

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС
ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ**

Ўзбекистон Миллий Университети

Биология-тупроқшунослик факультети

“Биотехнология ва микробиология” кафедраси

“Топинамбурдан озик-овқат этил спирти олиш”
мавзусида бажарилган магистрлик диссертацияси

Бажарди:

Рўзиева Зилола

Раҳбар:

т.ф.н., доц. Мирзарахметова Д.Т.

Тошкент - 2008

Мундарижа

1. Адабиётлар шарҳи.....	4
1.1. Инулин сақловчи хом ашёлар	4
1.2. Полифруктозанлар, уларнинг ҳосил бўлиши ва энзиматик ўзгаришларга учраши	6
1.3. Инулаза продуцентлари.....	8
1.4. Спирт чиқиши.....	10
1.5. Спирт ишлаб чиқаришнинг классик технологияси	12
2. Изланишлар усуллари ва объекти	15
2.1. Продуцентни ўстириш ва скрининг қилиш.....	15
2.2. Инулин миқдорини аниқлаш.....	15
2.3. Инулаза фаоллигини аниқлаш усули	16
2.4. Қандларни юпқа қават хроматографияси	16
2.5. Оқсил миқдорини аниқлаш	17
2.6. Этил спирти миқдорини аниқлаш усули	17
2.7. Редуцирловчи қандларни аниқлаш (Шомоди-Нельсон усули)	19
3. Олинган натижалар ва уларнинг таҳлили	21
3.1. Топинамбурнинг кимёвий таркибини ўрганиш	21
3.2. Ачитқи культурасини танлаш.....	22
3.3. Культуранинг ферментатив фаоллигини аниқлаш	22
3.4. Ферментатив гидролизланган топинамбур тугунагидан этил спирти олиш	24
Фойдаланилган адабиётлар рўйхати	26
Иловалар.....	28

КИРИШ

Ҳозирги кунда кўпгина тадқиқотлар сифатли озиқ-овқат маҳсулотларининг биотехнологиясини яратишга қаратилган. Улар орасида асосий диққатни қанд сақловчи маҳсулотларга, асосан, инулинга ва ундан спирт ишлаб чиқаришга қаратилмоқда. Охирги пайтларда Ўзбекистон Республикасида озиқ-овқат спирти ишлаб чиқаришнинг янги биотехнологиясини яратиш долзарб вазифа деб ҳисобланади.

Спиртнинг перспектив ва экологик қулай манбаи бўлиб инулин полисахаридини сақловчи ўсимлик хом ашёси ҳисобланади. Озиқ-овқат спирти ишлаб чиқариш мақсадида инулинни парчалаш учун микроб табиатли ферментларни қўллаш муҳим ўрин эгаллайди.

Ҳозирги кунда дунёнинг ривожланган давлатлари сингари Ўзбекистон Республикасида ҳам озиқ-овқат спирти ишлаб чиқариш учун альтернатив хом ашёдан фойдаланадиган биотехнологияни яратиш ва оптимизациялаш муҳим аҳамиятга эга. Айниқса, ўтган йилда бутун дунёда буғдой ҳосилининг бўлмаганлиги спирт ишлаб чиқаришда альтернатив хом ашёларни излашнинг нақадар муҳимлигини кўрсатди.

Юқоридагилардан келиб чиқиб инулин сақловчи перспектив субстратларни, микроорганизмлар орасидан инулинни фаол гидролизлаш хусусиятига эга бўлган продуцентларни танлаш, ферментнинг максимал ҳосил бўлиш босқичини ва инулаза хусусиятларини ўрганиш ҳамда этил спирти ҳосил бўлишининг юқори самарали ферментатив технологиясини яратиш долзарб ҳисобланади. Ушбу малакавий иш микроорганизм ферментини қўллаб топинамбур (*Helianthus tuberosus L.*) инулинини биотехнологик усулда гидролизлаш, ва уни бижғитиш йўли билан этил спирти олишга бағишланган.

Бу ишни амалга ошириш учун қуйидаги вазифалар қўйилган:

1. Топинамбурнинг кимёвий таркибини ўрганиш;
2. *Sacch. cerevisiae* авлодига мансуб бўлган 4 штамм ачитқилари ичидан юқори инулаза фаоллигига эга бўлганини танлаш;
3. Танланган штаммнинг юқори фаолликка эга бўлиши учун озуқа муҳити яратиш;
4. Топинамбур таркибидаги гидролизланган инулиннинг бижғиши натижасида этил спиртини олиш.

1. Адабиётлар шарҳи

1.1. Инулин сақловчи хом ашёлар

Инулин сақловчи ўсимликлар табиатда ёввойи ва махсус маданийлаштирилган ҳолда ўстирилади. Инулин сақловчи ўсимликларни бундай шартли бўлиш улардан ишлаб чиқариш масштабида фойдаланишни осонлаштиради.

Маданийлаштирилган инулин сақловчи ўсимликларга артишок, скорцонера, топинамбур, оқ илдиз (белый корень) каби ўсимликлар мисол бўлади.



1-расм. Инулин сақловчи ўсимлик– топинамбур

Топинамбур (*Helianthus tuberosus* L.) ёки ер ноки кўп йиллик ўсимлик бўлиб, мураккаб гулдошлар оиласига тааллуқли. Топинамбурнинг асл ватани Америка бўлиб, Европага биринчи бўлиб Францияга олиб келинган [19]. Топинамбурнинг “Файз-Барка” нави 2006 йилдан Ўзбекистон Давлат реестрига киритилган [23].

Топинамбурнинг пояси ярим ёғочланган бўлиб, баландлиги 1,5 дан 2,0 м гача етади. Поясининг қалинлиги 1-2 см атрофида бўлади. Барглари тухумсимон шаклда бўлиб, учлари тишсимон шаклга эга. Топинамбур кеч кузда гуллайди. Топинамбур тугунаклари картошка тугунакларидек ер остида шаклланади. Тугунаклар шакли, ўлчами ҳамда сони топинамбур навига боғлиқ. Тугунаклар сиртида “кўзча”лар бўлиб, кўпгина навларида ушбу кўзчаларда бўртмалар ҳосил бўлади (1-расм).

Инулин сақловчи ўсимликларнинг кимёвий таркиби турли туман бўлиб, уларнинг ўртача катталиги 1-жадвалда келтирилган. Жадвалда келтирилган ўсимликлар кимёвий таркибидан кўриниб турибдики, энг кўп миқдор инулин қоқиғулда (15,3%), ундан кейин скорцонерада (15,0) ва цикорийда (13,58 %) экан. Энг кўп миқдорда редуцирловчи қандлар артишокда (12,75 %) тўпланар экан. Топинамбурда инулин миқдори 11,7 %, редуцирловчи моддалар 6,14 %, азотли моддалар 1,8 % га тенг экан [2].

Юқорида ёритилганлардан кўриниб турибдики, мураккаб гулдошлар оиласига кирган деярли ҳамма ўсимликлар таркибида инулин тўпланар экан. Бироқ, жадвалда келтирилган маълумотларни таҳлили шуни кўрсатадики, ишлаб чиқаришга фақат иккита ўсимликни тавсия этиш мумкин – топинамбур (инулин миқдори 14-20 %) ва цикорий (инулин миқдори 12-17 %).

1-жадвал

Инулин сақловчи ўсимликларнинг кимёвий таркиби

№	Ўсимлик номи	Миқдори, %				
		Сув	Азотли моддалар	Инулин	Редуцирловчи қандлар	Кул
1.	Артишок	79,59	2,12	1,92	12,75	1,51
2.	Топинамбур	79,12	1,8	11,71	6,14	1,16
3.	Скорцонера	80,4	1,04	15,0	2,19	1,0
4.	Қоқиғул	80,15	2,60	15,3	0,80	1,7

5.	Цикорий, маданийлашган	76,0	1,2	14,6	2,85	1,05
6.	Цикорий, ёввойи	72,17	4,12	13,58	2,08	1,59

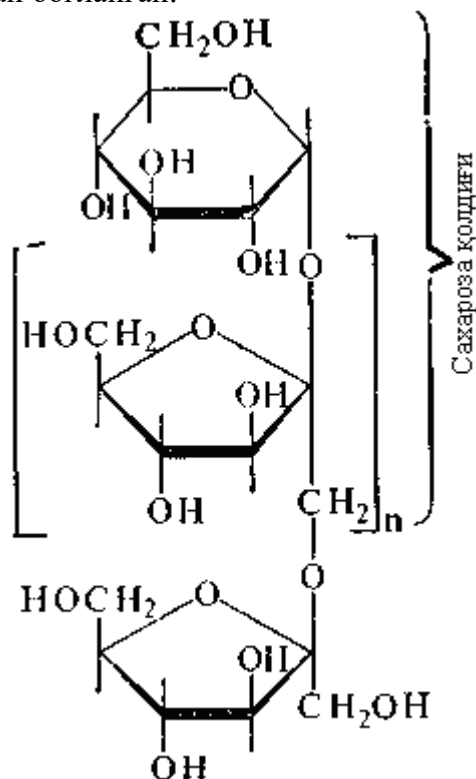
Юқоридаги иккита ўсимликлар орасидан топинамбур таркибида инулин камрок миқдорда бўлсада, у қуйидаги хусусиятлари билан устун туради: кўк массаси жуда кўп бўлиб, ундан қора моллар озуқаси сифатида фойдаланиш мумкин, тугунаклари ҳосилдорлиги жуда юқори, гуллари асаларилар учун яхши нектар манбаи. Топинамбур тугунакларининг ҳосилдорлиги тўғрисида бир оз тўхталмоқчи эдик. Файз-Барка навининг муаллифи қишлоқ хўжалиги фанлари доктори Мавлянова Ровза Фазлуддинованинг маълумотларига кўра 1 га ердан 80-200 т топинамбур тугунакларини олиш мумкин [19]. Агар картошка ҳосилдорлиги билан солиштирсак, 1 га ердан 10 марта кўпроқ ҳосил олиш мумкин. Булардан ташқари топинамбур уруғида мой миқдори жуда кўп. Ўсимликнинг ўзи эса совуқ, касалликлар ва зараркунандаларга жуда ҳам чидамли.

Кўпчилик олимларнинг фикрича, топинамбур спирт ишлаб чиқаришда қўлланиладиган дон ва картошка ўрнини бемалол боса олади. Худди шундай муваффақият билан топинамбур тугунагидан фруктоза ишлаб чиқариб, сахароза ўрнини бемалол боса оладиган маҳсулот олиш мумкин [21, 22].

Қандолатчилик саноати учун топинамбурдан қандли моддалар олишнинг бир қатор технологик жараёнлари ишлаб чиқилган. Бундан ташқари топинамбур тугунаклари вегетарианлар ва уй ошхонаси учун яхши маҳсулот бўлиб ҳисобланади. Ҳозирги кунда топинамбур поясидан оқсилга бўлган талабни қондириш ва ем-хашак сифатида қўлланиш устидан илмий изланишлар олиб борилмоқда.

1.2. Полифруктозанлар, уларнинг ҳосил бўлиши ва энзиматик ўзгаришларга учраши

Инулин тахминан ўлчами бир хил бўлган полифруктозанларнинг ўзига хос такрорланмас молекуляр шакллариدير. Инулин молекуласи асосан 30...35 моносахарид қолдигидан иборат бўлиб, молекуляр массаси 4,9...5,7 кДа га тенг. Фруктозанлар кимёвий тузилишига кўра β -D-фруктофуранозларнинг полимери бўлиб, бир-бири билан ўзаро β 2→1 гликозид боғлари билан боғланган.

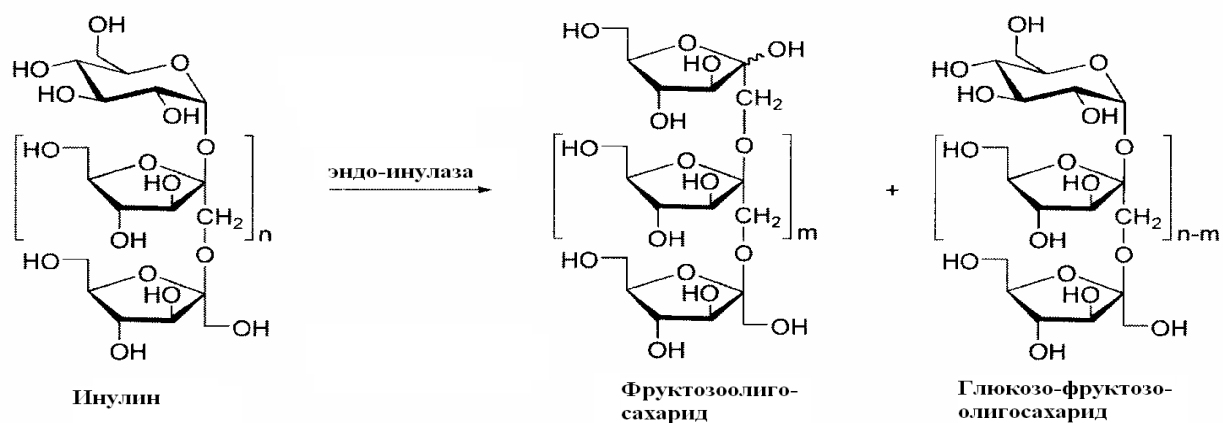


Инулин захира полисахариди сифатида топинамбур, георгин тугунакларида, артишок илдизидида тўпланади. Инулин озуқа захираси сифатида крахмалга нисбатан афзалроқ ҳисобланади [20].

Полифруктозанларга структура жиҳатдан яқин бўлган моддалар бир йилли ўсимликлар, масалан, тарик, арпа, буғдой, тимофеевка каби ўсимликларда тўпланади. Ушбу моддалар кимёвий тузилиши ва хусусиятларига кўра полифруктозанлардан фарқ қилади. Полифруктозанлардан энг яхши ўрганилгани инулин бўлиб, у георгин ва ер ноки тугунагини яшил массасига кўра 50 % миқдорида тўпланади. Инулин ушбу ўсимликлар пояси ва баргида коллоид ҳолда мавжуд бўлади. Бошоқли ўсимликларда эса, аксинча, баргларида крахмал мавжуд бўлмасада, сахароза ва фруктозанлар бўлиши исботланган

Инулиннинг ферментатив парчаланиши. Тирик ҳужайранинг яхши бир ўзига хос хусусияти бўлиб мураккаб кимёвий жараёнларни қисқа вақт ичида жуда катта тезлик билан амалга ошириши ҳисобланади. Бу ҳужайра томонидан синтез қилинадиган фаол катализаторлар – ферментлар туфайли амалга оширилади. Ферментлар биологик катализаторлар бўлиб, асосан, оксиллардан ташкил топган. Ферментлар кимёвий тузилишига кўра фақат оксиллардан ташкил топган ферментлар (оддий оксиллар) ва оксил билан биргаликда оксилмас моддалардан ташкил топган мураккаб ферментларга бўлинади.

Юқорида инулин ҳам крахмал сингари полисахарид эканлиги айтиб ўтилди. Инулиннинг ферментатив гидролизи инулаза КФ 3.2.1.7 (инулин 1-фруктаногидролаза) ферменти таъсирида боради. Инулиннинг ферментатив гидролизи куйидаги расмда келтирилган.



Ўсимликлар, бактериялар, замбуруғлар ва ачитқиларда инулинни фруктозагача парчаловчи инулаза ферментининг мавжудлиги шак-шубҳасиз биотехнология учун илмий ва амалий қизиқишга эга [24].

1.3. Инулаза продуцентлари

Инулинни самарали биодеградациялаш ва трансформациялаш учун инулин сақловчи хом ашё ва инулаза продуцентини танлаш муҳим аҳамиятга эга. Адабиётлардан маълумки, микроорганизмлар орасидан *Aspergillus*, *Fuzarium* авлоди замбуруғлари инулаза фаоллигига эга. Инулинни парчаловчи инулаза кўпгина бактериялар культурал суюқлигида, масалан *Clostridium* авлоди ва *Lactobacillus reuteri* тури бактерияларида аниқланган. Дунё амалиётида инулаза продуценти сифатида *Bacillus* авлоди бактерияларидан кенг фойдаланилади. Инулаза фаоллигига *Candida*, *Cryptococcus*, *Toruloides* каби ачитқилар авлодларининг вакиллари ҳам эгаллиги маълум. Бундан ташқари инулинни фруктоза ҳосил қилиб парчаловчи инулаза фаоллиги *Kluyveromyces fragilis*, *K. marxianu*, *S. cerevisiae*, *Pichia polymorpha* (*D. Polimorphs*) *Schizosaccharomyces* ва *Debaryomyces* ачитқиларида аниқланган. М. Кристиан ва С. Бака каби олимларнинг илмий ишларида инулазанинг асосий продуценти сифатида *Kluyveromyces marxianus* ачитқисининг инулаза гени экспрессия қилинган *Saccharomyces cerevisiae* ачитқиси штаммлари танланган.

Кейинги йилларда микроорганизмларнинг инулаза биосинтез қила олиш қobiliяти цикорий, саримсоқ, георжин ва топинамбур каби ўсимликлардан тайёрланган субстратларда текшириб кўрилган.

Ачитқилар – инулаза продуценти сифатида. Ачитқилар бир хужайрали ҳаракатсиз организмлар бўлиб, табиатда кенг тарқалганлар. Ачитқилар юқори биосинтетик хусусиятлар билан тавсифланадилар.

Ачитқининг хужайраси таркибида 25 % гача қуруқ моддалар бўлиб, ушбу қуруқ моддалар қуйидагилардан иборат (% да): оксил – 37-50, азотсиз моддалар – 34-45, ёғлар – 1,5-2,5, минерал моддалар – 6-10, витаминлар – 3-7. Ачитқилар оксиллари таркибига альбумин каби оддий оксиллар, глобулинлар, нуклеопротеидлар, фосфопротеидлар каби мураккаб оксиллар, ҳамда гликокол, цистеин ва глютамин кислотасидан тузилган трипептид – глютацион киради. Ачитқиларнинг фермент комплекси жуда хилма-хил бўлиб, протеазалар, дегидрогеназалар, сахараза, зимаза, фосфатазалар, нуклеазалар, липазалар, гликозидазалар ва бошқалар мавжуд.

Ачитқиларни ўстириш учун талаб қилинган шароитларга (муҳит рН-и, ҳарорат) риоя қилган ҳолда стационар шароитларда амалга оширилади. Ачитқиларнинг аксарияти куртакланиш билан кўпаяди. Янги хужайранинг шаклланиши (генерация давомийлиги) 30-40 дақиқа ва ундан ортиқроқ вақт давом этиши мумкин. Крахмалга бой муҳитларда эса генерация давомийлиги 2,5-3 соатни ташкил этиши мумкин. Аксарият ачитқиларнинг ўсиши учун оптимал ҳарорат 28-30 °С, оптимал рН эса 4,5-5,8 га тенг. Озуқа муҳити моддалари концентрациясининг ўта юқорилиги ёки озуқа таркибининг тўла қонли эмаслиги (яъни хужайра ўсиши учун ҳамма моддаларнинг мавжуд эмаслиги) улар хужайраларининг ўсишини секинлаштиради. Кўп миқдорда жадал аэрациялаш улар кўпайишини тезлаштирсада, ферментатив фаоллигини сусайтиради.

Ачитқиларнинг нормал ўсиши, озуқаланиши ва ҳаёт-фаолияти ҳамда биологик-фаол моддаларни ҳосил қилиши учун биринчи навбатда углеводлар, азотли моддалар, минерал бирикмалар, витаминлар ва ўстирувчи бирикмалар лозим. Азотли моддалардан ачитқилар аминокислотлар, оксилларнинг гидролиз маҳсулотларини яхшироқ ўзлаштирадилар. Мураккаб оксиллар ачитқилар томонидан қийин ўзлаштирилса, азотнинг энг қулай манбаи бўлиб аммонийли тузлар хизмат қилади. Аммиак азоти ачитқилар томонидан деярли тўлиқ ўзлаштирилади. Нитратлар ва нитритлар эса ачитқи хужайрасининг заҳарланишига олиб келади.

Масалан, *Saccharomyces cerevisiae* ачитқиларини ўстириш учун озуқа муҳити таркибида азот, углерод, фосфор, калий, магний, темир ва кул элементлари зарур. Витаминлар (В қаторига кирувчи ҳамма витаминлар) ва ўстирувчи моддалар (жумладан, биотин, солод ўсимталари экстракти), ачитқи хужайраси томонидан қисман ҳосил қилинсада, бироқ озуқа муҳитига ушбу моддаларни кўшиш тавсия қилинади.

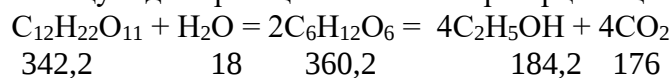
Ачитқи хужайраси ҳаёт-фаолияти учун зарур бўлган кимёвий энергия қандларни хужайра ичида ўзлаштириш орқали организм томонидан ҳосил қилинади, яъни ачитқилар хемоорганотрофлар бўлиб ҳисобланади.

Ачитқилар орасида инулаза фаоллиги юқори бўлган штаммларни скрининг қилгандан сўнг ферментини ўзини тоза ҳолда ажратиб олиш ёки продуцент хужайрасини ўзини тегишли сорбентда иммобилизация қилиш мумкин. Бироқ, ушбу усуллар ўзининг ютуғи билан биргаликда камчиликларига ҳам эга. Фермент ёки продуцент хужайрасини иммобилизация қилишда технологик ва иқтисодий самарадорликдан келиб чиқиш лозим [24].

1.4. Спирт чиқиши

Спирт заводларининг асосий кўрсаткичи бўлиб 1 тонна ўзлаштириладиган углеводлардан спирт чиқиши ҳисобланади. Спирт чиқиши деб хом ашёдаги 1 т ўзлаштириладиган углеводлардан олинадиган спиртнинг декалитрдаги ҳажмига айтилади.

Ушбу кўрсаткични қуйидаги реакция тенгламалари орқали ҳисоблаш мумкин:

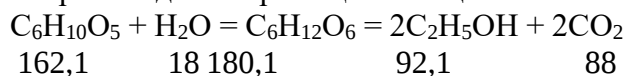


Тенгламадан кўриниб турибдики 342,2 г дисахариддан (сахароза, мальтоза) 184,2 г спирт олиш мумкин. 100 г дисахариддан эса $\frac{184,2 \cdot 100}{342,2} = 53,8$ г ёки $53,8 : 0,78927 = 68,2$ мл

спирт олиш мумкин.

бу ерда: 0,78927 – спиртнинг нисбий зичлиги (d_4^{20}).

Мос равишда 1 т дисахариддан (сахароза, мальтоза) 68,2 дал спирт олиш мумкин. Худди шу усул билан 1 т крахмалдан спирт чиқишини ҳисоблаймиз¹:



100 г крахмалдан $\frac{92,1 \cdot 100}{162,1} = 56,8$ г ёки $56,8 : 0,78927 = 71,98$ мл спирт олиш

мумкин.

Бундан 1 т крахмалдан 71,98 дал спирт олиш мумкинлиги келиб чиқади.

1 т ўзлаштириладиган углеводлар (крахмал, сахароза) спиртга тўлиқ айланганда олинадиган сувсиз спирт (100 %-ли) микдорига спиртнинг назарий чиқиши дейилади.

Спиртнинг фактик чиқиши унинг назарий чиқишидан кам бўлади. Чунки бир қисм ўзлаштириладиган углеводлар ачитқиларнинг кўпайишига, бижғишнинг иккиламчи маҳсулотлари ҳосил бўлишига ва бошқаларга сарфланади. Спиртнинг фактик чиқиши қайта ишланаётган хом ашё турига боғлиқ ҳолда 62-66 дал ни ташкил этади ва спиртнинг амалий чиқиши дейилади.

2-жадвалда хом ашёдаги 1 т крахмалдан спиртнинг амалий чиқиши келтирилган.

2-жадвал

Хом ашё	Қайта ишлаш турига боғлиқ ҳолда 1 т крахмалдан спирт чиқиши (дал ҳисобида)		
	даврий	яримузлуксиз	узлуксиз
Картошка	64,7	65,0	65,7
Маккажўхори	64,0	64,3	65,0
Жавдар	62,9	63,2	63,9
Бугдой	63,7	64,0	64,7
Арпа	62,4	62,7	63,4
Сули	61,8	62,1	62,0
Тарик	63,5	63,8	64,5
Меласса	65,9	-	66,5

Заводда технологик мукаммаллаштиришлар тадбиқ этилганда спирт чиқишига қуйидаги катталиклар қўшилади (1 т крахмалга дал ҳисобида):

- бижғиш давомийлиги 72 соатгача узайтирилганда – 0,8, жумладан 48 соатдан ошган ҳар 6 соатга 0,2;
- 60 соат давом этадиган узлуксиз-оқимли ёки циклик бижғитишда (72 соатли бижғитишга тенглаштирилади) – 0,8;
- вакуум-совутиш усули билан қандлаштирилганда – 0,1;
- солод тўлиқ ёки қисман микроорганизмлар ферментлари билан алмаштирилганда – 0,3, қисман алмаштирилганда – 0,2 [25].

¹ Крахмал молекуласи «п» дона глюкоза қолдигидан тузилганлиги ҳисобга олинмаган.

1.5. Спирт ишлаб чиқаришнинг классик технологияси

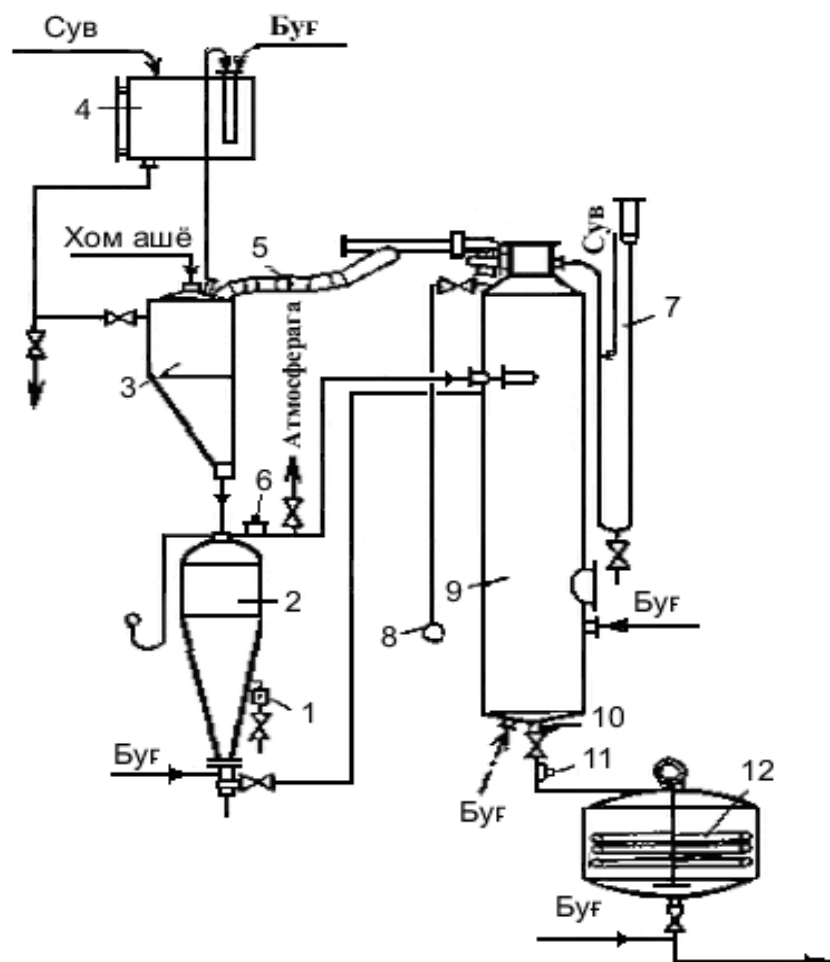
Спирт ишлаб чиқаришнинг классик технологияси бутун донларни тўйинган сув буғи таъсирида пиширишга асосланган. Усул асосида XIX асрнинг иккинчи эллик йиллигида Германиялик инженер Генце яратган пишириш қозонлари ётади. Таъкидлаш лозимки, ҳозирги кунда бир қатор мамлакатлар сингари Ўзбекистонда ҳам ушбу технологияни учратиш мумкин. Генце томонидан яратилган технологиянинг замонавий модификацияланган шакли уч бочқичли пишириш усули деб номланади. Қуйида ушбу усулни қисқача ёритамиз [21, 22, 25].

Уч босқичли пишириш қуйидагича амалга оширилади (2-расм). Тозаланган ва ўлчанган хом ашё пишириш олди қозони 3 га солинади. Хом ашёни солишдан олдин пишириш олди қозонига иситгич 4 дан керакли микдорда сув солинади. Хом ашёни қиздириш 30-60 дақиқа давом эттирилади. Қиздириш сақлагич 9 да ҳосил бўлган иккиламчи буғни қувур 5 орқали пишириш олди қозони остига юбориш орқали амалга оширилади. Пишириш олди қозонида конденсацияланмаган буғ сув иситгич 4 га юборилади. 50-90°C ҳароратгача қиздирилган хом ашё ўз оқими бўйлаб пишириш қозони 2 га туширилади. Хом ашё пишириш қозонида босим остида ўткир буғ билан пиширилади. Пишириш қозони сақлагич билан икки қувур орқали циркуляция буғи чиқарилса остидаги қувур орқали пишган масса пуфланади. Циркуляция қувурида пишириш олди қозони люкини очишдан олдин конденсацияланмаган буғни ва пиширишни бошлашдан олдин ҳавони чиқариш учун мўлжалланган қувур ўрнатилади. Хом ашёнинг пишганлиги пишириш қозони 2 да ўрнатилган намуна олгич 1 ёрдамида аниқланади. Деярли пишган масса сақлагич 9 га пуфланади. Сақлагичда масса 0,02-0,05 МПа ортиқча босим остида охиригача (иккиламчи) пиширилади. Сақлагичда ҳимоя воситаси сифатида гидравлик затор 7 ўрнатилади. Сақлагичдаги босим ва ҳароратни кузатиш учун манометр 8 ва термометр 10, намуна олгич 11 ўрнатилган. Пишган масса узлуксиз равишда қандлаштиргич 12 га келиб тушади.

Пишириш қозонида донни қиздириш хом ашёни тўлароқ бўктиришга йўналтирилган ҳолда олиб борилиши керак.

Пишириш қозонидаги массани тезроқ ва бир текисда пишириш учун вақт-вақти билан аралаштирилади. Аралаштириш пишириш қозонидан маълум бир микдордаги буғни сақлагичга юбориш орқали амалга оширилади. Намуна олгич 1 дан олинган намуна ранги тайёр масса рангига яқинлашгач пишириш қозонидаги масса сақлагичга пуфланади. Пишган хом ашёни сақлагичда 40-45 дақиқа 102-106°C ҳароратда иккиламчи пиширилади. Пишириш қозонидан пуфлаш шундай амалга оширилиш лозимки, иккиламчи буғ тўлиқ пишириш олди қозонидаги массани ёки иситгичдаги сувни қиздиришга сарфлансин ҳамда сақлагичдаги ортиқча босим 0,05 МПа дан ортмасин. Ўта нуқсонли хом ашёни қайта ишлашда иккиламчи буғ пишириш олди қозонига юборилмайди. Ушбу буғ змеевик орқали сувни иситишга сарфланади. Агар змеевик орқали сувни иситишга шароит бўлмаса буғ тўғридан тўғри атмосферага юборилади.

Сақлагичдан чиқадиган пишган хом ашё ранги тўқ сарикдан оч жигар ранггача бўлиши лозим. Пишган массада пишмаган бўлакчалар ёки бутун дон бўлишига йўл қўйилмайди. Бундан ташқари массанинг пишиб ўтиб кетишига ҳам йўл қўймаслик лозим. Пишиб ўтиб кетган масса ранги тўқ жигар ранг бўлиб, ўзига хос меланоидинлар ҳиди келиб туради [21, 22, 25].



2-расм. Уч босқичли ярим узлуксиз усулда крамал сақловчи хом ашёни пиширишнинг технологик схемаси:

1 – намуна олгич; 2 – пишириш қозони; 3 – пишириш олди қозони; 4 – сув иситгич; 5 – иккиламчи буғ учун кувур; 6 – босимни меъёрлагич (сақлаш клапани); 7 – гидравлик затвор; 8 – манометр; 9 – сақлагич; 10 – термометр; 11 – намуна олгич; 12 – қандлаштиргич.

Донни пишириш қуйидаги тартибда амалга оширилади. Донни пишириш олди қозонига солишдан олдин сув қуйилади. Сув миқдори хом ашё крахмаллигига боғлиқ ҳолда 1 кг донда 2,5-3,5 дм³ ни ташкил этади. Бунда пишириш ва қандлаштириш билан олинган шарбат концентрацияси сахаромер бўйича 16-18 % бўлиши лозим. Пишириш олди қозонига қуйиладиган сув бутун донни қайта ишлашда 75-80°C гача, майдаланган донни қайта ишлашда эса 55°C гача қиздирилган бўлиши лозим. Пишириш олди қозонида сув билан аралаштирилган хом ашё 90-95°C гача қиздирилади. Пишириш олди ва пишириш қозонларининг иши шундай ташкил этилиши лозимки, хом ашё пишириш олди қозонида иложи борича кўпроқ сақлансин.

Пишириш олди қозонида қиздирилган ва бўккан дон сув билан биргаликда ўз оқими бўйлаб пишириш қозонига туширилади. Бунда пишириш қозонида 0,7-0,8 м бўшлиқ қолсин. Пишириш қозони люки герметик ёпилгач ускуна остидан буғ берилади ва бир вақтнинг ўзида циркуляция вентилидан ҳаво чиқарилади. Сўнгра босим 10-15 дақиқа ичида хом ашё навига боғлиқ ҳолда қабул қилинган босим қийматигача кўтарилади.

Ҳар 5-7 дақиқадан сўнг циркуляция амалга оширилади. Циркуляция 1,0-1,5 дақиқа давом этиши ва ҳар гал босим қиймати 0,1 МПа гача пасайишига рухсат берилади [21, 22, 25].

Дон навига боғлиқ ҳолда пишириш режимлари 3-жадвалда келтирилган.

3-жадвал

Дон	Босим, МПа, кўпи билан	Ҳарорат, °С	Пишириш даво-мийлиги, дақиқа
Маккажўхори	0,55	161	70-75
Жавдар	0,40	151	50-60
Буғдой	0,45	155	60-65
Сули бутун бир оз майдаланган	0,45 0,4	155 151	70-75
Арпа бутун майдаланган	0,45 0,40	155 151	65-70 55-60
Тарик бутун майдаланган	0,50 0,45	158 155	70-75 55-60

2. Изланишлар усуллари ва объекти

2.1. Продуцентни ўстириш ва скрининг қилиш

Ачитқиларнинг *Saccharomyces* авлоди вакиллари шарбат-агарда сақладик.

Инулазанинг фаол штаммларини танлашда (скрининг) *Saccharomyces* авлоди ачитқиларининг 4 штаммини текширдик. Даставвал ачитқи штаммларини адаптациялаш учун улар 10 мг/мл инулин ва 2 %-ли агардан иборат Петри чашкаларига қуйилган озуқа муҳитида ўстирилди. Тайёрланган озуқа муҳитлари 112 °С ҳароратда 15 дақиқа давомида автоклавда стерилизацияланди. Олинган ачитқи штаммларининг инулаза ҳосил қилишини ўрганиш учун топинамбур тугунаги гомогенатидан иборат суюқ озуқа муҳитида ўстирдик. Ачитқиларни ўстириш 168 соат давом этди, намуналар ҳар 24 соатда олинди.

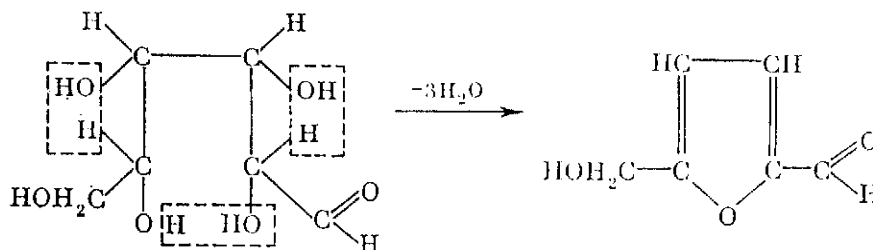
Азот манбаи сифатида мочевиначининг 1,0 % эритмаси ишлатилди. Озуқа муҳити рН-и ЭВ-74 иономериди аниқланди. Унинг қиймати 5,5 ни ташкил қилди. Озуқа муҳитлари 0,50 атм да 20-30 дақиқа давомида автоклавда стерилизацияланди. Озуқа муҳити совутилгач озуқа муҳити ҳажмига нисбатан 1-2 % ачитқи инокуляти солинди.

Ачитқиларни бутун ҳажмда ўстириш (глубинное культивирование) 32°С ҳароратда 24-168 соат давомийлиги олиб борилди. Намуналар ҳар 24 соатда олинди.

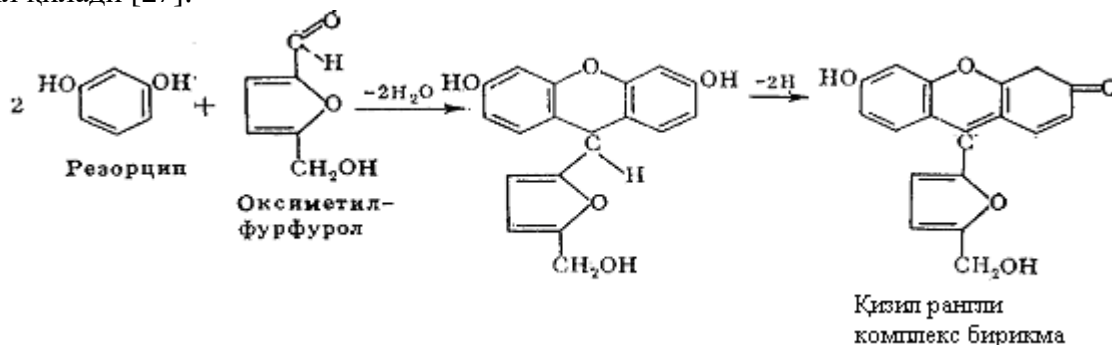
2.2. Инулин миқдорини аниқлаш

Ўсимликларда инулин миқдорини уни олдиндан хлорид кислотаси эритмаси билан гидролиз қилгандан сўнг ҳосил бўлган эркин фруктозани аниқлаш билан амалга оширдик [27]. Ўз навбатида ҳосил бўлган фруктоза миқдорини кетозаларни аниқлашда кенг қўлланиладиган колориметрик усулдан фойдаландик.

Усул Селиванов реакциясига асосланган бўлиб, реакция кучли кислотали муҳитда боради. Ушбу реакция туфайли фруктоза қуйидаги механизм асосида оксиметилфурфурол ҳосил қилади:



Оксиметилфурфурол резорцин билан интенсив қизил рангли комплекс бирикма ҳосил қилади [27]:



Альдегидларнинг резорцин билан реакцияси жуда ҳам секин боради. Бу эса реакцион муҳитда глюкоза мавжудлигида ҳам фруктозани аниқлашга имкон беради.

Анализ учун 1 мл ҳажмдаги намунага 1 мл резорцин эритмасидан ва 3 мл 30 %-ли хлорид кислотаси эритмасидан қуйилади. Аралашма 20 дақиқа давомида 80 °С ҳароратдаги сув ҳаммомида сақланади. Бу вақт ичида аралашма ранги қизил рангга киради. Аралашма совутилади ва оптик зичлиги ФЭК да 10 мм қалинликли кюветаларда 540 нм тўлқин узунлигида аниқланади.

Эритма рангининг жадаллиги оксиметилфурфурол миқдорига ва, ўз-ўзидан фруктоза миқдорига, боғлиқ. Фруктоза миқдори D-фруктоза ёрдамида қурилган калибровка чизигидан фойдаланиб топилади. Усул жуда сезгир бўлиб 10 мкг/мл миқдоргача фруктозани аниқлашга имкон беради.

2.3. Инулаза фаоллигини аниқлаш усули

Усул ЎзР ФА микробиология Инститuti «Микроорганизмлар ферментлари» лабораторияси ходимлари томонидан яратилган. Усул бактерия ва ачиткилар культурал суюқлигида ҳосил бўлган инулаза фаоллигини аниқлаш имконини беради [28].

Тажрибани амалга ошириш учун субстрат – 1 %-ли инулин эритмаси тайёрланади. Эритмани тайёрлашда аралашма 100°C ҳароратли сув ҳаммомида эритма шаффоф ҳолга келгунча сақланади (инулин иссиқ сувда яхши эрийди). Сўнггра эритма совутилади. 3 мл ҳажмдаги совутилган инулин эритмасига инулаза фаоллигига эга культурал суюқликдан 1 мл қуйилади. Аралашма аралаштирилгач 30-32°C ҳароратда 10 дақиқа давомида инкубацияланади. Ҳосил бўлган эркин фруктоза резорцин реактиви билан аниқланади. Ушбу усулда хлорид кислотасининг 30 %-ли эритмаси ишлатилади. Бундай юқори кислоталилик ва ҳарорат инулинни тўлиқ кимёвий парчалайди. Натижада эса сохта натижа олиш мумкин. Бунинг олдини олиш учун ферментация жараёнидан сўнг реакцион муҳитдан гидролизланмаган инулинни чиқариш лозим. Гидролизат ва субстрат аралашмаси ферментация жараёнидан сўнг қайноқ этил спирти аралашмаси билан ишлов берилди. Бунда қуйи молекуляр фруктозидлар ва эркин фруктоза спиртда эрийди, инулин эса спиртда эрмаганлиги сабабли чўкмага тушади. Фруктозанлар миқдори эса ўз навбатида резорцин реактиви билан сувли ва спиртли эритмаларда аниқланади. Фермент фаоллигини аниқлашда олинган инулин миқдорини ва ҳосил бўлган фруктоза миқдорини билган ҳолда инулаза фаоллигини ҳисоблаш мумкин.

Инулаза фаоллигининг 1 бирлиги сифатида оптимал шароитларда ($t=32^{\circ}\text{C}$; $\text{pH}=5,5-5,8$; 10 дақиқа) 1 дақиқа ичида инулиндан ҳосил бўлган 180 мкг фруктоза миқдорини қабул қилдик. Фруктоза миқдорини эса резорцин реактиви билан калибровка чизигидан топдик (1-илова).

2.4. Қандларни юпқа қават хроматографияси

Топинамбурнинг сувли экстрактларининг (гидролизланган ва гидролизланмаган) ва *Saccharomyces cerevisiae* 17 қуюқлаштирилган культурал суюқлигининг углевод таркибини юпқа қават хроматографияси усулида ўргандик. Топинамбур тугунаги экстрактини ротор-пардали буғлатгичда қуруқ моддалари 45,8 % бўлганча қуритдик. Қуруқ моддалар миқдорини УРЛ-2 лаборатория рефрактометрида аниқладик. Гидролизланган сувли экстрактини ўрганишда гидролиз жараёни ачитки инулазаси билан амалга оширилди. Сўнггра ушбу гидролизат ротор-пардали буғлатгичда қуруқ моддалари 67,5 % бўлгунча концентрацияланди. *Saccharomyces cerevisiae* 17 нинг культурал суюқлиги ҳам филтрлангандан сўнг қуруқ моддалари 40,3 % бўлгунча 30 °C ҳароратда концентрацияланди.

Углеводларнинг сифат таркибини ўлчамли 15×15 см бўлган «Silufol» («Кавалиер», Чехославакия) пластинкаларида аниқладик. Пластинкалар олдиндан бор кислотасининг 0,1 н. эритмаси билан ишлов берилди. Углеводларни бир-биридан ажратиш учун н-бутанол+сирка кислотаси+сув (50:40:10) эритувчи системасидан фойдаландик. Хроматограммани бўяш учун Дедонде реактивидан фойдаландик (100 мл Дедонде эритмаси 5 г мочеина ва 20 мл 2 н. HCl эритмасидан иборат) [29].

Метчик сифатида сахароза, фруктоза ва глюкозанинг 10 %-ли эритмасидан фойдаландик.

2.5. Оксил миқдорини аниқлаш

Оксил миқдорини Лоури (1951) [30] усули бўйича СФ-46 спектрофотометрида оптик зичликка қараб аниқладик.

Оксилни Лоури усулида аниқлаш учун керакли жиҳозлар ва реактивлар: Спектрофотометр (СФ-46), штатив, пробиркалар ва пипеткалар.

1. Уювчи натрийнинг NaOH 0,1 н. ли эритмаси; 2. А эритма – натрий карбонатнинг Na₂CO₃ 0,1 н. ли натрий гидрооксидидаги NaOH 2 % ли эритмаси. 3. В эритма. Мис сульфатнинг 1 % ли натрий тартратдаги 0,5 % ли эритмаси. Эритмани тайёрлаш учун 10 г натрий тартрат тузи 300 мл сувда эритилади. Кейин эритмага 5 г мис сульфат қўшилади ва ҳажми 1 л гача етказилади. 4. С эритма. Бу эритмани тайёрлаш учун А эритмадан 50 мл, В эритмадан 1 мл аралаштирилади. С эритма бевосита анализ қилишдан олдин тайёрланади. 5. Фолин реактиви. Бу эритмани тайёрлаш учун 1 литрли колбага 100 г Na₂WO₄·2H₂O ва 25 г Na₂MoO₄·2H₂O тузлари солиниб 700 мл сувда эритилади. Сўнгра эритмага 50 мл 85 % ли ортофосфат кислотаси H₃PO₄, 100 мл концентрантланган хлорид кислотаси HCl қўшилади. Сўнгра колбага қайтарувчи шиша совутгич уланиб 10 соат давомида қайнатилади. Қайнатиш тугагач 150 г литий сульфат Li₂SO₄, 50 мл сув ва бир неча томчи бромли сув қўшилади. Ориқча бромни чиқариб юбориш учун 15 дақиқа давомида совутгичсиз қайнатилади. Аралашма хона ҳароратига совутилгач филтрланади ва ҳажми 1 литргача етказилади. Ишлатилишидан олдин Фолин эритмаси 1:1 нисбатда сув билан суюлтирилади. 2-иловада 40-200 мкг/мл концентрацияда БСА оксили билан калибровка графиги келтирилган.

Аниқаш техникаси. Мос равишда суюлтирилган оксил эритмасидан 0,5 мл олиниб тоза пробиркага қуйилади. Устига А ва В эритмаларни 50:1 нисбатда аралаштириш билан ҳосил қилинган С эритмадан 2,5 мл қуйилади ва хона ҳароратида 10 дақиқа сақланади. Сўнгра устига сув билан 1:1 нисбатда суюлтирилган Фолин эритмасидан 0,25 мл қуйилади ва хона ҳароратида 30 дақиқа сақланади. Эритма рангининг жадаллиги 750 нм тўлқин узунлигида ўлчанади. Олинган оптик зичлик қийматига кўра калибровка чизиғидан оксил миқдори аниқланади.

2.6. Этил спирти миқдорини аниқлаш усули

Ҳайдалмадаги этанол миқдорини бихромат усулда аниқлаш топинамбур бўтқаси дистиллятидаги спиртни калий бихромат ёрдамида сирка кислотасига оксидлантиришга асосланган. Оксидланиш реакцияси қуйидагича боради [27]:



Калий бихроматнинг ориқча миқдори йодометрик усулда аниқланади.

Керакли эритмалар:

1. 0,686 н. ли калий бихромат (K₂Cr₂O₇) эритмаси;
2. Калий йодит KJ;
3. 0,1 н. ли натрий тиосульфат Na₂S₂O₃ эритмаси;
4. Крахмалнинг 1 %-ли эритмаси;
5. 0,1 н. ли уювчи натрий NaOH эритмаси;
6. Концентрантланган сульфат кислота (H₂SO₄); ρ = 1,84

Аниқлаш техникаси. 100 мл юмалоқ шаклли ҳайдаш колбасига 25 мл топинамбурнинг биҷғиган бўтқаси, кислоталарни нейтраллаш учун 12-15 мл 0,1 н. ли NaOH ҳамда 10 мл дистилланган сув қуйилади. Колбани шиша совутгичга улаб ҳайдаш жараёни бошланади. Ҳайдаш колбасида тахминан 15 мл суюқлик қолганида жараён тўхтатилади. Агар топинамбур биҷғиган бўтқасининг қуввати 15 % ҳ. гача бўлса йиғувчи идиш сифатида 250 мл ҳажмли, 15 % ҳ. дан юқори бўлса 500 мл ҳажмли ўлчов колбасидан фойдаланилади.

Ҳайдаш тўхтатилгандан сўнг ўлчов колбаларининг чизигигача дистилланган сув қуйилади ва обдон аралаштирилади.

Бир вақтнинг ўзида спиртни оксидлаш ва ортикча хромни титрлаш мақсадида 500 мл ҳажмли конуссимон колбада хромли аралашма тайёрланади. Бунинг учун колбага бюреткадан аниқ 10 мл 0,686 н. ли $K_2Cr_2O_7$ эритмасидан ва 5 мл концентратланган сульфат кислотаси (H_2SO_4) колба девори орқали қуйилади.

Хром аралашмаси совугандан сўнг бюретка ёрдамида 5 мл спиртли дистиллят қуйилади. 15 дақиқа ўтгандан кейин (бу вақт ичида хона ҳарорати $18^{\circ}C$ дан паст бўлмаса дистиллятдаги спирт тўлиқ сирка кислотасигача оксидланади) оз миқдордаги сувга эритилган 2-2,5 г калий йод эритмаси қуйилади ҳамда колба оғзи соат ойнаси билан беркитилади. 5 дақиқадан сўнг 200-250 мл дистилланган сув қуйилади ҳамда ажралиб чиққан йод 0,1 н. ли $Na_2S_2O_3$ эритмаси билан титрланади. Индикатор сифатида 2-3 мл 1 %-ли крахмал эритмасидан фойдаланилади. Титрлаш эритманинг ранги кўк рангдан яшил рангга ўтгунча давом эттирилади.

Ҳисоблаш. Ортикча калий бихроматни оксидлаш учун "а" мл 0,1 н. ли $Na_2S_2O_3$ эритмаси кетган бўлсин. Бундан спирт оксидланиши учун $(10 - (a/6,86))$ мл бихромат сарфланганлиги келиб чиқади. 1 мл бихроматнинг 0,686 н. ли эритмаси 0,01 мл абсолют алкоғолни оксидлашини ҳисобга олсак, 5 мл дистиллятда $(10 - (a/6,86)) \times 0,01$ мл спирт бўлиши келиб чиқади. Дистиллят 10 марта суюлтирилганини ва 100 мл топинамбурнинг бижғиган бўтқасига ҳисоблаш лозимлигини эътиборга олсак, топинамбурнинг бижғиган бўтқасидаги спирт миқдори қуйидагига тенг бўлади:

$$D = (10 - \frac{b}{6,86}) \cdot 0,01 \cdot 20 = 2(10 - \frac{b}{6,86})\% \text{ х.}$$

Дистиллят 20 марта суюлтирилган бўлса юқоридаги формула қуйидаги шаклни олади:

$$D = 4(10 - \frac{b}{6,86})\% \text{ х.}$$

Изоҳ. 1. Спирт миқдорини йодометрик топишда аниқ натижаларга эришиш учун қуйидагиларни назарда тутиш лозим:

а) бихроматнинг титри аниқ эритмасини концентрацияси ниҳоятда юқори бўлгани учун оксидловчи аралашма тайёрлаганда унинг миқдорини ниҳоятда аниқ ўлчаш лозим: бихромат эритмасини ўлчаётганда йўл қўйилган 0,1 мл хато 0,2 % х. хатоликка олиб келади. Анализ вақтида текширилган ҳамда 10 мл га мўлжалланган ингичка бюреткадан фойдаланиш лозим. Айнан шу бюретка ёрдамида бихромат эритмасининг титрини тиосульфат билан аниқлаётганда фойдаланиш керак;

б) бихроматнинг титрини спиртни аниқлаётган шароитларда бажариш лозим, чунки: конусли колбага ишчи бюреткадан 10 мл бихромат эритмаси олинади, унга 5 мл концентратланган сульфат кислотаси қуйилади ва муҳит совуганидан сўнг 5 мл дистилланган сув қуйилади. 15 дақиқа ўтгач 2-2,5 г калий йодид (сувдаги эритмасидан) солинади ва йод ажралиб чиққандан сўнг (5 дақиқа) 200-250 мл дистилланган сув қуйиб, 0,1 н. ли тиосульфат эритмаси билан титрланади. Вақт-вақти билан бихромат эритмасининг титри текширилиб турилади, ҳар ҳолда бу иш бир ҳафтада бир маротаба бажарилиши лозим;

в) спиртнинг сирка кислотасига тўла оксидланишига кафолат бериш учун бихромат эритмаси етарли даражада ортикча (2-3 мл) бўлиши лозим. Шунинг учун топинамбурнинг бижғиган бўтқаси қуввати юқори бўлганда (15 % х. дан ортик) дистиллятнинг суюлтириш даражаси 20 маротаба бўлиши керак;

г) анализ олиб бораётган хонада ҳаво ҳарорати паст бўлса ($18^{\circ}C$ дан паст), спирт сирка кислотасига тўла оксидланмай қолади ва натижада хато натижа олинади. Бундай

вақтда оксидланиш реакциясини ҳарорати 20-22°C бўлган термостат ёки сув ҳаммомида 15 дақиқа давомида олиб борадилар;

д) йодометрия учун кўзда тутилган ҳажмий (титриметрик) анализнинг барча талаблари (крахмал эритмасини тайёрлаш усули, йоднинг титрлаш режими, йод йўқотилишининг олдини олиш ва ш.ў.)га қатъий риоя қилиш керак.

2.7. Редуцирловчи қандларни аниқлаш (Шомоди-Нельсон усули)

Ушбу усулда иккита реактив тайёрланади [31].

Шомоди реактиви: “А” эритма: 24 г сувсиз Na_2CO_3 , 12 г вино тузи (калий ёки натрийли тузи) 250 мл дистилланган сувда эритилади. Олинган эритмага аралаштириб туриб 40 мл сувда эритилган 4 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ва 16 г NaHCO_3 қўшилади.

“Б” эритма: 180 г Na_2SO_4 500 мл қайноқ дистилланган сувда (80°C) эритилади ва 5 дақиқа давомида қайнатилади.

“А” ва “Б” эритмалар бир-бири билан қўшилиб, умумий ҳажми 1 л гача етказилади. Олинган ҳаво рангли эритма Шомоди реактиви бўлиб ҳисобланади. Ушбу реактивни қора рангли идишда 2-3 ой сақлаш мумкин.

Нельсон реактиви: 25 г аммоний молибдат 450 мл иссиқ (60°C) дистилланган сувда эритилади. Эритма 5-10° С гача совутилади ва 21 мл концентранган сульфат кислотада 3 г натрий арсенат эритилган эритма қуйилади. Эритманинг ҳажми 500 мл гача дистилланган сув билан суюлтирилади. Ҳосил қилинган аралашма 40°C ҳароратда 24-48 соат давомида ушланади ва лозим бўлганда филтрланади. Реактивнинг сақланиш муддати 2-3 ой га тенг.

Шомоди-Нельсон усулининг моҳияти қайтарувчанлик хусусиятига эга бўлган қандларни ишқорий муҳитда (рН=9) Шомоди реактиви билан мис (II) оксидидан мис (I) оксиди ҳосил қилиш ва ҳосил бўлган мис (I) оксиди ишқорий муҳитда (рН 1,7-2,0) Нельсон реактивидаги арсеномолибдатни молибден кўки ҳосил қилиб оксидлашига асосланган. Ҳосил бўлган молибден кўкининг ранги 24-36 соат давомида барқарорлигини сақлай олади.

Калибровка чизиғини куриш (глюкоза эритмасининг бошланғич концентрацияси 20 мг/100 мл сувда)

1	5 мг / 25 мл + 1975 мл сув	9	80 мг / 400 мл + 1600 мл сув
2	10 мг / 50 мл + 1950 мл сув	10	90 мг / 450 мл + 1550 мл сув
3	20 мг / 100 мл + 1900 мл сув	11	100 мг / 500 мл + 1500 мл сув
4	30 мг / 150 мл + 1850 мл сув	12	110 мг / 550 мл + 1450 мл сув
5	40 мг / 200 мл + 1800 мл сув	13	120 мг / 600 мл + 1400 мл сув
6	50 мг / 250 мл + 1750 мл сув	14	130 мг / 650 мл + 1350 мл сув
7	60 мг / 300 мл + 1700 мл сув	15	140 мг / 700 мл + 1300 мл сув
8	70 мг / 350 мл + 1650 мл сув	16	150 мг / 750 мл + 1250 мл сув

2) 2 мл дан Шомоди реагенти қуйдик.

3) 100°C да сув ҳаммомида 15 дақиқа қайнатилади.

4) Совутилади (муз солинган сув ёки водопровод суви остида) ва 2 мл дан Нельсон реактиви қўшилади.

5) Яна устига 4 мл дан сув қўшилади ва аралаштирилади.

6) 520 нм да СФ-46 да ўлчанди.

Контроль сифатида 2 мл сув + 2 Шомоди + 2 мл Нельсон + 4 мл сув.

Калибровка чизиғи 3-иловада келтирилган.

Аниқлаш техникаси. Ҳосил бўлган қандлар миқдорига кўра реакцион муҳитдан намуна олиниб у сув билан суюлтирилди. Керакли реактивлар қуйилгач реакцион муҳитнинг оптик зичлигини СФ-46 да ўлчадик. Оптик зичлик қийматида кўра калибровка чизиғидан ва суюлтириш даражасига кўра глюкоза миқдорини аниқладик.

3. Олинган натижалар ва уларнинг таҳлили

3.1. Топинамбурнинг кимёвий таркибини ўрганиш

Биотехнологияда ҳар йили қайта ҳосил бўладиган хом ашёларга, жумладан, ўсимлик хом ашёсига, катта эътибор берилади. Бунда асосий эътибор ўсимлик хом ашёсининг ҳосилдорлиги, сув ва ўғитга талаби, агротехникаси ва, энг асосийси, кимёвий таркибига катта аҳамият берилади. Шунинг учун ишни топинамбурнинг кимёвий таркибини ўрганишдан бошладик.

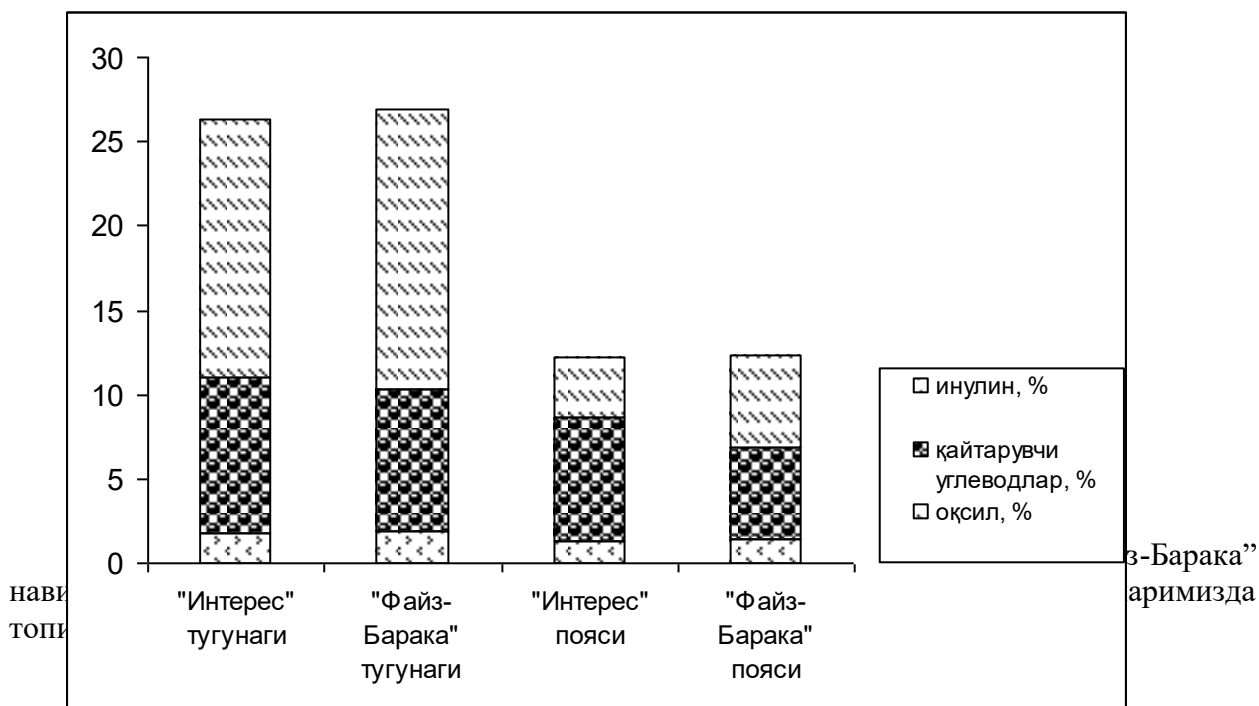
Адабиётларда келтирилган маълумотлардан топинамбурнинг навларини кўплигини ва уларнинг кимёвий таркиби бир-биридан ўстириш жойи, мелиоратив ҳолати ва об-ҳаво шароитларига боғлиқлигини аниқладик. Шунинг учун топинамбурнинг “Файз-Барка” ва “Интерес” навларини ўрганишни лозим деб топдик. Таҳлилларимизда ишлатилган “Файз-Барка” нави Тошкент вилоятида, “Интерес” нави эса Самарқандда етиштирилган эди. Проф. Р.Ф. Мавлянованинг маълумотларига кўра топинамбур тугунаги ҳосилдорлиги 120-125 т/га, кўк массаси (пояси ва барглари)нинг миқдори эса 135-140 т/га ни ташкил этади. Биз топинамбурнинг тугунаги ва поясининг кимёвий таркибини аниқладик.

4-жадвал

Топинамбурни иккита навининг кимёвий таркиби

№	Хом ашё номи	Миқдори, ҳўл массага нисбатан % да		
		Оқсил	Қайтарувчи углеводлар	Инулин
1.	Топинамбур навларининг тугунаги: «Интерес» «Файз-Барака»	1,8	9,2	15,3
		1,9	8,4	16,6
2.	Топинамбур навларининг пояси: «Интерес» «Файз-Барака»	1,3	7,3	3,6
		1,4	5,5	5,4

Топинамбур “Интерес” ва “Файз-Барака” навларининг кимёвий таркиби



3.2. Ачитқи культурасини танлаш

Топинамбур навларининг кимёвий таркибини ўргангандан сўнг Ўзбекистон Республикаси Фанлар Академияси “Микроорганизмлар ферментлари” лабораторияси культуралар коллекциясида мавжуд бўлган сахаромицет ачитқиларининг инулаза ҳосил қилиш қобилятини ўргандик (5-жадвал).

5-жадвал

Saccharomyces авлоди ачитқиларининг майдаланган топинамбурли озуқа муҳитида ўстиришда оқсил в инулаза ҳосил қилиш қобиляти

№	Ачитки штамми	Оксил микдори, мг/мл					Инулаза фаоллиги, бирлик/мл				
		Намуна олиш вақти, соат									
		48	72	96	120	144	48	72	96	120	144
1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 82-К	4,7	5,9	7,1	8,8	8,3	3,8	9,1	11,3	15,6	15,7
2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 17	5,3	6,7	7,6	8,2	7,9	4,5	10,7	12,3	17,1	16,6
3.	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> V	5,5	6,4	7,1	8,5	7,8	2,9	6,8	9,3	14,3	13,6
4.	<i>Saccharomyces vini</i> Ркацителi-6	4,9	5,8	7,2	8,3	7,7	2,3	6,1	8,7	12,9	12,6

Олинган натижалардан кўриниб турибдики, *Saccharomyces cerevisiae* 17 ачитқиси энг юқори инулаза фаоллигига эга. Инулаза фаоллиги максимал қийматига ўстиришнинг 120 соатида эришади. Кейинги изланишларда ушбу ачитқи штаммидан фойдаландик.

3.3. Культуранинг ферментатив фаоллигини аниқлаш

5-жадвалда *Saccharomyces cerevisiae* 17 ачитқи культураси текширилган ачитқилар орасидан инулаза фаоллиги энг юқорилигини аниқлаган эдик. Ушбу ачитқи культурал суюқлигида инулаза фаоллигини янада ошириш учун озуқа муҳитига 1 % миқдорда мочевино, 1 % диаммоний фосфат, 0,5 % магний сульфат ва 0,5 % аммоний сульфат солдик.

Топинамбурдан спирт ишлаб чиқариш учун ачитқиларнинг ўсиш динамикасида инулаза ферменти фаоллигини ўрганиш муҳим аҳамиятга эга. Чунки, адабиётлардан маълумки (Климовский, Стабников, 1955, А.А, Фукс, 1955, Крикунова Л.В., 2000) инулинни гидролизини минерал кислоталар эритмалари билан олиб боришда бирлик хом ашёдан чиқадиган спирт миқдори ниҳоятда кам. Бундан ташқари минерал кислоталар эритмаларини қўллаш ишлаб чиқаришдаги ҳамма ускуналарни зангламайдиган пўлатдан тайёрлашни талаб қилади. Бу эса тайёр маҳсулотнинг таннархи ошишига олиб келади. Юқоридагилардан келиб чиқиб инулинни гидролизини микроорганизмлар ферментлари билан олиб боришни маъқул топдик.

Saccharomyces cerevisiae 17 ачитқи культурасининг ўсиш динамикасида инулаза ва оқсиллар тўпланишини ўргандик. Ачитқиларни ўстириш жараёнини 30-32 °С ҳароратда 168 соат давомида олиб бордик ва 24 соатда намуна олдик. Топинамбурни қайта ишлашга тайёрлаш учун уни гўшт қиймалагичидан ўтказдик. Олинган майдаланган топинамбурга 1:0,25 нисбатда водопровод сувини қўшиб ҳосил қилинган массани лаборатория автоклавида 0,5 атм босим остида 30 дақиқа давомида стерилизация қилдик. *Saccharomyces cerevisiae* 17 ачиги культурасини ўстириш вақтида инулаза ва оқсил тўпланиш динамикаси қуйидаги жадвалга келтирилган.

Saccharomyces cerevisiae 17 ачиқти культурасини ўстириш вақтида инулаза ва оқсил
тўпланиш динамикаси

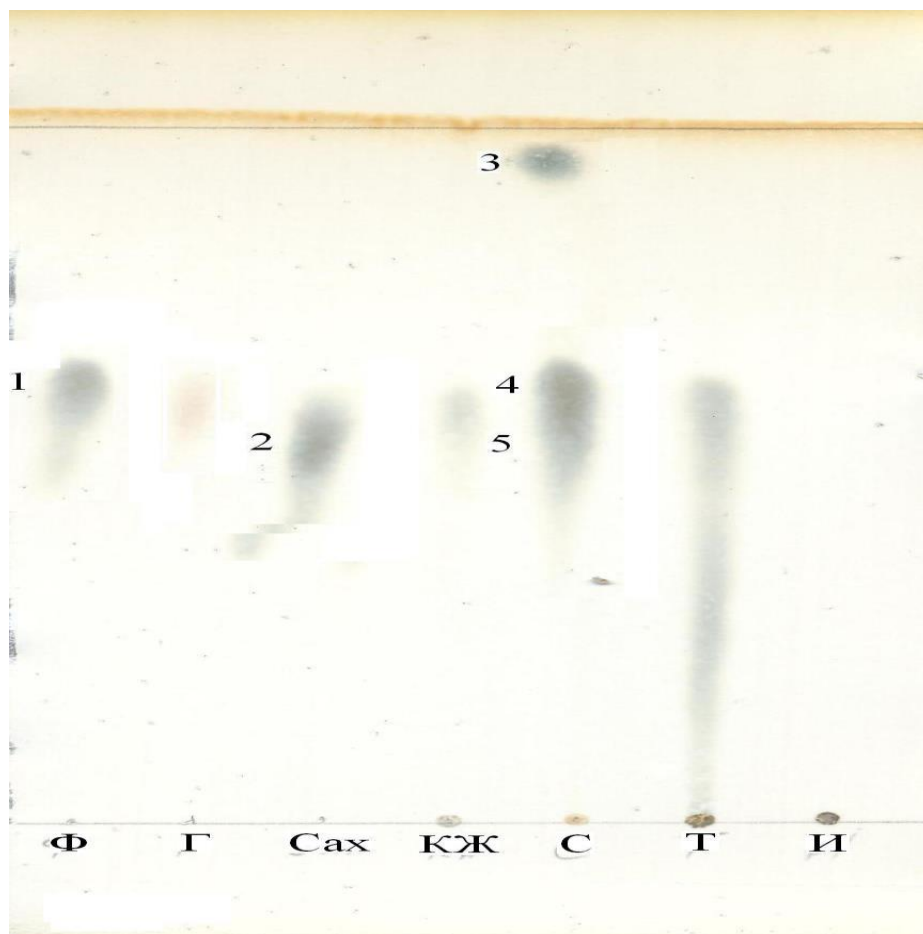
№	Културанинг ўсиш вақти	Инулаза фаоллиги, бирлик/мл	Оқсил, мг/мл
1.	24	3,8	4,5
2.	48	4,2	5,9
3.	72	9,8	7,5
4.	96	13,3	8,6
5.	120	18,2	9,2
6.	144	15,2	11,6
7.	168	10,8	14,2

Олинган натижалардан кўриниб турибдики, *Saccharomyces cerevisiae* 17 ачиқти культурасини ўстириш вақтида инулаза ва оқсил тўпланишининг максимал миқдори 120-144 соатга тўғри келади. Бу эса ачиткиларни ўстиришнинг стационар фазасига тўғри келади.

Шундай қилиб *Saccharomyces cerevisiae* 17 ачитқисининг культурал суюқлигида инулинни фруктозагача парчалайдиган инулаза фаоллигини янада оширдик.

Кейинги изланишларимизда инулаза ферментини олиш учун *Saccharomyces cerevisiae* 17 ачитқисини 120 соат давомида 1 % миқдорда мочевино, 1 % диаммоний фосфат, 0,5 % магний сульфат ва 0,5 % аммоний сульфат қўшилган 30 % топинамбур гомогенатидан иборат озуқа муҳитида ўстирдик.

Инулаза ферменти инулинни қанчалик гидролизлай олишини ўрганиш учун ферментация жараёнидан сўнг реакцион муҳитни ротор-пардали бўғлатгичда концентрациялаб, юпқа қаватда хроматографиялаш усулини қўлладик (3-расм).



3-расм. Қандларнинг юпка қават хроматографияси.

Ф – фруктоза; Г – глюкоза; Сах – сахароза; КЖ – культурал суюқлик; С – концентрацияланган реакцион муҳит; Т – топинамбурнинг концентрацияланган сувли экстракти; И – инлин эритмаси.

Олинган натижалардан кўриниб турибдики *Saccharomyces cerevisiae* 17 ачитқисининг културал суюқлиги инулинни фруктозага парчалайдиган инулаза фаолликка эга экан.

3.4. Ферментатив гидролизланган топинамбур тугунагидан этил спирти олиш

Этил спирти олишда энг муҳим кўрсаткич бу 1 бирлик хом ашёдан олинadиган тайёр маҳсулотнинг ҳажми бўлиб ҳисобланади.

Адабиётларни ўрганиш даврида топинамбурдан этил спирти ишлаб чиқариш технологияси билан асосан Россиялик ва Украиналик олимлар шуғулланганлигини аниқладик. Масалан, Климовский ва Стабников (Климовский Д.Н., Стабников В.Н. Технология спирта. – М.: Пищепромиздат, 1955. с.278) топинамбурдан спирт олиш учун топинамбур туганагини майдалашни, майдаланган топинамбур туганагини қиздириб туриб минерал кислоталар эритмаси билан гидролиз қилишни таклиф қилганлар. Крикунова Л.Н. эса (Патент RU 2144084, 2000) майдаланган топинамбурдаги инулинни гидролизлаш учун хом ашёдаги инулазадан фойдаланишни тавсия этади. Бундан ташқари муаллиф хом ашёдаги инулаза фаоллигини ушлаб туриш учун реакцион муҳитга Ca^{2+} ионларини қўшишни таклиф қилади. Юқоридаги икала усулда ҳам асосий камчилик бўлиб бирлик хом ашёдан олинadиган тайёр маҳсулот миқдорининг камлиги ҳисобланади.

Ишимизда топинамбурни гўшт майдалагичидан ўтказдик ва 30 дақиқа давомида 0,5 атм босим остида автоклавда стерилизация жараёнини амалга оширдик. 6-жадвалда келтирилганидек культурал суюқлик тайёрладик. Культурал суюқлик билан стерилизацияланган топинамбурни гидролизладик. Гидролиз жараёнини амалга ошириш

учун 1 г инулинга 2,5-3,0 бирлик фермент қўшдик. Ферментатив гидролиз жараёнини 90 дақиқа давомида олиб бордик. Ҳосил бўлган редуцирловчи қандлар миқдорини Шомоди-Нельсон усулида аниқладик. Сўнгра бижғиш жараёнини *Saccharomyces cerevisiae* 82-К ачитқиси билан 72 соатдан қўп бўлмаган вақт ичида олиб бордик. Бижғиш жараёни динамикасида ҳосил бўлган этил спирти миқдорини бихромат усулида аниқладик (7-жадвал).

7-жадвал

Топинамбур шарбатини бижғиш жараёни динамикасида шакар миқдорининг камайиши ва этил спиртининг ҳосил бўлиши

№	Маҳсулот номи	Бижғиш соатлари					
		12	24	36	48	60	72
1.	Шакар миқдори, г/100 мл	13,8	10,48	5,92	1,69	0,69	0,08
2.	Этанол миқдори, % ҳ.	0,0	1,98	4,7	7,3	7,8	7,85

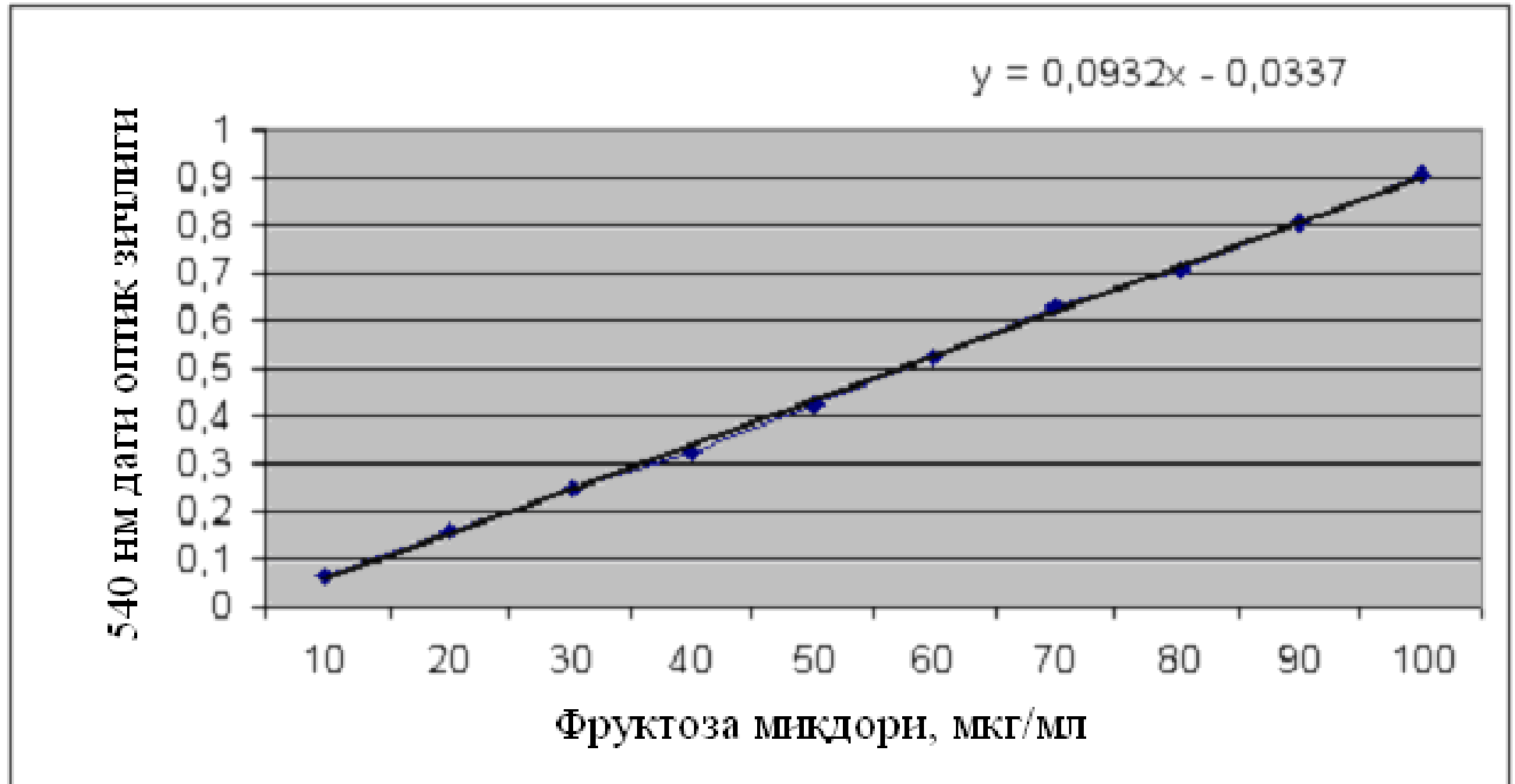
Ишда культурал суюқлик тайёрлаш учун 200 мл озуқа муҳити тайёрланган эди. Ундаги инулин миқдори 11 граммни ташкил қилди. Олинган культурал суюқликда инулаза фаоллиги 18,1 бирлик/мл га тенг бўлди. Олинган культурал суюқлик билан 10,850 кг инулинни ёки 67,8 кг топинамбурни гидролизлаш мумкин. Бижғиш жараёнини 72 соат давомида олиб бордик. Ҳосил бўлган бижғиган бўтқадан 250 мл олиб уни ҳайдадик. Дистиллят таркибидаги этил спирти миқдорини бихромат усулда аниқлаганимизда дистиллят таркибида 7,85 % ҳ. этанол борлигини аниқладик. Агар майдаланган топинамбурни 1:0,25 нисбатда сув билан аралаштирганимизни ва унинг таркибидаги инулин концентрацияси 13,8 % эканлигини ҳисобга олсак $250 \text{ мл} \times 0,138 = 34,5 \text{ г}$ инулин мавжуд. Бундан олинган спирт миқдори $250 \times 0,0785 = 19,62 \text{ мл}$ абсолют спирт. Ёки 1 г инулиндан 0,57 мл (спиртнинг назарий чиқиши 0,64 мл га тенг) абсолют алкоғол олиш мумкин.

Фойдаланилган адабиётлар рўйхати

1. Африкян Э., Манукян Л.С., Балаян А.М., Абелян В.А. Изучение химического состава различных сортов топинамбура и получение ФС с помощью иммобилизованной инулазы. // Тез.док. Вторая всесоюзная научно-техническая конференция «Топинамбур и топиподсолнечник – проблемы возделывания и использования». Иркутск, 6-10 августа, 1990. С.50.
2. Арасимович В.В., Кахане Б.И. Биохимия топинамбура. – Кишинев: Штиитца, 1974. – 120 с.
3. Бобровник Л.Д., Гулый И.С., Лезенко Л.А., Груshedский Р.И., Гриенко И.Д. Выделение углеводного комплекса топинамбура. // Тез.док. Вторая всесоюзная научно-техническая конференция «Топинамбур и топиподсолнечник – проблемы возделывания и использования». Иркутск, 6-10 августа, 1990. – С.53.
4. Бобровник Л.Д., Лезенко Л.А., Гриенко И.Д. и др. Исследование физико-химических свойств фруктанов топинамбура. // Тез. док. Вторая всесоюзная научно-техническая конференция «Топинамбур и топиподсолнечник – проблемы возделывания и использования». Иркутск, 6-10 августа, 1990. – С. 53-55.
5. Бахтина Т.Ю., Бобровник Л.Д., Слюсаренко Т.П., Ремесло Н.В. Микробиологические аспекты производства пищевых продуктов из топинамбура. // Тез.док. Вторая всесоюзная научно-техническая конференция «Топинамбур и топиподсолнечник – проблемы возделывания и использования». Иркутск, 6-10 августа 1990. – С. 51-52.
6. Биохимия растительного сырья. // Щербаков В.Г., Лобанов В.Г. и др. Под ред. заслуженного деятеля науки и техники РФ док-ра техн. наук, проф. В.Г. Щербакова. – М.: Колос, 1999. – 376 с.
7. Голубев В.Н. Куев В.Л., Гончаров Н.И. Биотехнологические аспекты переработки топинамбура. // Журнал. Пищевая промышленность, №9, 1991. С. 56-58.
8. Голубев В.Н., Губанов С.Н. Совмещенные процессы измельчения, экстрагирования и гидролиза растительного сырья в аппаратах роторно-кавитационного типа. // Всесоюзная научно-техническая конференция «Электрофизические методы обработки пищевых продуктов и сельскохозяйственного сырья». – М.: 1989.
9. Дорофеева Л.А., Рязанова Т.В., Чупрова Н.А. Переработка вегетативной части топинамбура. 2. Оптимизация процесса выделения целлюлозы. //Ж. Химия растительного сырья. 1998. № 2. – 59-62 с.
10. Дорофеева Л.А., Ким Н.Ю., Рязанова Т.В., Чупрова Н.А. Исследование вегетативной части топинамбура. 1. Оптимизация процесса получения экстрактов из вегетативной части топинамбура. // Ж.Химия растительного сырья, №2, 1998. – Стр. 53-57.
11. Дорофеева Л.А., Рязанова Т.В., Чупрова Н.А. Исследование вегетативной части топинамбура. 3. Влияние условий делигнификации на выход и качество целлюлозы //Ж. Химия растительного сырья, №2, 1998. стр.63-65.
12. Жеребцов Н.А., Шеламова С.А., Абрамова И.Н. Биосинтез инулиназ бактериями рода *Bacillus*. // Ж. Прикладная биохимия и микробиология. – М.,Т.38, №6, 2002. – С.634-638.
13. Жеребцов Н.А., Шеламова С.А., Абрамова И.Н., Попова Т.Н. Идентификация каталитически активных групп инулиназы *Bacillus polymyxa* 722. // Ж. Прикладная биохимия и микробиология. – М.,Т.39, №6, 2003. – С.619-624.
14. Жеребцов Н.А., Корнеева О.С., Тертычная Т.Н. О механизме каталитического действия карбогидроз (обзор). // Ж. Прикладная биохимия и микробиология. – М.,Т.35, №2, 1999. – С.123-132.

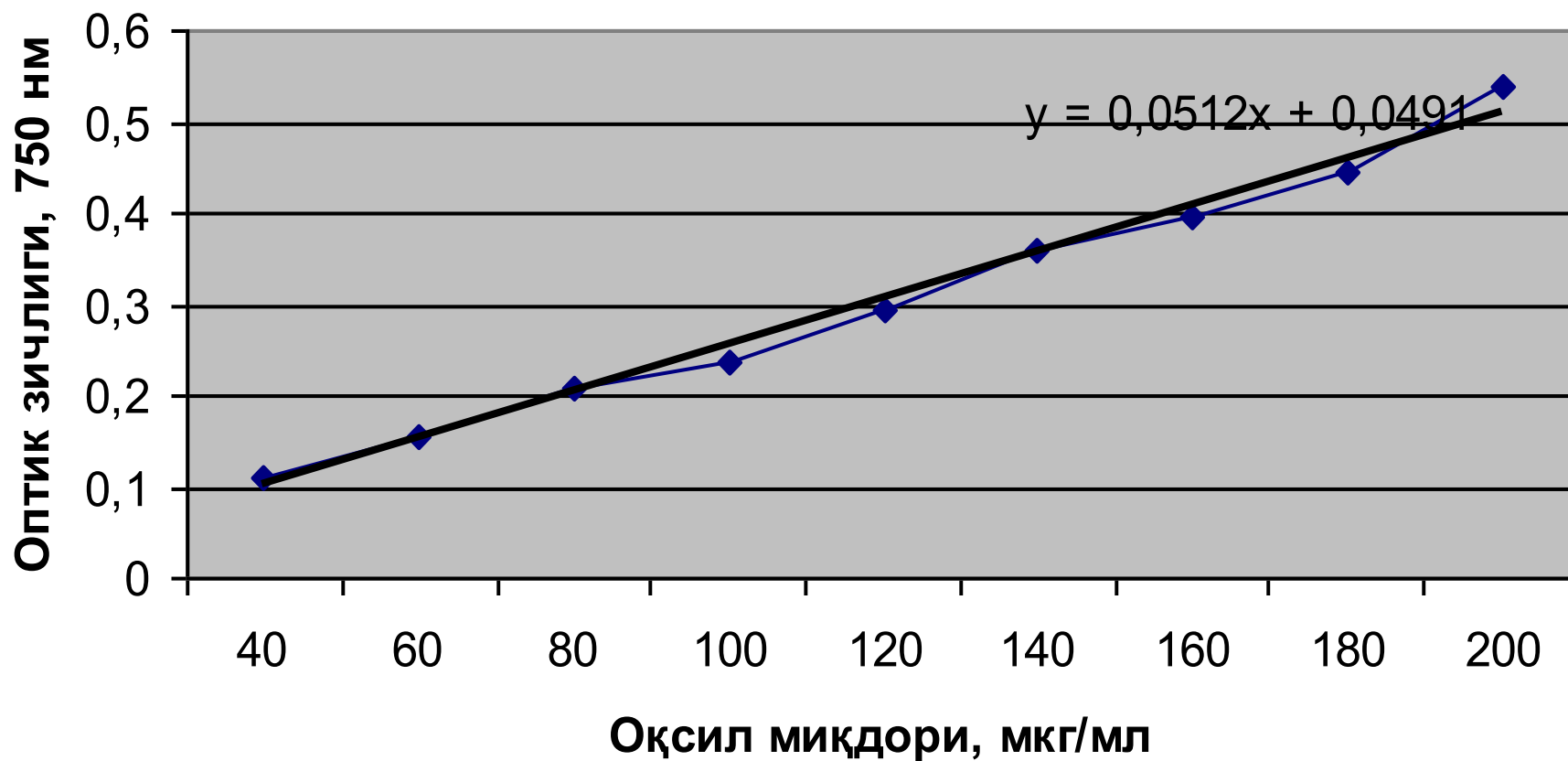
15. Жеребцов Н.А., Шеламова С.А., Геращенко И.Н.; Выбор продуцента инулазы. Воронеж. гос. технол. акад. - Воронеж, 1997. - 5 с. - Рус. - Деп. в ВИНТИ 09.07.97, N 2326-B97.
16. Ковалева Т.А., Кожокина О.М. Разработка технологических режимов получения фруктозы с помощью иммобилизованной инулазы. // Сборник трудов Второй Российской Конференции "Физика в биологии и медицине", посвященной памяти профессора Изакова В.Я. Екатеринбург, 24-26 апреля 2001. С.45-46.
17. Ковалева Т.А. Воздействие мочевины, химические свойства свободной и иммобилизованной инулазы. // Ж. Радиационная биология. Радиоэкология, 2000. - т. 40, № 1. - С. 23-27.
18. Крикунова Л.Н., Александрова М.М. Энерго- и ресурсосберегающая технология этанола из топинамбура. 1. Сравнительная характеристика способов подготовки сырья к сбраживанию. // Ж. Хранение и переработка сельхозсырья, №6, 2000. - С. 64-67.
19. Мавлянова Р.Ф. Изучение топинамбура в Ташкентской области.// Тез.докл. международной научно-практической конференции «Аграрная наука: достижения и перспективы», Ташкент, 1-2 мая, 2002. - С. 275-277.
20. Эйхе Э.П. Топинамбур, или земляная груша. (Основы возделывания и нар.-хоз.значение). М.-Л.: Изд-во АН ССР, 1957. - 193с.
21. Технология спирта // В.Л. Яровенко, В.А. Маринченко, В.А. Смирнов, П.М. Цыганков, В.Н. Швец, Н.И. Белов.: под редакцией доктора технических наук профессора В.Л. Яровенко. - М.: Колос, «Колос-Пресс», 2002. - 464 с.
22. Саломов Ҳ.Т., Ахмедова З.Р., Саломов Ш.Ш. Спирт технологияси асослари. - Т.: Ижод дунёси, 2003. - 224 б.
23. Ўзбекистон Республикаси ҳудудида экиш учун тавсия этилган қишлоқ хўжалиги экинлари Давлат Реестри.
24. Новаковская С.С., Шишацкий Ю.И. Производство хлебопекарных дрожжей. - М.: Пищепромиздат, 1990. - 375 с.
25. Технология спирта // В.А. Смирнов, П.М. Цыганков и др.: под редакцией доктора технических наук профессора В.А. Смирнова. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1996. - 416 с.
26. Биохимия растительного сырья. // Щербаков В.Г., Лобанов В.Г. и др. Под ред. заслуженного деятеля науки и техники РФ док-ра техн. наук, проф. В.Г. Щербакова. - М.: Колос, 1999. - 376 с.
27. Великая Е.И., Суходол В.Ф. Лабораторный практикум по курсу общей технологии бродильных производств. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. - 311 с.
28. Джаникулова У.Б. Биотехнология получения фруктозного сиропа из топинамбура: Автореф.дисс....канд.биол.наук: Ташкент, 2008. - 24 с.
29. Ольшанова К.М., Потапова М.А., Морозова Н.М. Практикум по хроматографическому анализу. - М.: Высшая школа, 1970. - 312 с.
30. Lowry O.H., Rosenbrough N.C., Farr A.L., Randal F., J. Biol. Chem., 1951, v 193, p. 265.
31. T.M. Wood, K.M. Bhat, *Methods Enzymol.*, **V. 160**, 87-113 (1988).

Иловалар



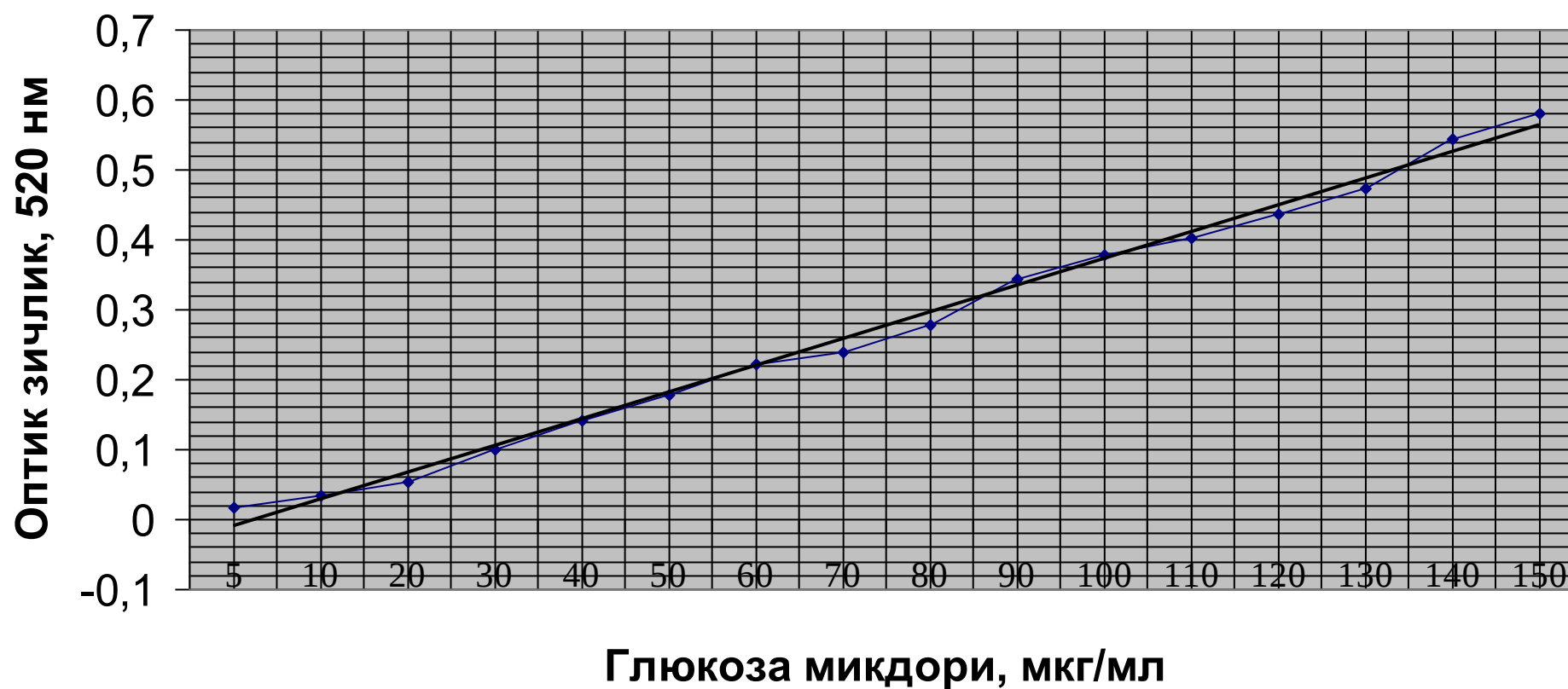
1-илова. Резорцин усулига кўра фруктоза миқдорини аниқлашнинг калибровка чизиғи

Лоури бўйича оқсил миқдори (БСА)



2-илова. Оқсиллини аниқлаш учун калибровка графиги

Глюкоза буйича калибровка (Шомоди-Нельсон)



З-илова. Шомоди-Нельсон усулида глюкозани аниқлаш учун калибровка чизиғи