

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

Биотехнология кафедрасы

Асан Нұрдәулет Нұржанұлы

Қатты және тереңдік сұйық фазалы дақылдау жағдайында целлюлоза және  
аэробты бактериялардың биоконверсиясы

**ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС**

5B070100 - «Биотехнология» мамандығы

Алматы 2019

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

Биотехнология кафедрасы



**ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ**

БТ кафедра менгерушісі

PhD профессор

З.К.Туйебахова

« 08 » Маусым 2019 ж.

## ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Қатты және тереңдік сұйық фазалы дақылдау жағдайында  
целлюлоза және аэробты бактериялардың биоконверсиясы»

5B070100 - «Биотехнология» мамандығы бойынша

Орындаған

Асан Нұрдәулет Нұржанұлы

Ғылыми жетекші б.ғ.д, профессор

Аур Құрбанова

Г.В.

« 6 » маусым 2019 ж.

Алматы 2019

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

Биотехнология кафедрасы

5B070100 - «Биотехнология»



**ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ**

БТ кафедра менгерушісі

PhD, профессор

З.К.Туйебахова

« 08 » *Мамыр* 2019 ж.

**Дипломдық жұмыс орындауға  
ТАПСЫРМА**

Білім алушы: Асан Нұрдәулет Нұржанұлы

Тақырыбы: Қатты және тереңдік сұйық фазалы дақылдау жағдайында целлюлоза және аэробты бактериялардың биоконверсиясы

Университет басшысының 2016 жылғы «15» желтоқсан №1544-а бұйрығымен бекітілген

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі «18» 05. 2017 ж.

Дипломдық жұмыстың бастапқы берілістері Диплом алды өнеркәсіптік практикадан алынған материалдар.

Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі

- а) Моно- және аралас дақылдардың целлюлоза белсенділігін өлшемдік әдіс көмегімен анықтау;
- ә) Қатты фазалы ферментация жағдайында кезінде целлюлоза моно дақылдарымен конверсияның тиімділігін анықтау;
- б) Қатты фазалы ферментация жағдайында араласқан дақылдармен конверсияның тиімділігін анықтау;
- в) Қатты фазалы ферментация жағдайында араласқан дақылдармен конверсияның тиімділігін анықтау;
- г) Тереңдік сұйық фазалы жағдайында моно және араласқан бактериялардың целлюлозалитикалық белсенділігін анықтау;




Сызбалық материалдар тізімі (міндетті сызбалар дәл көрсетілуі тиіс)

Ұсынылған негізгі әдебиет: 19 атау

Дипломдық жұмысты дайындау  
КЕСТЕСІ

Бөлімдер атауы, қарастырылатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекші мен кенесшілерге көрсету мерзімдері	Ескерту
Моно- және аралас дақылдардың целлюлоза белсенділігін өлшемдік әдіс көмегімен анықталды	ақпан	
Қатты фазалы ферментация жағдайында кезінде целлюлоза моно дақылдарымен коверсияның тиімділігін анықталды	наурыз	
Қатты фазалы ферментация жағдайында араласқан дақылдармен коверсияның тиімділігін анықталды	наурыз	
Тереңдік сұйық фазалы жағдайында моно және араласқан бактериялардың целлюлозалитикалық белсенділігін анықталды	сәуір	

Дипломдық жұмыс бөлімдерінің кенесшілері мен норма бақылаушының аяқталған жұмысқа қойған  
қолтанбалары

Бөлімдер атауы	Кенесшілер, аты, әкесінің аты, тегі (ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған күні	Қолы
Негізгі бөлім	б.ғ.д, профессор Курбанова Г.В.	14.01.2019	
Зерттеу бөлім	б.ғ.д, профессор Курбанова Г.В.	06.05.2019	
Норма бақылау	Ғылым магистрі Абилядаева А.Ж.	06.05.2019	

Ғылыми жетекші

 Курбанова Г.В.

Тапсырманы орындауға алған білім алушы

 Асан Н.Н.

Күні

« 6 » мамыр 2019 ж.



## АҢДАТПА

Дипломдық жұмыстың барысы моно- және аралас дақылдардың целлюлоза белсенділігін анықтау өлшемдік әдіс көмегімен жүргізілді. Жұмыстың нысаны ретінде целлюлозатикалық бактериялардың аралас 26 дақыл түрін қолдандық.

Алынған нәтижелер:

- 25 штамм (53 %) эндоглюканазамен қатар целлобиазаны түзді. Бұл штаммдардың ферментативтік кешендегі эндоглюканаздық белсенділігі  $0,24 \pm 0,01$  пен  $0,52 \pm 0,02$  мг/мл аралығында, целлобиазалық белсенділігі  $0,55 \pm 0,02$  тен  $1,61 \pm 0,01$  мг/мл дейін.

- целлюлозолитикалық бактерияларды қатты фазалы дақылдаудың зертханалық үлгісі жасалды.

- штаммдарды кешенді қолдану кезінде целлюлозаның жойылуы 2 – 3 есеге артты. Белсенді аралас дақылдар: Ж23+НП-9, С-17+ НП1, Ж-7 + С-7, Ж-7 + П-5 қатты субстраттарда клетчатканы 20 – 25 % гидролиздейді.

Практикалық маңыздылығы: Целлюлозаны ыдырата алатын микроорганизмдер, микробтық қалдықта биоконверсия, жемдік және азықтық ақуызды препараттар өндірісі сонымен қатар, энергетикалық мақсатта, спирт алу үшін пайдаланылады.

## АННОТАЦИЯ

В дипломной работе для выделения целлюлозолитических бактерий использован метод накопительных культур с двумя вариантами селективной среды Гетчинсона. В качестве объекта дипломной работы взяли 26 вариантов смешанных культур целлюлозолитических бактерий.

Полученные результаты:

- 25 штаммов (53 %) образовывали как эндоглюканазы, так и целлобиазу. Активность ферментного комплекса эндоглюканаз у этих штаммов составляет от  $0,24+0,01$  до  $0,52+0,02$  мг/мл, целлобиазы – от  $0,55+0,02$  до  $1,61+0,01$  мг/мл.

-Разработана лабораторная модель твердофазного культивирования целлюлозолитических бактерий.

-При совместном применении штаммов степень деструкции целлюлозы возрастает в 2-3 раза. Наиболее активные смешанные культуры: Ж23+НП-9, С-17+ НП1, Ж-7 + С-7, Ж-7 + П-5 гидролизуют клетчатку твердых субстратов на 20- 25 % .

Практическая значимость: Микроорганизмы, способные разрушать целлюлозу перспективны для микробной биоконверсии отходов, производства пищевых и кормовых белковых препаратов, а также для энергетических целей в получении спирта.

## ANNOTATION

In the thesis work for the isolation of cellulolytic bacteria used the method of cumulative cultures with two variants of the Getchinson selective medium. As the object of the thesis took 26 options for mixed cultures of cellulolytic bacteria.

### Results:

- of 25 strains ( 53 %) formed as endoglucanase, and cellobiase . Activity of the enzyme complex endoklyukanaz these strains ranges from 0.24 0.01 to 0.52 0.02 mg / ml, cellobiase - 0.55 0.02 to 1.61 0.01 mg / ml.

- developed a laboratory model of the solid-state culture of cellulolytic bacteria.

- when combined strains of the degree of degradation of cellulose increases by 2-3 times. The most active mixed cultures: ZH23 + NP-9, C-17 + NP1, F-7 + C-7, F-7, P-5 + hydrolyzed cellulose solid substrates 20 to 25 %.

Practical significance: Microorganisms capable of break down cellulose promising for microbial bioconversion of waste products , food and feed protein drugs , as well as for energy purposes in obtaining alcohol.

## МАЗМҰНЫ

	Кіріспе	9
1	Әдебиетке шолу	11
1.1	Целлюлозалитикалық микроорганизмдердің жалпы сипаттамасы	11
1.2	Микроорганизмдердің целлюлозалитикалық ферменттері	13
2	Зерттеу материалдары мен әдістері	15
2.1	Зерттеу нысаналары мен материалдары	15
2.2	Зерттеу әдістері	15
2.2.1	Целлюлозалитикалық бактерияларды бөліп алу	15
2.2.2	Целлюлазалық белсенділігі бар штаммдар скринингі	15
2.2.3	Микробтық целлюлозалардың белсенділігін, пайдалану аясы мен ауданын анықтау	16
2.2.4	Эксперимент нәтижесін статистикалық өңдеу	17
3	Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау	18
3.1	Қатты фазалы ферментацияда моно- және аралас дақылдардың целлюлоза конверсиясына белсенділігін анықтау	18
3.2	Табиғи көздерден целлюлозалитикалық бактерияларды бөліп алу	26
3.3	Целлюлозалитикалық белсенділігі жоғары штаммдарды іріктеп алу	29
3.4	Микробтық целлюлазалардың белсенділік аясын қант қысқарту әдісі арқылы анықтау	31
	Қорытынды	37
	Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	38



## КІРІСПЕ

Тақырыптың өзектілігі. Соңғы онжылдықтың ғылыми және аналитикалық зерттеулері тиімді және нәтижелі энергия алудың көзі ретінде қайта қалпына келетін әдістер ретінде биожүйені пайдалануға негізделген технология деген қорытындыға келген. Құрамында 40 % ауыр бұзылатын целлюлоза бар қатты өсімдік қалдықтарының биологиялық конверсиясы биотехнологияның негізгі салаларының бірі болып табылады. Бұл целлюлозолитикалық микроорганизмдердің целлюлозолитикалық шикізаттардың биоконверсиясына негізделген әртүрлі технологияларда қолданылуы мүмкін; компьютерлік және генноинженерлік зерттеулер үшін базалық дақылдар ретінде пайдаланылуы мүмкін, одан кейін жаңа продуцент штамдарын құрастыра отырып; целлюлазды кешеннің ферменттерін бөлу және басқа да бірқатар жұмыстар бар. Целлюлозалардың микробтық конверсиясы биотехнологиялық зерттеулердің маңызды бағыттарының бірі болып қала беруде [1;2].

Жемдік азықтың сіңімділігі мен құндылығын арттыра отырып, сонымен қатар, өнімділік индексін ұлғайтуға экзогенді микробтық ферменттерді пайдалану арқылы қол жеткізуге болады [3].

Оларды алудың қазіргі заманғы бағыты ол целлюлозалитикалық бактерияларды пайдалану. Олардың арасынан, жоғары ферментативтік белсенділік көрсететін штамдар іріктеліп алынуы мүмкін, сол арқылы ас қорытылуын реттеуге болады, өйткені бұл бактериялармен өндірілетін целлюлазалар азықтың қорытылуын жақсартады.

Практикалық маңыздылығы: Целлюлозаны бұзуға қабілетті аэробты бактериялар қалдықтардың микробтық биоконверсиясын жүзеге асыру, тағамдық және азықтық ақуыз препараттарын өндіру, сондай-ақ спирт алу үшін перспективалы. Алынған нәтижелер ағаш және ауыл шаруашылығы қалдықтарын биотехнологиялық өнімдерге өңдеуге арналған іріктелген биопрепараттар штамдарының негізінде одан әрі эзірлеу үшін негіз болып табылады. Мұндай субстраттардың микробтық утилизациясы табиғатты қорғауға да қызығушылық тудыруы мүмкін.

Зерттеу жұмысының мақсаты. Салмақтық әдіс көмегімен моно- және аралас дақылдардың целлюлоза белсенділігін анықтау.

Зерттеу жұмысының міндеттері:

- Моно- және аралас дақылдардың целлюлоза белсенділігін өлшемдік әдіс көмегімен анықтау;

- Қатты фазалы ферментация жағдайында кезінде целлюлоза моно дақылдарымен конверсияның тиімділігін анықтау.

- Қатты фазалы ферментация жағдайында араласқан дақылдармен конверсияның тиімділігін анықтау.

- Тереңдік сұйық фазалы жағдайында моно және араласқан бактериялардың целлюлозалитикалық белсенділігін анықтау.

Зерттеу объектісі ретінде:

Целлюлозалық бактериялардың 26 түрлі аралас дақылдары пайдаланылды. Зерттеу жұмысы Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті, химиялық және биологиялық технологиялар институты, биотехнология кафедрасында және Қазақ Ұлттық Аграрлық Университеті, Қазақ Жапон орталығында жасалынды.

## 1 Әдебиетке шолу

### 1.1 Целлюлозалитикалық микроорганизмдердің жалпы сипаттамасы

Целлюлоза – жоғары сатылы өсімдіктер және балдырлардың жасушалық қабатының ең басты компоненті болып табылатын полисахарид. Оның синтезі кезінде өзінің масштабы бойынша барлық табиғат синтездерінен асып түседі, сондықтан (крахмалмен бірге) целлюлоза жер бетінде кең тараған органикалық қосылыс болып табылды [4].

Целлюлоза ағаштарда, біржылдық өсімдіктерде, шөпте, жемістің тұқым қабығында, балдырлардың құрамында болады. Табиғатта, сонымен қатар, бактериялық және жануар (кейбір шаянтәрізділер және ұлулар) целлюлозасы кездеседі.

Целлюлозаның химиялық құрылымы көптеген әсерлерге инертті етеді. Целлюлоза - В-1,4-гликозидті байланыстармен байланысқан глюкозаның В-D-молекула тізбегінен тұратын полимер болып табылады. Тізбектер өз ретімен талшықтармен қосылып орналасқан. Талшықтар целлюлозаның тізбектерінің гидрофильді топтары сыртқы әсерлерден қорғалып тұратындай етіп орналасқан. Талшықтар құрамына балауыз және пектиннен тұратын қабықпен қапталған. Осының бәрі целлюлозаға механикалық беріктікті береді, яғни оларды суда ерімейді және әр түрлі химиялық әсерлерге тұрақты бола алады [5].

Табиғатта целлюлозаны пайдаланатын бактерияларға үлкен рөл бөлінген, өйткені соның арқасында табиғатта синтезделетін қосылыстардың басым көпшілігін, оның ішінде жасұнықты ыдыратуға болады.

Ауаның қол жетімділігі шектеулі жағдайда клетчатканы *Clostridium* мезофильді және термофильді түрлері бөледі. 30 - 40 кезінде целлюлозаны бұзатын мезофильді бактериялардың типтік өкілі – *Cl. Omelanskii*. Бұл микроорганизмнің таяқша тәрізді нысаны (4,0 - 8,0 x 0,5 - 3,0 мкм) бар, қозғалғыштығы (перитрих) бар, плектридиальды түрдегі дауларды құрайды. Термофильді бактерияларға, мысалы, *Cl. thermocellum* - шағын грамтеріциялық даулы таяқша. Олардың дамуы үшін оңтайлы 60 - 65 динамикасының қарқыны болып табылады. Бұл бактериялар өседі. Мезофильді және термофильді анаэробты бактериялар клетчатканы пайдалануға өте қатаң бейімделген. Құрамында қарапайым қант бар ортада (глюкоза, мальтоза, сахароза) олар әлсіз дамиды. Эубактериялар, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio* түрлеріне жататын күйіс жануарлары асқазанының тұрақты тұрғындары анаэробты жағдайларда целлюлозаны ыдыратуға қабілетті. Анаэробты целлюлозолитикалық бактериялар тобының көптеген өкілдерінің энергетикалық процесі майлы қышқылды ашыту болып табылады, сондықтан анаэробты процестерде клетчатканың бұзылуы сірке, май және құмырсқа қышқылдарының, CO<sub>2</sub> және H<sub>2</sub> түзілуімен қатар жүреді. Жиі сүт

және қышқылдары, сондай-ақ этанол. Азот көзі ретінде бактериялар амин қышқылдарын, аммоний тұздарын және нитраттарды пайдалана алады[6].

Миксобактериялар қарапайым агарлы қоректік ортада колониялар түзеді. Миксобактериялар – бұл ұсақ (0,3 – 0,4 x 0,7-10 мкм) , сәл иілген, таяқшаның ұштары жиектелген болып табылады. *Muxobacteriales* тәртібінің өкілдері басқа барлық бактериялардан ерекшеленетін кейбір ерекшеліктерге ие: олардың ядросы бар. Олардың жасушаларының қабығы басқа бактерияларға қарағанда жұқа және бояғыштармен әлсіз боялады. Миксобактериялардың көбею процесіндегі бірқатар ерекшеліктері бар. Олар басқа бактериялар сияқты аралық емес, тартумен бөлінеді. Олардың даму циклі күрделі және жасушалар таяқша түрінде болады. Қартаю шамасына қарай олар сығылады және микроцистер деп аталатын шарларды құрайды. Микроцистер бактериялық спораларға қарағанда аз төзімді. Миксобактериялар өкілдерінің бірқатарында микроцистер шырышқа салынған бірнеше ондаған жасушаларды қамтитын топтарға (цисталар) жиналады. Цисталардың жиналуы жиі көзге көрінетін жалған жеміс денелерін құрайды. Миксобактериялар жгутиктерге ие емес. Шамасы, бұл қозғалыс жасушаның беті шырыштың біркелкі бөлінуінің салдары болып табылады.

Сілтілі және қышқыл, төмен және жоғары ылғалдылықта, әр түрлі температурада өзектің ыдырауы аэробты және анаэробты жағдайда жүреді. Ауасы аз жерде өзекті *Clostridium туысының* мезофильді және термофильді түрлері ыдыратады.

Целлюлозаның 30 – 40 °С - *Cl. Omelanskii* мезофильді бактериялар өкілі ыдыратады. Оны бірінші рет Омелянский В.Л. 1902 жылы бөліп алды. Бұл микроорганизм таяқша тәрізді формасы бар (4,0 - 8,0 x 0,5 - 3,0 мкм), қозғалмалы болып келеді (перитрих), плектриальді түрлі спораларды түзеді, мысалы: *Cl. thermocellum* – кішірек келген грам теріс спора түзуші таяқша болып табылады. Олардың оптимальді 60 – 65 °С өседі. 30 – 40 °С бұл бактериялар өсе алмайды [6].

Мезофильді және термофильді анаэробты бактериялар өзекті пайдалануға мүмкіндігі жеткілікті. Құрамында қарапайым қанттары бар орталарда (глюкоза, мальтоза, сахароза) олар нашар дамиды.

Анаэробты жағдайда целлюлозаны эубактериялар ыдырата алады, яғни олар *Ruminicoccus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio* туыстарға жататын күйіс қайтаратын жануарлар асқазанында кездеседі. Анаэробты целлюлозатикалық бактериялар түрінің көбінесе энергетикалық процесі ретінде өкілі майқышқылды ашыту болып табылады, сондықтан өзектің анаэробты жағдайда бұзылуы сірке, май және құмырсқа қышқылы және CO<sub>2</sub> және H<sub>2</sub> пайда болуымен жүреді. Жиі сүт, шайыртас қышқылы және этанол жинақталады. Бактериялардың азот көзі ретінде аминқышқылдар, тұздар, аммоний және нитраттар қолданылуы мүмкін.

Аэробты жағдайда целлюлозаны миксобактериялардың мезофильді түрлері, бактериялардың споралы және спорасыз, актиномициттер және саңырауқұлақтар түрлері гидролиздейді[7].

Бактериялардың ішінде *Mycobacteriales* және *Cytophagales* қатарына жататын жылжымалы бактериялар негізгі рөлді атқарады.

## 1.2 Микроорганизмдердің целлюлозалитикалық ферменттері

Целлюлозаны гидролиздейтін көптеген бактериялар үшін осы субстратқа қатысты жоғары ерекшелік тән.

Бірінші типтегі целлюлаздар целлюлоза молекуласындағы және оның кейбір еритін туындылары (карбоксиметил-, гидроксипропилцеллюлоза және т.б.) әртүрлі ұзындықтағы поли - және олигомерлі фрагменттердің жиынтығын қалыптастыра отырып, ретсіз тәсілмен байланысты гидролиздейді. Екінші типтегі целлюлаздың эндоглюканаздан басқа айырмашылығы - олардың карбоксиметил немесе гидроксипропилцеллюлоза (полимердің гидролизі тең дәрежеде) түзілуінің тұтқырлығының шамалы төмендеуі[8].

Эндоглюканаза-целлюлозаның полимерлік тізбегінің ұштарынан целлюлоолигосахаридтер түзілетін ішкі байланыстарды гидролиздейтін ферменттер, бұл целлюлозаның полимерлену дәрежесінің Елеулі азаюымен қатар жүреді. Көптеген жағдайларда гидролиз ажыратылатын байланыс конфигурациясын сақтай отырып өтеді және трансгликозилденумен сүйемелденуі мүмкін[9].

Эндоглюканаза әдетте целлюлозаның аморфты бөліктерін гидролиздейді, бірақ кристалды целлюлозаны гидролиздейтін эндоглюканаздың мысалдары белгілі, мысалы, т. geesei саңырауқұлақтарынан жасалған эндоглюканазалар. Іс-қимылды реттеудегі әртүрлі дәрежедегі эндоглюканаздар бар. Эндоглюканазаның "реттелмеген" түрі субстраттың полимерлену дәрежесінің күрт азаюын тудырады, бұл, атап айтқанда, суда еритін целлюлоза туындылары ерітінділерінің тұтқырлығының тез азаюына әкеледі (мысалы, па - карбоксиметилцеллюлоза). Бұл жағдайда, ірі олигосахаридтердің пайда болуы моно - немесе дисахаридтердің пайда болуымен бірге болмайды[10].

Эндоглюканазалар деполимеризациямен бір мезгілде моно -, ди-және трисахаридтерді ыдыратады және полимеризация дәрежесін айтарлықтай азайтпайды. Әдетте, эндоглюканаза полимерлеу дәрежесі 4-тен аз целлюлоолигосахаридтер гидролиздей алмайды. Эндодеполимераз әсер ету кинетикасы негізінен полимерлеу дәрежесі 2-ден 7-ге дейінгі целлюлоолигосахаридтердің субстраттары ретінде пайдаланғанда зерттелді. Эндоглюканаздың белсенділігі олигосахарид ұзындығының ұлғаюымен артады.

Целлюлозаның трансгликозилдену реакцияларында глюкоза қалдығын акцептордың молекуласына тасымалдауды жүзеге асырады. Акцепторлар қант және басқа қосылыстар (спирттер, фенолдар) болуы мүмкін. Трансгликозилдеу әдетте акцептордың жеткілікті жоғары концентрациясы кезінде елеулі дәрежеде көрінеді. Целлюлоза гидролизінің тиімділігі целлюлоза кешені құрамының теңгерімділігіне және компоненттердің белсенділік деңгейіне, яғни кешеннің сапалық және сандық құрамына байланысты[11].

Целлюлазды кешеннің құрамына қойылатын негізгі талаптар Жоғары эндоглюканазды және целлюлобиогидролазды белсенділікке ие болуы, оларсыз целлюлозаның терең гидролизі мүмкін емес және сонымен қатар аралық еритін өнім - целлюлобиозды глюкозаға конверсиялау үшін жеткілікті жоғары целлюлобиазды белсенділік қажет[12].

Целлюлазды кешен компоненттерінің тән ерекшелігі олардың әрекеттерінде синергизмнің болуы болып табылады. Синергизм деп жүйенің екі немесе бірнеше компоненттерінің әсер ету тиімділігінің артуын, олардың жиынтықты (аддитивті) көрінісімен салыстырғанда жеке-жеке қатысуымен деп атайды. Эндоглюканаза және целлюлобиогидролаза жағдайында ферменттер целлюлозаны деполимерлеуді жүзеге асырады және осылайша екінші ферментке субстрат болып табылатын целлюлозды тізбектердің тоқтатпайтын ұштарының концентрациясын арттырады[13].

Гликозидазалар гликозидтік байланысты ыдырататын екі негізгі механизм бар. Бұл механизмдер реакция өнімдерінің стереохимиялық сипаттамаларымен дискриминацияланады. Аномер орталығының конфигурациясын реттейтін ферменттер бастапқы субстраттан стереохимиямен ерекшеленетін өнімдерді береді (мысалы, целлюлозадан  $\alpha$ -глюкозаның бөлінуі)[14].

Аномерлі көміртектің конфигурациясын сақтайтын ферменттер, мысалы, өнім ретінде глюкоза түзілетін целлюлозаны гидролиздейді. Рииз схемасы бойынша қолда бар ұғымдарға сәйкес, микроорганизмдердегі целлюлозаның ферментативті гидролизінің процесі C1 -, Cx - ферменттен және  $\beta$ -гликозидазадан немесе целлюлобиазадан тұратын целлюлазаның әсерінен болуы мүмкін. C1 - және Cx-ферменттерден басқа зерттеушілермен C2-фермент бөлінген, ол C1-ферментке өте жақын. C1 - ферментінің әсерінен целлюлозаның ісінуі басталады, содан кейін C2 - ферменттің әсеріне cx-ферменттің әсерінен целлюлодекстриндер түзілгенге дейін ұшырайды.

Оның көмегімен конверсия жүзеге асырылатын микроорганизмдердің целлюлазды кешенін сипаттайтын негізгі қасиет-құрамында целлюлоза бар субстраттарды терең қанттандыру және деструкциялау қабілеті, басқаша айтқанда, оның сахаролитикалық белсенділігі болып табылады. Сондықтан целлюлозаның глюкозаға дейінгі гидролизін тиімді жүзеге асыруға қабілетті ферменттері бар целлюлозолитикалық бактерияларды анықтау маңызды міндет болып табылады[15].

## 2 Зерттеу әдістері материалдары мен нысаналары

### 2.1 Зерттеу нысаналары мен материалдары

1 Целлюлозалық бактериялардың 26 түрлі аралас дақылдары.

2 Целлюлозалы шикізаттар: ағаш үгінділері, күріш қауызы, күнбағыс қалдығы.

1 Кесте - Зерттеу жұмысына қолданылатын целлюлозаликалық штаммдар

№	штаммдар	Түрлік атауы
1	P-2	<i>Bacillus subtilis</i>
2	P-5	<i>Bacillus pumilis</i>
3	НП-1	<i>Bacillus cereus</i>
4	НП-7	<i>Bacillus subtilis</i>
5	НП-9	<i>Bacillus pseudomycoides</i>
6	Ж-7	<i>Bacillus cereus</i>
7	Ж-23	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
8	Ж-25	<i>Bacillus licheniformis</i>
9	П-5	<i>Bacillus cereus</i>
10	С-7	<i>Brevibacillus brevis</i>
11	С-10	<i>Bacillus subtilis</i>
12	С-17	<i>Pseudomonas putida</i>

### 2.2 Зерттеу әдістері

#### 2.2.1 Целлюлозалитикалық бактерияларды бөліп алу

Целлюлозалитикалық бактерияларды бөліп алу үшін, жинақатушы селективті Гетчинсон қоректік ортасын пайдаланады. Гетчинсон қоректік ортасының құрамы (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 2,5;  $\text{FeCl}_3$  - 0,01;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaCl}$  – 0,1;  $\text{CaCl}_2$  – 0,1; 20% - ті  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ерітіндісін қоса отырып ортаның рН 7,2 - ге деін жеткізеді; дистилдеген су; ЕПА. Көміртектің көзі ретінде тек қана: сүзгіш қағазын немесе карбоксиметилцеллюлозаның натрий тұзын пайдаланылады (Na- КЦМ).

#### 2.2.2 Целлюлазалық белсенділігі бар штаммдар скринингі

1) Целлюлазалық белсенділікті анықтаудың табақшалы әдісі

Штаммдар скринингі Na-КМЦ бар агарозалы қоректік ортасына беттіне отырғызылған белсенді штаммдарды және әртүрлі дақылдарға жататын



бактерияларды бөліп алудан тұрды. Өндірілген дақылдардың арасынан целлюлозалитикалық белсенділігі жайлы табақшада өсіп шыққан колонияларды конго қызыл бояуымен бояуғаннан соң, түсі өзгерген аудандардың диаметрі бойынша анықтадық. 10 мм дейінгі гидролиз ауданы көрініс тапса, ферменттік белсенділігінің төмен екендігін көрсетеді, ал 10-20 мм белсенділік дәрежесі орташа, тек қана гидролиз ауданы 20 мм жоғары болса ол ферменттік белсенділігінің жоғары болғандығын көрсетеді.

## 2) Целлюлазалық белсенділікті анықтаудың салмақтық әдісі

Бұл әдістің мәнісі, целлюлозаны дақылды сұйықтықпен инкубациялағаннан кейін целлюлозаның салмақтық шығымын анықтау болып табылады. Ол үшін микроскоптағаннан кейін өсім пайда болған ауданнан сұйық қоректік ортаға егілді, ол жерде целлюлозаның бірден бір көзі ретінде, «Filtrak» № 88 сүзгіш қағазын пайдаландық. Эксперимент алдында арнайы жолақ болып кесіліп дайындалған, бюкста 105 °С кептірілген сүзгіш қағазын тұрақты 0, 001 г салмаққа келтіріп аламыз. Содан соң, оларды залалсыздандырылған пробиркаларға салып, үстіне 15 мл қоректік ортаны құйдылады. Осындай әдіс арқылы дайындалған пробиркаларға, алдын - ала қоректік бульонда (сорпада) бор мен целлюлоза қосу арқылы өсірілген 10 мл дақылдық суспензиядан енгізіледі. Пробиркаларды дегфлагматорлы дистилденген суы бар резиналы қақпақтармен жауып, 37 °С термостатқа орналастырылады. Субстраттың салмақтық шығымы инкубациядан соң, 24-72 сағаттан кейін әр сағат сайын 3 үлгіні алып зерттеу арқылы жүргізді. Ол үшін пинцет көмегімен пробиркадан сүзгіш қағазын шығарып алып, оны ағынды дистилденген судың астында абайлап жуып, бірқалыпты салмаққа 105 °С келгенге дейін кептіріледі. Штаммдардың целлюлозалитикалық белсенділігінің көрсеткіші, жинақтаушы қоректік ортаның құрамына кіретін целлюлозаның салмағының өзгеруі болып табылады, оның салмағын бастапқы салмақпен салыстыру арқылы жүргізілді. Сүзгіш қағазының салмағының 18% жоғары шығым болған жағдайда, белсенді штаммдар болып табылады.

### 2.2.3 Микробтық целлюлозалардың активтілігін және оның пайдалану ортасы мен ауданын анықтау

Қысқарған (редуцирленген) қанттар көмегімен колориметрлік әдісі.

Бұл әдіс, целлюлазалы кешен мынадай: Na-КМЦ, целлобиоза, маталы мақта, сүзгіш қағазы субстраттармен әрекеттескенен соң қалпына келетін қанттарды анықтауға негізделген.

Алдымен, бактерияларды колбада шайқағышта 2 тәулік, температурасы 37°С синтетикалық Гетчинсон қоректік ортасында дақылдау жүргізілді. Зерттеліп отырған ферменттер синтезі үшін көміртектің бірден - бір көзі ретінде (%): Na-КМЦ (карбоксиметилцеллюлозаның натрий тұзы) – 0,5; целлобиоза – 0,2; маталы мақта – 0,5 және сүзгіш қағазы – 0,5. Маталы мақтаны бөлме температурасында 10 н HCl өңдеу арқылы гидроцеллюлазаға айналдырдық, ағынды сумен тиянақты түрде жуып рН бейтараптандырылады.

Осыдан түзілген редуцирленген қанттардың мөлшерін 3,5-динитросалицил қышқылының реакциясы арқылы анықтадық. Бояудың қарқындылығын фотоэлектрколориметрде өлшенеді, жарықсүзгіш арқылы жарықөткізгіштігі  $\lambda=550$  нм оптикалық жолының ұзындығы 3 мм кюветада жүргізілді.

Бояудың сарыдан, қоңырға дейін өзгеруі целлюлозадан тұратын субстраттан азайған глюкозаның көлемін көрсетеді.

Бұл әдіс халықаралық ИЮПАК биотехнологиялық төрелігімен ұсынылған.

#### 2.2.4 Эксперимент нәтижесін статистикалық өңдеу

Эксперимент мағұлматтары қолданбалы программалар көмегімен «Statistics for Windows, v 5.0» и «BIOSTAT», «Microsoft Excel for Windows 2007» кестелік процессор Excel 7.0 арқылы өңделді. Орташа мәнін, медиананы, стандартты ауытқуды, орташа мәнді стандартты қателік анықталды.

### 3 Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау

#### 3.1 Қатты фазалы ферментацияда моно және аралас дақылдардың целлюлоза конверсиясына белсенділігін анықтау

Микробты целлюлоза конверсиясы биотехнология зерттеулеріндегі маңызды бағыт болып табылады.

Целлюлозолитикалық микроорганизмдерді компостирлеу әдісі арқылы ағаш қалдықтарын органикалық тыңайтқыштарға айналдыру кезінде қолданылады.

Сабандарды және басқа да жемдік азықтардың целлюлозалы шикізаттарын ферментациялау тәсілдері бар. Ол үшін қатты фазалы ферментация қолданылады. Осыған дейін жүргізілген барлық тәжірибелерде зерттелген целлюлозолитикалық бактериялардың штаммдары үшін сұйық орта қолданылды, яғни целлюлозаның ферменттермен жойылуы сұйық фазада жүрді. Бұл тәжірибелік кезеңнің мақсаты – қатты фазалы ферментация жағдайында жаңа штаммдардың целлюлозалы шикізатты жою қабілеттілігін анықтау.

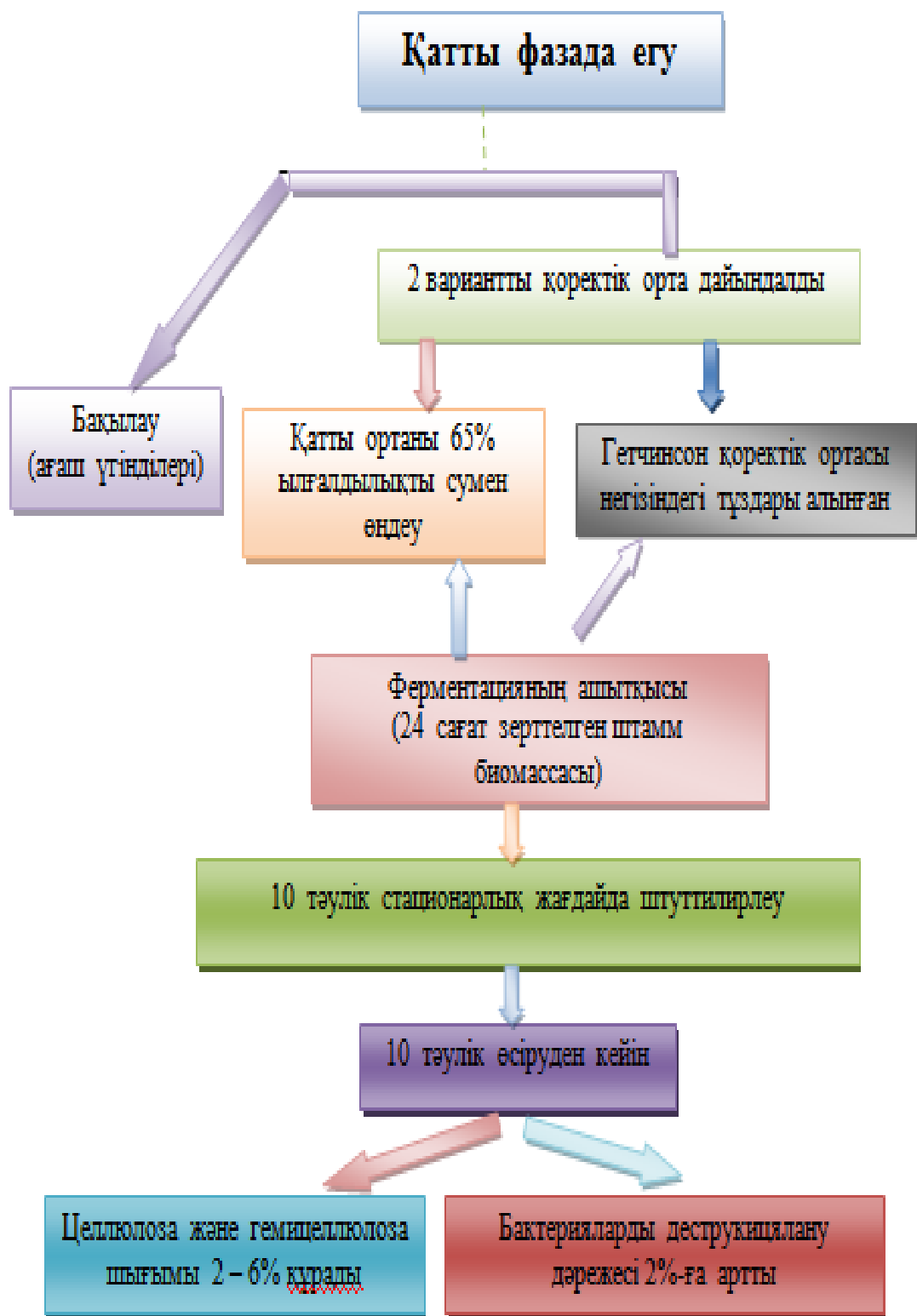
Шикізат ретінде ағаш үгінділері, сонымен қатар ауылшаруашылық өндірісінің екіншілік қалдықтары: күнбағыс қалдығы және күріш қауызы. Ұқсас субстраттардың микробты қалпына келуі қоршаған ортаны қорғауға қызығушылығын тудыруы мүмкін.

Қатты қоректік ортаның 2 түрін дайындадым. Біріншісінде, қолданылатын шикізатты 65% ылғалдылықты суға батырдым. Екіншісінде – Гетчинсон синтетикалық орта негізіндегі тұзды ерітінді. Ферментация үшін ұйытқы ретінде қолданылатын бактерия штаммдарының тәуліктік сорпа дақылдары суспензиясын қолдандық.

Шикізатты петри табақшасына орналастырдық, ұйытқыны 10 мл/100г мөлшерінде бірдей бөлдік. Егудің бірінші тәулігінде штуттелирледік, содан кейін 30 °C статистикалық жағдайда инкубирледік.

Ферментация әсерлілігі, яғни штаммдардың целлюлозалы қатты субстраттарда өсуі дақылдаудың 10-шы тәулігінде анықталған қиын гидролизденетін қанттың (целлюлозалар) және жеңіл гидролизденетін қанттардың (гемицеллюлозалар) азаюы бойынша бағаланды. Бақылау ретінде стерильді дистилденген сумен инокулирленген немесе базалы тұз ерітіндісімен және тәжірибедегі жағдайда ұсталған ағаш үгінділері қолданылды (кесте 4).

Қатты фазалы дақылдаудан кейін 28 – 30 °C температура жағдайында целлюлоза және гемицеллюлозалар азаюы 10-шы тәулікте 2 – 6 % құрады. Ағаш үгінділерін жай ғана сумен емес, құрамында фосфор және азоттың бейорганикалық көздері бар Гетчинсон тұзды ерітіндісін пайдалану, бактериялардың жойылу белсенділігін орташа 2 % - ға жоғарылатады.



1 Сурет - Қатты фазалы ферментацияда моно- және аралас дақылдардың целлюлоза конверсиясына белсенділігін анықтау

2 Кесте - Целлюлозолиткалық бактериялардың қатты фазалы ферментациядан кейінгі ағаш үгінділеріндегі клетчатканың құрамы (%)

Штамм	Ағаш үгіндісі+су				Ағаш үгіндісі+тұзды ерітінді			
	Целлюлоза	Шығымы, %	Гемицеллюлоза	Шығымы, %	Целлюлоза	Шығымы, %	Гемицеллюлоза	Шығымы, %
Р-2	40,53 $\pm$ 2	6	19,74 $\pm$ 2	6	39,52 $\pm$ 1	8	19,87 $\pm$ 2	5
Р-5	41,54 $\pm$ 1	3	20,32 $\pm$ 1	3	40,34 $\pm$ 2	6	19,91 $\pm$ 1	5
НП-1	42,14 $\pm$ 1	2	19,79 $\pm$ 1	6	41,24 $\pm$ 2	4	19,35 $\pm$ 2	8
НП-7	40,56 $\pm$ 1	6	20,58 $\pm$ 2	2	39,98 $\pm$ 2	7	20,16 $\pm$ 1	4
НП-9	41,09 $\pm$ 1	4	19,99 $\pm$ 2	5	39,66 $\pm$ 1	8	19,32 $\pm$ 2	8
Ж-7	41,57 $\pm$ 2	3	20,01 $\pm$ 1	5	39,54 $\pm$ 2	8	20,01 $\pm$ 2	5
Ж-23	40,78 $\pm$ 2	5	20,46 $\pm$ 1	3	40,56 $\pm$ 1	6	19,75 $\pm$ 2	6
Ж-25	42,08 $\pm$ 1	2	20,03 $\pm$ 1	5	41,28 $\pm$ 1	4	20,16 $\pm$ 2	4
П-5	40,54 $\pm$ 1	6	20,54 $\pm$ 2	2	39,73 $\pm$ 2	8	19,54 $\pm$ 1	7
С-7	41,12 $\pm$ 2	4	19,83 $\pm$ 1	6	39,91 $\pm$ 2	7	20,12 $\pm$ 1	4
С-10	42,13 $\pm$ 1	2	19,97 $\pm$ 2	5	40,12 $\pm$ 2	7	19,71 $\pm$ 2	6
С-17	41,04 $\pm$ 2	5	20,14 $\pm$ 1	4	40,34 $\pm$ 1	6	20,05 $\pm$ 2	5

Ескерту: ферменттелмеген үгінділерде целлюлоза – 43 $\pm$ 1 %, гемицеллюлозалар – 21 $\pm$ 2 %.

Алынған мәліметтер бойынша осы штаммдардың көмегімен ауылшаруашылық өндірісінің қалдықтары: күріш қауызы және күнбағыс қалдығына қатты фазалы ферментация жүргізілді (кесте 3).

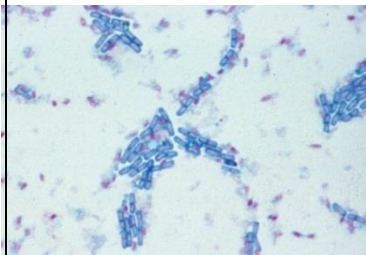

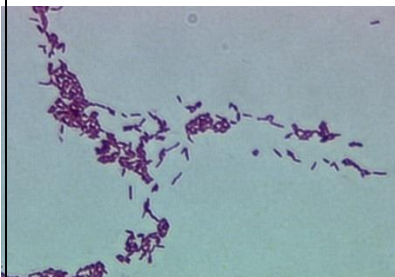

3 Кесте – Целлюлозолиткалық бактериялардың қатты фазалы дақылдаудан кейінгі күріш қауызы мен күнбағыс қалдығындағы клетчатканың құрамы (%)

Штамм	Күріш қауызы				Күнбағыс қалдығы			
	Целлюлоза	% шығымы	Гемицеллюлоза	% шығымы	Целлюлоза	% шығымы	Гемицеллюлоза	% шығымы
Р-2	35,05 $\pm$ 1	8	17,67 $\pm$ 2	7	19,27 $\pm$ 1	8	10,03 $\pm$ 1	9
Р-5	34,28 $\pm$ 1	10	17,62 $\pm$ 1	7	19,41 $\pm$ 2	8	10,22 $\pm$ 1	7
НП-1	34,56 $\pm$ 2	9	17,53 $\pm$ 2	8	19,95 $\pm$ 1	5	10,45 $\pm$ 2	5
НП-7	35,11 $\pm$ 2	8	17,24 $\pm$ 1	9	19,17 $\pm$ 1	9	10,21 $\pm$ 1	7
НП-9	34,32 $\pm$ 1	10	17,60 $\pm$ 1	7	19,87 $\pm$ 2	5	10,38 $\pm$ 1	6
Ж-7	34,28 $\pm$ 2	10	17,51 $\pm$ 2	8	19,57 $\pm$ 1	7	10,26 $\pm$ 2	7
Ж-23	34,76 $\pm$ 1	9	17,17 $\pm$ 2	10	19,68 $\pm$ 2	6	10,37 $\pm$ 1	6
Ж-25	34,98 $\pm$ 2	8	17,59 $\pm$ 2	7	19,11 $\pm$ 2	9	10,46 $\pm$ 2	5
П-5	35,34 $\pm$ 1	7	17,41 $\pm$ 1	8	19,36 $\pm$ 2	8	10,01 $\pm$ 1	8
С-7	35,30 $\pm$ 2	7	17,46 $\pm$ 1	8	19,15 $\pm$ 1	9	10,06 $\pm$ 2	9
С-10	35,02 $\pm$ 1	8	17,34 $\pm$ 2	9	19,66 $\pm$ 2	6	10,15 $\pm$ 2	8
С-17	34,31 $\pm$ 1	10	17,13 $\pm$ 1	10	19,32 $\pm$ 1	8	10,44 $\pm$ 2	5

Ескерту: Күріш қауызында целлюлозалар - 38 $\pm$ 1 %; гемицеллюлозалар – 19 $\pm$ 2 %; Күнбағыс қалдығында целлюлозалар - 21 $\pm$ 2 %, гемицеллюлозалар – 11 $\pm$ 1 %.

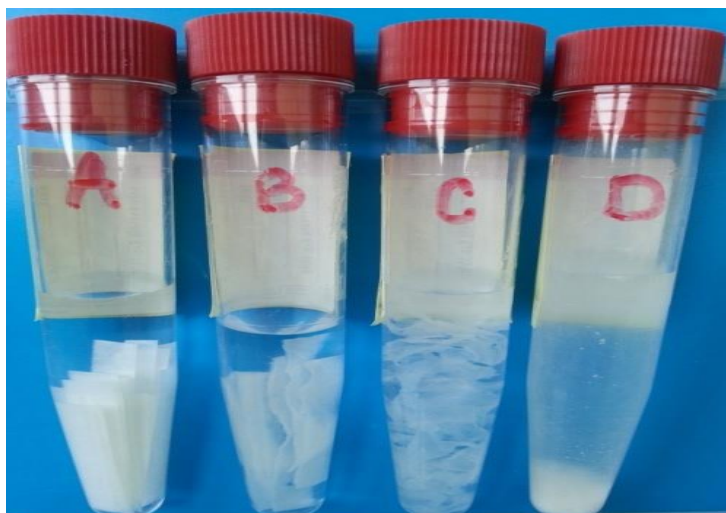
Зерттелген штаммдар осы субстраттардан да целлюлозаны қалпына келтіре алады екен. Бұл полимердің күріш қауызында жойылуы 7 – 10% құрайды, күнбағыс қалдығында 5 -9%. Бұл дегеніміз, штаммдар жоғары субстратты белсенділікке ие, яғни түрлі типтегі шикізат құрамындағы целлюлозаларды жоюға қабілетті.

4 Кесте - Целлюлозолитикалық бактериялардың белсенді штаммдарының дақылдық – морфологиялық қасиеттеріне сипаттама

Морфология	Гетчинсон қоректік ортасында өсуі	Целлюлазды фермент кешенінің белсенділігі (мг/мл)		Туыс	Штаммда р
		Эндоглю- каназалар	Целлоби- азалар		
 <p>Ірі грамоң таяқшалар, көлемі 3,0-5,0 мкм, споралы</p>		0,38-0,52	1,23 - 1,61	<i>Bacillus</i>	Р-2, Р-5, НП-1, НП-7, НП-9, Ж-27, П-5, С-7, С-10, С-17
 <p>Полиморфты, грамоң клеткалар, таяқша тәрізді формалы, көлемі 0,5-2,0 мкм, спорасыз</p>		0,43-0,50	1,34 - 1,60	<i>Cellulomonas</i>	Ж-7, Ж-25

Жұмыста аралас дақылдарды құрудың 2 принципі қолданылды. Біріншіден, экзопротеазалар мен литикалық ферменттердің белсенділігін арттыру мақсатындаа түрлі таксономиялық топтағы аралас дақыл микроорганизмдері қолданылды. Бірінші принцип – аралас дақыл құрамында түрлі таксономиялық қасиеттері бар целлюлозолитикалық бактериялар кіруі қажет. 12 жұмыс штаммдары әлі түрлерге дейін идентификацияланған жоқ

(келесі жылы жасалады), бірақ соның 10-ы *Bacillus* туысына, ал 2-і *Cellulomonas* туысына жататыны анықталды (кесте 6). Әрқайсысының құрамына *Bacillus* және *Cellulomonas* туысының штаммдары кіретін 20 түрлі екі компонентті аралас дақылдар құрастырылды. Белсенділікті анықтау принципі – визуалды бағаланған фильтр қағазының бөлшектену дәрежесі (сурет 2).



2 Сурет - Целлюлозолитикалық бактериялармен фильтрленген қағаздың ыдырауы, А – бақылау (инокулятсыз); В – монодақылдар; С, D – аралас дақылдар

Егу материалы ретінде 37 °С температурада үдемелі аэрациямен глюкоза қосындысымен (2 %) Гетчинсон ортасында өсірілген тәуліктік бактерия дақылдары қолданылды. Клетка концентрациясын оптикалық тығыздығына байланысты түзетіп отырдық, яғни 1 мл  $10^6$  клетка, ортаға 5% инокулят енгіздік. Аралас дақылдардың егу материалдары 1:1 қатынаста өскен штаммдардың суспензия қоспаларынан тұрады. Дақылдарды 37°С температурада 7 тәулік өсірдік. Осы тәжірибеден кейін жасалатын бір қорытынды – целлюлозалардың аралас дақылдармен жойылуы тіпті визуалды байқалады. Дегенмен, аралас дақылдар жағдайында қағаздардың ыдырау дәрежесі әртүрлі екендігін байқауға болады. Сол себептен белсенділіктерін бақылаудың екінші принципі қолданылады – фильтр қағазының бактериялармен дақылдауға дейінгі және кейінгі салмағы (кесте 5).

5 Кесте - Аралас дақыл бактерияларымен фильтрленген қағаздың ыдырауы

Аралас нұсқалары	дақыл	Бастапты салмақтан фильтрдің азаюы (%)	Белсенділік дәрежесі
Ж-7 + Р-2		24,02	Орташа



Ж-7 + Р-3	23,96	Орташа
Ж-7 + Р-5	23,96	Орташа
Ж-7 + НП-1	29,08	Жоғары
Ж-7 + НП-7	24,47	Орташа
Ж-7 + Ж-25	23,96	Орташа
Ж-7 + НП-9	26,28	Жоғары
Ж-7 + Ж-23	28,15	Жоғары
Ж-7 + П-5	27,29	Жоғары
Ж-7 + С-7	26,35	Жоғары
Ж-7 + С-10	21,76	Орташа
Ж-7 + С-5	21,61	Орташа
Ж-7 + С-17	25,33	Жоғары
Ж-25 + Р-2	25,24	Орташа
Ж-25 + Р-5	19,12	Орташа
Ж-25 + НП-1	19,45	Орташа
Ж-25 + НП-7	30,57	Жоғары
Ж-25 + НП-9	30,13	Жоғары
Ж-25 + Ж-23	23,23	Орташа
Ж-25 + Ж-25	22,14	Орташа
Ж-25 + Ж-27	19,14	Орташа
Ж-25 + П-5	20,59	Орташа
Ж-25 + С-7	22,14	Орташа
Ж-25 + С-10	24,56	Орташа
Ж-25 + С-17	23,12	Орташа

Алынған мәліметтер бойынша бірінші принцип жұмыс жасайды, яғни аралас дақылдардың белсенділігі артты. Жақсылары болып келесілері таңдалып алынды: Ж-7 + НП-1; Ж-7 + НП-9; Ж-7 + Ж-23; Ж-7 + П-5; Ж-7 + С-7; Ж-7 + С-17; Ж-25 + НП-7.

Спектрлері бойынша штаммдардың белсенділігін топтарға бөліп қарастыруға болады:

1. С1- және Сх- ферменттерінің бірдей дәрежелі белсенділік штаммдары: Р-2, Р-5, С-10, С-7, П-5, Ж-23, Ж-7;
2. С1- ферментінің басым белсенділігі: НП-1, НП-9;
3. Сх- ферментінің басқа жоғары белсенділігі: НП-7, Ж-25, С-17.

Сондықтан аралас дақылдар бұл жағдайда екі ферменттің ортақ белсенділікті штаммдары жасап шығарылды (кесте 6).

6 Кесте - Зерттелетін штаммдардағы целлюлозды кешенді С1- және Сх- ферменттерінің белсенділіктерін салыстыру

Сх- ферментінің белсенділігі (мкг/мкл)													
С1- фермент	Шта	Р-2	Р-5	НП-1	НП-7	НП-9	Ж-7	Ж-23	Ж-25	П-5	С-7	С-10	С-17
	мм												
	Р-2	440/ 460											

P-5		470/ 480										
НП-1			520/ 460									
НП-7				430/ 480								
НП-9					420/ 350							
Ж-7						560/ 550						
Ж-23							460/ 500					
Ж-25								560/ 550				
П-5									470/ 470			
С-7										520/ 510		
С-10											480/ 490	
С-17												470/ 480
Ескерту: Алымы – С1- ферменті; Бөлгіш – Сх- ферменті.												

Олардың белсенділік дәрежесі түрлеріне немесе тіпті штамм ерекшеліктеріне байланысты болып келеді. Бір жағынан ол ферменттің биосинтезін жылдамдатуға және оның белсенділігін арттыруға, ал екінші жағынан субстраттың тереңдік гидролизі мақсатында фермент кешендерін күшейту және толықтыруға, сонымен қатар қолданылатын субстраттардың спектрін кеңейтуге мүмкіндік береді.

Кешенді қолдану кезінде бөлек ферменттердің жоғары белсенділігі ғана емес, сонымен қоса олардың арақатынасы маңызды орын алады. Штамм – целлюлозолитиктерді кешенді қолдану кезінде бұл ерекшеліктер маңызды болуы мүмкін.

Осы тәжірибе нәтижесі ретінде перспективті аралас дақылдарды таңдап алу болып табылады: НП-7+ НП-9, Ж-23+НП-9, С-17+ НП-1, С-17+ НП-9. Барлық дақылдар қатты фазалы дақылдау тәжірибе серияларымен тексерілді (кесте 7).

7 Кесте - Целлюлозолитикалық бактерияларды аралас дақылдармен өсімдік субстраттарында қатты фазалы дақылдау

Штаммдар	Ағаш үгіндісі		Күріш қауызы		Күнбағыс қалдығы	
	Целлюлоза	% азаю	Целлюлоза,%	% азаю	Целлюлоза, %	% азаю

## 7 Кестенің жалғасы

Бақылау	43,00 <sub>+1</sub>	-	38,00 <sub>+1</sub>	-	21,00 <sub>+2</sub>	-
НП-7	39,98 <sub>+2</sub>	7	35,11 <sub>+2</sub>	8	19,17 <sub>+1</sub>	9
НП-9	39,66 <sub>+1</sub>	8	34,32 <sub>+1</sub>	10	19,87 <sub>+2</sub>	5
НП7+НП-9	38,27 <sub>+1</sub>	11	30,79 <sub>+2</sub>	18	17,46 <sub>+2</sub>	17
Ж-23	40,56 <sub>+1</sub>	6	34,76 <sub>+1</sub>	9	19,68 <sub>+2</sub>	6
НП-9	39,66 <sub>+1</sub>	8	34,32 <sub>+1</sub>	10	19,87 <sub>+2</sub>	5
Ж23+НП-9	32,24 <sub>+1</sub>	25	29,03 <sub>+1</sub>	23	15,92 <sub>+1</sub>	24
С-17	40,34 <sub>+1</sub>	6	34,31 <sub>+1</sub>	10	19,32 <sub>+1</sub>	8
НП-1	41,24 <sub>+2</sub>	4	34,56 <sub>+2</sub>	9	19,95 <sub>+1</sub>	5
С-17+ НП1	33,12 <sub>+1</sub>	23	28,5 <sub>+1</sub>	25	15,76 <sub>+1</sub>	25
С-17	40,34 <sub>+1</sub>	6	34,31 <sub>+1</sub>	10	19,32 <sub>+1</sub>	8
НП-9	39,66 <sub>+1</sub>	8	34,32 <sub>+1</sub>	10	19,87 <sub>+2</sub>	5
С-17+НП-9	37,34 <sub>+1</sub>	13	32,35 <sub>+2</sub>	14	18,23 <sub>+2</sub>	13
Ж-7	39,54 <sub>+2</sub>	8	34,29 <sub>+2</sub>	10	19,57 <sub>+1</sub>	7
НП-1	41,24 <sub>+2</sub>	4	34,56 <sub>+2</sub>	9	19,95 <sub>+1</sub>	5
Ж-7 +НП-1	36,76 <sub>+1</sub>	15	31,36 <sub>+2</sub>	17	17,02 <sub>+2</sub>	19
Ж-7	39,54 <sub>+2</sub>	8	34,29 <sub>+2</sub>	10	19,57 <sub>+1</sub>	7
НП-9	39,66 <sub>+1</sub>	8	34,32 <sub>+1</sub>	10	19,87 <sub>+2</sub>	5
Ж-7 +НП-9	36,79 <sub>+1</sub>	14	32,57 <sub>+1</sub>	14	17,48 <sub>+1</sub>	17
Ж-7	39,54 <sub>+2</sub>	8	34,29 <sub>+2</sub>	10	19,57 <sub>+1</sub>	7
С-7	39,91 <sub>+2</sub>	7	35,30 <sub>+2</sub>	7	19,15 <sub>+1</sub>	9
Ж-7 + С-7	33,97 <sub>+1</sub>	21	30,39 <sub>+1</sub>	20	16,79 <sub>+1</sub>	20
Ж-7	39,54 <sub>+2</sub>	8	34,29 <sub>+2</sub>	10	19,57 <sub>+1</sub>	7
П-5	39,73 <sub>+2</sub>	8	35,34 <sub>+1</sub>	7	19,36 <sub>+2</sub>	8
Ж-7 + П-5	34,40 <sub>+1</sub>	20	29,13 <sub>+1</sub>	23	16,24 <sub>+1</sub>	23
Ж-7	39,54 <sub>+2</sub>	8	34,29 <sub>+2</sub>	10	19,57 <sub>+1</sub>	7
С-17	40,34 <sub>+1</sub>	6	34,31 <sub>+1</sub>	10	19,32 <sub>+1</sub>	8
Ж-7 + С-17	37,12 <sub>+1</sub>	14	33,81 <sub>+2</sub>	11	18,45 <sub>+1</sub>	12
Ж-25	41,28 <sub>+1</sub>	4	34,98 <sub>+2</sub>	8	19,11 <sub>+2</sub>	9
НП-7	39,98 <sub>+2</sub>	7	35,11 <sub>+2</sub>	8	19,17 <sub>+1</sub>	9
Ж-25 +НП-7	37,03 <sub>+1</sub>	14	33,12 <sub>+2</sub>	13	18,65 <sub>+2</sub>	11
Ж-7	39,54 <sub>+2</sub>	8	34,29 <sub>+2</sub>	10	19,57 <sub>+1</sub>	7
Ж-23	40,56 <sub>+1</sub>	6	34,76 <sub>+1</sub>	9	19,68 <sub>+2</sub>	6
Ж-7 + Ж-23	34,82 <sub>+1</sub>	19	32,78 <sub>+2</sub>	14	18,69 <sub>+2</sub>	11
Ескерту: Кестеде 100 г шикізаттағы целлюлоза және гемицеллюлоза мөлшері (г) көрсетілген.						

Ұсынылып отырған мәліметтер бойынша, кешенді штаммдарды қолданған кезде ағаш үгінділерінде, күріш қауызында, сонымен қатар күнбағыс қалдықтарында целлюлозаның жойылу дәрежесі ұлғаятыны көрсетілді. Ең белсенді аралас дақылдар: Ж23+НП-9, С-17+ НП1, Ж-7 + С-7, Ж-7 + П-5 қатты субстраттардың клетчаткасын 20 %-дан 25 %-ға дейін гидролиздейді. Қалған басқа зерттелген қауымдастықтар да целлюлозаны жақсы ыдыратады. Целлюлозолитикалық ферменттердің биосинтезін күшейтуге арналған дақылдау әдісінің бұл түрі әлі табылмады.

Алынған мәліметтер ағаш ұалдықтарының биоконверсиясы үшін табиғи аэробты бактерия штамдарын принципті қолдану мүмкіндігін тудырады.

### 3.2. Табиғи көздерден целлюлозалитикалық бактерияларды бөліп алу

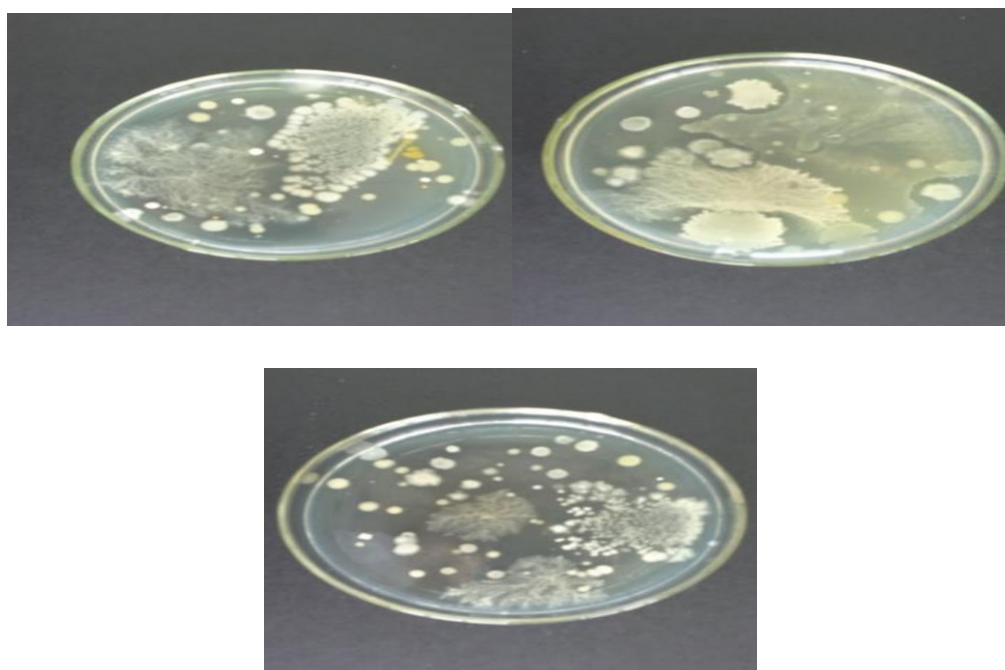
Табиғи субстраттардан целлюлозалитикалық бактерияларды (топырақ, жапырақ, құрғақ шөп) бөліп алуды, 250 мл колбаға жұқа қабатпен құйылған Гетчинсон сұйық ортасында жүргізіледі. Оған конус болып оралған сүзгіш қағазын орналастырамыз. Колбадағы ортаны пайдаланылатын субстраттармен қосып инокуляциялаймыз. (Сурет 3).



3 Сурет - Сұйық Гетчинсон ортасындағы табиғи субстраттардан целлюлозалитикалық бактерияларды бөліп алу

Дақылдау 10 тәулік ішінде жүргізілді, содан соң, суспензия көміртектің бірден - бір көзі ретінде, 0,1 % Na- КМЦ бар агарозалы қоректік ортасына егіледі.

Өсім пайда болған жағдайда, бактериялық қабат бөлініп алынып, сұйылту жасалып қоректік ортаға изоляцияланған колонияларды алу үшін ары қарай егіледі (Сурет 4).



4 Сурет - Қоректік агарда табиғи көздерден бөлініп алынған, целлюлозалитикалық бактериялардың колониялары

Морфологиялық сипаттамаларына қарай бактерия колониялары 7 типке бөлінді:

Ақ, ірі, кедір - бұдырлы, шеті күрекшелі (гүлді), радиалды иректелген

Ақ, теп - тегіс, жылтыр, ортасы шырышты, шетікедір бұдырлы, фестончаталы

Ірі, дұрыс емес формалы ортасы крем тәрізді, шеті ақ жиегі ұнтақты

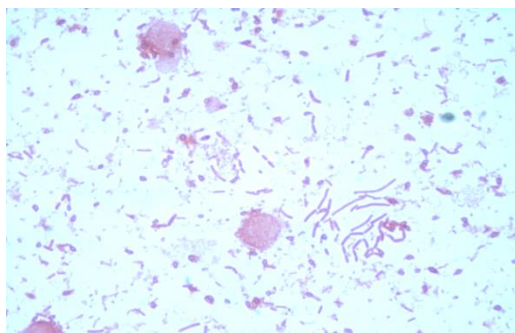
Ақсары, кедір - бұдырлы, дұрыс емес пішінді

Доңғалақ пішінді колония, беті кедір бұдырлы шеті тегіс емес

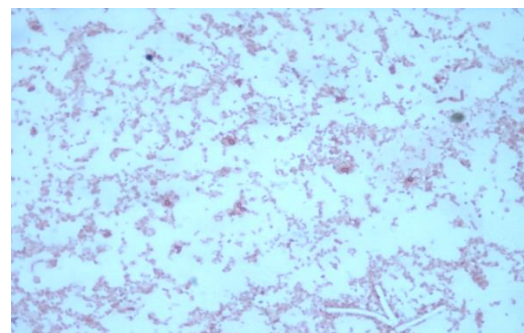
Дұрыс емес пішінді колониялар гифтәрізді өсіммен

Дұрыс емес пішінді колониялар, кедір - бұдырлы бетті, шеті тегіс емес.

Жоғарыда морфологиясы келтірілген бактерия жасушаларының колония типтері (Сурет 5)

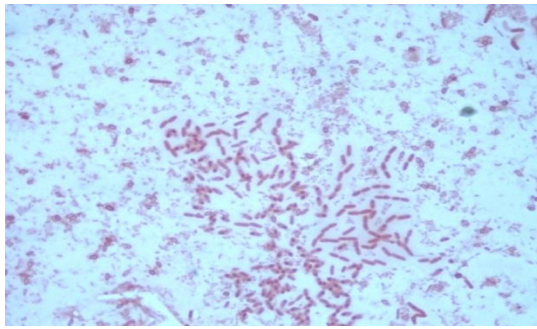


*1 мун*

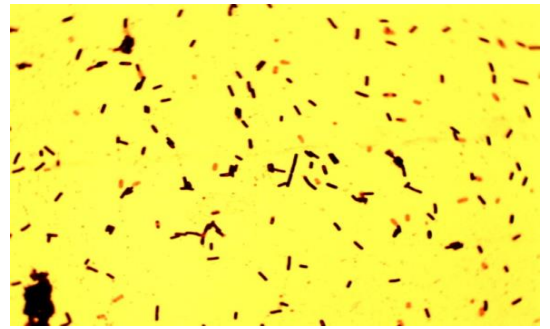


*1 мун*

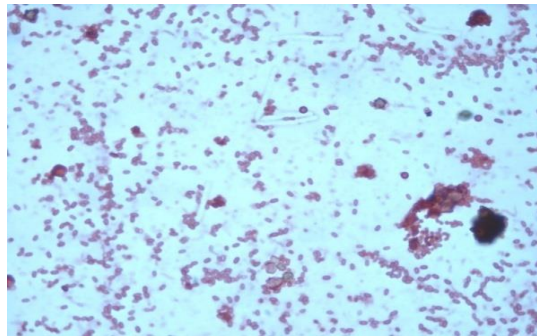




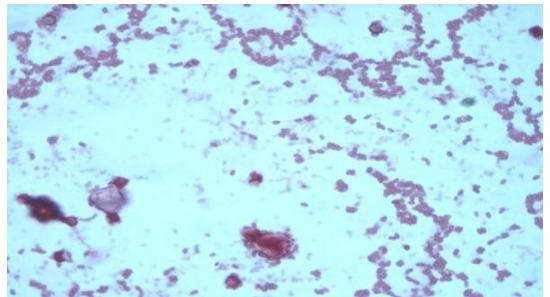
2 min



3 min



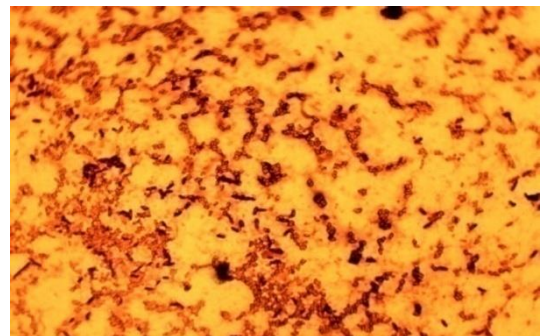
4 min



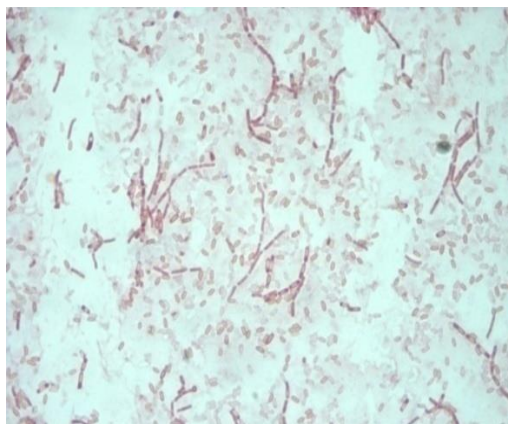
4 min



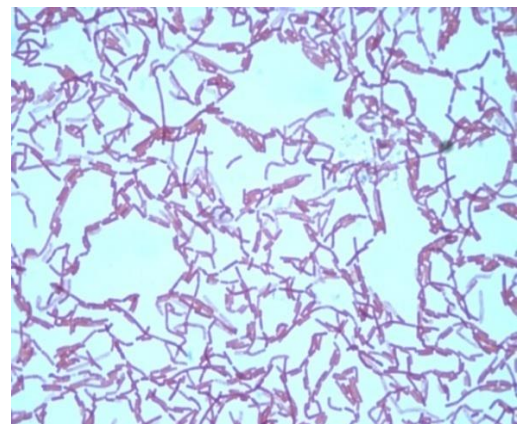
6 min



6 min



5 min



7 min

5 Сурет - Табиғи субстраттардан бөлініп алынған, целлюлозолитикалық бактериялардың жасушаларының морфологиясы

Жүргізілген жұмыстың нәтижесінде топырақтан, құрғақ жапырақтан, шөптен 125 бактерия изолятының бөлініп алынды. Изоляттар көміртектің бірден - бір көзі ретінде целлюлозалы ортада өсе алатын қабілеті болды.

Жұмыстың келесі этапында, барлық бөлініп алынған изоляттардың целлюлозалитикалық белсенділігі анықталды.

### 3.3 Целлюлазалық белсенділігі жоғары штаммдарды іріктеп алу.

Штаммдар скринингі екі этаптан тұрды. Бірінші этапта бөлініп алынған изоляттар 0,1 % Na- КМЦ бар, қатты Гетчинсон ортасына олардың целлюлозаны пайдалана алу және бұл белсенділіктің дәрежесін анықтау үшін егілді.

Әртүрлі морфологиялық типке жататын, бактерия изоляттарын зерттеу табақшаны Конго қызыл бояуымен бояғаннан кейінгі өсіп шыққан колониялардың ағарған аудандарының диаметрін өлшеу арқылы жүргізілді (Сурет 6).



6 Сурет - КМЦ целлюлозалитикалық бактериялардың гидролиз ауданы

Қазіргі бар әдеби мәліметтерге сүйене отырып, гидролиз ауданы 10 мм дейін болса ферменттік белсенділіктің төмен екендігін [8; 46], ал 10-20 мм аралығында болса орташа дәрежеде екендігін, егер 20 мм жоғары болған жайғдайда ғана, ферменттік белсенділіктің жоғары көрсеткіші болып табылады. Өсіп шыққан колонияларды конго қызыл бояуымен бояғаннан кейінгі ағарған аудандардың диаметрі бойынша өндірілген дақылды целлюлозалитикалық ферменттердің белсенділігі жайлы мәлімет алуға болады (кесте 8).



8 Кесте - Табиғи көздерден бөлініп алынған бактериялардың эндоглюканазалақ белсенділігі

Колония типі	Штаммдардың жалпы саны	Na-КМЦ қатысты белсенді штаммдардың саны (гидролиз ауданының диаметрі, мм)			
		0-10	10-15	15-20	20-25
Бақылау	125	15	20	50	40
1	16	0	1	4	11
2	19	3	6	6	4
3	21	1	0	8	12
4	15	1	0	9	5
5	22	5	9	8	0
6	13	3	1	5	4
7	19	2	3	10	4

15 изоляттың белсенділігі төмен, ал 70 - орташа, және 40 штамм – жоғары белсенділікке ие болып шықты. Сондықтан, скринингтің бірінші сатысы көбінесе зерттеліп отырған штаммдар ерігіш КМЦ гидролиздейтіні анықталды, олар жасушадан тыс целлюлазалы кешен түзетін қабілеті бар екендігі де анықталды. Бірақ та, мұндай қасиетке зерттеліп отырған штаммдардың барлығының қабілеті болмады. Сонымен, 28 штамм КМЦ ыдырататын жасушадан тыс ферменттерді түзбеді, немесе олардың белсенділігі өте төмен болды. Зерттеліп отырған изоляттардың басым көпшілігі (143) орташа КМЦ-алы белсенділікке ие болды. Бұл штаммдар, белсенділік көрсетпеген штаммдар сияқты эксперименттік жұмыстан кетірілді.

Скринингтің екінші сатысында КМЦ гидролиз ауданы 20 мм жоғары болған штаммдардың целлюлозалитикалық белсенділікті салмақтық әдіс арқылы анықталынды. Бұл әдістің мәнісі, дақыл бактериялармен инкубациялағанан кейін целлюлозаның салмақтық шығымын анықтауда. Ол үшін, зерттеліп отырған штаммдар сұйық қоректік ортаға егіледі, ол жерде целлюлозаның бірден - бір көзі ретінде сүзгіш қағазы пайдаланылады «Filtrak» № 88. Субстрат шығымы инкубациядан кейін 24-72 сағаттан соң, әр шығарған сайын үш үлгіні алып салыстырылады. Штаммдардың целлюлозалитикалық белсенділіктің көрсеткіші, бастапқы салмақпен салыстырғанды целлюлозаның салмағының өзгеруі.

Олардың анализі сонымен қатар бактериялармен өндірілетін целлюлазалы кешеннің ферменттің сандық құрамдас қатынасы целлюлозаны дақылдауда бар екенін кең көлемде түрленетінін көрсетті. Соның нәтижесінде, сүзгіш қағазының шығымы 18% көрсеткен штаммдар іріктеліп алынды. Бұл көңнен бөлініп алынған 6 бактерия штаммы, қидан бөлініп алынған (Н-2, Н-3, Н-5, Н-6, Н-10, Н-1), 8 тауықтың тезегінен (КП-1, КП-2, КП-5, КП-7, КП-9, КП-10, КП-13, КП-16), тауықтың асқазан бұлшық етінен изоляцияланған 14 штамм (Ж-1, Ж-3, Ж-5, Ж-7, Ж-10, Ж-11, Ж-12, Ж-14, Ж-16, Ж-17, Ж-21, Ж-23, Ж-25, Ж-27).

Содан соң целлюлозалы (сүзгіш қағазы) қоректік ортаға дақылдау жүргізгенде соңғысының 18,22-19,13 % деградациясы жүреді.

Тегі «топырақты-өсімді» белсенді штаммдар келесілері: 4 (П-2,П-3,П-5,П-6), топырақтан бөлініп алынған, 10 (С-1,С-2,С-5,С-7,С-9,С-10,С-13,С-16,С-17,С-18) сүрлем шөптен 5 (СЛ-1,СЛ-3,СЛ-5,СЛ-11,СЛ-12) шөптен және қыстап шыққан сүрленген жапырақтан. Целлюлозаның салмақтық шығымы жоғары болғандары, 18, 27-19, 19 % іске асатын, дақылдаудың 72- сағатынан кейінгі. Бұл әдістің «рұқсат бере алу қабілетінің шеті» деген болжам жасауға болады.

КМЦ ыдырауы нәтижесінде әртүрлі боялған аудандардың пайда болғанын атап өткен жөн: басында бұлыңғыр сары түс пайда болса, 5-6 сағаттан соң колонияның айналасында бұл аудандардың ортасында көк бояу пайда болды, ол целлюлозалитикалық ферменттердің әртүрлі белсенділікке ие екендігін көрсетеді, олар бір - бірнен молекулалық массасымен, көміртектің құрамымен, аминқышқылдарға байланысты ажыратылады

Бұл целлюлаза продуценттері үшін қалыпты нарсе деп есептеледі. Кейбір зерттеулердің мәліметіне сүйенсек, сары аудандардың пайда болуы глюкозаның бар екендігін көрсетеді, ал көк түс болса, пентоза немесе целлоолигосахаридтердің түзілгенін сипаттайды.

Осылайша, жүргізілген зерттеу нәтижелері зерттеліп отырған штаммдардың жасушадан тыс бактериялы целлюлаза өз белсенділігін тек қана КМЦ типіне жататын ерігіш өндірілетін целлюлазаға ғана емес, сонымен қатар ерімейтін (сүзгіш қағазын) да гидролиздейтінін көрсетті. Осыған байланысты зерттеудің келесі сатысында скрининг нәтижесінде бөлініп алынған 47 бактерия штаммдары әртүрлі целлюлазадан тұратын субстраттарда оларды тереңдік дақылдау арқылы целлюлазалы кешеннің құрамын анықтауға мүмкіншілік туды.

### **3.4 Микробтық целлюлазалардың белсенділік аясын қант қысқарту әдісі арқылы анықтау**

Целлюлозалардың аэробты бактериялармен ферментативтік гидролизі, екі түрлі типті целлюлазадан тұратын, целлюлазалы кешен әсерінен жүреді:

- КМЦ ыдырататын, эндоглюканаза;
- целлобиозаны ыдырататын, целлобиаза.

Эндоглюканаза бірінші болып полимерлі молекула тізбегінің соңынан кетірілген байланыстарды ыдыратады, соның әсерінен целлюлоаның полимеризация дәрежесі төмендеп, гидролиз жылдамдығы жоғарылайды. Целлобиаза бөлшекті гидролизденген целлюлозалы эндоглюканазадан целлобиозаны ыдыратып, соңында глюкоза түзеді.

9 Кесте - Бактериялардың целлобиазалық белсенділігі

изолят №	Целлобиазамен гидролиз ауданының диаметрі (мм)			Белсенділік дәрежесі
	0 - 10	10 - 20	20 және жоғары	
Н-2			26 $\pm$ 0,4	Жоғары
Н-3			22 $\pm$ 0,2	Жоғары
Н-5			21 $\pm$ 0,3	Жоғары
Н-6		15 $\pm$ 0,4		Орташа
Н-10			23 $\pm$ 0,3	Жоғары
Н-1	7 $\pm$ 0,3			Төмен
КП-1			25 $\pm$ 0,2	Жоғары
КП-2		13 $\pm$ 0,6		Орташа
КП-5	0			Мүлдем жоқ
КП-7			21 $\pm$ 0,2	Жоғары
КП-9			24 $\pm$ 0,3	Жоғары
КП-10			26 $\pm$ 0,3	Жоғары
КП-13		11 $\pm$ 0,2		Орташа
КП-16	0			Мүлдем жоқ
Ж-1	2 $\pm$ 0,1			Төмен
Ж-3	8			Төмен
Ж-5			22 $\pm$ 0,4	Жоғары
Ж-7			24 $\pm$ 0,3	Жоғары
Ж-10	0			Мүлдем жоқ
Ж-11		10 $\pm$ 0,4		Орташа
Ж-12	1 $\pm$ 0,1			Төмен
Ж-14	0			Мүлдем жоқ
Ж-16	7 $\pm$ 0,2			Төмен
Ж-17	3 $\pm$ 0,1			Төмен
Ж-21			23 $\pm$ 0,2	Жоғары
Ж-23			22 $\pm$ 0,3	Жоғары
Ж-25			21 $\pm$ 0,3	Жоғары
Ж-27			25 $\pm$ 0,4	Жоғары
П-2		16 $\pm$ 0,2		Орташа
П-3			240,4	Жоғары
П-5			21 $\pm$ 0,2	Жоғары
П-6	4 $\pm$ 0,2			Төмен
С-1			26 $\pm$ 0,3	Жоғары
С-2			23 $\pm$ 0,2	Жоғары
С-5	7 $\pm$ 0,4			Төмен
С-7			22 $\pm$ 0,4	Жоғары
С-9			25 $\pm$ 0,2	Жоғары
С-10			24 $\pm$ 0,4	Жоғары
С-13			21 $\pm$ 0,2	Жоғары
С-16		13 $\pm$ 0,2		Орташа

Скрининг нәтижесінде түзілген барлық 47 штамм жоғары эндоглюканазалық белсенділікке ие болды. Ол біріншіден, гидролиз ауданына

байланысты (табақшалы әдіс) және целлюлозаның салмақтық (filter paper activity) шығыны арқылы бағаланды.

Келесі этапта, осы штаммдарда целлобиазалық белсенділігін анықтаудан тұрды. Ол үшін, конго қызыл бояуын пайдалану арқылы табақшалы тест жүргізілді (Кесте 9).

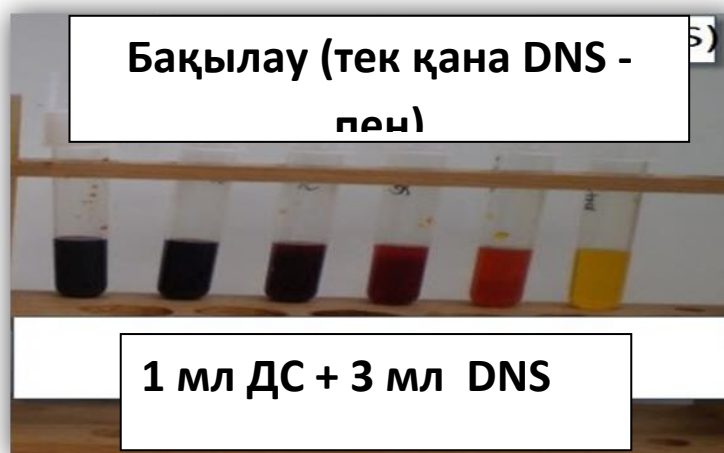
Алынған зерттеу нәтижелері 40 штаммды целлюлозалы субстратты ыдырата алу мүмкіншілігіне қарай 4 топқа бөлуге мүмкіншілік берді:

- Целлобиозаны мүлдем пайдаланбайтындар – 6 штамм;
- Целлобиозалық белсенділігі өте төмен – 9 штамм;
- Целлобиозалық белсенділігі орташа – 7 штамм;
- КМЦ және целлобиозаны белсенді ыдырататын – 25 штамм.

Рииздің эндоглюканазалық кешенді классификациясы үш түрлі ферменттен тұратынын атап өткен жөн болады:

- Сх-фермент, КМЦ ыдыратады;
- С1-фермент, маталы мақтаны ыдыратады;
- С2-фермент, сүзгіш қағазын ыдыратады.

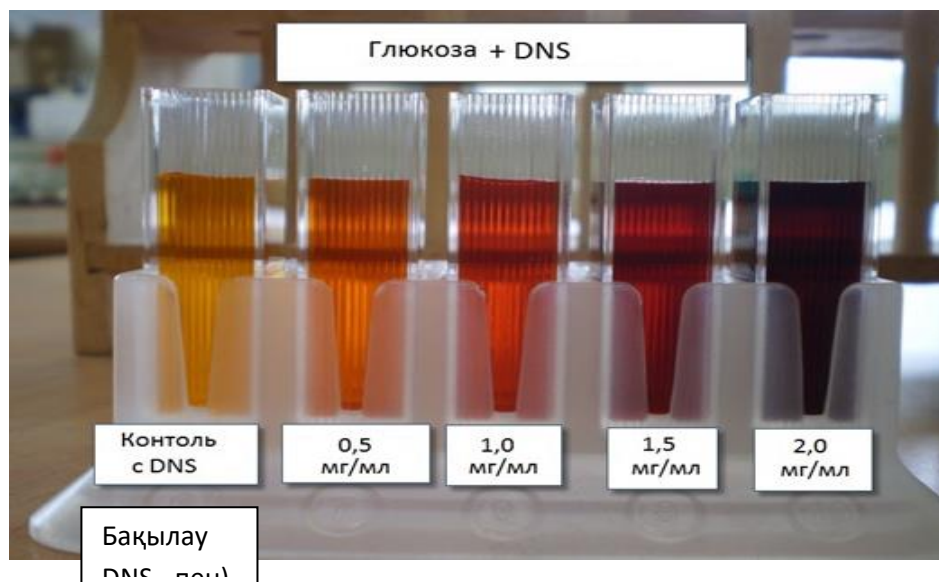
Бұл ферменттердің және целлобиазаның белсенділігінің сандық көрсеткіштерін анықтау үшін қалпына келетін қанттарды анықтауға негізделген әдіс пайдаланылады. Целлюлозаның гидролизі кезінде түзілетін редуцирленген қанттарды 3,5-динитросалицил қышқылымен реакция арқылы анықталады. Бояудың сарыдан қою қоңырға дейін өзгеруі, целлюлозадан тұратын субстратта штаммның дақылды сұйықтығында пайда болатын глюкозаның санын көрсетеді (Сурет 7).



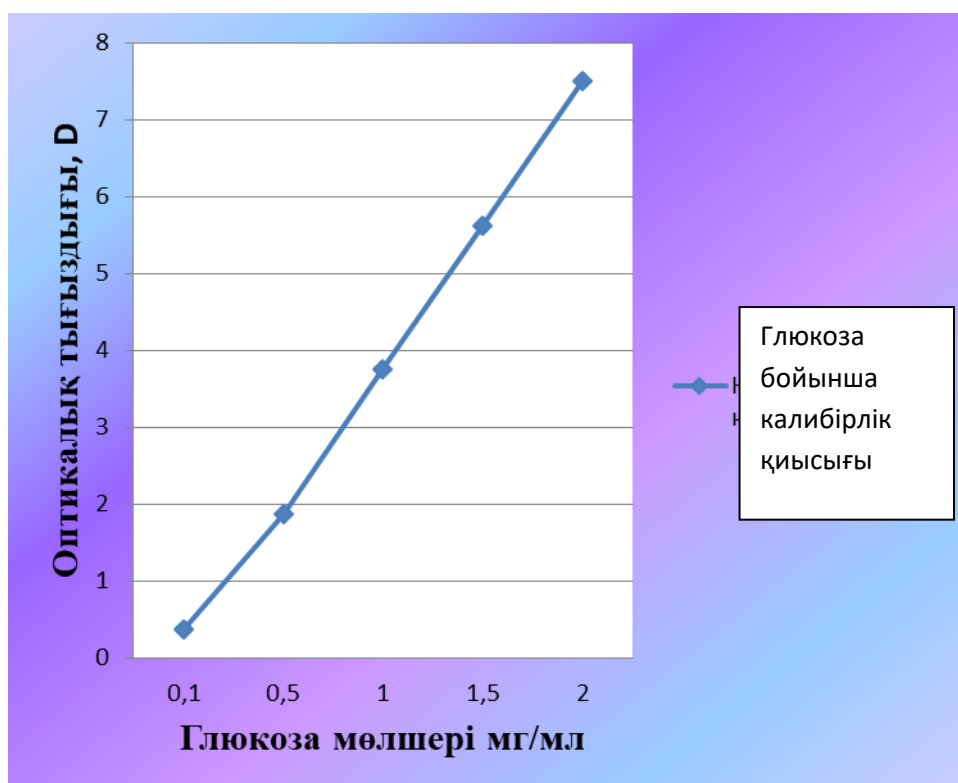
7 Сурет - DNS пен реакциядан соң дақылды сұйықтықтың түсінің өзгеруі.

Бояудың қарқындылығы  $\lambda=550$  нм толқында фотоэлектроколориметрде өлшенді. Оптикалық тығыздықтың ұзындығын субстрат гидролизінің дәрежесін көрсетеді, яғни ферменттік ыдыраудан кейінгі дақылдық сұйықтықта пайда болған глюкоза санын көрсетеді. [49].

ФЭК көрсеткіштері бойынша глюкозаның сандық көрсеткіштерін анықтау үшін калибрлік қисығы тұрғызылды (Сурет 8).



8 Сурет - ФЭК көрсеткіштері бойынша әртүрлі глюкоза концентрациясы бойынша калибрлік қисық тұрғызу.



Жүргізілген эксперименттік зерттеулердің нәтижесі, зерттеліп отырған штаммдардың жасушадан тыс бактериялы целлюлазалар тек қана КМЦ типіне жататын, ерігіш өндірістік целлюлазаларға ғана емес, ерімейтінді де (маталы мақта, сүзгіш қағазы) гидролиздеген, сонымен қатар целлобиозаны да гидролиздейтінін көрсетті. Бұл ферменттердің белсенділігі (Кесте 10).

10 Кесте - Өртүрлі субстраттарда бактериялармен өндірілетін целлюлазалы кешеннің ферменттік белсенділігі

Штамм аты	Қысқарған (редуцирленген) қанттардың целлюлазалық белсенділігі (мл реакциялық қосылысқа мг қысқарған қант)			
	Na-КМЦ	Целлобиоза	Маталы мақта	Сүзгіш қағаз
Н-2	0,46±0,02	1,55±0,01	0,38±0,01	0,44±0,01
Н-3	0,50±0,03	1,48±0,02	0,41±0,02	0,46±0,02
Н-5	0,48±0,02	1,46±0,01	0,39±0,02	0,47±0,01
Н-10	0,49±0,04	0,57±0,02	0,47±0,03	0,43±0,01
КП-1	0,46±0,02	1,53±0,01	0,45±0,01	0,52±0,01
КП-7	0,43±0,03	1,50±0,02	0,46±0,02	0,49±0,03
КП-9	0,35±0,02	1,60±0,01	0,50±0,01	0,42±0,02
КП-10	0,24±0,01	1,54±0,02	0,36±0,01	0,37±0,01
Ж-5	0,37±0,02	1,47±0,01	0,46±0,01	0,25±0,01
Ж-7	0,48±0,02	1,34±0,03	0,43±0,03	0,43±0,03
Ж-21	0,44±0,03	0,59±0,02	0,52±0,02	0,50±0,02
Ж-23	0,49±0,02	1,61±0,01	0,46±0,02	0,49±0,01
Ж-25	0,50±0,01	1,60±0,04	0,42±0,03	0,46±0,02
Ж-27	0,35±0,02	0,55±0,02	0,45±0,01	0,47±0,01
П-3	0,28±0,02	1,15±0,04	0,44±0,01	0,44±0,03
П-5	0,46±0,01	1,23±0,02	0,52±0,02	0,43±0,02
С-1	0,45±0,01	0,60±0,01	0,49±0,02	0,29±0,02
С-2	0,39±0,02	0,86±0,02	0,45±0,01	0,28±0,03
С-7	0,43±0,01	1,34±0,01	0,45±0,01	0,44±0,01
С-9	0,42±0,03	1,13±0,01	0,29±0,02	0,47±0,02
С-10	0,49±0,02	1,46±0,02	0,43±0,02	0,48±0,01
С-13	0,46±0,01	0,93±0,01	0,42±0,03	0,46±0,03
С-17	0,48±0,04	1,38±0,04	0,38±0,01	0,47±0,02
С-18	0,32±0,02	1,27±0,02	0,33±0,01	0,45±0,01
СЛ-11	0,45±0,02	1,12±0,01	0,28±0,03	0,46±0,03

Өртүрлі бактерия штамдарының целлюлазалы кешен сапалық компоненттерінің құрамы бойынша айырмашылықтары айтарлықтай көп болған жоқ.

Зерттеліп отырған штамдар КМЦ, маталы мақтаны, сүзгіш қағазын ортаға глюкоза  $0,24 \pm 0,01$  тен  $0,52 \pm 0,02$  мг/мл дейін бөле отырып гидролиздеген. Бірақта, целлюлозада секреттелетін ферменттермен белсенді целлобиоза ыдыраған.

Барлық зерттеліп отырған штамдардың арасынан белсенділігі өте жоғары 12 штамм болды: С-17, С-10, С-7, П-5, Ж-25, Ж-23, Ж-7, КП-7, КП-1, Н-5, Н-2.

## ҚОРЫТЫНДЫ

Бактерия штаммдарынан микробты целлюлоз спектрі анықталды. 25 штаммдар (53 %) эндоглюкозалар және целлобиозалар ретінде түзілді. Бұл штаммдардағы эндоглюканаз ферменті кешенінің белсенділігі 0,24+0,01-ден 0,52+0,02 мг/мл, целлобиозалар - 0,55+0,02-ден 1,61+0,01 мг/мл құрайды. Ерекше белсенділікпен 12 штамм ерекшеленді: С-17, С-10, С-7, П-5, Ж-25, Ж-23, Ж-7, НП-9, НП-7, НП-1, Р-5, Р-2. Целлюлозатикалық бактерияларды қатты терең фазада ортада культиверлеудің тәжіребиелік үлгілері құрастырылды. Барлық штаммдар целлюлазды кешендерді түзетін субстратты ерекшеліктерге ие. Ағаш үгінділерінде дақылдаудың 10-шы тәулігінде целлюлоза концентрациясы 4 – 6%-ға, күріш қауызында 7 – 10%-ға, күнбағыс қалдығында 5 - 9%-ға төмендеді.

Штаммдарды кешенді қолдану кезінде целлюлозаның жойылуы 2 – 3 есеге артты. Белсенді аралас дақылдар: Ж23+НП-9, С-17+ НП1, Ж-7 + С-7, Ж-7 + П-5 қатты субстраттарда клетчатканы 20 – 25 % гидролиздейді.



## ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1 Esteghlalian A., Mansfield S., Saddler J. Cellulases: Agents for Fiber Modification or Bioconversion. The effect of substrate accessibility on cellulose enzymatic hydrolyzability // *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, L. Viikari, R. Lantto, editors. Elsevier Science. - 2002. P. 21-36.

2 Авдеева Л.В., Осадчая А.И., Хархота М.А. Целлюлазная активность бактерий рода *Bacillus* // *Мікробіологія и біотехнологія*. - 2011. - №2. - С. 65-72.

3 Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Целлюлозодеградуючі мікроорганізмів: біосинтез, властивості та структурно-функціональні особливості // *Біотехнологія*. - 2009. - Т.2, № 2. - С. 23-41.

4 Кащаев А., Петренко А., Калашников А.З. Кормовые добавки на основе живых культур микроорганизмов // *Птицеводство*. - 2006. - № 11. - С. 43-45. 61 Pratima G., Kalpana S., Avinash S. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential // *International Journal of Microbiology*. - 2012. - P. 1-3.

5 Панкратов Т. А., Дедыш С. Н., Заварзин Г. А. Ведущая роль представителей Actinobacteria в процессах аэробной деструкции целлюлозы в сфагновых болотах // *ДАН*. - 2006. - Т.410, № 4. - С. 438 - 442.

6 Sun J.Z., Scharf M.E. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. *Insect Sci*. 2010. - № 17. - P. 163-165.

7 Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М. Способность бактерий рода *Bacillus* гидролизовать ксилан // *Микробиология и биотехнология*. - 2009. - №7. - С. 63-69.

8 L.R. Lynd, P.J. Weimer, W.H. van Zyl, I.S. Pretorius Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology// *Microbiol Mol Biol Rev*, 66 (2002), P. 506.

9 Balamurugan A., Jayanthi R., Nepolean P., Vidhya R. Pallavi and R. Premkumar Studies on cellulose degrading bacteria in tea garden soils // *African Journal of Plant Science*. - 2011. - Vol 5 (1). - P. 22-27.

10 Бутова С.Н. Методические указания к выполнению лабораторных работ по курсу «Биохимические основы биологически активных веществ растительного сырья и отходов его переработки» Часть 3. Пектин. М.: Изд. комплекс МГУПП, 2007. - С. 39

11 Саубенова М.Г., Олейникова Е.А., Саданов А.К. Практическое использование целлюлолитической активности бактерий / *Lamber Academic Publishing*, Германия. - Саарбрюккен, 2014. - С. 106.

12 Dubois M., Yilles K.A., Hamilton J.K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem*. - 1989. Vol. 28. P. 350-356. 70 Оболенская, А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: Учебное пособие для вузов // А.В. Оболенская, З.П. Ельницкая, А.А. Леонович. - М.: «Экология», 2001. -С. 320

13 Ушакова, Л. П. Белов, А. А. Варшавский, А. А. Козлова, Т. В. Колганова, Е. С. Булыгина, Т. П. Турова Расщепление целлюлозы при дефиците азота бактериями, выделенными из кишечника растительноядных позвоночных // Микробиология.- 2003.-Т.72, № 3.- С.400-406.

14 Мокрушина Н.С., Тарасова Т.С., Дармов И.В. Выделение микромицетов, перспективных для разработки на их основе биопрепарата для ускоренной переработки древесных отходов в удобрение // Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского. – 2010. - №2. - С. 430434.

15 Логинова Л.Г. Микробиологические аспекты сверхсинтеза ферментов микроорганизмами // Изв. АН СССР. Серия биол. - 1999. - №5. - С. 682–688

## Краткий отчет



---

Университет:	Satbayev University
Название:	Қатты және тереңдік сұйық фазалы дақылдау жағдайында целлюлоза және аэробты бактериялардың биоконверсиясы
Автор:	Асан Нұрдеулет Нұржанұлы
Координатор:	Гульнара Курбанова
Дата отчета:	2019-05-06 13:47:58
Коэффициент подобия № 1: ?	<b>15,7%</b>
Коэффициент подобия № 2: ?	<b>5,9%</b>
Длина фразы для коэффициента подобия № 2: ?	<b>25</b>
Количество слов:	7 553
Число знаков:	54 111
Адреса пропущенные при проверке:	
Количество завершенных проверок: ?	38

---



К вашему сведению, некоторые слова в этом документе содержат буквы из других алфавитов. Возможно - это попытка скрыть позаимствованный текст. Документ был проверен путем замещения этих букв латинским эквивалентом. Пожалуйста, уделите особое внимание этим частям отчета. Они выделены соответственно.

Количество выделенных слов 11