

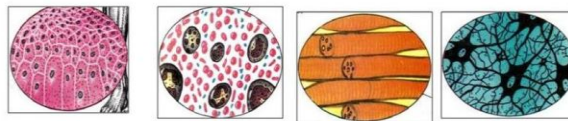
**Энзимдерді бөліп алу мен тазарту әдістері,
энзимдердің белсенділігін анықтау әдістері**

***Лектор: қауымдастырылған профессор, химия
ғылымдарының кандидаты Тюсюпова Бакыт
Баймуратовна***

Дәрістің жоспары:

- 1. Энзимдерді бөліп алу әдістері**
- 2. Энзимдерді тазарту әдістері**
- 3. Энзимдердің белсенділігін анықтау әдістері**

Ферменттердің әсерін зерттеу кезінде **гомогенат** деп аталатын заттарды жиі пайдаланады.



Гомогенатты алу үшін жуылған бактериялық массаны, өсімдік немесе жануар ұлпасын келішеде немесе **гомогенизатор** деп аталатын құралда ұсақтайды.



Көптеген ферменттерді бөліп алу үшін ацетондық ұнтақтар деп аталатын заттарды пайдаланады.

Бұл жақсы тәсіл, алайда барлық ферменттерге жарамайды. Өйткені олардың кейбіреулері ацетонның әсерінен белсенділіктерін жоғалтуы мүмкін.

**Сулы немесе тұзды экстракттан
бізді қызықтыратын ферментті қалай бөліп
алуға болады?**

✚ Алайда, осы тәсілдің **айтарлықтай кемшілігі бар**, ол барлық ферменттердің спирт немесе ацетонмен өңдеуге шыдай алмайтындығы, өйткені ол кезде олардың кейбіреулері **табиғисызданады да, өздерінің белсенділігін жоғалтады.**

✚ Органикалық еріткіштермен ерітіндіден тұндырған кезде ферменттердің табиғисызданбауы және белсенділігін жоғалтпауы үшін операцияны берілген еріткіш пен судың қоспасының қату температурасына жақын төменгі температурада жүргізу керек.

✚ Органикалық еріткіштерден басқа ферменттерді бөліп алу үшін ***ерімталдандырмауды*** қолданылады. Бұл өте кең таралған әдіс, оны ғылыми зерттеулерде белсенділігі жоғары ферменттік препараттарды алу үшін пайдаланады.

✚ Ферменттерді бөліп алу үшін және бір-бірінен ажырату үшін ***препараттық электрфорезі*** қолданылады.

Қазіргі кезде ферменттерді бөліп алу және ажырату үшін әдетте аймақтық электрофорез пайдаланылады.

Ферменттерді бөліп алу мен тазартудың маңызды тәсілі - оларды **ерітінділерден таңдамалы адсорбциялау.**

Алғаш рет А.Я. Данилевский қолданған, бұл тәсілді Р.Вильштеттер кең пайдаланды. Бұл тәсілде ерітіндідегі фермент белгілі-бір адсорбентпен, мысалы, алюминий оксидімен адсорбцияланады.

Ерітіндіден **таңдамалы адсорбциялау әдісі** ферменттік өнеркәсібінде саңырауқұлақтың және бактериалдың амилазаны **бөліп алу және тазартуда қолданылады.** Бұл кезде адсорбент ретінде крахмал пайдаланылады, ол осы фермент үшін **төлсипаттық адсорбент** болып табылады.

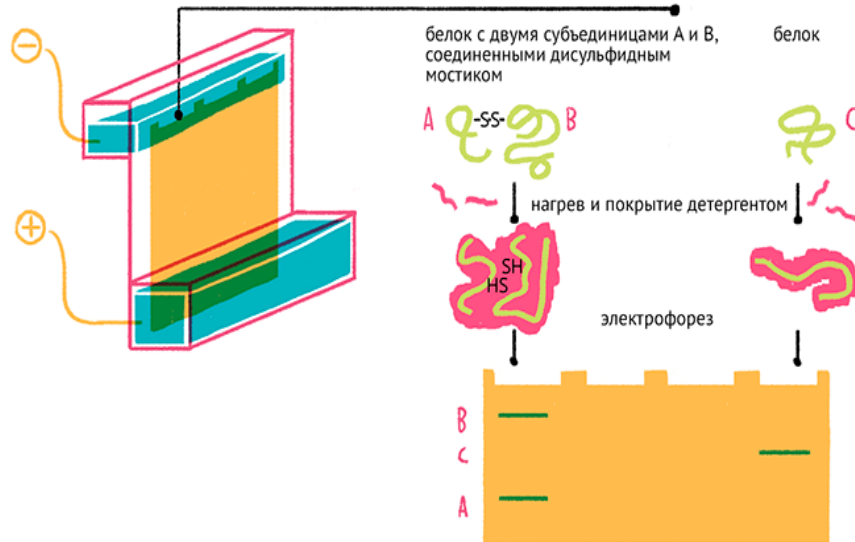
Энзимологияда ферменттерді бөліп алу және тазарту үшін колонкадағы таңдамалы адсорбцияның әр түрлі түрлері кең қолданылады.

Электродфорез



ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

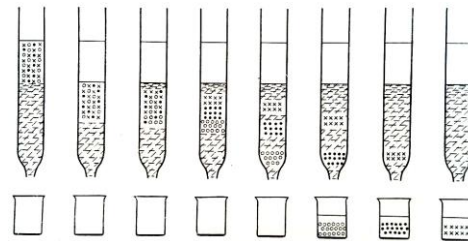
Электр өрісінде биомолекула қоспаларының бөлінуі
электрофорез деп аталады



Тандамалы адсорбция

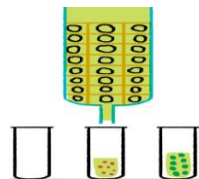
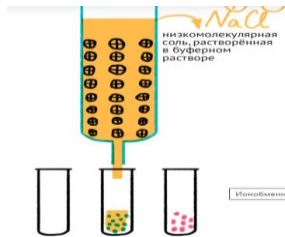
Алғаш рет А.Я. Данилевский қолданған, бұл тәсілді Р.Вильштеттер кең пайдаланды. Бұл тәсілде ерітіндідегі фермент белгілі-бір адсорбентпен, мысалы, алюминий оксидімен адсорбцияланады.

Ерітіндіден **тандамалы адсорбциялау әдісі** ферменттік өнеркәсібінде саңырауқұлақтың және бактериалдың амилазаны **бөліп алу және тазартуда қолданылады**. Бұл кезде адсорбент ретінде крахмал пайдаланылады, ол осы фермент үшін **төлсипаттық адсорбент** болып табылады

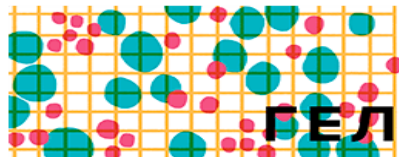


Адсорбциялық түтікке үш фермент қоспасын бөлу

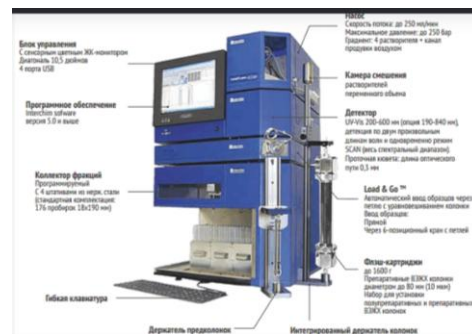
Хроматография



ХРОМАТОГРАФИЯ



ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ



БАҒАНАЛЫ АДСОРБЦИЯЛЫҚ ХРОМАТОГРАФИЯ



Бағаналы адсорбциялық хроматография

— бұл зертханалық және өндірістік деңгейде кеңінен қолданылатын, компоненттердің қоспаларын бөліп алу үшін қолданылатын хроматографиялық әдіс. Ол адсорбция принципін негізделген және белгілі бір бөлшектердің немесе молекулалардың әртүрлі фазалар арасындағы бөлінуін қамтамасыз етеді. Бұл әдіс химиялық құрамдарды тазарту, қосылыстарды анықтау, әртүрлі препараттарды және қоспаларды сипаттау сияқты көптеген салаларда пайдаланылады.



Бағаналы адсорбциялық хроматографияның принципі

Бағаналы адсорбциялық хроматографияның негізінде адсорбция принципі жатыр. Бұл принцип бойынша, қоспадағы компоненттер стационарлы фазамен әртүрлі дәрежеде әрекеттеседі. Әр компоненттің адсорбциялық қабілеті әртүрлі, сондықтан олар стационарлы фазада әртүрлі жылдамдықпен ұсталады.

Мобильді фаза арқылы өтіп бара жатқанда, компоненттер адсорбцияланып, бөлінеді. Көптеген компоненттер жылдам қозғалады, бірақ кейбіреулері стационарлы фазамен күшті байланысқа түсіп, баяу қозғалады.

- Осылайша, әр компонент белгілі бір уақыт ішінде бағананың әртүрлі бөліктерінде бөлініп шығады.

*Бағаналы адсорбциялық
хроматографияның негізгі құрамдас
бөліктері:*

❖ **Хроматографиялық бағана:** Бағана — бұл адсорбенттің орналасқан бөлігі, ол өз алдына бағананың ішінде компоненттердің бөлінуін қамтамасыз етеді. Бағанада әдетте түтіктер немесе цилиндрлер болады, олар толық толтырылған стационарлы фазамен жабдықталған.

❖ **Стационарлы фаза:** Бұл әдетте қатты немесе жартылай қатты материал болып табылады, мысалы, силикагель немесе алюминий оксиді. Бұл материалдар әртүрлі химиялық топтармен жабылған болуы мүмкін, ол әртүрлі молекулалармен өзара әрекеттесуді жеңілдетеді.

Ферменттердің белсенділігін анықтау әдістері

Ферменттердің белсенділігі олардың белгілі бір жағдайда белгілі-бір реакцияны катализдеу жылдамдығымен, яғни берілген ферменттілік реакцияның өнімдерінің жиналу жылдамдығымен немесе субстраттың азаю жылдамдығымен анықталады

$$Q = \pm \frac{dc}{dt}$$

Ол үшін әр түрлі әдістер (химиялық, колериметрлік, газометрлік, хроматографиялық, вискозиметрлік, спектроскопиялық) қолданылады.

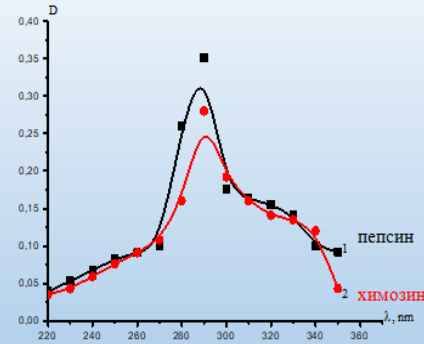
Ферменттердің белсенділігін анықтаудың химиялық әдістерінің негізіне ферменттің әсерінен белгілі топтардың немесе ерітіндіде түзілетін немесе жоғалатын заттарды есепке алу жатады.

Протеолиттік ферменттердің активтілігін анықтаудың тағы бір әдісі — **Вильштеттер әдісі**. Оның мәні мынадай: реакция жүрген ерітіндіге белгілі бір концентрациядағы спиртті құяды. Ол кезде зерттелетін ерітіндідегі амин топтарының диссоциациясы тоқтатылады, ал босатылған карбоксил топтары сілтімен титрлеу арқылы анықталады.

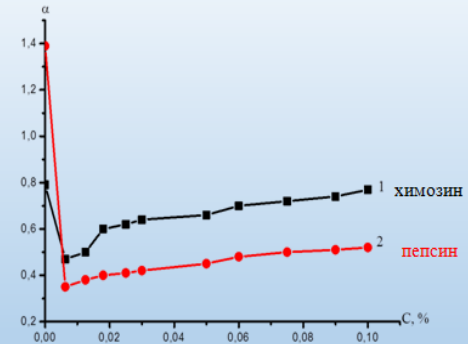
Спектрофотометрлер



Энзимнің меншікті белсенділік көрсеткіші.



1-сурет. Энзим ерітіндісінің оптикалық тығыздығының толқын ұзындығына тәуелділігі



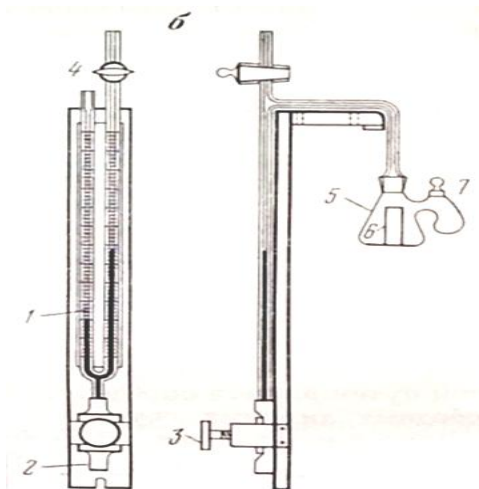
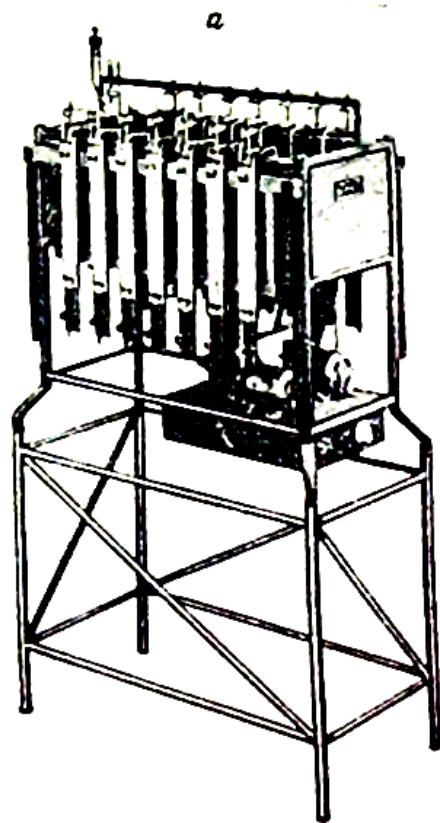
2-сурет. Энзим ерітіндісі концентрациясының меншікті белсенділік көрсеткішіне тәуелділігі.

Кейбір ферменттердің әсерлерін анықтау үшін **поляриметрлік әдіс** қолданылады. Мысалы, β -фруктофураноазидазаның әсерін білу үшін осы әдіс қолданылады. Поляриметрді қолдану ерітіндінің **меншікті айналуының өзгеруін** анықтауға негізделген.

Поляриметрлер



$$\alpha = \alpha_0 \cdot C \cdot l$$



Ферменттердің белсенділігін анықтауғы **газометрлік әдістер** де қолданылады. Олар реакция нәтижесінде түзілетін газдың мөлшерін анықтауға негізделген. Нәруыздардың амин топтарын анықтау үшін Ван Слайктің **газометрлік әдісі** қолданылады. Бұл әдіс бойынша зерттелетін ерітіндіні азотты қышқылмен өңдейді.

Газометрлік әдістің жетілген түрі – **Варбург әдісі**.

а) Жалпы көрініс б) **Варбург аппаратының сұлбасы**: 1 – мономерлік түтікше; 2 – каучук түтікшесі; 3 – винт; 4 – шүмек; 5 – тәжірибе ыдысшасы; 6 – орталық стакан; 7 – бүйірлік шығарма

Инфрақызыл спектроскопия

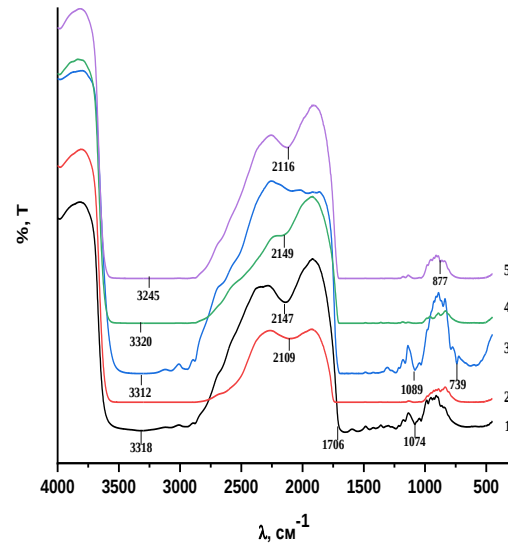
ИҚ-спектрлер «Avator 310-CsI» спектрометрінде біріктірілген Фурье-өндегіш қатысында $4000-100\text{ см}^{-1}$ жиілік диапазонында анықталынды.

Ферменттердің белсенділігін анықтау әдістерінің соңғы тобы **спектрфотометрлік әдістер**. Спектрметрлер деп берілген заттың ерітіндісінің әр түрлі толқын ұзындығындағы (ИҚ, көрінетін, УК) спектрде жарықты жұтуын зерттеуге мүмкіндік беретін құралдар.



Характеристические частоты валентных колебаний некоторых молекулярных групп

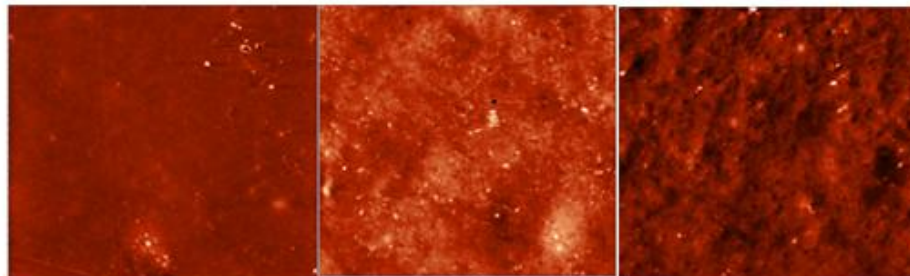
Группа	Приближенное значение частоты, см^{-1}	Группа	Приближенное значение частоты, см^{-1}
$-\text{OH}$	3600	$\text{C}=\text{O}$	1750-1600
$-\text{NH}_2$	3400	$\text{C}=\text{C}$	1650
$\equiv\text{CH}$	3300	$\text{C}\equiv\text{N}$	1600
	3060	$\text{C}-\text{C}$	1200-1000
$=\text{CH}_2$	3030	$\text{C}-\text{N}$	
$-\text{CH}_3$	2970 (асим.валент.)	$\text{C}-\text{O}$	
	2870 (сим.валент.)	$\text{C}=\text{S}$	
	1460 (асим.деформ.)	$\text{C}-\text{F}$	1050
	1375 (сим.деформ.)	$\text{C}-\text{Cl}$	725
$-\text{CH}_2-$	2930 (асим.валент.)	$\text{C}-\text{Br}$	650
	2860 (сим.валент.)	$\text{C}-\text{I}$	550
$-\text{SH}$	1470 (деформ.)		
$-\text{C}\equiv\text{N}$	2580		
$-\text{C}\equiv\text{C}-$	2250		
	2220		



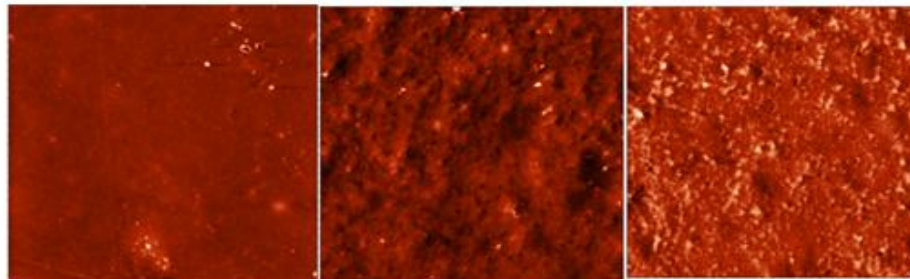
Микроскопия



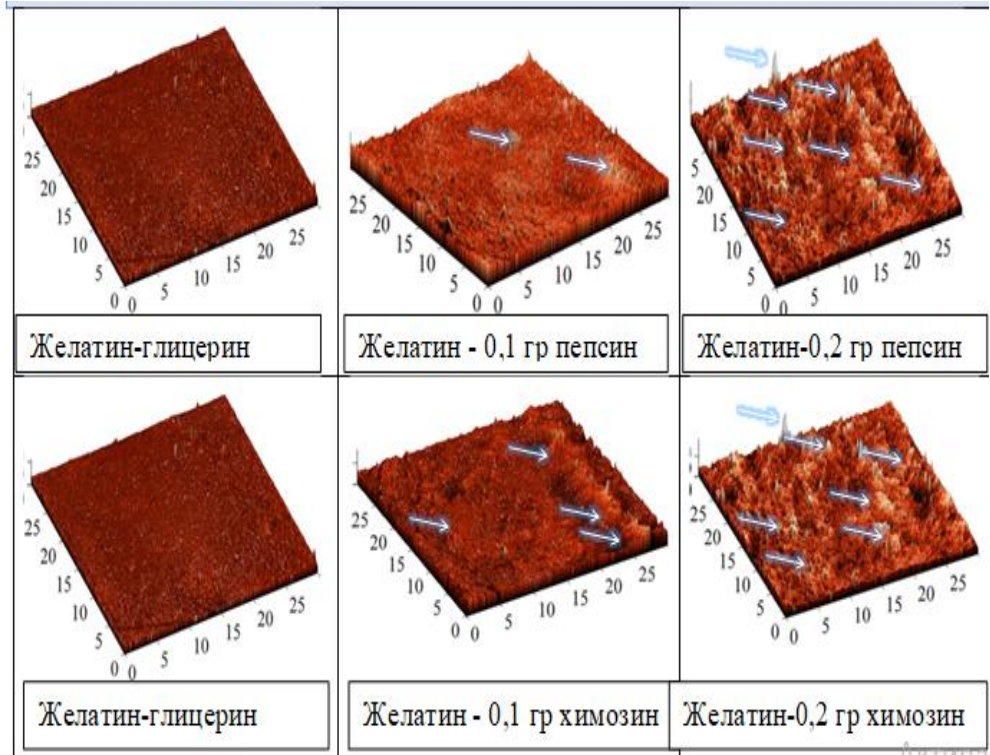
Электронды микроскоп



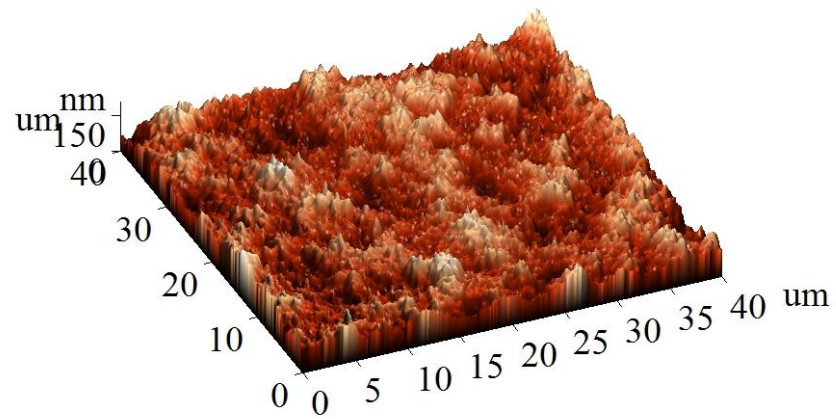
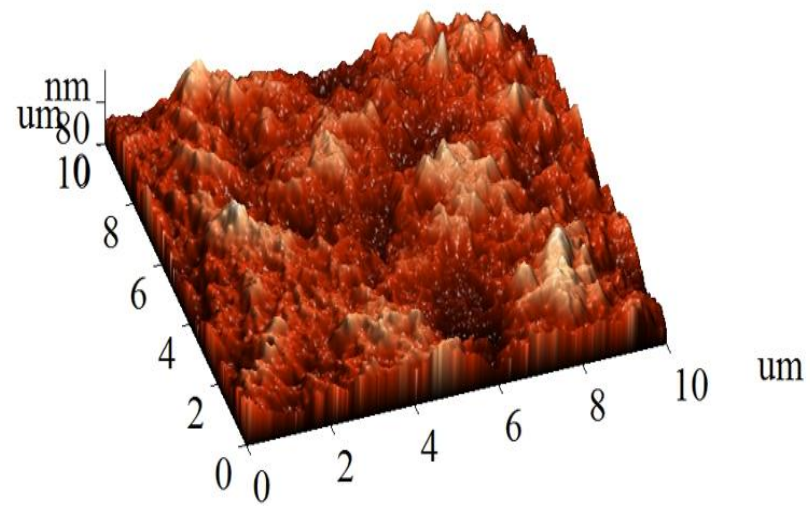
а) желатин-глицерин; ә) желатин - 0,1 гр химозин; б) желатин - 0,2 гр химози



в) желатин-глицерин; г) желатин - 0,1 гр пепсин; ж) желатин - 0,2 гр пепсин

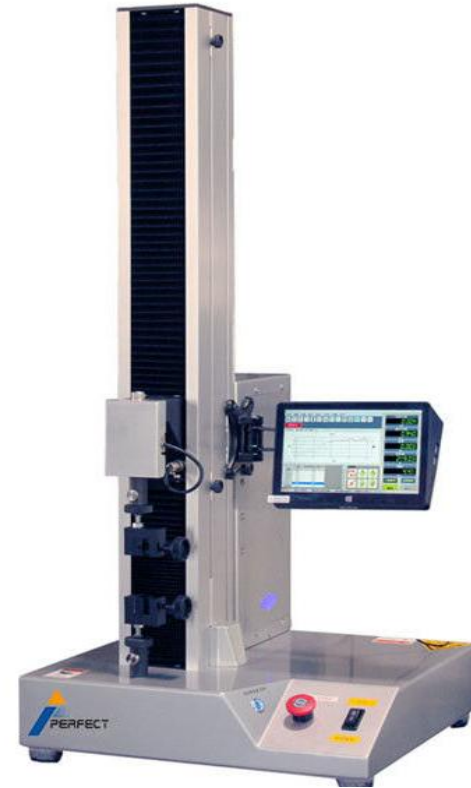


Сканерлеуші зондтық микроскоп



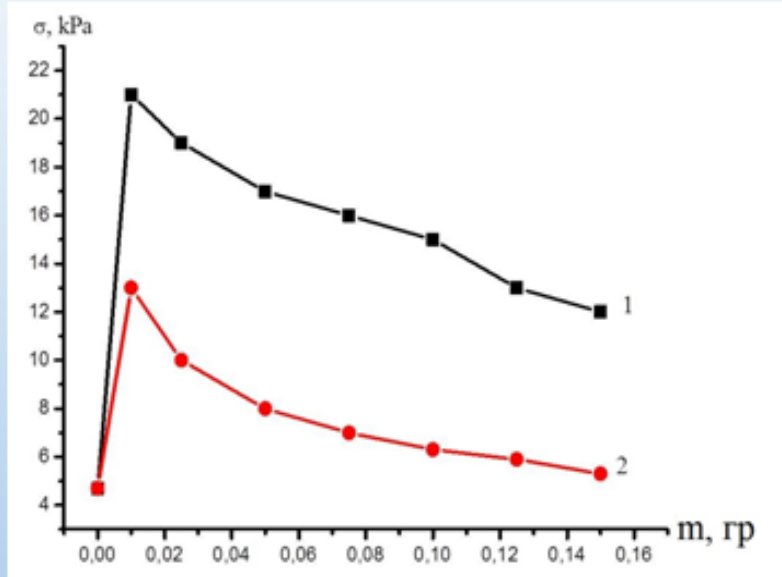
Үлдірдің созылу және салыстырмалы ұзаруы кезінде бұзылатын кернеуді анықтау **MT 150 жару машинасы**

Тәжірибе барысында өлшемі ені 4 см және ұзындығы 15 см сәйкес төртбұрыш қиып алынып құрылғыға бекітілді. Құрылғы көмегімен үлгінің ұзару шамасы мен созылу массасы анықталды. Өлшенген шамалар арқылы үлдірдің құрылымдық-механикалық қасиеттері зерттелінді.



MT 150 жару машинасы

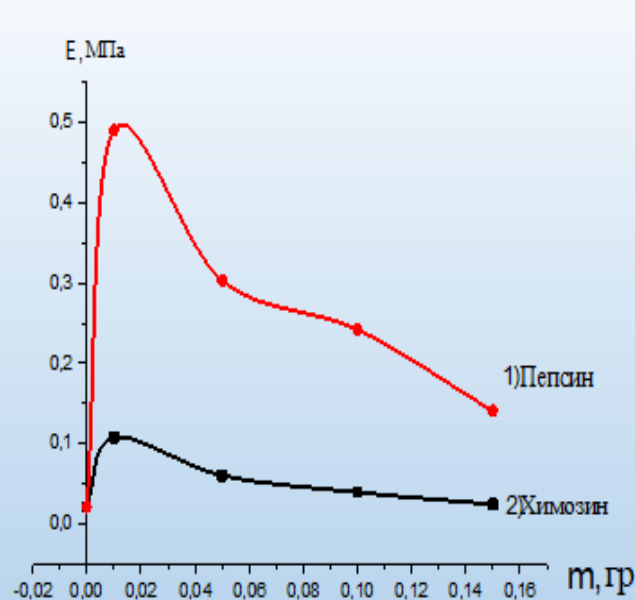
Желатин-глицерин жүйесі негізінде алынған үлдірдің құрылымдық – механикалық қасиеттеріне энзимнің әсері



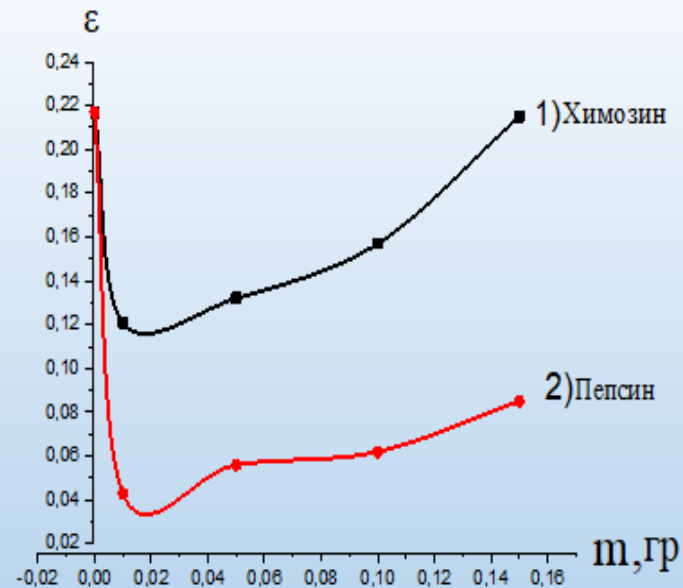
3-сурет. Желатин негізінде алынған
үлдірдің беріктілігінің энзим массасына
тәуелділігі

Сипаттамалар	Үлдірдің құрамы				
	3,0:1,0	0,01% Пепсин	0,05% Пепсин	0,1% Пепсин	0,15% Пепсин
F, Н	28,322	122,31	101,12	90,45	68,72
ΔL , мм	32,57	6,36	8,42	9,23	12,74
Беріктілік, МПа	0,0047	0,021	0,017	0,015	0,012
Деформация, е	0,2171	0,043	0,056	0,062	0,085
Серпімділік модулі, МПа	0,022	0,489	0,303	0,242	0,141

Сипаттамалар	Үлдірдің құрамы				
	3,0:1,0	0,01% Химозин	0,05% Химозин	0,1% Химозин	0,15% Химозин
F, Н	28,32	77,51	47,83	37,71	31,89
ΔL , мм	32,57	18,06	19,81	23,55	32,15
Беріктілік, МПа	0,0047	0,013	0,008	0,0063	0,0053
Деформация, е	0,217	0,121	0,132	0,157	0,215
Серпімділік модулі, МПа	0,022	0,108	0,061	0,04	0,025



4-сурет. Желатин негізінде алынған
үлдірдің серпімділік модуль
шамасының энзим массасына
тәуелділігі



5-сурет. Желатин негізінде алынған
үлдірдің деформацияның энзим
массасына тәуелділігі

ҚОРЫТЫНДЫ:

Энзимдерді бөліп алу мен тазарту – олардың функционалдық белсенділігін сақтау үшін маңызды кезеңдер. Бұл процестерде шикізатты дұрыс таңдау, жасушаларды тиімді бұзу және энзимдерді жоғары селективтілікпен бөліп алу әдістерін қолдану қажет. Тазарту әдістері – тұндыру, диализ, хроматография және электрофорез – энзимдердің тазалық дәрежесін арттырып, олардың нақты белсенділігін зерттеуге мүмкіндік береді. Энзимдердің белсенділігін анықтау – олардың функционалдық тиімділігін бағалауға мүмкіндік беретін маңызды кезең. Бұл үшін түрлі әдістер (спектрофотометрия, колориметрия, хроматография) қолданылады. Жалпы, энзимдерді бөліп алу, тазарту және белсенділігін анықтау биотехнологияда, медицинада және тағам өнеркәсібінде кеңінен қолданылады. Осы процестердің тиімді жүргізілуі энзимдерді практикалық қолданудың сапасын анықтайды.

Пысықтау сұрақтары:

1. Энзимдерді бөліп алудың негізгі кезеңдері қандай?
2. Энзимдерді бөліп алу барысында қандай әдістер қолданылады?
3. Тазартудың қандай негізгі әдістерін білесіз және олардың принципі қандай?
4. Хроматография әдісі энзимдерді қандай негізде бөледі?
5. Энзимдердің белсенділігін анықтау үшін қандай әдістер қолданылады?
6. Спектрофотометриялық әдіс арқылы энзим белсенділігі қалай өлшенеді?
7. Температура мен рН-тың энзим белсенділігіне әсері қандай?

Пайдаланылған әдебиеттер:

1. Қоқанбаев Ә.Қ., Түсюпова Б.Б., Тәжібаева С.М., Мұсабеков Қ.Б.

Химиялық энзимология негіздері: оқу құралы /.—Алматы: Қазақ университеті, 2016 ж. С. 376. ISBN 978-601-04-1921-6.

2. Duncan J. Show. Introduction to colloid and surface chemistry 4th, 2003. - 306 p.

3. Shchukin E.D., Pertsov A.V., Amelina E.A., Zelenev A.Z. Colloid and surface chemistry. Elsevier, 2001. — P. 747

4. Клесов А.А. ферментативный катализ. —М. Издво МГУ, 1984.

5. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия.-М.: просвещение, 1987. — С. 304.

6. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. Пер. с англ. —М.: Мир, 1990. — С. 350.

7. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. —М.: академия, 2005. — С. 471.

8. Яковлев В.Л. Кинетика ферментативного катализа. —М.: Наука, 1965. — С. 298.

Назарларыңызға рахмет!!!