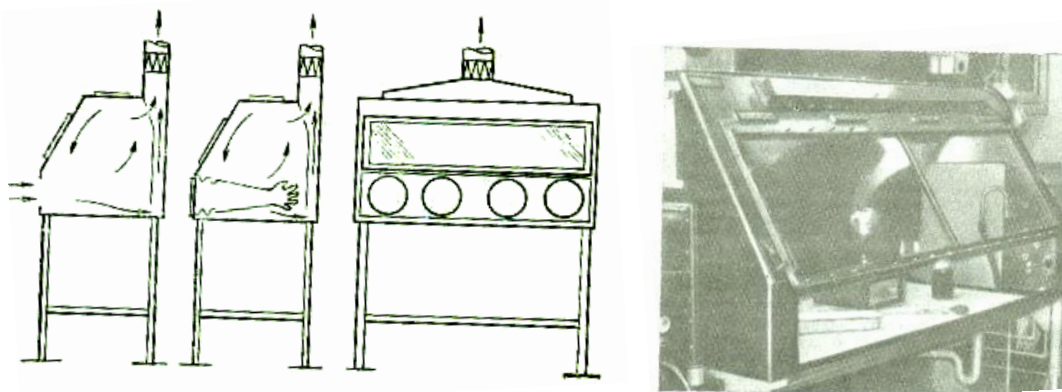
Turbidostat va xemostat tipidagi fermentyorlar sanoat asosida, kichik ishlab chiqarishlarda yoki tajriba laboratoriya yoki o‘quv laboratoriyalarda qo‘llanilishiga ko‘ra hajmi turli xilda bo‘ladi. Asosan, 3-10 l hajmli fermentyorlar o‘quv-labarotoriyalari uchun ishlatilsa, 10-60 l hajmli fermentyorlar tajriba laboratoriya yoki kichik ishlab chiqarish uchun qo‘llaniladi. 100 l yoki undan ortiq (ba‘zan bir necha tonna hajmli, masalan Bersk shahridagi mikrobiologik zavodda, insektisid biopreparatlar ishlab chiqarish uchun 30 tonna hajmli fermentyorlar ishlatiladi) hajmli fermentyorlar sanoat asosida ishlab chiqarish uchun qo‘llaniladi.



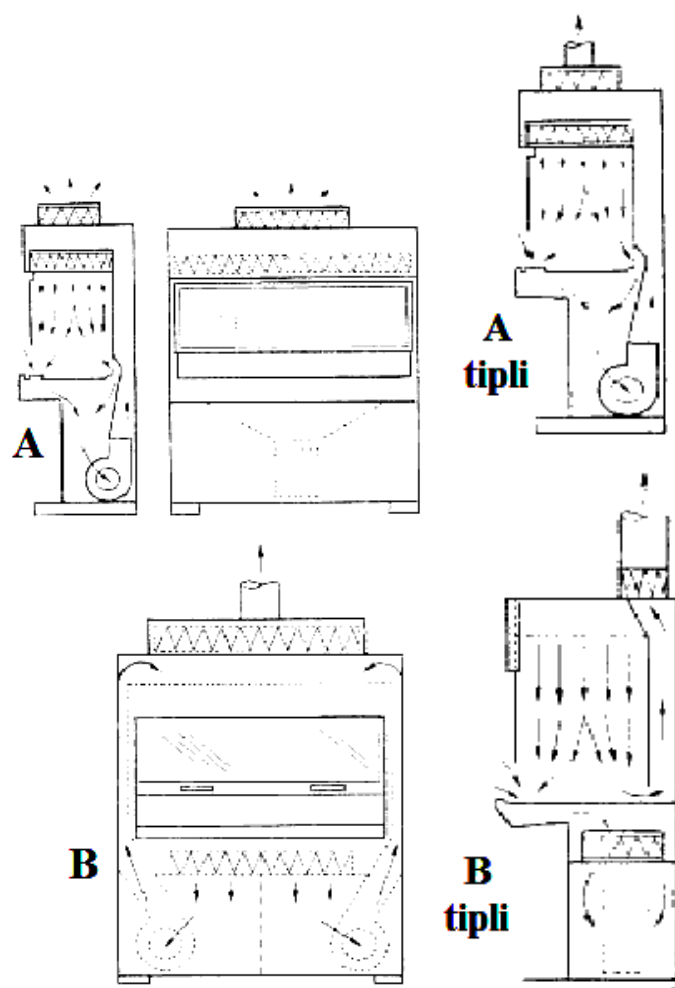
9-rasm. O‘quv – laboratoriya (a) va tajriba laboratoriya fermentyorlari (b)

Laminar-boks – odatda mikrobiologik tajribalar uchun qo‘llaniladi. Bundan tashqari biotexnologik jarayonlarda ham keng ishlatilishi mumkin. Masalan, hujayra organoidlarini ajratish, ular ustidan turli xil manipulyatsiyalarni amalga oshirish hamda ularni ekish jarayonlarida keng qo‘llaniladi. Mikrobiologik laminar boks o‘rniga ba‘zan maxsus izolyatsiyalangan xonalar tashkil etish mumkin, ularni boks-xonalari deb ataladi. Ammo, unda kelayotgan havodan va odamning nafas olishidan chiqayotgan mikrofloradan himoyalash cheklanganligi uchun to‘liq talabga javob bermasligi bilan xarakterlanadi.

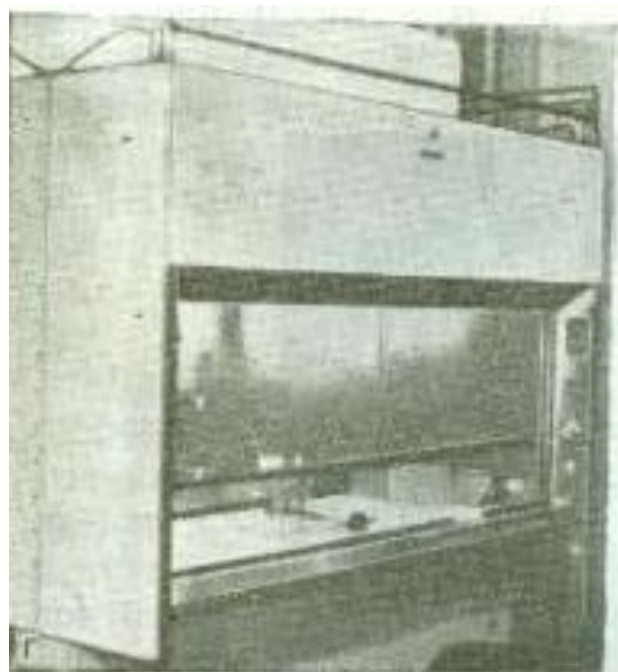
Mikrobiologik laminar boksning uchta sinfi tafovut qilinadi. Bular birinchi, ikkinchi va uchunchi darajali laminar bokslar deb nomlanib, ko‘pincha ikkinchi va uchunchi darajali laminar bokslar hujayra organoidlari bilan ishlashda keng qo‘llaniladi.



10-rasm. 1-darajali laminar boksning tuzilish chizmasi va tashqi ko‘rinishi

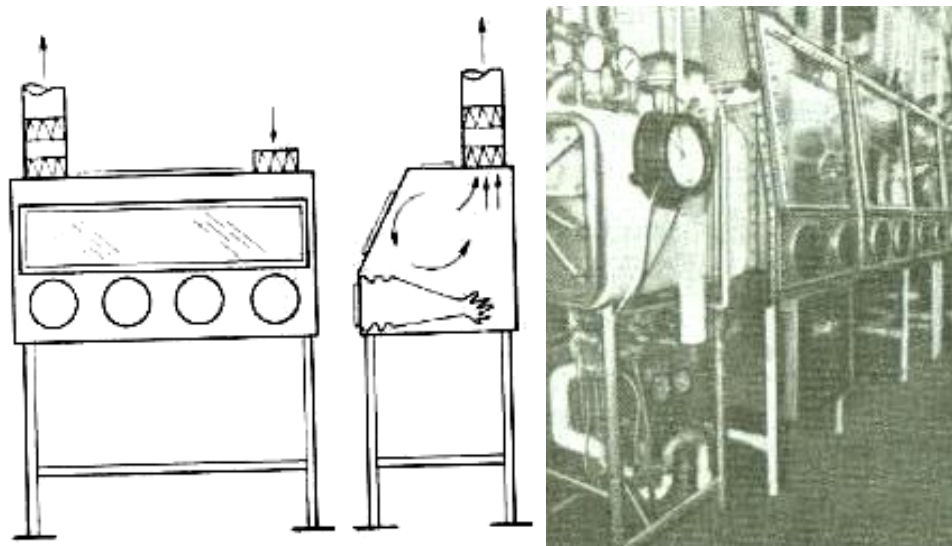


A



B

11-rasm. 2-darajali laminar boksning tuzilish chizmasi va tashqi ko‘rinishi



12-rasm. 3-darajali laminar boksning tuzilish chizmasi va tashqi ko‘rinishi

Maxsus boks xonalarda mikroorganizmlar va hujayra organoidlari bilan ishlash davomida albatta gaz gorelkasi baland bosimda ishlab turishi lozim (13-rasm).



13-rasm. Maxsus boks-xonada gaz gorelkasi yordamida ishlash

Sinov savollari:

1. Oziq muhitlari qanday xonalarda tayyorlanishi kerak?
2. Laminar-boksning qanday turlari bor?
3. Sentrifuga apparati nima maqsadda ishlatiladi?
4. Avtomat-samplerlar nima maqsadda ishlatiladi?
5. Fermentyorlarning qanday turlarini bilasiz?

2-laboratoriya ishi

Hujayra va to'qima to'plamlari bilan ishlash jarayonida sterillash usullari

Ishdan maqsad: Biotexnologik jarayonlarning moddiy asoslaridan bo'lgan hujayra organoidlaridan foydalanib tajribalar o'tkazish uchun zarur bo'lgan asbob-uskunalar, zarur materiallar va idishlarni sterillash usullari haqida ma'lumotga ega bo'lish.

Ishning tashkil etilishi: murabbiy guruh talabalarini ikki guruhga (ko'proq guruhchalarga ham bo'lish mumkin, faqatgina bunda har bir guruhchalarning vaqt me'yorini to'g'ri taqimlash zarur) ajratadi.

Birinchi guruh talabalari: laminar boks, asbob – uskunalar va oziq muhitini sterillashni o'rganishadi;

Ikkinchi guruh talabalari: idishlarni va zarur materiallarni sterillashni o'rganishadi.

Oradan ma'lum vaqt o'tgacha (50 minut) har ikkala guruh talabalari ishchi o'rinlarini almashtirishadi.

Jarayonlar davomida murabbiy talabalarning bergan savollariga javob berib borishi va tug'ilgan muammrolarni hal etishda amaliy yordam berishi lozim.

Dars (ikkinchi juftlik) oxirida talabalar laboratoriya daftarlariga qayd etilgan ma'lumotlar asosida kollokvium topshiradi va mashg'ulotga ajratilgan reyting balini oladi. Reyting balini to'play olmagan talaba keyingi mashg'ulotgacha ushbu laboratoriya ishini qayta topshirishi mumkin.

Tushintirish:

Ajratilgan organlar, to'qimalar, hujayra va protoplastlarni o'stirishda sterillikka katta ahamiyat berish zarur. Sterillikni ahamiyati shundan iboratki, ajratilgan organlar, to'qimalar, hujayralar va protoplastlarni o'stirish uchun tayyorlangan sun'iy oziq muhitlarida mikroorganizmlar ham juda yaxshi o'sadi. Mikroorganizmlarning rivojlanishi o'stirilayotgan hujayra va to'qimalar uchun ikki yoqlama havf tug'diradi.

Birinchi dan, mikroorganizmlarning yashash faoliyati davrida oziq muhitlarining tarkibi sezilarli darajada o'zgarib, belgilangan turg'un sharoitda hujayraning o'sishini to'xtatadi.

Ikkinchi dan, o'simlikdan ajratilgan to'qima, hujayra va ayniqsa protoplastlarni mikroorganizmlar osongina zararlaydi.

Ayniqsa, hujayra kulturalarini fermentyorda o‘stirish jarayonini amalga oshirish uchun o‘ta darajadagi sterillik talab etiladi.

Shuning uchun ajratilgan organ, to‘qima, hujayra va protoplastlar bilan olib boriladigan tajribalar steril xonalar, bokslar yoki laminar bokslarda olib boriladi.

Bokslar, asboblari, idishlar, o‘simliklar, oziq muhitlari, paxta tiqinlar va boshqa ishga kerakli narsalarning hammasi sterillanadi. Umuman olganda sterillash jarayoni talabalar uchun yangilik emas, chunki biokimyo, kimyo, mikrobiologiya kabi fanlarda sterillashning ba’zi bir jabhalari bilan tanish bo‘lganliklari uchun ushbu laboratoriya ishini bajarish hech qanday qiyinchilik tug‘dirmaydi.

Shuni ham ta’kidlab o‘tish joizki, biotexnologik jarayonlarda oziq muhitini sterillash jarayoni mikrobiologik tajribalar uchun oziq muhiti tayyorlashdan kam farq qilsada, foydalaniladigan tarkibiy komponentlarning juda ham kam miqdorda ishlatilishi va ko‘pincha garmonlar, o‘stiruvchi omillar va vitaminlar kabi juda tez buziluvchi tarkibga ega bo‘lganligi uchun diqqat bilan sterillash sharoitini tanlashni talab etadi.

Shuningdek, ushbu jarayonlarda talabalar to‘liq texnika xavfsizligi va laboratoriyada ishlash qonun va qoidalariga rioya etishlari talab etiladi.

Asbob-usunalar va materiallar:

1. 500-700 ml li kimyoviy stakanlar (2 ta);
2. Distillangan suv uchun bir litrli kolba;
3. Spirt, spirtovka yoki tabiiy gaz;
4. Petri likobchalari (2ta);
5. Avtoklav;
6. Sterilizator;
7. Natriy bikarbonatning 1% li eritmasi;
8. Oziq muhitli probirkalar;
9. Quritish shkafi;

Ishning borishi:

Laminar-boks sterilizatsiyasi. Laminarning ish olib boriladigan ichki yuzasi 70% li spirt bilan artiladi;

So‘ng laminarga spirtovka, gugurt, 96% spirtli stakan, sterillangan idishlar, asboblari va sterillangan suvli kolba joylanadi;

Meristemalar ajratishda laminarga binokulyar lupa ham qo‘yiladi;

Ishlashdan oldin 2 soat davomida laminar boks bakteriotsid ultrabinafsha lampasi bilan nurlantiriladi;

Ishlashdan ikki soat oldin laminarning ichki yuzasi 70% li spirt bilan yana artiladi;

Ish boshlashdan avval qo'llarni yaxshilab sovun bilan yuvib, spirt bilan artiladi va steril oq xalat kiyiladi, og'ziga steril niqob tutiladi.

Idishlarni sterillash. Idishlar quritish shkaflarida quruq issiqda yoki nam bug'da avtoklavda sterillanadi;

Sterillashdan oldin idishlarni yaxshilab yuvib, quritish kerak;

Idish yuvish uchun turli idish yuvish vositalari va xrompik (kaliy bixromatning sulfat kislotasidagi eritmasi) ishlatiladi;

Yuvilgan idishlarni distillangan suvda chayib, quritish shkafiga quritiladi;

Sterillashdan avval havodan infeksiya tushishining oldini olish uchun probirkalar, kolbalar og'zi paxta tiqinlar bilan yopiladi va qog'ozga (iloji boricha falga qog'ozga) o'raladi;

So'ngra idishlarni quritish shkaflariga joylab 2 soat 160°C da (falga qog'ozga o'ralgan bo'lsa 250°C gacha) qizdiriladi. Bunday qizdirishda bakteriyalargina emas, balki ularning sporalari ham o'ladi;

Quritish shkafigidagi haroratni 175°C dan oshirish mumkin emas, chunki paxta tiqinlar sarg'ayib ketadi idishlar o'ralgan qog'oz esa sinuvchan holga kelib qoladi;

Avtoklavda bosim ostida bundan ham yaxshiroq sterillashga erishish mumkin, chunki namli issiqlikda qizdirilganda mikroorganizmlar va ularning sporalari yana ham yaxshi o'ladi;

Turli xil stakanlar, Petri likobchalari, pipetkalar, distillangan suvli kolbalar avtoklav qilinadi;

Idishlar fal'ga yoki o'rash qog'ozlarga o'ralgan holda 25-30 daqiqa 2 atmosferada avtoklavlanadi;

Pipetkalarni avtoklavlashda ularning yuqori qismiga paxta tiqib, alohida-alohida qilib o'raladi.

Asbob-uskunalarini sterillash. Asbob uskunalar, skalpel, pinset, ignalar va hakazolar quritish shkafiga 12 soat davomida 140°C quruq issiqlikda yoki suvda qaynatib sterillanadi;

Temirdan yasalgan asboblari avtoklavlanmaydi, chunki nam bug'tasirida ular zanglaydi va o'tmaslashadi;

Ish boshlashdan avval va ish davomida asboblari chinni stakanlarga solinib, 96% li etil spirtida sterillanadi va spirtovka alangasida qizdirib olinadi;

Spirtovka alangasida lansetlar, pinsetlar va mikrobiologik ilmoqlar qizdiriladi va steril qog'ozlar orasida saqlanadi;

Sterillangan asboblari faqatgina bir martalik muolaja uchun ishlatiladi, qayta ishlatilganida ular yana spirtda sterillanadi va alangada qizdiriladi;

Igni va pakkilar spirtga solib sterillanadi.

Materiallarni sterillash. Tajribada ishlatiladigan paxta, doka, paxta tiqinlar, filtr qog'ozlari, xalatlar va ro'mollar avtoklavda 2 atmosferada 25-30 daqiqa sterillanadi.

O'simlik materiallarini sterillash. Urug'lar, yuqori meristemalar, o'simliklarning turli qismlaridan olingan to'qima bo'laklarini sterillash uchun turli sterillovchi eritmalaridan:

sulemaning 0,1% li eritmasi;

1% li brom eritmasi;

13 % li pergidrol';

3-6 % li xloramin, dioksid;

10% li natriy giroxloridning suvdagi eritmalaridan foydalaniladi.

Ildiz mevalar, tugunaklar, o'simliklarning yo'g'on poyalari sovun va ishqalagich bilan oqar suvda yaxshilab yuviladi, po'stlog'i shilinadi, (ildizlar va ildiz mevalar), distillangan suvda chayiladi va absolyut spirtga bir necha sekundga solib olinadi;

O'simlik obyektlari sterillangandan so'ng, sterillovchi moddalardan tozalash uchun distillangan suvda ko'p marta chayilishi kerak;

Ayniqsa bromidli suv bilan ishlov berilgan o'simlik materiallarini diqqat bilan yuvish kerak chunki bromidning eng kam miqdori ham urug'larning o'sishini to'xtatib qo'yadi. Brom bug'i zaharli bo'lganligi uchun, brom bilan sterillashda albattda mo'rili shkaflaridan foydalanish kerak;

Brom eritmasida faqatgina makkajo'xori urug'larini sterillashda foydalanish tavsiya etiladi; Loviya, beda, kungaboqar (po'chog'idan tozalangan) uchun – sulema ishlatiladi;

Brom va sulema bilan sterillash vaqti 10-15 daqiqani, pergidrol bilan sterillash esa 30 daqiqani tashkil qiladi. Meristemalar va o'simliklarning har xil qismlaridan olingan bo'laklari ikki marotaba tezroq sterillanadi; Tukli urug'lar (chigit) yuqori konsentratsiyali sulfat kislotasiga 5 daqiqaga solinsa yaxshi sterillanadi; Pergidroldan urug'lar osonroq yuviladi (steril suv 5-7 marta o'zgartirilganda). Sulemadan so'ng suv 5-6 marta o'zgartiriladi;

Bromdan so'ng suv 12 soat davomida, yuvishning boshida har 30 daqiqa, so'ngra esa har 3 soat davomida almashtirib turiladi;

Antiseptiklar bilan ishlov bermasdan, pomidor, olma, qovoq, tamaki va dukkaklilardan steril urug' olish mumkin. Yetilish davrida bu o'simlik urug'lari go'shtli, yog'ochli yoki danakli qatlamlar orasiga joylashgan bo'ladi. Sog' zararlanmagan bu mevalar sovunli suvda va spirtida bir necha marta yuviladi. So'ng atseptik sharoitda bo'laklarga bo'linadi, steril skalpel bilan uning ichidan urug'lar olinadi va steril filtr qog'ozi solingan Petri likobchalariga solinadi.

Oziq muhitlarini sterillash. Oziq muhitlari bosim ostida (avtoklavda) bug' bilan sterillanadi. Oziq muhitlari solingan probirkalar og'zi paxta tiqinlar bilan yopilib, o'rash qog'oziga o'raladi, va 120°C, 1 atmosfera bosimida 20 daqiqa davomida avtoklaflanadi.

Sovuq sterillash. Issiqlikka chidamsiz organik suyuqliklar bakteriyalardan mayda teshikli (diametri 0,15-0,45 mkl teshikli) bakterial filtrlardan o'tkazish orqali tozalanadi.

1. Petri likobchalari (2 ta), 500-700 ml li kimyoviy stakanlar (2 ta) va buyum oynachalar pishiq qog'ozga o'ralgan holda 160°C da 2 soat davomida quritish shkaflarida sterillanadi.

2. Skalpel, ajratish ninalari, pinsetlar quritish shkafida 140°C da 1 soat davomida sterillanadi va tayyorlangan asboblarni laminardagi qog'oz varaqalari orasiga joylanadi.

3. Og'zi paxta tiqinlar bilan yopilgan probirkalardagi oziq muhitlari 1 atmosfera bosimda 20 daqiqa davomida sterillanadi. Oziq muhitli probirkalar 10-20 tadan qog'ozga o'ralgan bo'lishi kerak. Bir vaqtning o'zida o'simlik materiallari uchun doka xaltachalarni qog'ozga o'rab avtoklavlanadi.

Sinov savollari:

1. Laminar-boks qanday usulda sterilizatsiya qilinadi?
2. Idishlarni sterillash qanday amalga oshiriladi?
3. Asbob-uskunalarini sterillashda nimalarga ahamiyat berish kerak?
4. Oziq muhitlarini sterillash qanday amalga oshiriladi?
5. Sovuq sterillash nima?

3-laboratoriya ishi

Mikroorganizmlarni ekish uchun oziq muhiti tayyorlash va sterilizatsiya qilish

Ishdan maqsad: O'rganilayotgan bakteriyalarning biomassasini ko'paytirish uchun oziq muhiti tayyorlash, sterillash, unga produtsentlarni ekish va biomassa olishni o'rganish.

Ishning tashkil etilishi: murabbiy guruh talabalarini ikki guruhga ajratadi.

Birinchi guruh talabalari: suyuq oziq muhiti tarkibini tuzadi, sterillizatsiya qilishadi va produtsentni ekib, zarur ko'rsatkichlarni ta'minlagan holda mikrobiologik chayqatgichga idishlarni joylashtirishadi. Guruhchadagi talabalarning har ikkitasi turli xil hajmdagi suyuqlikka oziq tarkibi tuzishlari lozim;

Ikkinchi guruh talabalari: qattiq oziq muhiti tayyorlashadi, sterillizatsiya qilib, produtsentlarni (Petri likopchalariga) ekishadi va termostatga joylashtirishadi. Guruhchadagi talabalarning har ikkitasi turli xil hajmdagi suyuqlikka oziq tarkibi tuzishlari lozim;

Jarayonlar davomida murabbiy talabalarning bergan savollariga javob berib borishi va tug'ilgan muammolarni hal etishda amaliy yordam berishi lozim.

Dars (ikkinchi juftlik) oxirida talabalar laboratoriya daftarlariga qayd etilgan ma'lumotlar asosida kollokvium topshiradi va mashg'ulotga ajratilgan reyting balini oladi. Reyting balini to'play olmagan talaba keyingi mashg'ulotgacha ushbu laboratoriya ishini qayta topshirishi mumkin.

Laboratoriya ishigacha texnik xodim yoki laborant talabalar uchun 2 sutka davomida kolbalarda va kosyaklarda o'stirilgan (Petri likopchasida o'stirish ham mumkin) produtsent mikroorganizm kulturasi va steril idishlar bilan ta'minlashi lozim. Shuningdek, avtoklavni zarur vaqtda qo'shib, streillash jarayoniga tayyorlab beradi. Bundan tashqari mikrobiologik chayqatgichda qoldiriladigan kultural suyuqlikni nazorat qilish va keyingi mashg'ulotgacha saqlashni ta'minlashi zarur.

Murabbiy tomonidan har ikkala guruhning bir vaqtda sterillash jarayonini amalga oshirilishi nazorat qilinadi. Sterilizatsiya vaqtida esa zarur bo'lgan ma'lumotlarni talabalar daftarlariga qayd etib qo'yadilar.

Tushintirish:

Ayni vaqtda jahon agrar sanoati amaliyotida mikrob insektisid biopreparatlardan qishloq xo'jaligi ekinlarini zararkunanda hasharotlardan himoya qilishda unumli foydalanib kelinmoqda.

Bu borada *Bac. thuringiensis* turiga mansub entomopatogen bakteriyalar asosida tayyorlanayotgan insektisidlar asosiy o'rin tutadi. Shu boisdan *Bac. thuringiensis* bakteriyasi asosida biopreparat tayyorlash uchun mo'tadil va arzon oziq muhiti tanlash katta amaliy ahamiyat kasb etadi.

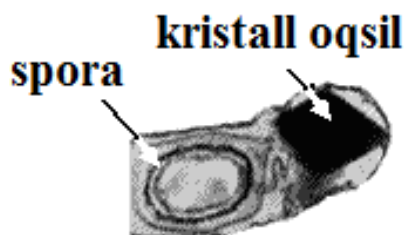
Adabiyotlardan ma'lumki *Bac. thuringiensis* bakteriyasi shtammlarini o'stirish uchun asosan glyukoza qo'shilgan makkajo'xori, achitqi va quruq achitqi ekstraktlari asosida tayyorlangan oziq muhitlaridan foydalaniladi.

Ma'lumki, *Bac. thuringiensis* bakteriyalarini biotexnologiya sanoati miqyosida o'stirish uchun taklif etilgan makkajo'xori ekstrakti va glyukoza saqlovchi oziq muhiti ehtiyojga yetarlicha javob bermaydi, shuningdek, makkajo'xori ekstraktining beqarorligi va glyukozaning tanqisligi bu oziq muhiti o'rnini bosadigan arzon va mo'tadil oziq muhiti manbalarini topishni taqozo etadi.

Shu boisdan mazkur ishda biz *Bac. thuringiensis* entomopatogen bakteriyasi shtammlari uchun quyidagi oziq muhitida o'stirishni tavsiya etamiz: standart oziq muhiti: Pepton 1,0 g; NaCl 0,05 g; K_2HPO_4 0,05 g; $MgSO_4$ 0,02 g; (pH 7,0) (1 litr suyuqlik uchun). Bunda kulturalar yuqori darajada mahsuldorlik ko'rsatadi. Ushbu oziq muhiti asosida asosan laboratoriya ishlari bajariladi.

Uning asosida ishlab chiqarishni tashkillashtirish esa iqtisodiy samaradorlikka olib kelishi mumkinligi isbotlab berilgan. Shuning uchun laboratoriya sharoitida biz maqsadimiz faqatgina ushbu bakteriyalar sintez qiladigan kristall oqsillarni o'rganish bo'lganligi uchun xohlagan oziq muhitidan foydalanishimiz mumkin.

Quyidagi rasmda o'rganilayotgan bakteriyaning spora va kristall hosil qilishi aks ettirilgan bo'lib, talabalar mikroskop ostida shu shaklni aniq ko'rishlari talab etiladi.



14-rasm. Bakteriyalarning spora va kristall hosil qilishi

Asbob-usunalar va materiallar:

- ✓ 500-700 ml kimyoviy stakanlar (2 ta);
- ✓ distillangan suv uchun kolbalar;
- ✓ Petri likobchalari (zarur miqdorda);
- ✓ Kartoshka donalari (zarur miqdorda murabbiy tomonidan ta'minlanadi);
- ✓ *Bacillus thuringiensis* bakteriyasining tayyor kulturasi (zarur miqdorda murabbiy tomonidan ta'minlanadi);

- ✓ Avtoklav;
- ✓ Quritish shkafi;
- ✓ Suyuq oziq muhitida o‘stirish uchun (1yoki 2 litrli kolbalar);
- ✓ Termostat;
- ✓ Mikrobiologik chayqatgich;
- ✓ Sentrifuga;
- ✓ Mikroskop va zarur bo‘yoqlar;
- ✓ pH-metr.
- ✓ Tarozilar.

Ishning borishi:

Mikroorganizmlar uchun oziq muhiti tayyorlash, uni sterilizatsiyalash va unga produtsentlarni ekish usullari bilan mikrobiologiya fanining laboratoriya mashg‘ulotlarida yetarli darajada tanishganligi sababli talabalar ushbu laboratoriya ishini quyidagi tavsiyalar asosida bajarishadi:

Foydalaniladigan produtsent: *Bacillus thuringiensis* bakteriyasi shtammi laboratoriya muzeyidan texnik laborant tomonidan maxsus kosyaklar ekilgan holda beriladi.

Produtsentni o‘stirish va saqlash. Kultura agar-agar qo‘shilgan kartoshkali suyuq va qattiq oziq muhitlarida 28-30 °C haroratda 5 kun davomida o‘stirib (suyuq oziq muhiti uchun mikrobiologik chayqatgichda; qattiq oziq muhiti uchun termostatda) olinadi.

Oziq muhitlari. Bakteriyalarni o‘stirish va saqlashda quyidagi oziq muhitlaridan foydalanish mumkin: go‘sht peptonli agar (GPA), go‘sht peptonli sho‘rva (GPSH), Xottinger oziqasi, kartoshkali agar va suslo-agar (ma‘qul oziq muhiti murabbiy tomonidan tavsiya etiladi).

Dastlabki ekuv materialini tayyorlash. Ekish materialini o‘stirish uchun agarli kartoshka oziqa muhiti kosyakida 2 kun davomida 28-30 °C haroratda o‘stirilgan kulturadan foydalaniladi (texnik laborant tomonidan ta‘minlanadi); Shundan keyin, kultura sig‘imi 750 ml bo‘lgan kolbalarda 100 ml oziqa muhitiga ekilib, chayqatgichda (200 tez/min) 48 soat davomida 28-30 °C haroratda o‘stiriladi (100 ml oziqa muhitiga 100 mln/hujayra). Ushbu kultura biomassasi oziqa muhitidan sentrifugalash usulida (5000 tez/min) yoki Zaysev filtrida ajratib olinadi (ma‘qul usul murabbiy tomonidan tavsiya etiladi).

Sterilizatsiyalash sharoiti. Oziq muhiti 105-110 °C haroratda 1 atmosfera bosimda 20 minut davomida sterillanadi. Oziq muhitining pH ko‘rsatkichi: sterilizatsiyagacha 7,0-7,2 va sterilizatsiyadan keyin 6,8-7,0 ga teng bo‘lishi lozim (zarur bo‘lganda pH ko‘rsatkichi

mo'tadillashtirilishi kerak, kulturaning mo'tadil o'sib rivojlanishi uchun oziqa muhiti pH ko'rsatkichini 7,4 da ushlab turish maqsadga muvofiqdir).

pH ko'rsatkichi (suyuq oziq muhiti uchun). pH ko'rsatkichi fermentatsiya jarayonigacha 6,8-7,0 bo'lishi kerak; fermentatsiya jarayoni oxirida pH ko'rsatkichi ko'tarilib ketadi (8,0). Tabiiyki oziq muhitining ishqoriy holatga o'tishi kristallarni kichik bo'laklarga bo'linib ketishiga olib keladi va bu keyingi kristall oqsillarni ajratib olishda qiyinchilik tug'diradi. Shu boisdan fermentatsiya jarayoni tugagandan so'ng, biomassani ajratib olishda kul'tural suyuqlikning pH ko'rsatkichini 6,2-6,4 darajasigacha keltirib olamiz. Bunda maqsadga muvofiq bo'lgan barcha kristall oqsillarni sentrifugalash (5000 tez/min. 20 min) orqali ajratib olishga erishiladi. Buning uchun HCl ning kuchsiz eritmalaridan foydalanish mumkin.

Sinov savollari:

1. Mikroob insektisid biopreparatlardan nima maqsadda foydalaniladi?
2. *Bac. thuringiensis* entomopatogen bakteriyasi shtammlarini o'stirish uchun qanday oziq muhitlari tavsiya etiladi?
3. Produtsentni o'stirish va saqlashda nimalarga ahamiyat berish kerak?
4. Bakteriyalarni o'stirish va saqlashda qanday oziq muhitlaridan foydalanish mumkin?
5. Fermentatsiya jarayonigacha pH ko'rsatkichi qanday bo'lishi kerak?

4-laboratoriya ishi

Mikroorganizmlar asosida entomopatogen biopreparatlar olish texnologiyasi, produtsentlari va xom-ashyo manbalarini o'rganish

Ishdan maqsad: o'rganilayotgan bakteriyalarning biomassasini ajratib olish, biomassadagi sporalar va kristallarni alohida ajratish va ularning miqdorini mikroskopik tahlil qilishni o'rganishdan iborat.

Ishning tashkil etilishi: murabbiy guruh talabalarini ikki guruhga ajratadi.

Birinchi guruh talabalari: kultural suyuqlikdan mikroob biomassasini sentrifugalash usulida ajratib olishadi va undan belgilangan tartibda kristall oqsillarni ajratishadi;

Ikkinchi guruh talabalari: qattiq oziq muhitida o'stirilgan biomassani yig'ib, undan sporalar va kristall oqsillarni belgilangan tartibda ajratishadi.

Har ikkala guruh talabalar oqsillarni quyidagi chizma asosida bajarishlari va mikroskopda tahlil qilishlari lozim. Mikroskop ostida ko'rgan spora va kristall oqsillar rasmlari daftarlarga chizib olinadi.

Dars (ikkinchi juftlik) oxirida talabalar laboratoriya daftarlariga qayd etilgan ma'lumotlar asosida joriy nazorat topshiradi va mashg'ulotga ajratilgan reyting balini oladi. Reyting balini to'play olmagan talaba keyingi mashg'ulotgacha ushbu laboratoriya ishini qayta topshirishi mumkin.

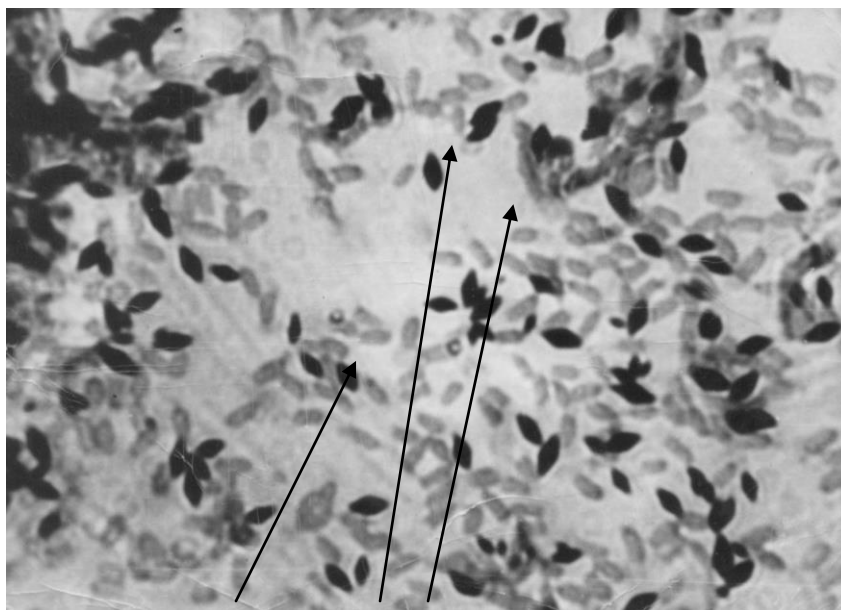
Tushuntirish:

Ma'lumki, oqsillar tirik organizmdagi morfologik va boshqa o'zgarishlarning asosini belgilaydi va o'zgargan genotip haqida informatsiya beruvchi biopolimer modda hisoblanadi. Kristall ko'rinishdagi oqsillarning funksional va aminokislotalari tarkibini o'rganish ularni toza holda ajratib olish muammosini tug'diradi. Ushbu bakteriyalarda, kristallarni spora, vegetativ hujayra va ularning fragmentlaridan ajratish uchun asosan quyidagi usullardan foydalaniladi: xloroform – suv, tetrabrom etan – suv, to'rtxlorli uglevodorod 1% li natriy sulfat, polietilenglikol 6000 – dekstransulfat natriy 500, flotatsiya, CsCl zichligi gradientida qavatida sentrifugalash va h.k. Ammo ushbu usullar yordamida *Bac. thuringiensis* kulturalaridan toza kristallar ajratib olish katta qiyinchilik tug'diradi. Shu boisdan shtammlardan kristallarni ajratib olishda biz Pendlton usulidan ma'lum bir o'zgartirish kiritgan holda quyidagi tartibda ish olib borish tavsiya etamiz. Pendlton usulida ikki fazali (1% li natriy sulfat–n-ksilol) tozalash usulidan foydalanilgan bo'lsa, biz birinchi bosqichdagi gomogenizatorida aralashtirish va tindirishdagi 1% li natriy sulfat o'rniga kulturani o'stirishda foydalanilgan suyuq oziq muhitidan, oxirgi bosqichda esa suvdan foydalanamiz.

Pendlton usulini bunday modifikatsiya qilish bizga *Bac. thuringiensis* var. *thuringiensis* bakteriyasi shtammlaridan 99% dan ko'proq toza kristall ajratib olish imkonini beradi.

Shu nuqtai nazardan tabiiy va mutant shtammalarning umumiy oqsil spektrlarini qiyosiy o'rganish ular genomidagi molekulyar o'zgarishlarni farqlashga va keyingi biotexnologik jarayonlarni bajarishga yordam berishi mumkin. Ushbu oqsillarni toza holda ajratib olish qishloq xo'jaligi, meditsina va fundamental tadqiqotlarda katta ahamiyatga ega.

Talabalar ish davomida ushbu kulturalarning quyidagi rasmlardagidek manzaralarni ko'rishlari mumkin:

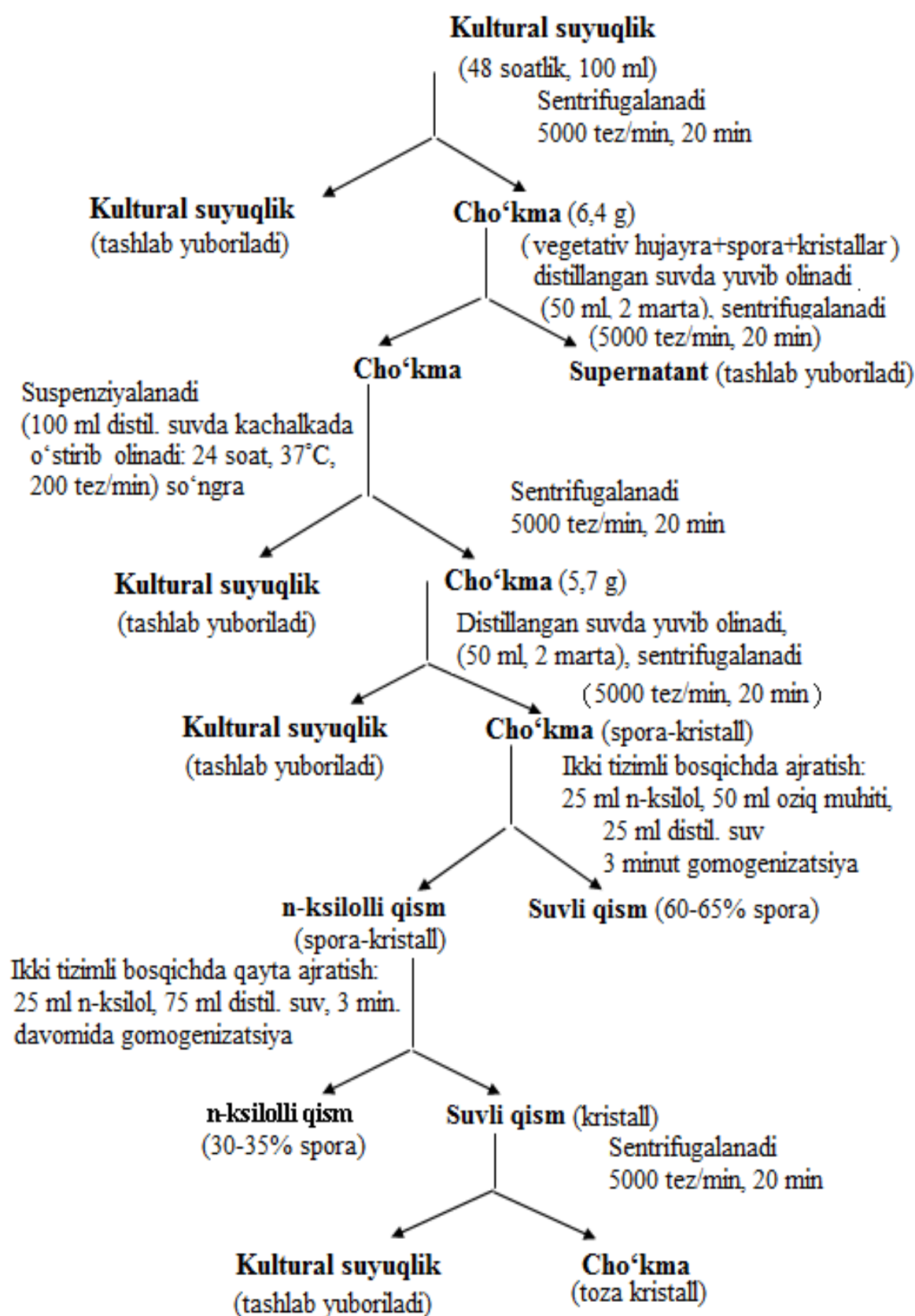


15-rasm. Spora va kristall oqsillarning ko‘rinishi

Asbob-usunalar va materiallar:

- ✓ 500-700 ml-li kimyoviy stakanlar (8 ta);
- ✓ n-ksilol (200 ml);
- ✓ distillangan suv va bir litrli kolbalar;
- ✓ Petri likobchalari (zarur miqdorda);
- ✓ Suyuq oziq muhitidan biomassani cho‘ktirish uchun epindorf yoki sentrifuga stakanlari (zarur miqdorda);
- ✓ Sentrifuga;
- ✓ Mikroskop va zarur bo‘yoqlar;
- ✓ pH-metr.

5) **Ishning borishi:** talabalarga quyidagi chizma asosida ishlash tavsiya etiladi:



1-chizma. Kultural suyuqlikdan kristall oqsillarni ajratib olish chizmasi

Sinov savollari:

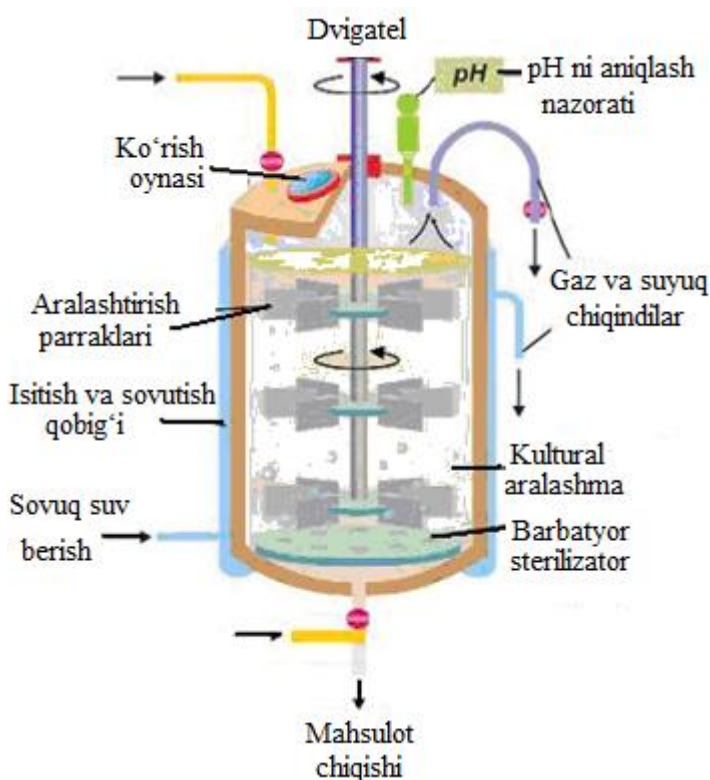
1. Nima tirik organizmdagi morfologik va boshqa o'zgarishlarning asosini belgilaydi?
2. Kristall ko'rinishdagi oqsillarning funksional va aminokislotalari tarkibini o'rganishda qanday muammolar mavjud?
3. *Bac. thuringiensis* kulturalaridan toza kristallar ajratib olish qanday usulda amalga oshiriladi?
4. Pendlton usuli nima?
5. Oqsillarni toza holda ajratib olish qaysi sohalarda katta ahamiyatga ega?

5-laboratoriya ishi

Fermentlarning mikroorganizm – produtsentlarini suyuq oziq muhitlarda o'stirish

Ishdan maqsad: Fermentlarni mikroorganizm produtsentlarini suyuq oziq muhitida o'stirish usuli orqali ularni ekish va ajratib olishni o'rganish.

Kerakli reaktiv va asboblari: Suv, mineral tuzlar (uglerod, azot) maxsus chayqatgich (kachalka) sterilizator, fermentyor, sentrifuga, pH-metr, tarozi.



16-rasm. Mexanik aralashtirgichli fermentyor

Laboratoriya sharoitida: Producerslarni suyuq oziq muhitini tayyorlash uchun suv, mineral tuzlar, uglerod, azot manbalari qo'shib sterillanadi va oziq muhitiga steril sharoitda ferment produtsenti ekiladi. Suyuq oziq muhitida ekilgan produtsentlar maxsus chayqatgichga qo'yib chuqur o'stiriladi. Chayqatgich (kachalka)da o'stirilganligi uchun chuqur o'stirish usuli hisoblanadi.

Bu usul qattiq oziq muhiti yuzasida o'stirish usuliga qarganda bir qator, ya'ni ishlab chiqarish maydonini bir necha marotaba qisqartirishga, og'ir qo'l mehnatini bartaraf qilishga, mehnat gigienasini yaxshilashga, ishlab chiqarishni avtomatik tizimini yaratishga va boshqa ustunliklarga ega.

Suyuq oziq muhiti ichida o'stirishda oziqani bir muncha iqtisod bilan ishlatishga va ferment preparatlarini tozaroq hamda yuqori faollik bilan olishga erishish mumkin.

Mikroorganizmlarni suyuq oziqa muhiti ichida o'stirish vertikal holatda joylashgan fermentyorlarda olib boriladi. Fermentyorga qo'yilgan eng asosiy talab produtsentni o'stirish jarayonida intensiv havo almashinuvi bilan birga atseptika sharoitlarini vujudga keltirish imkoniyatlaridir. O'stirish jarayonida murakkab bo'lgan uch fazali suyuqlik-qattiq, jism-gaz tizimi bilan ishlashga to'g'ri keladi. Bu tizimda massa almashinuv jarayonlari juda qiyin kechadi va uskunani o'stirishning hamma bosqichlariga moslab yaratish ancha mushkuldir.

Sanoatda ishlatilayotgan fermentyorlarni havo almashinuvi uchun energiya uzatishi va aralashtirish usullariga qarab uch guruhga bo'lish mumkin:

1. Mexanik aralashtirgichli va purkama uskunalar (birlashtirilgan);
2. Siqilgan havoni purkash tizimiga (energiyani suyuqlik ichiga purkovchi) asoslangan uskunalar;
3. Purkashga asoslangan (energiyani gaz fazasiga uzatuvchi) uskunalar.

Ferment sanoati uchun birinchi guruh fermentyorlari atseptika talablariga javob berishlari bilan juda katta ahamiyatga ega. Bu uskunalar asosan silindr shakligi ega bo'lib, bir-birlaridan hajmi, ichki tizim konustruksiyasi, aylantirish tezligi va qurilmalari hamda issiqlik almashtirish moslamalari bilan farq qiladi.

Fermentyorlarning eng yirigi mexanik aylantirgichlari va ko'pik so'ndirgichlari bilan birgalikda 2000 m³ hajmga ega. "Xeman" firmasi 360-400 m³ li fermentyorlarni ishlab chiqarish va joriy qilish bilan shug'illanadi.

Bizda asosan Rossiyada ishlab chiqarilgan 50 m³ li va 100 m³ li germetik berk bo'lgan va mexanik aralashtirgichli hamda havoni purkovchi fermentyorlardan keng miqyosda foydalaniladi. Bundan tashqari Germaniya mahsuloti bo'lgan 63 m³ li fermentyorlar juda ko'plab ferment korxonalarida ishlatiladi.

Sinov savollari:

1. Fermentyorga qo'yilgan eng asosiy talab nimadan iborat?
2. Suyuq oziq muhiti ichida o'stirish orqali qanday faollikka erishiladi?
3. Sanoatda ishlatilayotgan fermentyorlarni qanday turlari bo'ladi?
4. Birinchi guruh fermentyorlari qanday ahamiyatga ega?

6-laboratoriya ishi

Fermentlarning mikroorganizm – produtsentlarini qattiq oziq muhitlarda o'stirish

Ishdan maqsad: Talabalarga fermentlarni mikroorganizm produtsentlarini qattiq oziq muhitlari yuzasida o'stirishni laboratoriya va sanoat usullarida ajratib olishni o'rgatish.

Kerakli reaktiv va asboblari: Jelatin, agar-agar, mineral tuzlar (uglerod, azot), suv, avtoklav, kyuveta, kolba, maxsus aralashtirgich, chayqatgich (kachalka) sterilizator, termometr, termostat.

Laboratoriya sharoitida: produtsentlarni qattiq oziq muhiti yuzasida o'stirish uchun suv, mineral tuzlar uglerod, azot manbalari qo'shib sterillanadi va oziq muhitiga steril sharoitda ferment produtsenti ekiladi. Bu jarayon huddi suyuq oziq muhitini tayyorlash kabi boradi, qo'shimcha qilib yuqoridagi oziq muhiti tarkibiga jelatin yoki agar-agar solinadi. Avtoklavda sterilizatsiya qilingach, soviq holatda ekiladi, keyin qattiq dirildoq massa hosil bo'ladi. Qattiq oziq muhitining ustida ferment produtsenti yuzaki o'stiriladi, va biomassa hosil qilinadi keyin hujayra ichidagi fermentlari ajratib olinadi. Shu usul orqali ferment produtsentlarini qattiq oziq muhitlarida o'stirilib ajratiladi.

Sanoatda: esa produtsentlarni o'stirish jarayoni sovutilgan steril oziq muhitiga ekish materialini sepishdan boshlanadi. Davriy sterilizatsiya sharoitida ekishni odatda sterilizatorning o'zida uzluksiz aralashtirish yo'li bilan o'tkaziladi. Uzluksiz sterilizatsiya qilish sharoitida esa

oziqaga ekish sterilizatorning sovitish bo'limida amalga oshiriladi va ekilgan oziq muhiti kultura bilan birgalikda o'stirish sexiga yuboriladi.

Kulturalarning qattiq oziq muhiti yuzada o'stirish jarayonini har xil usullar bilan bajarish mumkin. Kyuvetalarga ekib o'stirish ananaviy usul hisoblanib, ko'p qo'l mehnatini va ko'p ishlab chiqarish maydonini talab qiladi. Produtsentlarni mexanizatsiyalashgan qurilmalarda o'stirish birmuncha yangi usul bo'lib hisoblanadi.

Kyuvetali o'stirish usulining elementar yacheykasi bo'lib oddiy ruxlangan temir tunikadan yasalgan usti ochiq yoki yopiq va balandligi 20-50 mm li 0,25-0,50 m² maydonga ega bo'lgan idish tashkil qiladi. Bu idishning tag qismi teshikli yoki teshiksiz bo'ladi.

Kyuvetalarga 2-2,5 sm qalinlikda namlangan, ekilgan oziq muhiti solinadi va u o'stirish xonasiga yuboriladi. Bu yerda kyuvetalar harakatlanuvchan yoki statsionar uskunalarda bir necha qavatli qilib teriladi. Har bir qavat orasi 10-11 sm bo'ladi.

Odatda bu qavatlar soni 18 ta atrofida bo'lib, umumiy bo'yi 2 m dan oshmasligi kerak. Birinchi kyuveta 20-25 sm balandlikda o'rnatiladi. Hamma temir uskunalar korroziyaga qarshi material bilan qoplangan bo'lishi lozim. Kyuvetalarni o'stirish xonasiga bo'shatishda ular formalin bilan dizenfeksiya qilinadi. O'stirish xonalari harxil shakl va ko'rinishda bo'lishi mumkin. Ko'pincha ular uzun ensiz ikki tomoniga eshik o'rnatilgan yo'lak shaklida bo'ladi. O'stirish xonasi tepasida havo haydash va havoni tozalash moslamalari o'rnatiladi. O'stirish xonalarida olib boriladigan butun texnologik jarayonlar 36-90 soat davom etadi.

Mexanizatsiyalashgan o'stirish qurilmalarini yaratishning imkoniyatlari oziq muhiti qavatlarining orasida havoning yaxshi aylanishi, zichlashib qolmasligi yoki tezda qurib qolmasligi kabi talablar bilan cheklangan. Shu bilan birga ularni shunday qurish kerakki, agarda o'stirilayotgan mikroorganizmlar ifloslanib qolsa, o'stirish tizimini to'xtatmasdan shu yerdagi ifloslangan oziq muhitlarini bimalol almashtirish va sterilizatsiya qilish imkoniyatlari bo'lishi kerak. Bunday nisbatan yaxshi qurilmalarga Djeffris, Xristensen, Anderkofler, Valershteyn, Chexoslovakiya va VNIIFS, VNII biotexnika va boshqalar ishlab chiqargan uskunalarni kiritish mumkin Djeffris va Xristensen qurilmalari tuzilishi jihatidan bir-birlaridan sal farq qilsada, ishlash mexanizmi harakatlanuvchan tasma yoki transporteriga asoslangan va har bir o'stirish jarayoni to'liq bajariladi. Lekin bu qurilmalarda ifloslanish hodisasi ruy bersa butun boshli tizimni to'xtatish va hamma qismlarini sterilizatsiya qilish kerak bo'ladi.

Mikroorganizmlarni mexanizatsiyalashgan o‘stirishning Anderkofler, Valershteyn va Chexoslovakiya qurilmalarida o‘stirishni uzluksiz olib borish, har bir qism va jihozlarni alohida sterilizatsiya qilish mumkin va ifloslanish jarayonida butun tizimni to‘xtatish shart emas. Ularning samaradorligi sutkasiga 0,4 tonnadan 10 tonnagacha bo‘lishi kuzatilgan.

Sinov savollari:

1. Laboratoriya sharoitida produtsentlarni qattiq oziq muhiti yuzasida o‘stirish qanday amalga oshiriladi?
2. Sanoat sharoitida produtsentlarni o‘stirish jarayoni qanday olib boriladi?
3. Laboratoriya va sanoat usullarida produtsentlarni o‘stirish farqi nimada?
4. Mexanizatsiyalashgan o‘stirish qurilmalarini samarali tomoni nimada?

7-laboratoriya ishi **Amilolitik ferment faolligini aniqlash**

Ishdan maqsad: So‘lak tarkibidagi amilaza faolligini sifat va miqdoriy jihatdan aniqlash usulini o‘rganish.

Kerakli reaktiv va asboblari: 10 marta suyultirilgan so‘lak eritmasi; 0,1% li kraxmal eritmasi; yod eritmasi; 1% li mis sulfat eritmasi; 1% li osh tuzi eritmasi; probirkalar; byuretkalar; pipetkalar; shtativ; suv hammomi; termometr.

So‘lak tarkibidagi amilaza faolligi deganda 1 ml hajmdagi so‘lakning ma‘lum bir vaqt (30 daqiqa) davomida qancha miqdordagi kraxmalni parchalash tezligi tushuniladi. Kraxmal ferment ta‘sirida to‘la parchlanganda yod eritmasi bilan odatdagi zangori rang o‘rniga qizg‘ish rang hosil qiladi.

So‘lak tarkibidagi amilaza faolligini aniqlash paytida fermentlar tezligiga ta‘sir qiluvchi aktivatorlarning faoliyatini ham kuzatish mumkin. Masalan, substratga ozgina osh tuzining suyultirilgan eritmasini qo‘shish bilan reaksiya tezligi oshsa, mis sulfat tuzi ta‘sirida esa kraxmalning parchalanish tezligi ancha pasayadi.

Ishning bajarilishi: 10 ta probirka olib, ularning har biriga 1 ml distillangan suv quyiladi va shtativga tartib raqami bilan joylashtiriladi. So‘ngra birinchi probirkaga 10 marta suyultirilgan so‘lakning filtrlangan eritmasidan 1 ml olib solinadi va yaxshilab aralashtiriladi. Birinchi

probirkadagi aralashmadan pipetka yordamida 1 ml olib ikkinchi probirkaga solinadi va yaxshilab aralashtiriladi. Ikkinchi probirkadagi aralashmadan uchinchi probirkaga va hokazo to'qqizinchi probirkaga, undan esa o'ninchi probirkaga olib solinadi. O'ninchi probirka ham yaxshilab aralashtiriladi va undan 1 ml aralashma olib tashlanadi. Shu tartibda tayyorlangan eritmalarning hajmi bir xilda bo'lib, aralashma tarkibidagi ferment konsentratsiyasi birinchi probirkadan boshlab o'ninchi probirkagacha kamaya boradi. so'ngra har bir probirkaga 1 ml dan distillangan suv va 0,1% li kraxmal eritmasidan 2 ml dan solib, yaxshilab aralashtiriladi. Probirkalarga kraxmalni oxirgi o'ninchi probirkadan boshlab solish kerak.

Kraxmal solingach, probirkalar harorati 37°C bo'lgan suv hammomida 30 daqiqa tutiladi. Mo'ljaldagi vaqt o'tishi bilan probirkalar suv hammomidan olinib, vodoprovod tagida sovitiladi va tartib raqami bo'yicha shtativga joylashtiriladi. So'ngra probirkalarning har biriga 1-2 tomchi yod eritmasidan tomizilib sekin-asta chayqatiladi. Probirkalardagi aralashmalar yod ta'sirida so'lak konsentratsiyasiga qarab sariq, qizil-qo'ng'ir va ko'k ranggacha bo'yaladi.

Sariq rangning hosil bo'lishi, kraxmalning amilaza ishtirokida to'la parchalanganligini ko'rsatadi. Qizil-qo'ng'ir rangning hosil bo'lishi, kraxmal parchalanishida oraliq birikmalarda dekstrinlar borligini ko'rsatadi. Aralashmalarning ko'k rangga bo'yalishi esa amilazaning kraxmalni butunlay parchalamaganligidan dalolat beradi.

So'lak tarkidagi amilaza faolligini hisoblash. Qaysi bir probirkada ko'k rang hosil bo'lgan bo'lsa, kraxmal hali parchalanmagan deyiladi. Agar probirkadagi eritmada hech qanday ko'k rang hosil bo'lgan bo'lmasa, u probirkadagi kraxmal to'la parchalangan bo'ladi. Faraz qilaylik, to'rtinchi probirkagacha ko'k rang ro'y bermagan bo'lsin. Beshinchi probirkadan boshlab esa aralashmada salgina ko'kimtir rang paydo bo'lib, qolgan probirkalarda ko'k rangning hosil bo'lishi kuchaya borsin. Kuchsiz ko'k rangning hosil bo'lishi beshinchi probirkada kuzatilganligi uchun ham, u yerdagi so'lak konsentratsiyasi $1/60$ ga teng bo'ladi. Bu beshinchi probirkadagi so'lakning 160 marta suyultirilganligini ko'rsatadi.

Agar $1/160$ millilitr so'lak – 2 ml, 0,1% li kraxmalni

1 — X parchalagan bo'lsa,

$$X = \frac{2 \times 1}{\frac{1}{160}} = 320 \text{ ml}$$

Demak, 1 ml suyultirilmagan so‘lak, yarim soat davomida 37°C da 0,1% li kraxmalning 320 millilitrini parchalashi mumkin.

Sinov savollari:

1. Amilaza fermenti qaysi ferment guruhiga mansub?
2. Kraxmalni amilaza ta’sirida to‘liq parchalanganligini qanday aniqlash mumkin?
3. Ferment faolligi uchun haroratning ahamiyati qanday?
4. So‘lak tarkidagi amilaza faolligini hisoblash qanday amalga oshiriladi?

8-laboratoriya ishi

Mikroorganizmlar tomonidan sintez qilinadigan fermentlarni ajratib olish

Ishdan maqsad: Mikroorganizmlar sintez qiladigan fermentlarni cho‘ktirish usuli yordamida ajratib olish usulini o‘rganish.

Tusuntirish. Fermentlar kimyoviy tabiatiga ko‘ra yuqori molekulyar massaga ega bo‘lgan oqsil moddalar bo‘lib, reaksiya tezligiga katalizator sifatida ta’sir ko‘rsatadi, ya’ni uning faollanish energiyasini pasaytiradi va osonlikcha ketishini ta’minlaydi, lekin o‘zireaksiyaning oxirgi mahsulotlari tarkibiga kirmaydi.

Fermentlar ham oqsillar kabi yarim o‘tkazgich parda orqali o‘tmaydi, yuqori haroratga chidamsiz – termolabildir, ular yuqori harorat ta’sirida denaturatsiyaga uchraydi, o‘z faolligini yuqotadi. Fermentlar denaturatsiyaga faqat yuqori harorat ta’sirida uchragina qolmay, balki boshqa omillar ta’sirida ham, masalan, mineral kislotalar, ishqorlar, og‘ir metall tuzlari, alkaloidli reaktivlar, eritmani uzoq vaqt chayqatish, ultrabinafsha va rentgen nurlari ta’sirida ham o‘z faolligini yo‘qotadi.

Organizmida fermentlar turli oqsil va boshqa moddalar bilan aralashma hamda kompleks holida uchraydi. Fermentlar ham oqsil modda sifatida fizik-kimyoviy tabiati jihatidan boshqa oqsillar aralashmasida juda kam uchraganidan ularni ajratib olish ancha murakkab. Lekin bu jarayonda fermentlarning faolligini kuzata borib aralashma tarkibida uning bor yoki yo‘qligini, konsentratsiyasining ortib

borishi yoki qandaydir noqulay sharoitlar ta'sirida kamayishi yoki butunlay yo'qolib ketishini nazorat qilib turish mumkin.

Fermentlarni ajratishning dastlabki davrlarida ular bilan birga qo'shib ekstraksiya qilingan juda ko'p boshqa oqsillardan qutulish kerak. Buning uchun oqsillar massasi isitilganda ularning tanlab denaturatsiya qilinishidan foydalanish mumkin. Bunda, ko'pincha, ferment faolligini saqlab qolgan holda yo'ldosh inert oqsillar denaturatsiyaga uchrab cho'kadi, ular filtrlash yoki sentrifugalash yo'li bilan bartaraf qilinadi. Qo'shimcha oqsillarning ko'pgina qismidan ozod qilingandan so'ng fraksiyalab cho'ktirish orqali eritmadan eng katta fermentlik faolligiga ega fraksiya olinadi. Buning uchun eritma neytral tuzlar, asosan ammoniy sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bilan turli darajada to'yintiriladi. Eritma ammoniy sulfat bilan to'la to'yintirilganda barcha oqsillar ham ajralib cho'kmaga tushadi. Olinmoqchi bo'lgan ferment-eritma ammoniy sulfat bilan qay darajada to'yintirilganda uning cho'kishi tajriba yo'li bilan aniqlanadi. cho'ktirish uchun spirt, atseton, dioksan ham qo'llaniladi.

Fermentlarni toza holda ajratib olish uchun oqsillar kimyosining barcha qudratli va nozik usullari elektroforezning turli variantlari, ion almashinuv, biospetsifik (affin) xromatografiya, gel (sefadesklar) orqali filtrlash va preparativ ultrasentrifugalashdan foydalaniladi.

Fermentlarni tuzlar yordamida cho'ktirish.

Kerakli reaktivlar va asboblari: Mikroorganizm (bakterial yoki zamburug' o'stirilgan kultural suyuqlik) kultural suyuqligi; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ning to'yingan eritmasi; MgSO_4 tuzi; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ning yarim to'yingan eritmasi; atsetat kislota; NaCl tuzi; probirkalar; pipetkalar; shtativ.

Fermentlar oqsiltabiat moddalar bo'lganligi uchun tuzlar ta'sirida oson cho'kmaga tushadi. Bu jarayon fermentlarni tuzlanishi deyiladi.

Ishning bajarilishi. I. Toza yuvib quritilgan probirkaga 2-3 ml mikroorganizm kultural suyuqligidan olib, uning ustiga teng hajmda ammoniy sulfatning yarim to'yingan eritmasi solinadi va eritma chayqatiladi. Probirkada hosil bo'lgan ammoniy sulfatning yarim to'yingan eritmasida zarrachalari albuminlarga nisbatan katta bo'lgan globulinlar cho'kmaga tushadi. Cho'kmadagi globulinlar filtrlash yo'li bilan ajratib olinadi.

Filtratda qolgan albuminlarni ajratib olish uchun probirkadagi eritmaga $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ning maydalangan kukunidan to'yingan tuz eritmasi

hosil bo'lgunga qadar qo'shiladi. Natijada albuminlar cho'kmaga tushadi. Probirkadagi cho'kma filtrlash yo'li bilan ajratiladi. Eritmada ferment (oqsil)ning qolgan-qolmaganligini biuret reaksiyasi orqali aniqlanadi.

II. Fermentlarni natriy xlorid va magniy sulfat tuzlari bilan cho'ktirish uchun ikkita probirka olib, ularning har biriga kultural suyuqlikdan quyuladi, so'ngra birinchi probirkaga natriy xloridning maydalangan kukunidan, ikkinchi probirkaga esa magniy sulfat kukunidan to'yingan tuz eritmasi hosil bo'lguncha qo'shiladi. Natijada globulinlar cho'kmaga tushadi. Probirkalardagi cho'kma filtrlash yo'li bilan ajratib olinadi. Neytral tuz eritmalarida cho'kmaga tushmagan albuminlar filtratda qoladi.

Sinov savollari:

1. Fermentlar tarkibiga ko'ra qanday moddalar?
2. Oqsillar denaturatsiyasi deganda nima tushuniladi?
3. Fermentlarni toza holda ajratib olish uchun qanday usullardan foydalaniladi?
4. Fermentlarni tuzlar yordamida cho'kmaga tushirish uchun qanday usullardan foydalaniladi?

9-laboratoriya ishi

Oziq muhitidagi va kultural suyuqlikdagi glyukoza miqdorini aniqlash va achitqilarni o'stirish

Ishdan maqsad: O'tkaziladigan o'quv jarayonidan mavzuni o'zlashtirishi natijasida talabalar quyidagilarni biladi:

mikroorganizmlarni o'stirish jarayonida biologik ko'rsatkichlarni aniqlashning asosiy usullarini;

bioreaktorlarning massa almashinish tavsifi, asosiy qonuniyatlarini va hisoblash formulalarini o'zlashtiradi.

Talabalar oldindan belgilangan xususiyatli kultural suyuqlik olish bo'yicha bir qadar xarakterli bo'lgan texnologik jarayonlarni bajarish bo'yicha ko'nimkmalarga ega bo'ladilar.

1-ish. Ishning tashkil etilishi:

1-jadval

Mashg'ulotda vaqt taqsimoti

№	O'quv savollari	Ajratilgan vaqt, minut
1	Kirish (mavzu bo'yicha ma'ruza tarzida tushintirish beriladi)	5
2	Asosiy nazariya	20
3	Amaliy qism: 1. Achitqilarni xemostat usulida o'stirish davomida k-ko'rsatkichini aniqlash; 2. k_S , k_{PS} , G , Y , η - ko'rsatkichlarini aniqlash;	100
4	Eksperimental ma'lumotlarni umumlashtirish va tajriba bayonnomasini yozish;	20
5	Laboratoriya ishini himoya qilish;	10
6	Yakunlovchi qism.	5
Jami:		160 minut

O'qituvchi o'stirish usullarini o'rgatish uchun talabalarni ikki guruhga ajratadi:

Birinchi guruhdagi talabalar: oziq muhiti tayyorlash va kultural suyuqlikdagi glyukozani aniqlashni o'rganishadi.

Ikkinchi guruhdagi talabalar: achitqilarni xemostat usulida o'stirish uskunasiqa quyilishini kuzatadilar;

O'stirish uskunasi o'stirish jarayonlarini laboratoriya mudiri, ya'ni texnik xodim bajarib berishi lozim.

Har guruhdan 2-3 ta talaba biopreparat olishning asosiy rejimini bajarib ko'rishi kerak. Ishning borish jarayonida o'qituvchi talabalarning savollariga javob berib boradi, talabalar esa ishchi daftarlariga qayd etib borishlari kerak.

Shundan keyin (50 minutdan so'ng) talabalar ishchi o'rinlarini almashtirishadi. Ishchi o'rinni almashtirish rejasi keyingi jadvalda aks ettirilgan:

2-jadval

Oziq muhiti va ekuv materialini tayyorlash uchun vaqt me'yorlari

№	Bajariladigan ish	Vaqt, minut	Ishning natijasi
1	Glyukoza asosida 3 l (o'zgarishi mumkin) oziq muhiti tayyorlash	10	Oziq muhiti tayyorlanadi
2	Achitqidan ekuv materialini tayyorlash	10	Ekuv materialini tayyorlanadi
3	Kultural suyuqlikdagi glyukozani aniqlash	15	Sarf bo'lgan glyukoza miqdori aniqlanadi
4	Mikroskopik usulda hujayralar sonini aniqlash	15	Mikroorganizmlar hujayrasi ko'payishi aniqlanadi

3-jadval

Achitqilarni o'stirish rejasi

№	Bajariladigan ish	Vaqt, minut	Ishning natijasi
1	Achitqilarni xemostat rejimda turli xil F quyilish oraliqlarida o'stirish	50	
2	Ushbu rejimdan namunalar tanlash va laboratoriyaga topshirish		Har bir F ko'rsatkichidan

Tadqiqot natijalarini tahlil qilish va qayta ishlash ushbu vaqt taqsimotiga kiritilmagan. Buni talabalar mustqil bajarishlari mumkin. Zarur bo'lganda 2 soat audotoriya mashg'uloti tarzida o'tish maqsadga muvofiq bo'ladi.

Tushuntirish:

Ma'lumki, har qanday biotexnologik yoki mikrobiologik ishlab chiqarish sanoatida (non va non mahsulotlari ishlab chiqarish, alkogolli yoki turli xil sharbat ichimliklari ishlab chiqari va h.k.) produtsentlarni o'stirish va ulardan mahsulotlar olish jarayoni tayyorlanadigan oziq muhiti tarkibini to'g'ri tuzish va olingan yoki olinadigan mahsulotlar haqida to'g'ri tahliliy xulosalar chiqarish talab etiladi.

Ishlab chiqarish davomida, sarflanadigan xomashyo miqdori, uning mikroorganizmlar tomonidan o'zlashtirilishi va olinadigan mahsulotning

miqdori kabi ko'rsatkichlar asosiy e'tibor talab etadigan omillar hisoblanadi.

Ushbu ishda oziq tarkibiga kiritilgan glyukoza miqdorining sarf bo'lishi va produtsentning miqdori aniqlanadi. Har ikkala ko'rsatkichdan kelib chiqib glyukozaning sarfi va maqsaddagi mahsulotning chiqishi kabi asosiy ko'rsatkichlar haqida ma'lumot olish mumkin.

Zarur asbob-uskunalar va materiallar:

1. Fermentyor (zarur hollarda mikrobiologik chayqatgichdan ham foydalanish mumkin);
2. O₂ aniqlagichi;
3. kompressor (P - 1 atm. kam bo'lmasligi lozim);
4. Aylanma tubli kolbalar (250-350 ml), o'lchov naychalari – byuretkalar (500-300 ml);
5. Menzurkalar (5, 10, 25, 300 ml), pipetkalar (2-5 ml);
6. 0,5-1,0 n. natriy sulfit eritmasi;
7. 0,1 n. natriy tiosulfat eritmasi;
8. 0,1 n. yod eritmasi;
9. Glyukoza – 1 kg (zarur miqdori olinishi mumkin);
10. Etil spirti – 0,5 kg;
11. *S. cerevisiae* kulturasini (75% namlik holatidagi 100 g quruq preparat);
12. Glyukoza miqdorini aniqlash uchun reaktivlar to'plami.

Ishning borishi:

1) Oziq muhiti tayyorlash uchun:

- ✓ 5 litr o'lchamli steril idishga 0,5 kg glyukoza solinadi;
- ✓ 0,1 g NaCl, MgSO₄, KCl olinib, ushbu idishga solinadi;
- ✓ Ushbu idishga 36°C haroratli distillangan 3 l suv quyiladi va yaxshilab aralashtiriladi;
- ✓ Fotokolometrik usulda glyukoza miqdori aniqlanadi;
- ✓ Tajriba bayonnomasini to'ldiriladi.

2) Ekv materialini tayyorlash uchun:

- ✓ 50 g. *S. cerevisiae* achitqisi o'lchab olinadi;
- ✓ 500 ml hajmli idishga 300 ml distillangan 36°C haroratli suv quyib olinadi;
- ✓ O'lchab olingan achitqi namunasi ushbu idishga ya'ni suvga solinib yaxshilab aralashtiriladi;
- ✓ Mikroskopik usulda ekuv materiali miqdori nazorat qilinadi;
- ✓ Tajriba bayonnomasi to'ldiriladi.

3) Achitqilarni o'stirishni boshlash uchun:

✓ 36°C haroratli 5 l steril oziq muhiti o'stirish uskunasiga quyiladi (zarur bo'lganda termoregulyatorni qo'shish mumkin);

✓ 300 tez/min. da aylanadigan aralashtirgich (meshalka) yoqiladi va unga ekuv materiali quyiladi;

✓ Jarayon 15-20 minut davom ettiriladi, unga zarur bo'lganda ko'piksizlantiruvchi (10 ml) modda qo'shiladi;

✓ Shundan keyin xemostat rejimi boshlanadi. Buning uchun o'stirish uskunasiga alohida idishdagi oziq muhiti qo'shiladi, ya'ni qancha miqdorda F quyilsa, bir vaqtning o'zida shuncha miqdordagi kultural suyuqlik ajratib olinadi;

✓ Ushbu rejimda har 5 minut davomida 5 ml miqdorida probirkalarga alohida-alohida namunalar olinadi va glyukoza miqdori va mikroorganizmlar sonini tahlil qilish uchun olib qo'yiladi;

✓ Namunalarning miqdorlari aniqlanadi;

✓ Achitqilar miqdori mikroskopik tahlil va fotokolometrik usulda aniqlanadi;

✓ Quyidagi jadvalga olingan natijalar qayd etiladi:

4-jadval

Tadqiqot natijalari

<i>Namunalar №</i>	<i>Tajriba natijalari</i>		<i>Hisoblash natijalari</i>		
	<i>F, l/soat</i>	<i>S_{chiqish}, g/l</i>	<i>DqF₁/V_p, soat⁻¹</i>	<i>1/S</i>	<i>1/kq1/D, soat</i>
1					
2					
3					
4					

Talabaning kollokvium topshirishi uchun topshiriqlar:

1. Talaba uslubiy ko'rsatmada berilgan ma'lumotlar va chizmalarni daftoriga qayd etgan bo'lishi;
2. Oziq muhiti tayyorlashni bilishi va amalda ko'rsatib berishi;
3. Oziq tarkibidagi glyukoza miqdorini fotokolometrik usulda aniqlay bilish;
4. Ekuv materialidagi produtsentlar miqdorini mikroskopik nazorat qila olishi;

5. Kultural suyuqlikdagi glyukoza miqdori va mikroorganizmlar sonini hisoblab borishni amalga oshirishi va olingan natijalar asosida yuqorida berilgan jadvalni to'ldirishlari lozim.

Yuqorida berilgan topshiriqlarni bajargan talabalarga belgilangan tartibda reyting bahosi qo'yiladi.

2-ish. Olingan tajriba natijalarini qayta ishlash (hisoblash)

1. D , S^{-1} , k^{-1} ko'rsatkichlarini hisoblang;
2. $1/k$ q $f(1/S)$ grafigini tuzing;
3. Ushbu grafikdan $1/k_m \times \text{soat}$ yoki soat^{-1} , shuningdek k_s ni quyidagi formula bo'yicha aniqlang: $k_s q k_m \times \text{tg} \alpha_1$, kg/m^3 .
4. $S-S_0$, $S[k(k_s+S)]^{-1}$ ko'rsatkichini hisoblang va yuqoridagi jadvalni to'ldiring.
5. $S[k(k_s+S)]^{-1}$ q $f(S_0-S)$ grafigini tuzing.
6. k_{ps} ko'rsatkichini quyidagi formula bo'yicha hisoblang: $k_{ps}(\text{tg} \alpha_2 \times k_m)$.
7. k_s va $k_{\max}$ ko'rsatkichini aniqlashtiring. Buning uchun ushbu grafikni tuzing: $k_{ps}[k(k_{ps}+S_0-S)]^{-1} q f(S^{-1})$. Quyidagi formula bo'yicha $k_s q k_m \times \text{tg} \alpha_3$ k_s ni hisoblash uchun grafikdan k_m va $\text{tg} \alpha_3$ ni aniqlang.
8. O'stirish uskunasi samaradorligini (G) quyidagi formula bo'yicha hisoblang:

$$G = k_{\max} \frac{S_0 - \alpha_x}{k_{ps} + S_0 - \alpha_x} \times \frac{k_{ps}}{k_{ps} + \alpha_x} \times X$$

9. Iqtisodiy koeffitsiyenti (Y) quyidagi formula bo'yicha hisoblang:

$$G_{\text{o'rtacha}} = \frac{S_0 - S}{\alpha_\tau}, \quad Y = \frac{X_k - X_0}{S_0 - S}$$

bu yerda α - kg/kg biomassa birligi hosil bo'lishi uchun sarflanadigan substrat miqdori.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Finn R.K., Agutiation and Aeration, in Biological Engineering Science, Blakebrough N.(ed.), vol.1, p. 69, Academic Press, Inc., New York, 2007.
2. Manufacturing Process and Equipment. George Tlusty. Prentice Hall Lewiston NY, U.S.A 1999
3. Handbook of Food Processing Equipment (Food Engineering Series) 2nd ed. 2016 Edition, George Saravacos, Athanasios, E. Kostaropoulos Springer; 2nd ed. 2016 edition), USA 2015
4. Неверова О.А., Гореликова Г.А., Позняковский В.М. Пищевая биотехнология. Продуктов из сырья растительного происхождения. Новосибирск – 2007.
5. Biotexnologiya asoslari. Elektron darslik. TXTI – 2006. X.M. Komilov, M.M. Raximov, D.Yu. Odilbekova. Biotexnologiya asoslari. Elektron darslik. Toshkent. “EXTREMUM PRESS” 2010.
6. Oziq-ovqat va ozuqa mahsulotlari biotexnologiyasi. Elektron darslik. TXTI – 2006.
7. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Введение в биотехнологию. – Минск. БГУ, 2002.
8. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Дегтяров С.В. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. – Москва: Высшая школа, 2002.
9. Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б., Гринь Н.А. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учебное пособие. – Москва, 2002.

Elektron resurslar

1. <http://www.ziyo.net>
2. www.cbio.ru
3. www.biotex.ru
4. www.promega.com
5. www.molbio.ru
6. www.biotech.ru

Mundarija

№	Mavzularning nomi	Bet
1	Kirish. Biotexnologiya haqida umumiy tushunchalar.....	3
2	Biotexnologiya laboratoriyasiga qo'yiladigan asosiy talablar va asbob-uskunalar bilan ishlash tartibini o'rganish.	7
3	Hujayra va to'qima to'plamlari bilan ishlash jarayonida sterillash usullari.....	18
4	Mikroorganizmlarni ekish uchun oziq muhiti tayyorlash va sterilizatsiya qilish.....	22
5	Mikroorganizmlar asosida entomopatogen biopreparatlar olish texnologiyasi, produtsentlari va xom-ashyo manbalarini o'rganish.....	26
6	Fermentlarning mikroorganizm – produtsentlarini suyuq oziq muhitlarda o'stirish.....	30
7	Fermentlarning mikroorganizm – produtsentlarini qattiq oziq muhitlarda o'stirish.....	32
8	Amilolitik ferment faolligini aniqlash.....	34
9	Mikroorganizmlar tomonidan sintez qilinadigan fermentlarni ajratib olish.....	36
10	Oziq muhitidagi va kultural suyuqlikdagi glyukoza miqdorini aniqlash va achitqilarni o'stirish.....	38
11	Foydalanilgan adabiyotlar.....	43

Tuzuvchi: Sattarov M.E., Parpiyev Z.T.
“Biotexnologiya asoslari” fanidan laboratoriya ishlarini bajarish
uchun uslubiy qo‘llanma.

Muharrir: Sidikova K.A.