

***Кистаубаева А., Савицкая И., Шокатаева Д., Жабакова А., Құли Ж.**

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті,
Қазақстан, Алматы қ., *e-mail: aida.kistaubaeva@kaznu.kz

АУЫЛ ШАРУАШЫЛЫҚ ҚАЛДЫҚТАРЫНЫҢ ЦЕЛЛЮЛОЗАЛЫ СУБСТРАТТЫҢ АШЫТҚЫ БАКТЕРИАЛДЫ КОНВЕРСИЯ ЖОЛЫМЕН ЖЕМДІК АҚУЫЗ ӨНІМДЕРІНЕ ДЕЙІН УТИЛИЗАЦИЯЛАУ

Микробтық ақуыз пен пробиотиктерге бай целлюлозалы шикізаттың биоконверсиясы – жануар және құс шаруашылығындағы жемнің сапасын жақсартудың әдістерінің бірі. Микроорганизмдердің екі тобының біріккен қатты фазалы ферментациясы соңғы субстраттың биоконверсияның құралы ретінде пайдаланылады (Norman 2009: 268). Бұл конверсияның алғашқы кезеңі ретінде – шикізаттың қанттануын жүзеге асыратын *Bacillus* (целлюлозалық ферменттер және антимикробтық субстанциялардың продуценттері) туысының бактериясы. Екіншісі – ақуыз продуценттері – ашытқылардың арнайы штаммдары.

Целлюлозалы шикізат – бидай кебегін, күнбағыс қалдығын және күріш қауызын тәуліктік сорпалы бактериалды дақылмен инокуляттады. Дақылдауды 10 тәулік бойы 28-30°C температурада жүзеге асырады. Ферментацияның тиімділігі, яғни *Bacillus* туысының 12 штамының қатты целлюлозалы субстраттарда өсу қабілетін құрамындағы 80% H_2SO_4 және 2% HCl-да оңай гидролизденетін полисахаридті целлюлозаның өзгеруімен бағалайды.

Зерттеу барысында целлюлоза және гемицеллюлозаның шығыны: кебекте – 2-6 %, күріш қауызында – 7-10 %, күнбағыс қалдығында – 5-9%. 3 түрлі аралас дақыл құрастырылды. *Bacillus* туысы бактериялары мен *Pichia guilliermondii* ашытқыларынан тұратын аралас дақылдарды пайдалану целлюлозаның бұзылу тиімділігін 2-3 есе арттырды. Бұлардың арасындағы белсенділері қатты субстраттарда жасуықтың гидролизін 20- 25 % жүргізді.

3 тәулік ішінде 8×10^9 КОЕ/г-ға дейін соңғы субстраттарда өсуге қабілетті, ал алдыңғы бактериалды конверсия олардың өсуін 25% арттырған, алдын ала өңделген ашытқы штаммдарының субстраттарын инокуляттады.

Алынған нәтижелер целлюлозаның бактериалды конверсия жолымен алынатын қантты пайдаланушы аэробты, целлюлозолитикалық *Bacillus* туысының бактериялары мен целлюлозолитикалық емес *Pichia guilliermondii* ашытқылары өсімдік субстратының сатылы ыдырауға қабілетін көрсетеді.

Түйін сөздер: целлюлозалы шикізат, қатты фазалы ферментация, *Pichia guilliermondii*, микробтық ақуыз.

*Kistaubayeva A., Savitskaya I., Shokataeva D., Zhabakova A., Kuli Zh.

Al-Farabi Kazakh National University,
Kazakhstan, Almaty, *e-mail: aida.kistaubaeva@kaznu.kz

Utilization of agricultural waste by yeast-bacterial conversion of cellulose-containing substrates to protein feed products

Bio-conversion of cellulose containing raw materials into enriched with microbial protein and probiotics is one of the ways to increase the nutrition of fodder for livestock and poultry. Bio-conversion of initial substrates is a joint solid-phase fermentation by two groups of microorganisms. Saccharification of raw materials is the first step of conversion performed by first group of bacteria from the *Bacillus* genus (producers of cellulolytic enzymes and antimicrobial substances). The second step is performed by special strains of yeast that produce proteins.

Cellulose containing raw materials like wheat bran, sunflower meal and rice husk inoculated for 10 days within 24-hours at 28-300 ° C temperature in bacterial broth culture. Effectiveness of fermentation based on growth ability of 12 Bacillus genus strains on cellulose containing solid substrates by changing content of cellulose hydrolyzed by 80% H₂SO₄ and easily hydrolysable polysaccharides (hemicelluloses) hydrolyzed by 2% HCl.

According to our research cellulose and hemicellulose in bran decreased to 2-6%, decrease in rice husk is 7-10%, in sunflower meal is 5-9%. Three mixed cultures were constructed. Mix cultures based on bacteria of the Bacillus genus and yeast Pichia guilliermondii increase cellulose destruction efficiency by 2-3 times. The most active of them hydrolyzed 20-25% of cellulose on solid substrates.

Prefabricated substrates were inoculated with yeast strains that capable to grow on initial substrates to 8 × 10⁹ cfu / g during 3 days of cultivation, and preliminary bacterial conversion increases their growth to 25%. The obtained results demonstrate the possibility of step-by-step degradation of the plant substrate by aerobic cellulolytic bacteria of the Bacillus genus and non-celluloseolytic yeast Pichia guilliermondii, which use sugar obtained by bacterial cellulose conversion.

Key words: cellulose containing raw materials, solid-phase fermentation, Pichia guilliermondii, microbial protein.

*Кистаубаева А., Савицкая И., Шокатаева Д., Жабакова А., Кули Ж.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы, *e-mail: aida.kistaubaeva@kaznu.kz

Утилизация отходов сельского хозяйства путем дрожже-бактериальной конверсии целлюлозосодержащих субстратов в белковые кормовые продукты

Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья в обогащенные микробным белком и пробиотиками – это один из путей повышения питательности кормов для животноводства и птицеводства. Инструментом биоконверсии исходных субстратов является совместная твердофазная ферментация двумя группами микроорганизмов. Это бактерии рода Bacillus (продуценты целлюлозолитических ферментов и антимикробных субстанций), осуществляющие первый этап конверсии – осахаривание сырья. Вторая – специальные штаммы дрожжей – продуценты белка.

Целлюлозосодержащее сырье – пшеничные отруби, подсолнечный шрот и рисовую шелуху – инокулировали суточной бульонной бактериальной культурой. Культивирование осуществляли при температуре 28-30°C в течение 10-ти суток. Эффективность ферментации, т.е. способность 12-ти штаммов рода Bacillus расти на твердых целлюлозосодержащих субстратах оценивали по изменению содержания целлюлозы (клетчатки), гидролизуемой 80% H₂SO₄, и легкогидролизуемых полисахаридов (гемицеллюлоз), гидролизуемых 2% HCl.

В ходе исследования было установлено, что убыль целлюлозы и гемицеллюлозы в отрубях составляла 2-6%, в рисовой шелухе – 7-10%, в шроте подсолнечника – 5-9%. Было сконструированы 3 смешанные культуры. Использование смешанных культур на основании бактерий рода Bacillus и дрожжами Pichia guilliermondii увеличивало эффективность деструкции целлюлозы в 2-3 раза. Наиболее активные из них гидролизовали клетчатку твердых субстратов на 20-25%.

Предобработанные субстраты инокулировали штаммами дрожжей, способных расти на исходных субстратах до 8×10⁹ КОЕ/г в течение 3-х суток культивирования, а предварительная бактериальная конверсия увеличивает их рост в среднем на 25%. Полученные результаты демонстрируют возможность поэтапной деградации растительного субстрата аэробными целлюлозолитическими бактериями рода Bacillus и нецеллюлозолитическими дрожжами Pichia guilliermondii, которые используют сахар, полученный путем бактериальной конверсии целлюлозы.

Ключевые слова: целлюлозосодержащее сырье, твердофазная ферментация, Pichia guilliermondii, микробный белок.

Егін алқабында және жыртылған алқапта қалдырылған бидай кебектері, күріш қауызы және күнбағыс қалдықтары құрамында жасұнық пен кремний органикалық байланыстардың қатынасының жоғарылығының нәтижесінде ыдыраудың ұзақ мерзімін қамтиды (Kanochkina 2010: 236-237). Сондықтан, жыртылатын

қабаттарда бұл қалдықтар 3-5 жыл көлемінде сақталады. Олар топырақтың сусыздануына және азот көздерінің тиімді жұмсалмауына алып келеді. Өсімдік қалдықтарының шіру процесін биоконверсия арқылы тездетуге болады.

Қазіргі уақытта Қазақстан үшін маңызды мәселелердің бірі ауылшаруашылық өндіріс

кешеніндегі пайдалы өнімдердің әртүрлі қалдықтарының микробиологиялық конверсиясы. Целлюлозалық бактериялардың жеке түрлерінің биологиялық құрылымын зерттеу арқылы, бұл микроорганизмдердің ортаны белсенді заттарға байытып, жемдік өнімдердің сапасын арттыру қызметін атқаратыны белгілі болды (Silas 2002: 541–545).

Жем сапасының жақсаруы мен тез сіңірілуі микробтық ақуызды пайдалануымен тығыз байланысты. Әдетте ол үшін жемге ашытқы белогын енгізеді (Tian 2013: 17–23). Қоректік жемнің сапасының жоғарылауының тағы бір жолы – ақуыздық өнімге өсімдік шикізатының тікелей биоконверсиясы (Yong 2011: 489–495).

Дәстүрлі әдебиеттер бойынша биоконверсияның негізгі құралы ретінде жемдік шикізатты алмаспайтын аминқышқылдар және витаминдермен байытумен қатар (Pratima 2012: 1-3), болашақта өсімдік субстраттарында ашытқылардың өсу тиімділігін жоғарылататын қанттануды қамтамасыз етеді (Bagman 2011: 1-7).

Басқа жағынан қарасақ, жануар және құс өсіру шаруашылығында заманауи өндірістік технология жоғары тиімді өсу стимуляторлары мен бактериальды инфекцияға қарсы профилактика құралдарынсыз жүзеге аспайтын еді. Сондықтан қазіргі кезде пробиотикалық-ферментативті микробты жемдік қосылыстардың жасалуына мән берілуде (Han 2003: 119-153). Оларды жүзеге асырудың заманауи бағыттарының бірі – *Bacillus* туысының бактерияларын пайдалану. Олардың арасында патогенді және шартты патогенді микроорганизмдерге қарсы антогонистік белсенділікке ие штаммдар кездеседі (Clayton 1995: 595–599). Осы продуцент бактериялар синтездейтін амилаза, целлюлоза, пектиназа ферменттері жемнің сіңірілуіне қабілетті (Clarridge 2004: 840–862). Биоконверсияның бірінші сатысында целлюлозолитикалық бактериялар субстратта жай қанттардың жинақталуына әсер етеді, сол арқылы сахаролитикалық ашытқылар үшін қорек көзін дайындайды (Tian 2013: 17–23). Олай болса, *Bacillus* туысының целлюлозолитикалық бактериялары субстраттардың қанттануы арқылы ашытқылардың өсу тиімділігін жоғарылатып қана қоймай, жемді антимикробты субстанциялар мен гидролитикалық ферменттермен байытады.

Осыған байланысты жүргізіліп отырған зерттеудің мақсаты – жемдік-ақуызды өнімдердің целлюлозолитикалық субстраттарының ашытқы-бактериальды конверсия процесінің мүмкіндігін

экспериментті түрде дәлелдеу. Ол үшін, біріншіден, целлюлозолитикалық белсенділікке ие, белсенділігі жоғары *Bacillus* туысының бактерия штаммдарын іріктеу. Екіншіден, зерттелген субстраттарда тиімді түрде биомассаны жинақтайтын ашытқы штаммдарын сұрыптау.

Материалдар мен әдістер

Ферментация үшін шикізат ретінде ауыл шаруашылық өндірісінің екінші реттік қалдықтары пайдаланылады: бидай кебегі, күнбағыс қалдығы және күріш қауызы. Ферментацияның бірінші сатысында ұйытқы ретінде *Bacillus* туысы бактериясының 12 штамының тәуліктік сорпасының дақыл суспензиясын пайдаланады. Барлық штамдар жоғары деңгейде патогенді және шартты-патогенді энтеробактерияларға қарсы антогонистік қабілетке ие (Сушкова 2008: 117). Стерильді майдаланған және деылғалданған шикізатты 10^7 КОЕ/г мөлшерде ұйытқысы бар кюветаларға біркелкі орналастырады. Алғашқы тәулікте себінділерді араластырып, кейін статикалық жағдайда 30°C -та инкубациялайды. Штамдардың қатты целлюлозалы субстраттарда өсу қабілетін сұйылту әдісі арқылы, 1 г ферменттелген материалда тіршілікке қабілетті бактерияларды санау арқылы анықтайды. Субстраттардың ферментация тиімділігін дақылдаудың Гуго-Мюллер әдісі арқылы 5-ші тәулікте целлюлозаның шығынына қарай бағалайды (Han 2003: 119-153). Целлюлазды кешендегі ферменттердің белсенділігін штамдарды әртүрлі целлюлозалық субстраттарда (филтрленген қағазда, карбоксиметилцеллюлозада, мақтада, целлюлозада) өсіргеннен кейін дақылдық сұйықтықта түзілетін қанттардың редуцирленген әдісі арқылы анықтайды (Пузанков 2000: 147-149).

Екінші сатыда ферменттелген бактерия шикізатына 10^7 КОЕ/г мөлшеріндегі ашытқы ұйытқысы енгізіледі. Ашытқылардың интенсивті түрде өсуі ферменттелген материалды сұйылту арқылы Сабуро қоректік ортасына егілгеннен кейін, 1 г субстраттағы тіршілікке қабілетті клеткалардың санымен бағаланады. Өнімділік Кьельдала әдісі бойынша ақуыз мөлшерімен сипатталады (Norman 2009: 268).

Штамдардың идентификациясы *16S rRNA* гені фрагментінің нуклеотидтерінің тізбектелуін анықтау әдісі арқылы жүзеге асады (Kanochkina 2010: 236-237). Бұл нуклеотид тізбегіндегі халықаралық GenBank дерек базасында сақталған сәйкестікті анықтау арқылы жүзеге асады.

ДНҚ Kate Wilson әдісі арқылы бөлініп алынады (Борисенко 2012: 46-49).

Генотиптеу олардың түрлік қажеттіліктерін анықтады: *Bacillus cereus* (НП-1, П-5, Ж-7); *Bacillus subtilis* (Р-2, НП-7, С-10, НП-9); *Bacillus licheniformis* Ж-25, *Bacillus pumilis* Р-5, *Brevibacillus brevis* С-7, *Bacillus pseudomycooides* С-17, *Rhodococcus rhodochrous* Ж-23, *Candida famata* (А1, А3); *Pichia guilliermondii* (КВ-4, IS-7), *Pichia anomala* Р-12. Барлық штамдар Қазақстан Республикасының РКМ-де сақталған. Алынған белсенді дақылдар Еуропалық ЕНА мүмкіндігі бар ген банкіне және Жапонияның ДНҚ ген банкінде SUB2501869 *Bacillus*_P2 KY780502; SUB2501867 *Pichia*_KB4 KY780500 және SUB2501870 *Bacillus*_ZH25 KY780501 орналастырылды.

Нәтижелер және оларды талқылау

Bacillus туысының бактериялары штамдарының целлюлозалитикалық белсенділігін беттік қатты фазалы жағдайда, бактерияларды 65%-ға дейінгі ылғалданған қатты, кеуекті материалдары (ұн өнеркәсібінің қалдығы, май экстракционды өндіріс және өсімдік шаруашылығы: бидай кебектері, күнбағыс қалдығы және күріш қауызы) бар қоректік ортада өсіру арқылы анықтайды. Кебектер және күнбағыс қалдығы

– жануар және құс шаруашылығының барлық түрлерінде қолданылатын жоғарғы протеинді өнім (Лыско 2006: 54-55). Алайда, олардың құрамында көп мөлшерде жасұнық болады (Троякова 2007: 52-54). Күріш қауызы – Қазақстан Республикасында күріш өндірісіндегі көп тоннажды, құрамында органикалық заттары аз қосалқы өнім. Оның құрамындағы жасұнықтың көп мөлшерде (38%-ға дейін) болуы, пайдалы утилизация ретінде пайдалану мүмкіндігі ақуыздық өнім алу үшін күріш қауызын сапалы субстрат ретінде пайдалануының негізі (Golowcyc 2009: 111–116). Алынған мәліметтер бойынша барлық штамдар экспериментальді субстраттарда өсу қабілетіне ие. Бірақ бидай кебегінде *Pichia guilliermondii* КВ-4 және *Bacillus subtilis* Р-2 және *Bacillus licheniformis* Ж-25 (патент №18 бюлл. 30 желтоқсан 2016 жылдан бастап) штамдары жақсы өседі. *Pichia guilliermondii* КВ-4 пен *Bacillus subtilis* Р-2 штамдары күнбағыс қалдығында және күріш қауызында, құрамы жоғары мөлшерде целлюлозасы бар, бірақ басқа органикалық заттар аз субстратта *Bacillus subtilis* Р-2 және *Bacillus licheniformis* Ж-25 штамдары белсенді өседі.

Зерттелетін барлық штамдар бұл субстраттардағы целлюлозаны ыдырата алады (1-кесте).

1-кесте – *Bacillus* туысының қатты фазалы ферментациядан кейін целлюлозалы субстраттарда жасұнық мөлшерінің төмендеуі

Штамм	Бидай кебегі		Күріш қауызы		Күнбағыс қалдығы	
		% целлюлоза шығыны		% целлюлоза шығыны		% целлюлоза шығыны
Р-2	7.03±2	12,12	35.05±1	14,2	17.27±1	20,76
Р-5	7.08±1	11,5	34.28±1	7,8	19.41±2	7,57
НП-1	7.43±2	7,13	34.56±2	9,05	19.95±1	5
НП-7	5.15±2	31,6	35.11±2	7,6	19.17±1	8,7
НП-9	6.12±2	23,5	34.32±1	9,7	19.87±2	5,38
Ж-7	7.18±2	10,25	33.28±2	12,42	19.57±1	6,8
Ж-25	5.45±2	35,86	34.76±1	8,52	17.68±2	20,57
Ж-23	7.04±1	12	34.98±2	7,9	19.11±2	9
П-5	6.55±1	18,13	32.34±1	10,89	19.36±2	7,8
С-7	7.30±1	8,75	35.30±2	7,1	19.15±1	8,8
С-10	7.12±2	11	35.02±1	7,8	17.66±2	15,9
С-17	5.45±1	31,88	34.31±1	9,7	19.32±1	8

Ескерту: целлюлозаның бидай кебегіндегі мөлшері – 8±1%; күріш қауызында – 38±1%; Күнбағыс қалдығында – 21±2 %.

Сонымен қатар, целлюлозаның максималды шығыны бидай кебегінде 35,86 %-ға дейін байқалады. Күнбағыс қалдығында целлюлоза мөлшері 15-20%-ға, күріш қауызында 10-15% азаяды. Бұл штаммдардың жоғары спецификалық қасиетке ие екендігін, яғни әр түрлі шикізат көздеріндегі целлюлозаның ыдырау қабілетілігін көрсетеді. Онымен қоса, целлюлозаның субстраттарда ыдырау диапазоны біршама кең: 7,13% – 35,86% бидай кебегі, күріш қауызында 7,1%-дан 14,2%-ға дейін, күнбағыс қалдығында 5%-дан 20,76%-ға дейін.

Күтілгендей, штаммдардың осы және басқа да субстраттарда өсу қабілеті ондағы целлюлоза деңгейінің төмендеуімен байланысты, оны қолданылатын штаммдардың целлюлозолитикалық белсенділігін әртүрлі дәрежесімен түсіндіруге болады. Бірақ бұлардың ешқайсысы берілген субстраттар сұрыптамасында целлюлозаны ыдырату қабілетіне қарай «әмбебап» болмағандықтан, басқа да түсініктерге ие. Субстраттардың гидролиздік тереңдігі цел-

люлазды комплекстегі ферменттердің белсенділігінің қатынасына және синергизмнің болуына тәуелді ([Plumed-Ferrer 2011: 1032–1040](#)). Соған байланысты, мақсатқа сәйкес аралас дақылды субстраттардың ферментациясын жүргізу, негізгі бекітілген принцип бойынша әр түрлі басымды целлюлозалы типтерді бір штамм дақылға біріктіру. Целлюлозолитикалық ферменттердің белсенділігі дәстүрлі түрде ферментациядан кейін глюкоза саны анықталатын әр түрлі жасұнық түрлерінің ыдырау деңгейімен бағаланады ([Bautista-Gallego 2008: 1412–1421](#)). Бұл ферменттердің пайдалану спектрі әр түрлі целлюлозалы субстраттарда штаммдарды өсіргеннен кейін дақылдық сұйықтықты түзетін редуцирленген қанттар әдісімен анықтаған. Бұл үшін Гетчинсон қоректік ортасына целлюлоза көзі ретінде карбоксиметилцеллюлозаны, целлобиозаны, мақтаны, фильтр қағазын қосты ([Filipa 2013: 5949–5961](#)).

Целлобиаза және C2 ферментінің белсенділігі бойынша барлық бактерия штаммдары өзгешеленбеген (2-кесте).

2-кесте – Ферментативті бактерия комплексінде жеке целлюлозалардың қатынасы

Штамм	редуцирленген қант (мг/мл)				Сх: Цб: C2: C1
	Сх-фермент	Целлобиаза	C2- фермент	C1-фермент	
P-2	0.55±0,06	1.18±0,03	0.38±0,01	0.44±0,01	1.6: 1: 1,1: 1.2
P-5	0.48±0,03	1.27±0,02	0.39±0,02	0.47±0,01	1.3: 1.1: 1,1: 1.1
НП-1	0.49±0,04	1.23±0,01	0.36±0,01	0.56±0,05	1.3: 1.1: 1: 1.3
НП-7	0.32±0,01	1.29±0,03	0.40±0,03	0.52±0,03	1.3: 1.1: 1,1: 1
НП-9	0.35±0,02	1.21±0,01	0.36±0,01	0.56±0,02	1: 1: 1: 1.3
Ж-7	0.46±0,03	1.30±0,02	0.38±0,02	0.43±0,03	1.3: 1.1: 1,1: 1
Ж-23	0.50±0,01	1.17±0,04	0.41±0,03	0.46±0,02	1.4: 1: 1,1: 1.1
Ж-25	0.55±0,02	1.29±0,03	0.39±0,02	0.42±0,01	1.6: 1.1: 1,1: 1
П-5	0.47±0,01	1.28±0,02	0.37±0,04	0.47±0,02	1.3: 1.1: 1: 1.1
С-7	0.51±0,01	1.20±0,01	0.36±0,01	0.52±0,01	1.5: 1: 1: 1.2
С-10	0.49±0,02	1.22±0,05	0.41±0,02	0.48±0,01	1.4: 1: 1,1: 1.1
С-17	0.56±0,04	1.21±0,04	0.38±0,03	0.57±0,02	1.4: 1: 1,1: 1.4

Ескерту: бірлік ретінде әр штаммның жеке ферментімен целлюлозаның ыдырауы кезінде түзілген глюкозаның абсолютті мағынада аз көрсеткішін қабылдау керек.

Басқа ферменттердің белсенділік деңгейіне байланысты штаммдарды 2 топқа бөледі: С₁ – ферментінің белсенді басымдылығына ие: НП-1, НП-9 және Сх – ферментінің белсенді

басымдылығына ие: P-2, Ж-25, С-17 (карбоксиметилцеллюлозаны ыдыратады). Аралас дақыл целлобиазы және Сх – ферменттерінің байланысқан белсенділігіне ие штаммдардан түзілді.

3-кесте – Целлюлозалитикалық бактериялардың аралас дақылмен өсімдік субстраттарын қатты фазада дақылдау

Штаммдар	Бидай кебегі		Күріш қауызы		Күнбағыс қалдығы	
	Целлюлоза	% шығын	Целлюлоза, %	% шығын	Целлюлоза, %	% шығын
Бақылау	43,00+3	-	38,00+1	-	21,00+2	-
НП-7	39,98+2	7	35,11+2	8	19,17+1	9
НП-9	39,66+1	8	34,32+1	10	19,87+2	5
НП7+НП-9	38,27+1	11	30,79+2	18	17,46+2	17
Ж-25	40,56+1	6	34,76+1	9	19,68+2	6
НП-9	39,66+1	8	34,32+1	10	19,87+2	5
Ж25+НП-9	32,24+1	21	29,03+1	20	15,92+1	22
С-17	40,34+1	6	34,31+1	10	19,32+1	8
НП-9	41,24+2	4	34,56+2	9	19,95+1	5
С-17+ НП9	33,12+1	23	28,5+1	22	15,76+1	23
Р-2	41,24+2	4	34,56+2	9	19,95+1	5
НП-1	39,54+2	8	34,29+2	10	19,57+1	7
Р-2 +НП-1	36,76+1	15	31,36+2	17	17,02+2	19
Ж-7	39,54+2	8	34,29+2	10	19,57+1	7
НП-9	39,66+1	8	34,32+1	10	19,87+2	5
Ж-25 +Р-2	42,97+3	25	38,39+4	24	22,79+1	25
Ж-7	39,54+2	8	34,29+2	10	19,57+1	7
С-7	39,91+2	7	35,30+2	7	19,15+1	9
С-17 +НП-1	36,79+1	14	32,57+1	14	17,48+1	17

Ескерту: кестеде 100 гр шикізатта болатын целлюлоза мен гемицеллюлозаның мөлшері көрсетілген.

Штаммдарды бірге қолдану барысында кебектегі және күріш қауызында, күнбағыс қалдығында целлюлоза ыдырау деңгейі жоғарылайды, мысалы Ж-25+Р-2 штаммдарын біріктіріп зерттеу нәтижесінде бидай кебегінде жасұнықтың шығыны 25%, күріш қауызында – 24%, күнбағыс қалдығында – 25% болды. Осы мазмұнға сәйкес целлюлозаның мөлшері: күріш қауызында – 38,39±4%; қалдығында – 22,79±1 %, кебекте – 42,97±3%. Басқа түзілген аралас дақылдар бидай кебегінің, күріш қауызының, күнбағыс қалдығының жасұнығын 11-ден 23%-ға дейін гидролиздейді. Кебектегі целлюлозаның болу диапазоны: күріште – 39-41%, күріш қауызында – 29%-34% және күнбағыс қалдығында 5%-дан 23%-ға дейін.

Барлық сынақтан өткен ассоциациялар целлюлозаларды жақсы ыдыратады (монодақыл 4-тен – 10%-ға дейін).

Алынған нәтижелер *Bacillus* туысының бактерияларын қатаң ауыл шаруашылық қалдықтардың қанттануында қолдану мүмкіншіліктерін көрсетеді.

Өсімдік қалдықтарына *Bacillus* туысының бактерияларын ендіру күрделі көмірсулардың сіңірілуіне септігін тигізіп, өсімдік қалдықтарының энергетикалық құндылығын 15–25 %-ға жоғарылатады.

Күтілгендей, жемдік ақуызды өнімдерге *Bacillus subtilis* Р-2 *Bacillus licheniformis* Ж-25 штаммдарының мультиэнзимді қосылысын қосу арқылы жемдік өнімнің тиімділігін 25%-ға дейін арттыруға болады.

Бұдан басқа, жасұнықты бір уақытта ыдырататын тірі бактериялардың кешені энергопатогенді микроорганизмдер қатынасында антогонистік рөл атқаруы мүмкін (Leon-Romero 2015: 689–695). Осыған байланысты ауыл шаруашылық жануарлар мен құстардың рационнда бұл препарат жемдік фермент және пробиотик секілді 2 түрлі жемдік қоспаны алмастыра алады (Tati 2013: 3).

Ферментті кешен бидай кебегінің, күнбағыс және күріш қауызының қалдығының сіңірілуін жоғарылатады және кешен құрамындағы пробиотикалық бактериялар патогенді микроорга-

низмдердің өсуін тежейді (Pratima 2012: 1-3), соған орай жануарлардың ас қорыту жолында пайдалы микрофлораның пайда болуына әсер етеді (Norman 2009: 268).

Жүргізілген зерттеу тапсырмаларының бірі – оның қанттануын жүзеге асыратын бактериялардың қатысында целлюлозалы шикізаттан ақуызды алу мүмкіндігін экспериментальді дәлелдеу. Ол үшін арнайы эксперимент-

тер жүргізілді. Целлюлозолитикалық бактериялардың дақылдарын 5 тәулік бойы 30°C-та күнбағыс қалдығында, күріш қауызында, бидай кебегінде өсірді. Содан кейін субстратты *Candida* және *Pichia* туысына жататын ашытқылардың дақылдарымен инокуляттады. Егу дозасы – 3×10^7 КОЕ/г. 27°C-та 3 тәулік дақылданған кейін ферменттелетін ашытқы субстратының өнімділігін анықтады (4-кесте).

4-кесте – Целлюлозолитикалық бактериялар мен ашытқылардың деңгейлі дақылдау процесінде өсімдік қалдықтарында биомасса мен ақуыздың түзілуі

Ашытқы түрі	Ашытқы клеткаларының мөлшері, КОЕ/г			
	Күнбағыс қалдығы		Күріш қауызы	
	Қанттануға дейін ЦЛБ	Қанттанудан кейін ЦЛБ	Қанттануға дейін ЦЛБ	Қанттанудан кейін ЦЛБ
<i>Candida famata A1</i>	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^8$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^9$	$(3.4 \pm 0.2) \times 10^8$	$(2.2 \pm 0.2) \times 10^9$
<i>Candida famata A3</i>	$(3.9 \pm 0.2) \times 10^8$	$(3.6 \pm 0.3) \times 10^9$	$(3.1 \pm 0.2) \times 10^8$	$(3.8 \pm 0.4) \times 10^9$
<i>Pichia guilliermondii</i> KB-4	$(4.9 \pm 0.3) \times 10^8$	$(8.8 \pm 0.5) \times 10^9$	$(3.1 \pm 0.1) \times 10^8$	$(6.6 \pm 0.4) \times 10^9$
<i>Pichia guilliermondii</i> IS-7	$(4.6 \pm 0.5) \times 10^8$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^9$	$(3.2 \pm 0.3) \times 10^8$	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^9$
<i>Pichia anomala</i> P-12	$(4.5 \pm 0.4) \times 10^8$	$(5.1 \pm 0.3) \times 10^9$	$(3.5 \pm 0.4) \times 10^8$	$(4.3 \pm 0.3) \times 10^9$
Бастапқы субстрат	0	0	0	0
Ашытқы түрі	Шікі протеиннің массалық үлесі, %			
	Күнбағыс қалдығы		Күріш қауызы	
	Қанттануға дейін ЦЛБ	Қанттанудан кейін ЦЛБ	Қанттануға дейін ЦЛБ	Қанттанудан кейін ЦЛБ
<i>Candida famata A1</i>	44.6±2.7	57.7±3.8	12.8±0.6	15.6±0.8
<i>Candida famata A3</i>	43.9±2.2	58.0±2.8	13.1±0.7	17.1±1.6
<i>Pichia guilliermondii</i> KB-4	45.1±2.6	59.3±2.9	13.5±0.6	17.6±1.1
<i>Pichia guilliermondii</i> IS-7	43.8±2.6	57.1±2.8	12.9±0.8	15.6±0.9
<i>Pichia anomala</i> P-12	44.1±2.3	58.6±2.4	12.5±0.6	16.3±1.2
Бастапқы субстрат	37.6±2.1	37.6±2.1	4.08±0.1	4.08±0.1

Алынған нәтижеге сай *Pichia guilliermondii* KB-4 штаммы өнімді болып табылады. Бастапқы субстратта ашытқы клеткаларының концентрациясы 8.8×10^9 КОЕ/г-ға 3 тәулік культивирлеуден кейін жетеді. Алдын ала бактериалды конверсияны пайдалану ашытқылардың өсуін біршама арттырады (Marchal 2002: 205-217). Къельдаль бойынша бастапқы массада ақуыздың мөлшері қатты фазалы ферментацияда күнбағыс қалдығында орташа шамамен 45.1%, күріш қауызында – 13.5%.

Амило- және глюколитикалық ферменттердің бактериялармен бөлінуі олардың өмірлік

циклімен тікелей байланысты. Споралардың пісіп жетілуі сыртқы ортаға ферменттің крахмалды клейстердің бөлінуімен сипатталады. Вегетативті формалардың алдағы бөлінуі қанттану ферментінің (глюколитикалық фермент) бөлінуімен байланысты (Reise 2000: 485 – 488). Бактериялар қорда жиналған крахмалды жай метаболитикалық белсенді көмірсуларға айналдырады. Бактериялардың дақылдары қайнатылған крахмалдан моносахаридтерге дейін қанттайды, одан бөлек бактериялар сұйықтататын және қанттататын экзоферменттерді бөледі (Dale 2000: 287-291).

Сол себепті, субстраттың қанттануынан кейін целлюлозолитикалық бактериялар шикізаттың құрамындағы протеин орташа мөлшерде 25%-ға артады.

Қорытынды

Целлюлозолитикалық бактериялардың қатты фазалы дақылдауының лабораториялық моделі жасалды. Барлық штаммдар целлюлозалық комплекспен түзілген кең субстратты спецификаға ие екені айқындалды. Күнбағыс қалдығында, ағаш жоңқасында, күріш қауызында қатты фазалы дақылдауда монодақылды целлюлоза конверсиясының тиімділігі белгілі болды. Дақылдаудың 5-ші тәулігінде бидай кебегінде целлюлозаның концентрациясы – 4-6%, күріш қауызында – 7-10 %, күнбағыс қалдығында 5-9%-ға төмендейді.

Целлюлоза ыдырауының тиімділігін 2-3 есеге жоғарылататын 6 аралас дақылдар құрылды. Аралас дақылдардың ішіндегі ең белсенділері: *B.licheniformis* Ж-25 + *B.subtilis* НП-9, *B.cereus* С-17 + *B.subtilis* НП-9, *B.licheniformis* Ж-25 +

B.subtilis Р-2, олар жасұнықты қатты фазалы субстраттарда 20-25%-ға гидролиздейді. Бұл табиғи аэробты бактерия штаммдарын ағаш жоңқасын және ауыл шаруашылығының қатты қалдықтарын қанттауда қолдану мүмкіндігін туғызады.

Ашытқылардың *Pichia guilliermondii* КБ-4 өнімдірек штаммдары таңдалынып алынды. Бұл ашытқылар 3 тәулік ішінде дақылдау барысында бастапқы субстраттарда 8.8×10^9 КОЕ/г-ға дейін өсуге қабілетті. Алдын ала бактериялыды конверсияны пайдалану шикі протеиннің массалық үлесін орта шамамен 25%-ға жоғарылатады. Алынған нәтижелер *Bacillus* туысының бактериялары мен микробты целлюлозалы конверсия нәтижесінде алынған редуцирленген қантты пайдаланатын целлюлозалитикалық емес ашытқылардың *Pichia* және *Candida* туысы өсімдік субстратының толық ыдырау мүмкіндігін көрсетеді.

Айта кетсек, бұл қалдықтарды құс өндірісінде жемге қосады және осы штаммдардың негізінде жемдік пробиотиктердің алыну мүмкіндігінің перспективасын ашады.

Әдебиеттер

- 1 Norman F., Haard S.A., Odunfa and etc., «FAO agricultural services bulletin», (2009): 268
- 2 Kanochkina M.S., Borisenko E.G., Gorin K.V., Nguen C.Z., «EurasiaBio: 2nd International Congress-Partnering & Exhibition on Biology and Bioenergy», 2 (2010): 236-237.
- 3 Silas G.V-B., Elisa E., Margarida M.M., «World Journal of Microbiology & Biotechnology», 3 (2002): 541–545.
- 4 Tian V.C., Gulimova L.A., Nguyen T.G., Gorin K.V., Borisenko E.G., «Bulletin of Biotechnology and Physical and chemical biology», 9 (2013): 17–23.
- 5 Yong T., Danqing Zh., Liwei Zh., Jianxin J., «Eur Food Res Technol», 233 (2011): 489–495.
- 6 Pratima G., Kalpana S., Avinash S., «International Journal of Microbiology», (2012): 1-3.
- 7 Barman D., Saud Z.A., Habib M.R., Islam M.F., Hossain K., Yeasmin T., «Life Sciences and Medicine Research.», (2011): 1-7.
- 8 Han Y.W., «Adv. App. Microbiol.», 23 (2003): 119-153.
- 9 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C., «International Journal of Systematic Bacteriology», 45 (1995): 595–599.
- 10 Clarridge III J. E., «Clinical Microbiology Reviews», 17 (2004): 840–862.
- 11 Tian Van Chi, Gulimova L.A., Nguyen Truong Giang, Gorin K.V., Borisenko E.G., «Plant-Microbe Nutrients. Report 2: Yeast bioconversion of plant material. Bulletin of Biotechnology and Physical and chemical biology», 66 (2013): 17–23.
- 12 Сушкова В.И., Воробьева Г.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества [Текст] // Дели принт. – 2008. – Т. 7, №2. – С. 117.
- 13 Han Y.W., «Microbial utilization of straw Adv. App. Microbiol», 66 (2003): 119-153.
- 14 Пузанков А., Мхитарян Г. Техника для повышения питательной ценности кормов [Текст] // Свиноводство. – 2000. – Т.4, №6. – Р. 147-149.
- 15 Norman F., Odunfa S.A., «Fermented cereals a global perspective. FAO agricultural services bulletin», 3 (2009): 268.
- 16 Kanochkina M.S., Borisenko E.G., Gorin K.V., Nguen Chyoung Zang., «The yeast bacterial edible products based on the primary and secondary agroindustrial raw materials. EurasiaBio: 2nd International Congress-Partnering & Exhibition on Biology and Bioenergy», 2 (2010): 236-237.
- 17 Борисенко Е.Г., Каночкина М.С., Горин К. В. Функциональные свойства дрожжей и бактерий, входящих в состав микробных корректоров пищевого и кормового назначения [Текст] // Хранение и переработка сельхозсырья = Storage and processing of farm products: теоретический журнал. – 2012. – Т. 8, №. 3. – С. 46-49.
- 18 Лыско К. А., Шамсутдинова В. Р., Ганькина Е. В., Борисенко Е. Г. Дрожжевые технологии в производстве продуктов питания [Текст] // Пищевая промышленность. – 2006. – Р. 54-55.

- 19 Троякова С.А., Лыско К. А., Шамсутдинова В. Р., Борисенко Е. Г., Терешина Е.Н. Дрожжевые обогатители пищи и кормов на основе молочной сыворотки и зернового сырья [Текст] // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2007. – P. 52-54.
- 20 Golowczyc M.A., Mobili P., Garrote G., de Los Angeles Serradell M., Abraham A., De Antoni G.L., «Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins», 76 (2009): 111–116.
- 21 Plumed-Ferrer C., von Wright A., «Antimicrobial activity of weak acids in liquid feed fermentations, and its effects on yeasts and lactic acid bacteria», 91 (2011): 1032–1040.
- 22 Bautista-Gallego J., Arroyo-López F., Durán-Quintana M., Garrido-Fernandez A., «Individual effects of sodium, potassium, calcium, and magnesium chloride salts on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth», 71 (2008): 1412–1421.
- 23 Filipa Mendes, Sander Siewerts, Erik de Hulster, Marinka J.H., Marijke A.H., Jack T., Eddy J., Peter A., «Based Characterization of Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Lactose-Grown Chemostat Cocultures», 79 (2013): 5949–5961.
- 24 Leon-Romero A., Dominguez-Manzano J., Garrido-Fernandez A., Arroyo-Lopez F., Jimenez-Diaz R., «Formation of In Vitro Mixed-Species Biofilms by *Lactobacillus pentosus* and Yeasts Isolated from Spanish-Style Green Table Olive Fermentations», 82 (2015): 689–695.
- 25 Tati Barus, «Genetic diversity of yeasts from Ragi tape starter for cassava and glutinous rice fermentation from Indonesia», (2013): 3.
- 26 Pratima G., Kalpana S., Avinash S., «Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential», (2012): 1-3.
- 27 Norman F., Odufa S.A., «Fermented cereals a global perspective. FAO agricultural services bulletin», 3 (2009): 268.
- 28 Marchal R., Ropars M., Pourquie J., «Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass», 42 (2002): 205-217.
- 29 Reise E. T., Sin R. Y., Levinson H.S., «The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relation to the mechanism of cellulose hydrolysis», (2000) 485 – 488.
- 30 Naoki N., Shin H., Zong J.C., Masaharu I., Yasuo I., «Effect of Adding Cellulolytic Bacterium on Stable Cellulose-Degrading Microbial Community», 104 (2007): 432-434.
- 31 Dale Bruce E., «Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology», 5 (2000): 287-291.

References

- 1 Norman F., Haard S.A., Odufa and etc., «FAO agricultural services bulletin», (2009): 268
- 2 Kanochkina M.S., Borisenko E.G., Gorin K.V., Nguen C.Z., «EurasiaBio: 2nd International Congress-Partnering & Exhibition on Biology and Bioenergy», 2 (2010): 236-237.
- 3 Silas G.V-B., Elisa E., Margarida M.M., «World Journal of Microbiology & Biotechnology», 3 (2002): 541–545.
- 4 Tian V.C., Gulimova L.A., Nguyen T.G., Gorin K.V., Borisenko E.G., «Bulletin of Biotechnology and Physical and chemical biology», 9 (2013): 17–23.
- 5 Yong T., Danqing Zh., Liwei Zh., Jianxin J., «Eur Food Res Technol», 233 (2011): 489–495.
- 6 Pratima G., Kalpana S., Avinash S., «International Journal of Microbiology», (2012): 1-3.
- 7 Barman D., Saud Z.A., Habib M.R., Islam M.F., Hossain K., Yeasmin T., «Life Sciences and Medicine Research.», (2011): 1-7.
- 8 Han Y.W., «Adv. App. Microbiol.», 23 (2003): 119-153.
- 9 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C., «International Journal of Systematic Bacteriology», 45 (1995): 595–599.
- 10 Clarridge III J. E., «Clinical Microbiology Reviews», 17 (2004): 840–862.
- 11 Tian Van Chi, Gulimova L.A., Nguyen Truong Giang, Gorin K.V., Borisenko E.G., «Plant-Microbe Nutrients. Report 2: Yeast bioconversion of plant material. Bulletin of Biotechnology and Physical and chemical biology», 66 (2013): 17–23.
- 12 Sushkova V.I., Vorobeva G.I. Bezothodnaya konsersiya rastitelnogo surya v biologicheskii aktivnyye veshstva // Deli print. – 2008. – T. 7, №2. – S. 117.
- 13 Han Y.W., «Microbial utilization of straw Adv. App. Microbiol», 66 (2003): 119-153.
- 14 Puzhankov A., Mhitaryan G. Tehnika dlya povysheniya pitatelnoi cennosti kormov // Svinovodstvo. – 2000. – T.4, №6. – P. 147-149.
- 15 Norman F., Odufa S.A., «Fermented cereals a global perspective. FAO agricultural services bulletin», 3 (2009): 268.
- 16 Kanochkina M.S., Borisenko E.G., Gorin K.V., Nguen Chyoung Zang., «The yeast bacterial edible products based on the primary and secondary agroindustrial raw materials. EurasiaBio: 2nd International Congress-Partnering & Exhibition on Biology and Bioenergy», 2 (2010): 236-237.
- 17 Borisenko E.G., Kanochkina M.S., Gorin K.V. Funkcionalnye svoistva drozhzhei i bakterij, vkhodyashih v sostav microbnykh korrektorov pishhevoego i kormovogo naznacheniya // Hranenie i pererabotka sel'hozsyrya = Storage and processing of farm products: teoreticheskij zhurnal. – 2012. – T. 8, №. 3. – P. 46-49.
- 18 Lysko K. A., Shamsutdinova V.R., Gankina E. V., Borisenko E.G. Drozhzhevye tehnologij v proizvodstve productov pitaniya // Pishhevaya promyshlennost. – 2006. – P. 54-55.
- 19 Troyakova S/A/, Lysko K.A., Shamsutdinova V.R., Borisenko E.G., Tereshina E.N. Drozhzhevye obogatiteli pishi i kormov na osnove molochnoi sыворотки i zernovogo сыrya// Hranenie i pererabotka sel'hozsyrya. – 2007. – P. 52-54.

- 20 Golowczyc M.A., Mobili P., Garrote G., de Los Angeles Serradell M., Abraham A., De Antoni G.L., «Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins», 76 (2009): 111–116.
- 21 Plumed-Ferrer C., von Wright A., «Antimicrobial activity of weak acids in liquid feed fermentations, and its effects on yeasts and lactic acid bacteria», 91 (2011): 1032–1040.
- 22 Bautista-Gallego J., Arroyo-López F., Durán-Quintana M., Garrido-Fernandez A., «Individual effects of sodium, potassium, calcium, and magnesium chloride salts on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth», 71 (2008): 1412–1421.
- 23 Filipa Mendes, Sander Sieuwerts, Erik de Hulster, Marinka J.H., Marijke A.H., Jack T., Eddy J., Peter A., «Based Characterization of Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in Lactose-Grown Chemostat Cocultures», 79 (2013): 5949–5961.
- 24 Leon-Romero A., Dominguez-Manzano J., Garrido-Fernandez A., Arroyo-Lopez F., Jimenez-Diaz R., «Formation of In Vitro Mixed-Species Biofilms by *Lactobacillus pentosus* and Yeasts Isolated from Spanish-Style Green Table Olive Fermentations», 82 (2015): 689–695.
- 25 Tati Barus, «Genetic diversity of yeasts from Ragi tape starter for cassava and glutinous rice fermentation from Indonesia», (2013): 3.
- 26 Pratima G., Kalpana S., Avinash S., «Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential», (2012): 1-3.
- 27 Norman F., Odunfa S.A., «Fermented cereals a global perspective. FAO agricultural services bulletin», 3 (2009): 268.
- 28 Marchal R., Ropars M., Pourquie J., «Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass», 42 (2002): 205-217.
- 29 Reise E. T., Sin R. Y., Levinson H.S., «The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relation to the mechanism of cellulose hydrolysis», (2000) 485 – 488.
- 30 Naoki N., Shin H., Zong J.C., Masaharu I., Yasuo I., «Effect of Adding Cellulolytic Bacterium on Stable Cellulose-Degrading Microbial Community», 104 (2007): 432-434.
- 31 Dale Bruce E., «Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology», 5 (2000): 287-291.