

IRSTI: 34.27.19

G.Zh. ABDIEVA, P.S. UALIEVA, A.M. MALIK*, A. YERMEK, A. ABILDA,
A. SISIMOVA, A. NURMAGANBETOVA
Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
*e-mail: azhar.malikkyzy@gmail.com

STUDYING THE DYNAMICS OF YEAST GROWTH ON MILK WHEY

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.12

Abstract

Industrial whey processing makes it possible to implement the principles of waste-free technology, increase the resources of complete food and feed, ensure the profitability of production, and eliminate environmental pollution. Industrial processing of whey is currently carried out in three main areas: comprehensive use of all dry residue; extraction and deep fractionation of individual most valuable components; targeted chemical, enzymatic or biological transformation of individual components to obtain industrially important derivatives. During the study, the microflora of dairy products was studied, and pure yeast cultures were isolated. The morphological and cultural properties were determined, and molecular genetic identification of yeast to species was also carried out. Genetic analysis revealed promising strains in these samples: *Kluyveromyces marxianus* SH1, *Kluyveromyces marxianus* AI1, and *Saccharomyces cerevisiae* M1. The purpose of this work is to study the microflora of lactic acid bacteria and identify yeast strains to species.

Keywords: yeast, culture, bioethanol, whey, strain.

For the dairy industry in the 21st century, environmental problems are of particular relevance due to the depletion of resources and the need to preserve the environment. Thus, there is a need to create an industry-wide system for monitoring key environmental indicators for water consumption and wastewater disposal, as well as to develop a methodology for the environmental safety of production.

An analysis of the situation in the dairy industry shows that the most relevant are scientific research aimed at the integrated waste-free use of dairy raw materials, the development of new technological production of a wide range of multi-component products for various functional purposes on a dairy basis, the modernization and creation of new technological equipment, solving energy problems -, resource saving, greening of dairy production [1].

Both in domestic and international practice, the problem of using whey, which has high nutritional and biological value and is the largest pollutant of wastewater, has not been solved. In recent years, a fundamentally new direction in the industrial processing of whey has been actively and purposefully formed - the production of derivative components that are target products, in particular alcohol. The main reasons for insufficient whey processing are the seasonal nature of dairy production and its insufficient concentration [2-3]. Due to difficulties associated with transportation and processing (declining level of dairy production, rising costs of transportation, equipment, etc.), part of the whey is not used and ends up in sewage systems, and in emergency cases (as well as in the absence or imperfection of treatment systems) - into the environment. The cost of treatment facilities and the harm caused by draining whey into water bodies make the problem of its industrial processing urgent. Industrial processing of whey makes it possible to implement the principles of waste-free technology, increase the resources of complete food and feed, ensure the profitability of production and eliminate environmental pollution [4-5].

In connection with the above, we can conclude that it is necessary to carry out greening of dairy production, associated with solving the problem of using secondary raw materials in this industry.

Materials and methods of research

Study of the microbial diversity of fermented dairy products and method for isolating pure yeast cultures

The microbial diversity of the dairy products was determined by the inoculation method (Koch's method) in dense nutrient media. The essence of the method is to count germinated colonies by inoculating the suspension under investigation in a Petri dish into a solid nutrient medium (Fig. 7). According to Koch's principle, each colony is considered to be the result of the multiplication of one cell. By seeding a known volume of the test suspension into solid nutrient medium, the number of germinated colonies can be used to determine how many cells the microorganism contained in its original composition. Results of microorganism quantification using the Koch method are often reported as colony forming units (CFU) rather than cell counts.

Seeding consists of 3 steps: preparation of the dilution, inoculation into a Petri dish on nutrient dense media, counting of germinated colonies.

Preparation of the dilution. The dilution is prepared in sterile tap water using a constant dilution factor, usually 10. To prepare the dilution, 9 ml of sterile tap water was poured into sterile dry tubes. Then 1 ml of the original suspension obtained with a sterile pipette was transferred to a test tube containing 9 ml of sterile water, this was the first dilution, 1:10. The suspension obtained from the first dilution was mixed with a new sterile pipette. The 1 ml of the suspension was obtained with this pipette and transferred it to a second tube, this was the second dilution, 1:100. The remaining dilutions were prepared in the same way.

Inoculation into a Petri dish. The suspension can be inoculated by either the pour plate or the spread plate inoculation method. Before inoculation by the spread plate method, 20-30 ml of the dissolved nutrient medium was poured into sterile Petri dishes. Inoculation was carried out from a known dilution. Using a sterile pipette, 0.1 ml of the appropriate dilution was inoculated. The suspension was spread over the surface of the nutrient medium using a Drigalsky spatula. Plates were incubated for several days at 28-30 °C in a thermostat.

Count the overgrowth colonies. Depending on the growth rate, the number of colonies grown in a Petri dish is counted on the 1-15 days after sowing. Determined the average number of colonies in the dish, then by using the next formula the number of cells in 1 ml was calculated:

$$M = \frac{a \times 10^n}{V} \quad (1)$$

where M – is number of microbial cells in 1 ml; a – average number of microbial colonies in a Petri dish; 10 – dilution factor; n – serial number of dilutions in which inoculation was performed; V – volume of suspension taken for inoculation [6].

Method for the study and identification of morphological and cultural properties of yeast cultures

Yeast cultures were identified by determining the direct nucleotide sequence of the ITR (intergenic transcribed region), followed by determination of nucleotide identity with sequences stored in the international gene bank database.

Genomic DNA was isolated from daily bacterial cultures using the Purelink Genomic DNA Kit according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, USA). DNA concentration in samples was determined on a Qubit® 2.0 fluorimeter using the Qubit™ dsdna HS Assay Kit (Life Technologies, Oregon, USA). A 16S rRNA gene site was used as a genetic marker. For amplification of the 16S rRNA site, 25 µl of reaction mixture was prepared: 12.5 µl of Q5® hot Start High-Fidelity 2x Master Mix (New England Biolabs Ins., USA); a pair of universal primers: 8F (5'-AGAGAGTTGATCCTGCTCAG-3') and 806r (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') [Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M., Velasco E., Ruiz J., Vila J. Outbreak of infection with *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. - 2006. - Vol. 27. - P. 397-404.] 1.2 µl at a concentration of 10 µM; DNA matrix

and water up to 25 µl. The application regime consisted of the following cycles 95°C for 5 min, then 95°C for 30 s, 55°C for 40 s, 72°C for 50 s for 30 cycles; elongation at 72°C for 10 min.

PCR products were purified using CleanSweep™ PCR Purification (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Sequencing of bacterial 16S rRNA gene fragments was performed using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems, USA) and then fragments were separated on a 3500 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Tokyo, Japan).

The sequencing results were processed using SEQ software (Applied Biosystems). Homologous nucleotide sequences of 16S rRNA genes were searched using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in the Gene Bank international database of the US National Center for Biotechnology Information.

Phylogenetic analysis was performed using MEGA 6 software [Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics*. Vol. 5 No 2. 150-163. June, 2004. [PubMed]. Nucleotide sequence alignments were performed using the ClustalW algorithm. Phylogenetic relationships were determined using the BLASTN Neighbor-Joining (NJ) Altschul method [7].

Study of the growth dynamics of yeast cultures in milk whey

In the study of the growth dynamics of yeast cultures over a period of 7 days, the total number of germinated yeast cultures was determined by the Koch method.

A cell culture has certain optical properties that can determine its density, state, etc. In the case of bacterial or eukaryotic cell cultures, measuring the optical density within 600 nm indicates the concentration of cells in the medium. The optical density is measured using a spectrophotometer.

The 1 ml of the strain suspension was obtained by pipetting and transferred into the cuvette. When measuring the optical density of the strains *Torulopsis kefyr var kumis* T17, *Kluyveromyces marxianus* SH1, *Kluyveromyces marxianus* A11, *Saccharomyces cerevisiae* M1, the wavelength was 585 nm [24].

The Bradford method is a colourimetric method for the quantitative determination of proteins in solution. It was recommended by the biochemist Marion Bradford in 1976. The Marion Bradford method: a sample volume is made up to 0.5 ml with water; 0.5 ml of reagent is added; mixed and waited for colour development; measured at a nanometre OD600 [6].

Statistical processing method

An important indicator of research is its efficiency. High values can be achieved if the effectiveness of the work is suitable for generalisation and contributes to the acquisition of new information. The effectiveness of the conducted research is largely determined by the quality of planning, designing and conducting the experiment, as well as the depth of analysis of the obtained results. All of the stages listed above play an equally important role in the conduct of research.

The arithmetic mean, often called the "average", is obtained by adding all the values and dividing this sum by the number of values in the sample. This can be expressed by an algebraic formula. The control set of n variables of x can be represented as $x_1 x_2 x_3 \dots, x_n$. The formula for the arithmetic mean is given by

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} \quad (4)$$

The more accurate measure of variation or dispersion is the parameter around the arithmetic mean square. It is based on looking at the deviation of the descriptive values of individual population units from the arithmetic mean. It uses the method of averaging the deviations of the

variants from the arithmetic mean, which makes it possible to overcome the difficulties arising from the fact that their algebraic sum is zero. This approach minimises the calculation of the squares of the deviations of the variants from the mean, followed by averaging. The mean squared deviation (σ) is the average squared deviation between the calculated values and the actual value [8]:

$$\sigma = \sqrt{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 f_1}{\sum f_1}} \quad (5)$$

Results and discussion

The study of the microbial diversity of fermented milk products and isolation of pure yeast culture

The milk and fermented milk products are a favourable environment for the development of many microorganisms. The microflora of dairy products can be divided into specific and non-specific microflora. The specific microflora of milk and dairy products includes lactic acid bacteria and propionic acid bacteria, which initiate the processes of lactic acid and propionic acid opening. In addition, sour milk products contain lactose-degrading yeasts, which are involved in the alcohol degradation process. The production of fermented milk products is based on microbiological processes related to the activity of the main microorganisms.

The main types of yeasts found in milk and dairy products are lactose-degrading yeasts - *Saccharomyces lactis*, *Zygosaccharomyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Debaryomyces* and *Torulopsis kefir*, *Torulopsis sphaerica*, *Candida pseudotropicalis* [3].

The microbial diversity of cow's milk and homemade sour cream, kefir, qurt (fermented milk products) products were studied in the research. The determination of the microflora of dairy products was carried out in Sabouraud and beef-extract agar nutrient media (Fig. 1).

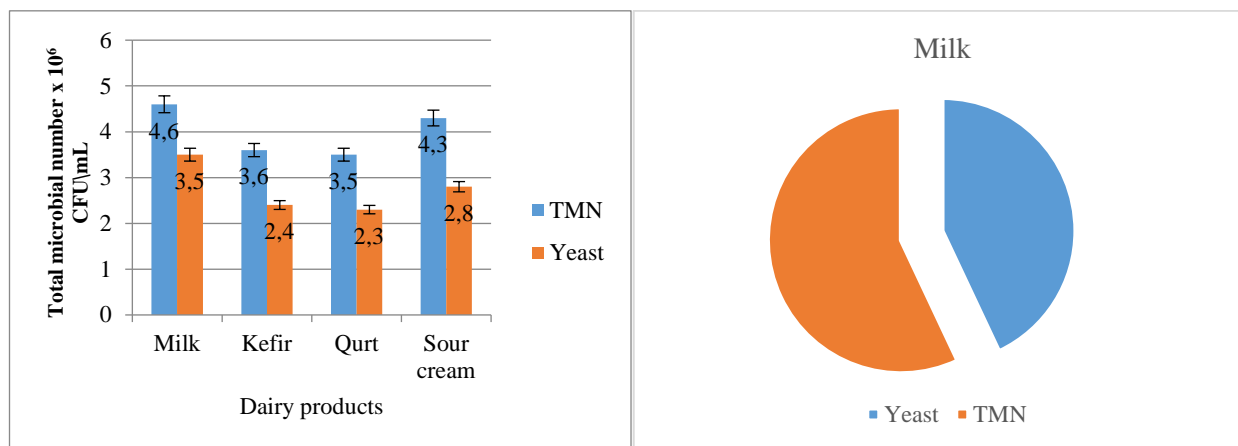


Figure 1 - The quantitative and qualitative indicators of total microflora in dairy products

The total microbial diversity of cow's milk and samples of homemade kefir, sour cream and qurt products was investigated as shown in Figure 1. The total microbial amount of cow's milk was 4.6×10^6 CFU/ml, the yeast amount was 3.5×10^6 CFU/ml, and the total microbial amount of kefir samples was 3.6×10^6 CFU/ml, the yeast amount was 2.4×10^6 CFU/ml. It was found that in sour cream samples, the total microbial amount was 4.3×10^6 CFU/ml, yeast amount was 2.8×10^6 CFU/ml, and in qurt samples, the total microbial amount was 3.5×10^6 CFU/ml, yeast count was 2.3×10^6 CFU/ml.

The essence of the research is to determine whether yeast is detectable in dairy products, as a result, the 3 new pure yeast cultures were isolated from the dairy products obtained for the study: cow's milk, sour cream and qurt.

The study and identification of morphological and cultural properties of yeast cultures

The morphological and cultural properties of 3 pure yeast cultures isolated from milk and fermented milk products were studied, the characteristics of the colonies were described, and the macromorphology and micromorphology were shown (in Table 1).

Table 1 - Morphological and cultural characteristics of yeast cultures isolated from dairy products

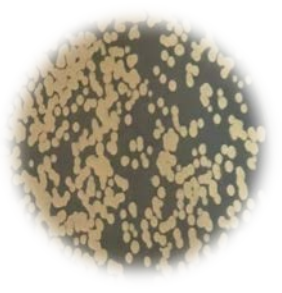
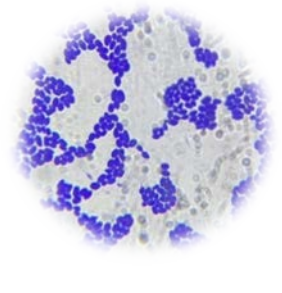
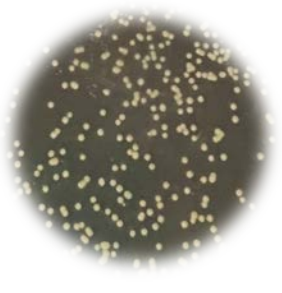
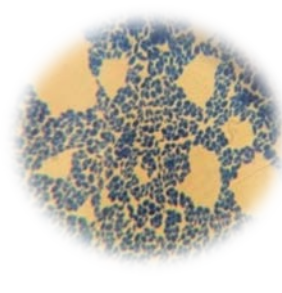
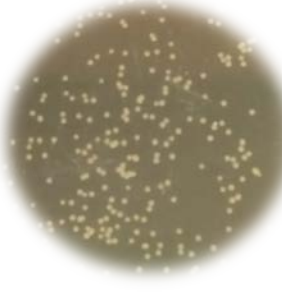
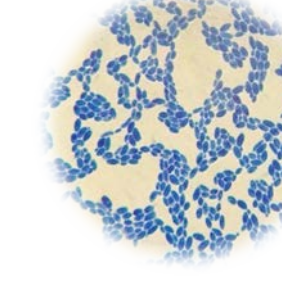
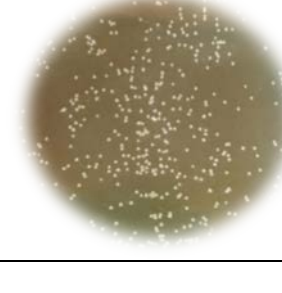
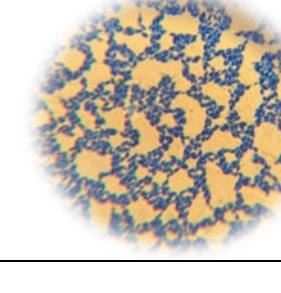
Strain	Colony morphology	Macromorphology	Cell morphology
A11		The round shaped Surface-smooth Side view-smooth Gloss-transparent Color-white Edge-smooth Construction-homogeneous.	
M1		The round shaped colony, the color is whitish, the surface is smooth, the edge was smooth, the texture homogeneous. Cell shape is oval, yeasts	
T17		The round shaped colony, circle-shaped, size - 1 µm, point, flat, transparency-the colony is luminous, color-pale yellow, edge-smooth, wavy. The structure is fine or coarse- grained. consistency-slimy.	
SH1		Yeast colonies are small, rounded, whitish in color, and smooth in surface, the edge was smooth, the texture homogeneous.	

Table 1 shows the microscopic picture of the yeast cultures. The microscopy method showed that the yeast cells are close together and the shape of the cells is oval.

The essence of the study was to determine the presence of yeast in the dairy products obtained as the object of study. The morphological and cultural characteristics of the isolated yeast cultures were studied. As a result, yeast strains isolated from the cow's milk product – SH1, qurt – M1, sour cream – A11 were obtained as an object of study.

Therefore, the molecular genetic characteristics of 3 pure yeast cultures isolated from different dairy products were investigated. The identification of species was carried out by PCR.

Polymerase chain reaction (PCR) is a molecular biological technique that allows significant amplification of low concentrations of certain nucleic acid fragments (particularly DNA) in

biological material (sample). In addition to DNA amplification, PCR allows many other manipulations with nucleic acids (insertion of mutations, fusion of DNA fragments) and is widely used in biological and medical practice, for example, in the diagnosis of diseases (hereditary, infectious), paternity determination, gene cloning, isolation of new genes [9].

The nucleotide sequences of the ITS region determined during the identification of yeast cultures are shown.

Kluyveromyces marxianus AI1

```
CGTCTGAACAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCAGTTCTTGATTCTCTGCTATC
AGTTTTCTATTTCTCATCCTAAACACAATGGAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTG
GAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAATATTTGTATTATGAAAACT
ATTATACTATAAAATTTAATATTCAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCAT
CAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGC
GTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTCTCGGGTAACT
TGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGA
CTCGACTCTTGACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTTGGGTCA
TAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAGGCATACGGC
TTAACCAAAACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTT
AAGCATATCAATAG
```

Saccharomyces cerevisiae M1

```
CGTCTGAACAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCAGTTCTTGATTCTCTGCTATC
AGTTTTCTATTTCTCATCCTAAACACAATGGAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTG
GAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAATATTTGTATTATGAAAACT
ATTATACTATAAAATTTAATATTCAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCAT
CAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGC
GTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTCTCGGGTAACT
TGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGA
CTCGACTCTTGACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTTGGGTCA
TAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAGGCATACGGC
TTAACCAAAACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTT
AAGCATATCATA
```

Kluyveromyces marxianus SH1

```
CGTCTGAACAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCAGTTCTTGATTCTCTGCTATC
AGTTTTCTATTTCTCATCCTAAACACAATGGAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTG
GAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAATATTTGTATTATGAAAACT
ATTATACTATAAAATTTAATATTCAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATC
GATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCAT
CAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGC
GTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTCTCGGGTAACT
TGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGA
CTCGACTCTTGACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTTGGGTCA
TAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAGGCATACGGC
TTAACCAAAACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTT
AAGCATATCATA
```

The phylogenetic analysis was performed and the species of the yeast cultures were identified (Figures 2, 3, 4).

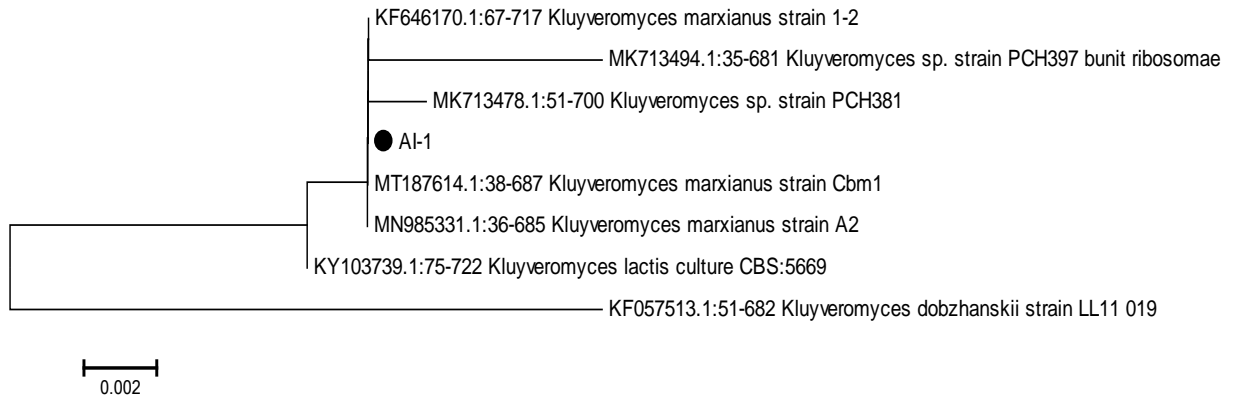


Figure 2 – Phylogenetic tree of *Kluyveromyces marxianus* AI1 strain

As shown in Figure 2, it was found that the yeast strain AI1, which was isolated from the kefir, fermented milk product, belongs to the species *Kluyveromyces marxianus*.

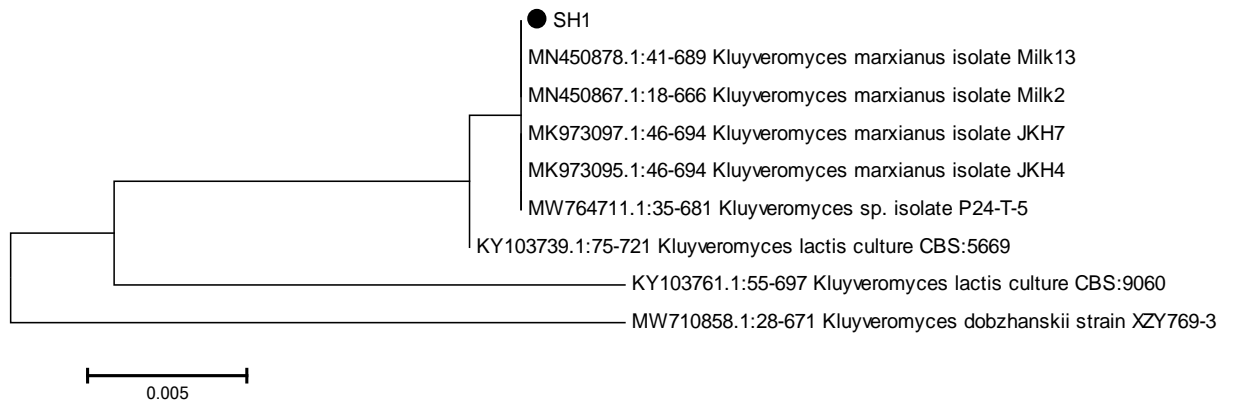


Figure 3 – Phylogenetic tree of *Kluyveromyces marxianus* SH1 strain.

Figure 3 shows the phylogenetic tree of the yeast strain SH1 isolated from cow's milk. The yeast culture SH1 was found to belong to the species *Kluyveromyces marxianus*.

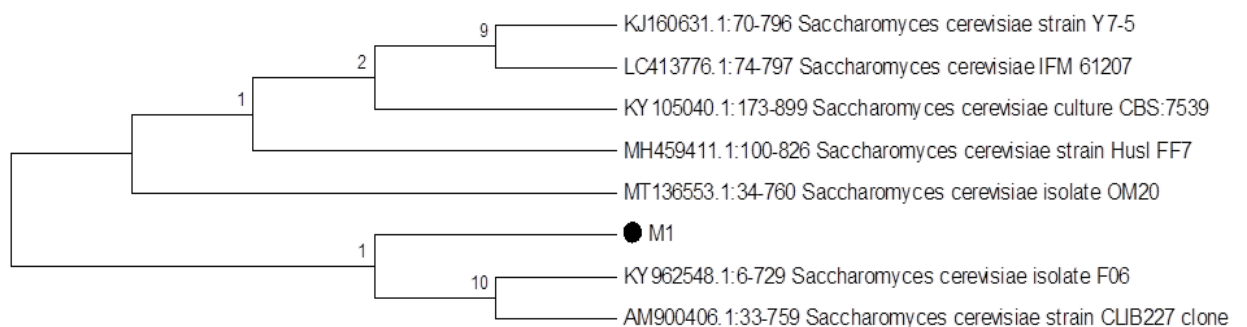


Figure 4 – Phylogenetic tree of *Saccharomyces cerevisiae* M1 strain.

Figure 4 shows the phylogenetic tree of the yeast strain *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast culture M1 was found to belong to the species *Saccharomyces cerevisiae*.

As a result, the 3 pure yeast cultures isolated from dairy products were identified to species using molecular genetic PCR method and are summarised in Table 2.

Table 2 – Molecular genetic identification of pure yeast cultures isolated from dairy products

№	Strain	Name of the strain
1	AI1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> - AI1
2	M1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - M1
3	SH1	<i>Kluyveromyces marxianus</i> - SH1

The morphological and cultural characteristics of the yeast cultures were studied by conventional methods, as well as, the molecular genetic characteristics by PCR analysis. Therefore, based on the results of these methods the yeast strains were identified to species AI1 - *Kluyveromyces marxianus*, M1 - *Saccharomyces cerevisiae*, SH1 - *Kluyveromyces marxianus*.

The study of the growth dynamics of yeast cultures in milk whey

Whey is the residual product that remains after the separation and separation of curd and cheese in milk processing. The composition of milk whey is about 93% water.

The whey solids consist mainly of lactose or milk sugar. Milk whey contains nicotinic acid, choline, biotin, vitamins B, A, E, C, calcium and magnesium. Because of its high biological value, whey can be effectively used as a substrate for industrial purposes [10-12].

In this study the growth dynamics of the pure yeast cultures selected from fermented milk products - *Kluyveromyces marxianus* SH1, *Kluyveromyces marxianus* AI1, *Saccharomyces cerevisiae* M1 and the collection strain of the Department of Biotechnology of KazNU - *Torulopsis kefir var kumis T17* in normal and optimised milk whey were analysed for 7 days (Fig.5, 6).

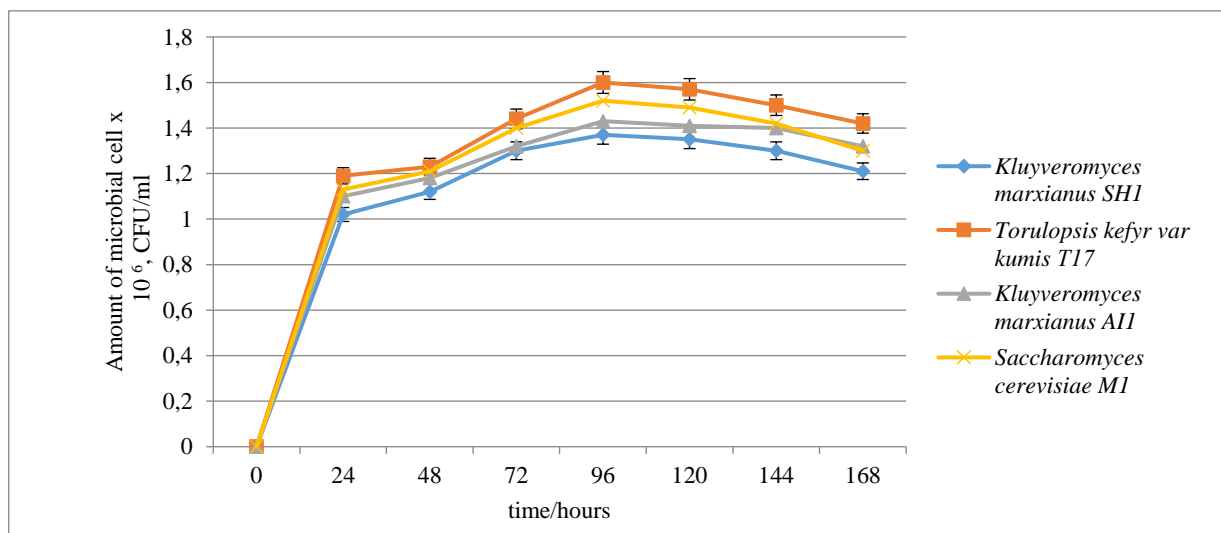


Figure 5 – The growth dynamics of yeast cultures in normal milk whey

Figure 5 shows the growth dynamics of the studied yeast strains in normal milk serum. As seen in the figure, the most active growth time of the yeast strains was recorded at 96 hours. The maximum value for the yeast strain *Kluyveromyces marxianus* SH1 was $1,37 \times 10^6$ CFU/ml, *Kluyveromyces marxianus* AI1 - $1,43 \times 10^6$ CFU/ml, *Saccharomyces cerevisiae* M1 - $1,52 \times 10^6$ CFU/ml, *Torulopsis kefir var kumis* T17 – $1,6 \times 10^6$ CFU/ml.

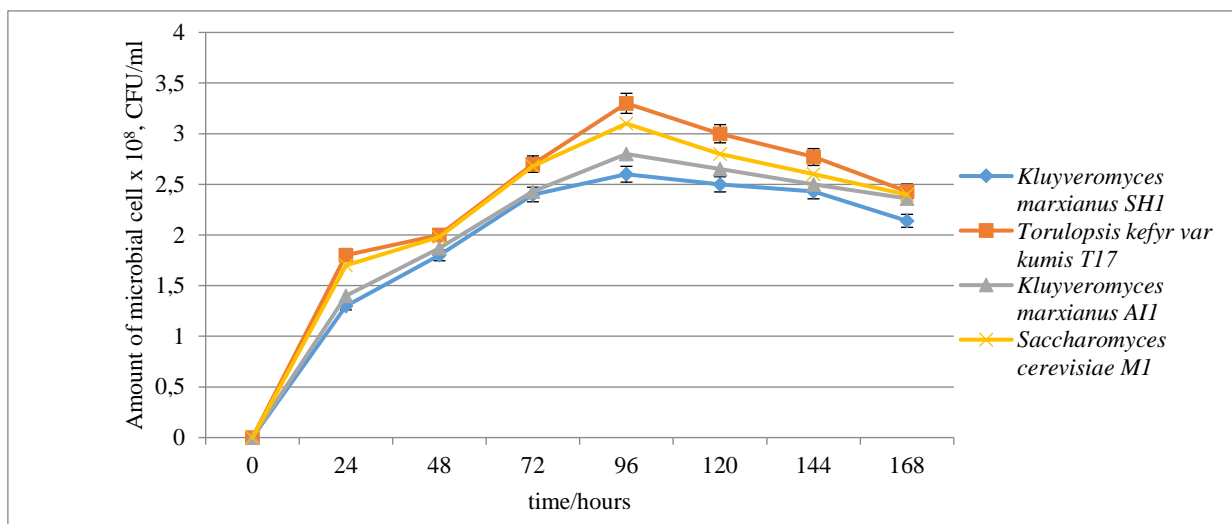


Figure 6 – The growth dynamics of yeast cultures in optimised milk whey

The growth dynamics of yeast cultures in optimised milk whey is shown in the figure 6. The best results were observed in 96 hours for all the yeast strains. The maximum growth observed in the optimised milk whey for the *Kluyveromyces marxianus SH1* strains was 2.6×10^8 CFU/ml, *Kluyveromyces marxianus AII* - 2.8×10^8 CFU/ml, *Saccharomyces cerevisiae M1* - 3.1×10^8 CFU/ml, and for the *Torulopsis kefir var kumis T17* - 3.3×10^6 CFU/ml.

The analysis of the biomass accumulation in the yeast culture in an optimized milk whey was carried out using shakers at room temperature for a period of 7 days. (Figure 7).

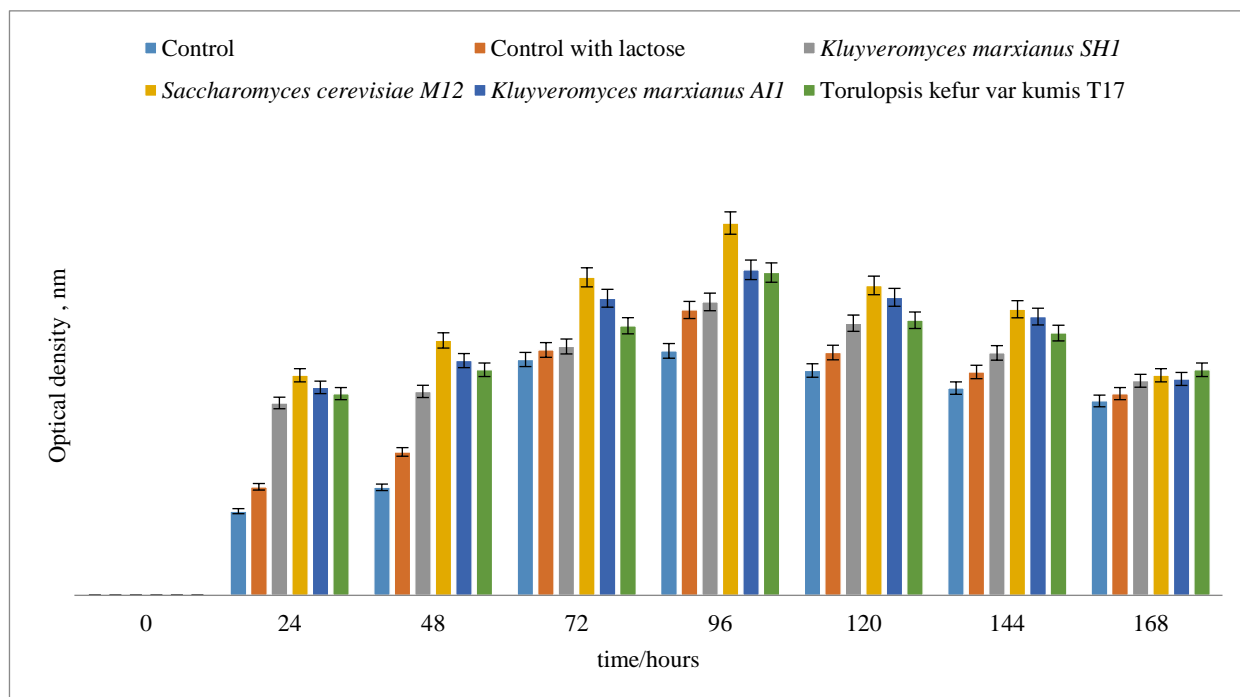


Figure 7 – The intensity of the biomass accumulation in the yeast culture in an optimized milk

As shown in figure 7, we can observe that all yeast cultures have the most active biomass harvesting ability in 96 hours. The most active biomass accumulation ability was 2.03 nm for *Saccharomyces cerevisiae M1* strain.

The study showed that yeast cultures in optimised whey had more active growth dynamics than those in normal whey.

In recent years, there has been an increase in the demand for bioethanol due to factors such as excessive environmental pollution, rising oil prices, and decreasing raw material reserves. Bioethanol production is currently developing, exploring different production technologies, raw materials and substrate sources.

Conclusion

Yeast cultures isolated from dairy products and milk whey can effectively be used as research objects for bioethanol production.

The results obtained from this research allow us to draw several conclusions:

1. The total microflora of dairy products was analyzed. It was found that the total microbial amount in raw cow's milk was 4.6×10^6 CFU/ml, with a yeast amount of 3.5×10^6 CFU/ml. In sour cream, the total bacterial count was 4.3×10^6 CFU/ml, and the yeast count was 2.8×10^6 CFU/ml. The three pure yeast cultures were isolated from these products.

2. The isolated yeast cultures were identified as *Kluyveromyces marxianus* SH1, *Kluyveromyces marxianus* A11, and *Saccharomyces cerevisiae* M1.

3. It was found that the growth dynamics of the *Saccharomyces cerevisiae* M1 strain in an optimised yeast culture medium is more active compared to those of the *Kluyveromyces marxianus* SH1, *Kluyveromyces marxianus* A11, and *Torulopsis kefir var kumis* T17 strains.

Funding

The research was supported by the project AP09258285 “Production of bioethanol by continuous whey fermentation using immobilised yeast cells” funded by CS MSHE RK and implemented at Al-Farabi Kazakh National University (2021-2023).

References:

- 1 Zafar S, Owais M. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem Eng J*, 2006, 27:295-298 (<https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.05.009>)
- 2 Mabel K., Nafisatu B., Oluwaseyi A. Probiotics Potential of Yeast and Lactic Acid Bacteria Fermented Foods and the Impact of Processing: A Review of Indigenous and Continental Food Products. *Advances in Microbiology*, 2020, 10(9), (<https://doi.org/10.4236/aim.2020.109037>)
- 3 Marlene B., Lucília D. *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation. *Biotechnology Advances*, 2020, 60: 65-220 (<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108027>)
- 4 Arora R., Behera S., Sharma N.K., Kumar S. A new search for thermotolerant yeasts, its characterization and optimization using response surface methodology for ethanol production. *Front. Microbiol.*, 2015, 6:1-16 (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00889>)
- 5 Adnan, N. A., Suhaimi, S. N., Abd-aziz, S., Hassan, M. A., and Phang, L.Y. Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. *Renew. Energy*, 2014, 66: 625–633 (<https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.032>)
- 6 Netrusov A.I. *Praktikum po mikrobiologii*. M.: Akademiya, - 2005. - 608. (<https://library.tou.edu.kz/fulltext/buuk/b3190.pdf>)
- 7 Scully, S. M., and Orlygsson, J. Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. *Bioenergies*, 2015, 8:1–30 (<https://doi.org/10.3390/en8010001>)
- 8 Tofighi, A., Assadi, M. M., Asadirad, M. H. A., and Karizi, S. Z. Bio-ethanol production by a novel autochthonous thermo-tolerant yeast isolated from wastewater. *J. Environ. Health Sci. Eng.*, 2014, 12:1–6 (<https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-107>)
- 9 Gabardo S, Rech R, Rosa CA, Ayub MAZ. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renew Energy*, 2014, 69:89-96 (<https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.03.023>)
- 10 Kaur R, Panesar P.S, Singh R.S. Utilization of Whey for the Production of β -Galactosidase Using Yeast and Fungal Culture. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2015, 9:690-694 (<http://scholar.waset.org/1307-6892/10001706>)

11 Avchar R., Lanjekar V., Baghela A. Bioprospecting thermotolerant yeasts from distillery effluent and molasses for high-temperature ethanol production. *J. Appl. Microbiol.*, 2022, 132: 1134-115 (https://doi.org/10.1111/jam.15288)

12 Cabañas. K.T., Peña-Moreno I.C., Parente D.C., García A.B., Gutiérrez R.G. de Morais M.A. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* isolates for ethanol production in the presence of inhibitors. *Biotech*, 2019, 9:1-11(https://doi.org/10.1007/s13205-018-1541-3)

Г.Ж. АБДИЕВА, П.С. УАЛИЕВА, А.М. МӘЛІК*, А. ЕРМЕК, А. ӘБІЛДА,
А. СИСИМОВА, А. НУРМАГАНБЕТОВА

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: azhar.malikkyzy@gmail.com

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ РОСТА ДРОЖЖЕЙ НА МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКЕ

Аннотация

Промышленная переработка молочной сыворотки позволяет реализовать принципы безотходной технологии, увеличить ресурсы полноценных продуктов питания и кормов, обеспечить рентабельность производства и исключить загрязнение окружающей среды. Промышленная переработка молочной сыворотки в настоящее время осуществляется по трем основным направлениям: комплексное использование всего сухого остатка; извлечение и глубокое фракционирование отдельных наиболее ценных компонентов; направленная химическая, ферментативная или биологическая трансформация отдельных компонентов, с целью получения промышленно важных производных. В ходе исследования изучена микрофлора молочных продуктов и выделены чистые культуры дрожжей. Определены морфолого-культуральные свойства, проведена молекулярно-генетическая идентификация дрожжей до вида. Генетический анализ выявил в этих образцах перспективные штаммы — *Kluveromyces marxianus* SH1, *Kluveromyces marxianus* АП, *Saccharomyces cerevisiae* М1. Целью данной работы является изучение микрофлоры молочнокислых бактерий и идентификация штаммов дрожжей до вида.

Ключевые слова: дрожжи, культура, биоэтанол, молочная сыворотка, штамм.

МРНТИ: 34.27.19

Г.Ж. АБДИЕВА, П.С. УАЛИЕВА, А.М. МӘЛІК*, А. ЕРМЕК, А. ӘБІЛДА,
А. СИСИМОВА, А. НУРМАГАНБЕТОВА

әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: azhar.malikkyzy@gmail.com

СҮТ САРЫСУЫНДА АШЫТҚЫ ДАҚЫЛДАРЫНЫҢ ӨСУ ДИНАМИКАСЫН ЗЕРТТЕУ

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.12

Түйін

Сарысуды өнеркәсіптік өңдеу қалдықсыз технология принциптерін жүзеге асыруға, толық азық-түлік пен жемшөп ресурстарын көбейтуге, өндірістің рентабельділігін қамтамасыз етуге және қоршаған ортаның ластануын жоюға мүмкіндік береді. Сарысуды өнеркәсіптік өңдеу қазіргі уақытта үш негізгі бағыт бойынша жүзеге асырылады: барлық құрғақ қалдықты кешенді пайдалану; жеке бағалы компоненттерді алу және терең фракциялау; өнеркәсіптік маңызды өнімдерді алу мақсатында жекелеген компоненттердің мақсатты химиялық, ферментативті немесе биологиялық түрленуі.

Зерттеу барысында сүт өнімдерінің микрофлорасы зерттеліп, таза ашытқы дақылдары бөлініп алынды. Морфологиялық-культуральдық қасиеттері зерттеліп, ашытқылардың молекулалық-

генетикалық әдіс негізінде түрге дейін идентификациясы жүргізілді. Генетикалық талдау нәтижесі бойынша перспективті штамдары түрге идентификацияланды: *Kluyveromyces marxianus* SH1, *Kluyveromyces marxianus* A11 және *Saccharomyces cerevisiae* M1. Бұл жұмыстың мақсаты сүт қнмдерінің микрофлорасын зерттеу және ашытқы штамдарын түрге дейін идентификациялау болып табылады.

Кілтгі сөздер: ашытқылар, дақыл, биоэтанол, сүт сарысуы, штамм.

21 ғасырдағы сүт өнеркәсібі үшін ресурстардың таусылуына және қоршаған ортаны сақтау қажеттілігіне байланысты экологиялық проблемалар ерекше өзекті болып табылады. Осылайша, суды тұтыну және сарқынды суларды бұру бойынша негізгі экологиялық көрсеткіштер мониторингінің жалпы салалық жүйесін құру, сондай-ақ өндірістің экологиялық қауіпсіздігінің әдістемесін әзірлеу қажеттілігі туындады.

Сүт өнеркәсібіндегі жағдайды талдау сүт шикізатын кешенді қалдықсыз пайдалануға, әртүрлі функционалдық мақсаттарға арналған көп компонентті өнімдердің кең ассортиментін жаңа технологиялық өндірісті дамытуға бағытталған ғылыми зерттеулердің ең өзекті екенін көрсетеді. Сүт негізі, жаңа технологиялық жабдықтарды жаңарту және құру, энергетикалық мәселелерді шешу -, ресурстарды үнемдеу, сүт өндірісін жасылдандыру [1]. Отандық және халықаралық тәжірибеде жоғары тағамдық және биологиялық құндылығы бар және ағынды суларды ең үлкен ластаушы болып табылатын сарысуды пайдалану мәселесі шешілген жоқ. Соңғы жылдары сарысуды өнеркәсіптік өңдеудің принципті жаңа бағыты белсенді және мақсатты түрде қалыптасты - мақсатты өнімдер болып табылатын туынды компоненттерді, атап айтқанда, алкогольді өндіру. Сарысуды жеткіліксіз өңдеудің негізгі себептері сүт өнімдерінің маусымдық сипаты және оның концентрациясының жеткіліксіздігі болып табылады. Тасымалдау мен өңдеуге байланысты қиындықтарға байланысты (сүт өндіру деңгейінің төмендеуі, тасымалдаудың, жабдықтың құнының өсуі және т.б.) сарысудың бір бөлігі пайдаланылмайды және кәріз жүйелерінде, сондай-ақ апатты жағдайларда (сондай-ақ тазарту жүйелерінің жоқтығы немесе жетілмегендігі) - қоршаған ортаға. Тазарту құрылыстарының құны және су айдындарына сарысуды ағызудан келетін зиян оны өнеркәсіптік өңдеу мәселесін өзекті етеді. Сарысуды өнеркәсіптік өңдеу қалдықсыз технология принциптерін жүзеге асыруға, толық азық-түлік пен жемшөп ресурстарын көбейтуге, өндірістің рентабельділігін қамтамасыз етуге және қоршаған ортаның ластануын жоюға мүмкіндік береді [2].

Жоғарыда айтылғандарға байланысты, осы салада қайталама шикізатты пайдалану мәселесін шешумен байланысты сүт өндірісін жасылдандыруды жүргізу қажет деп қорытынды жасауға болады.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Сүт қышқылды өнімдердің микробтық алуантүрлілігін зерттеу және ашытқылардың таза дақылын бөліп алу әдісі

Зерттеу объектісі ретінде алынған сүт өнімдерінің микробтық алуантүрлілігі тығыз қоректік орталарға егу әдісі (Кох әдісі) арқылы анықталды. Әдістің мәні зерттеліп отырған суспензияны Петри табақшасына қатты қоректік ортаға егіп, өскен колонияларды санау болып табылады (Сурет 7). Кохтың қағидасы бойынша мұндағы әр колония бір клетканың көбею нәтижесі ретінде саналады. Зерттелетін суспензияның белгілі көлемін қатты қоректік ортаға егу арқылы өсіп шыққан колониялардың саны негізінде бастапқы құрамында қанша микроорганизм клеткалары болғандығын айтуға мүмкіншілік береді. Көбінесе Кох әдісі бойынша жүргізілген микроорганизмдерді сандық анықтау нәтижелерін клетка саны арқылы емес, колония түзетін бірлік (КТБ) ретінде көрсетеді.

Егу 3 кезеңнен тұрады: сұйылту дайындау, Петри табақшасына тығыз қоректік орталарға отырғызу, өскен колонияларды санау.

Сұйылту дайындау. Сұйылтуды стерильді құбыр суында, сұйылтудың тұрақты коэффициентін пайдалана отырып дайындайды, әдетте бұл коэффициент 10 санына тең.

Сұйылту дайындау үшін стерилді құбыр суын стерилді құрғақ пробиркаларға 9 мл-ден құяды. Одан кейін стерилді пипетканың көмегімен алынған бастапқы суспензияның 1 мл-ін 9 мл стерилді суы бар пробиркаға құяды, бұл бірінші сұйылту, 1:10. Бірінші сұйылтудан алынған суспензияны жаңа стерилді пипеткамен араластырады. Осы пипеткамен алынған суспензияның 1 мл алып, екінші пробиркаға көшіреді, бұл екінші сұйылту, 1:100. Осылайша қалған сұйылтуларды дайындалады.

Петри табақшасына егу. Суспензияны беттік және тереңдік әдістермен егуге болады. Беттік әдіспен егу алдында стерилді Петри табақшаларға ерітілген қоректік ортаны 20-30 мл-ден құяды. Егуді белгілі сұйылтудан жүргізеді. Стерилді пипеткамен сәйкес сұйылтудың белгілі көлемін 0,1 мл енгізеді. Суспензияны қоректік орта бетіне Дригальский шпателінің көмегімен жаяды. Табақшаларды термостатқа 28-30 С температурасында бірнеше күнге қалдырады.

Өскен колонияларды санау. Өсу жылдамдығына байланысты Петри табақшасында өскен колониялардың санын дақылдаудың 1-15 тәулігінен кейін санайды. Табақшадағы колониялардың орташа санын анықтайды да формула бойынша 1 мл-дегі клеткалар санын есептейді:

$$M = \frac{a \times 10^n}{V} \quad (1)$$

мұндағы, M – 1 мл-дегі микроорганизм клеткаларының саны; a – Петри табақшасындағы микроорганизмдер колониясының орташа саны; 10 – сұйылту коэффициенті; n – егу жүргізілген сұйылтудың реттік саны; V – егуге алынған суспензия көлемі [23].

Ашытқы дақылдарының морфология-культуралдық қасиеттерін зерттеу және идентификациялау әдісі

Ашытқы дақылдарын идентификациялау ITS (генералық транскрипцияланатын аймақ) тікелей нуклеотидтер тізбегін анықтау әдісімен, содан кейін Gene Bank халықаралық деректер базасында сақталған тізбектермен нуклеотидтік сәйкестікті анықтау арқылы жүргізілді.

Геномдық ДНҚ өндірушінің хаттамасына (Invitrogen, Carlsbad, USA) сәйкес PureLink Genomic DNA Kit ДНҚ-ны оқшаулауға арналған жинақтың көмегімен бактериялардың тәуліктік өсірінділерінен бөлінді. Үлгілердегі ДНҚ концентрациясы Qubit® 2.0 флуориметрінде Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Oregon, USA) жиынтығының көмегімен анықталды. Генетикалық маркер ретінде рРНҚ-ның 16S генінің бөлімі қолданылды. 16s учаскесін күшейту үшін РНҚ 25 мкл реакция қоспасын дайындады: 12,5 µl Q5® hot Start High-Fidelity 2x Master Mix (New England Biolabs Ins., USA); әмбебап праймерлер жұбы: 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3') және 806r (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') [Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M., Velasco E., Ruiz J., Vila J. Outbreak of infection with Acinetobacter strain RUH 1139 in an intensive care unit // Infection Control and Hospital Epidemiology. - 2006. - Vol. 27. - P. 397-404.] 10 µM концентрацияда 1,2 мкл; ДНҚ матрицасы және су 25 µl дейін. Амплификация режимі келесі циклдерден тұрды: 5 минут ішінде 95°C, содан кейін: 95°C – 30 секунд, 55°C – 40 секунд, 72°C – 50 сек - 30 цикл; 10 минут ішінде 72°C кезінде элонгация.

ПТР – өнімді тазарту CleanSweep™ PCR Purification (Life Technologies, Carlsbad, CA) реагентінің көмегімен жүргізілді.

Бактериялардың 16S rRNA генінің фрагменттерін ретке келтіру өндірушінің хаттамасына сәйкес Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, АҚШ) жиынтығын қолдана отырып жүргізілді (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol қолданбалы Biosystems, АҚШ), содан кейін фрагменттерді 3500 DNA Genetic Analyzer генетикалық анализаторында бөлді (Applied Biosystems, Hitachi, Tokyo Japan).

Секвенирлеу нәтижелері SEQ (қолданбалы Biosystems) бағдарламасында өңделді. 16S rRNA гендерінің гомологиялық нуклеотидтік тізбегін іздеу АҚШ Ұлттық биотехнологиялық ақпарат орталығының Gene Bank халықаралық деректер базасында BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) бағдарламасы арқылы жүзеге асырылды.

Филогенетикалық талдау MEGA 6 бағдарламалық жасақтамасын қолдану арқылы жүргізілді [Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics*. Vol. 5 No 2. 150-163. June, 2004. [PubMed]. Нуклеотидтер тізбегін туралау ClustalW алгоритмін қолдана отырып жүргізілді. Филогенетикалық туыстарды анықтау BLASTN Neighbor-Joining (NJ) Altschul әдісі арқылы жүргізілді [18].

Ашытқы дақылдарының сүт сарысуында өсу динамикасын зерттеу

Ашытқы дақылдарының 7 тәулік өсу динамикасын зерттеу барысында, өскен ашытқы дақылдарының жалпы саны Кох әдісі арқылы анықталды.

Жасушалық дақыл өзінің тығыздығын, жағдайын және т.б. анықтай алатын белгілі бір оптикалық қасиеттерге ие. Бактериалды немесе эукариоттық дақыл жасушалары жағдайында оптикалық тығыздығын 600 нм аралығында өлшеу, ортадағы жасушалар концентрациясын көрсетеді. Оптикалық тығыздықты өлшеу спектрофотометр көмегімен жүргізіледі.

Дозатормен алынған штамм суспензиясының кюветадағы көлемі 1 мл болды. *Totulopsis kefir var kumis* T17, *Kluuveromyces marxianus* SH1, *Kluuveromyces marxianus* A11, *Saccharomyces cerevisiae* M1 штамдарының оптикалық тығыздығын өлшеу барысында толқын ұзындығы 585 нм-ді құрады [24].

Бредфорд әдісі - ерітіндідегі ақуыздарды сандық анықтаудың колориметриялық әдістерінің бірі. Биохимик Марион Бредфорд 1976 жылы ұсынған. Марион Бредфорд Әдісі: үлгінің көлемі сумен 0.5 мл дейін жеткізіледі; 0.5 мл реагент қосылады; араластырылып және бояудың дамуы күтіледі; OD600 нанометрінде өлшелінеді [25].

Статистикалық өңдеу әдісі

Ғылыми-зерттеу жұмысының маңызды көрсеткіші оның тиімділігі болып табылады. Жұмыстың тиімділігі жалпылауға жарамды және жаңа ақпарат алуға ықпал ететін жағдайларда жоғары мәндерге қол жеткізуге болады. Жүргізілген зерттеулердің тиімділігі көбінесе экспериментті жоспарлау, қою және өткізу сапасымен, сондай-ақ алынған нәтижелерді талдау тереңдігімен анықталады. Зерттеулерді жүргізуде аталған барлық кезеңдер бірдей маңызды рөл атқарады.

Көбінесе «орташа» деп аталатын орташа арифметикалық мән барлық мәндерді қосу және осы соманы үлгідегі мәндер санына бөлу арқылы алынады. Мұны алгебралық формула арқылы көрсетуге болады. x айнымалысының n бақылау жиынын $x_1 x_2 x_3 \dots, x_n$ түрінде көрсетуге болады. Орташа арифметикалық шаманы анықтау формуласы келесідей белгіленеді:

$$x = \frac{x_1+x_2+x_3+\dots+x_n}{n} \quad (3)$$

Вариацияны немесе дисперсияны сипаттайтын дәлірек көрсеткіш арифметикалық орташа мәннің айналасындағы опция-орташа квадраттық мән. Ол популяцияның жеке бірліктерінің сипаттамалық мәндерінің арифметикалық ортадан ауытқуын қарастыруға негізделген. Бұл жағдайда нұсқалардың арифметикалық орташадан ауытқуын орташалау әдісі қолданылады, бұл олардың алгебралық қосындысының нөлге тең болуына байланысты қиындықты жеңуге мүмкіндік береді. Бұл тәсіл азайтатын есептеу квадраттар ауытқулар нұсқалардың орташа кейіннен усреднением. Орташа квадраттық ауытқу (σ) - дисперсияның квадрат түбірі [11]:

$$\sigma = \sqrt{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 f_1}{\sum f_1}} \quad (4)$$

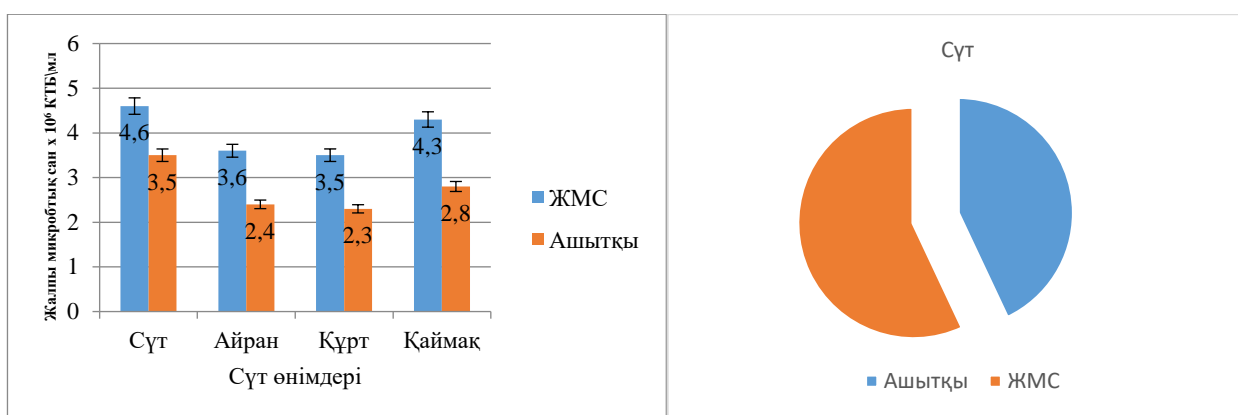
Нәтижелер және оларды талқылау

Сүт қышқылды өнімдердің микробтық алуантүрлілігін зерттеу және ашытқылардың таза дақылын бөліп алу

Сүт және сүтқышқылды өнімдерд көптеген микроорганизмдердің дамуына қолайлы қоректік орта болып табылады. Сүт өнімдерінің микрофлорасын спецификалық және спецификалық емес деп бөліп қарастыруға болады. Сүт және сүт өнімдерінің спецификалық микрофлорасына сүтқышқылдық және пропионқышқылдық ашу процестерін қоздыратын сүтқышқылды бактериялар, пропион қышқылды бактериялар жатады. Сонымен қатар сүтқышқылды өнімдерде спирттік ашу процесінің қоздырғыштары лактоза ыдыратушы ашытқы саңырауқұлақтар кездеседі. Сүтқышқылды өнімдерді алу негізгі микроорганизмдердің белсенділігімен байланысты микробиологиялық процестерге негізделеді.

Сүт және сүт өнімдерінде кездесетін ашытқылардың негізгі түрлері лактоза ыдыратушы ашытқылар - *Saccharomyces lactis*, *Zygosaccharomyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Debaryomyces* және *Torulopsis kefir*, *Torulopsis sphaerica*, *Candida pseudotropicalis* жатады [3].

Зерттеу жұмысының барысында сиыр сүтінің және үй жағдайында дайындалған қаймақ, айран, құрт өнімдерінің микробтық алуантүрлілігі зерттелінді. Сүт өнімдерінің микрофлорасын анықтау Сабуру және ЕПА қоректік орталарында жүргізілді (Сурет 1).



Сурет 1 – Сүт өнімдерінің жалпы микрофлорасының сандық және сапалық көрсеткіштері

1 суретте көрсетілгендей, сиыр сүтінің және үй жағдайында дайындалған айран, қаймақ, құрт өнімдерінің үлгілерінің жалпы микробтық алуантүрлілігі зерттелінді. Сиыр сүтінің жалпы микробтық саны – $4,6 \times 10^6$ КТБ/мл, ашытқылардың саны – $3,5 \times 10^6$ КТБ/мл құраса, айран үлгілерінде жалпы микробтық сан – $3,6 \times 10^6$ КТБ/мл, ашытқылардың саны – $2,4 \times 10^6$ КТБ/мл тең болды. Қаймақ үлгілерінде жалпы микробтық саны – $4,3 \times 10^6$ КТБ/мл, ашытқылардың саны – $2,8 \times 10^6$ КТБ/мл, ал құрт үлгілерінде жалпы микробтық саны – $3,5 \times 10^6$ КТБ/мл, ашытқылардың саны – $2,3 \times 10^6$ КТБ/мл болатындығы анықталды.

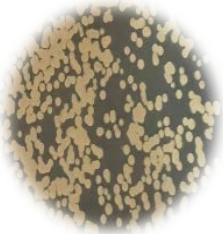
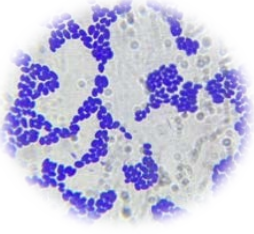
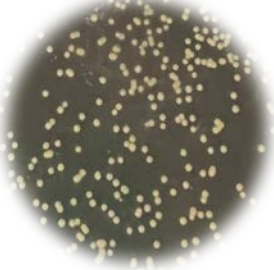
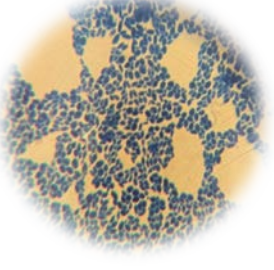
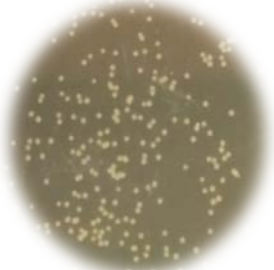
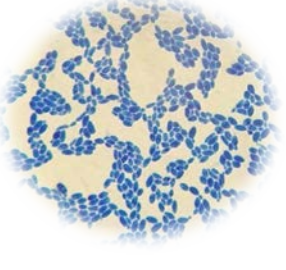
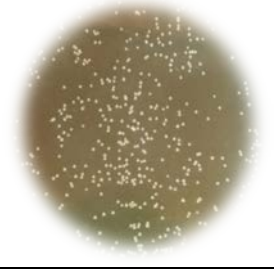
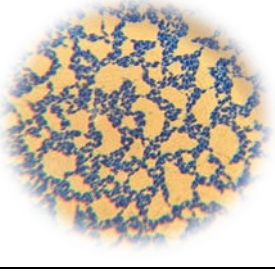
Зерттеу жұмысының мәні сүт өнімдерінде ашытқылардың кездесетінін анықтау, нәтижесінде зерттеуге алынған сүт өнімдерінен – сиыр сүті, қаймақ және құрттан ашытқы дақылдарының жаңа 3 таза дақылы бөлініп алынды.

Ашытқы дақылдарының морфология-культуралдық қасиеттерін зерттеу және идентификациялау

Сүт және сүтқышқылды өнімдерден бөлініп алынған ашытқыларының 3 таза дақылдарының морфологиялық және культуралдық қасиеттері зерттелініп, колониялары

ерекшеліктері сипатталып, макроморфологиясы мен микроморфологиясы (1-кестеде) көрсетілген.

Кесте 1 - Сүт өнімдерінен бөлініп алынған ашытқы дақылдарының морфология – культуральдық қасиеттері

Дақыл	Колония морфологиясы	Макро морфологиясы	Клетка морфологиясы
АП		Пішіні -дөңгелек. Беті – тегіс. Жанынан көрінісі – тегіс. Жылтырлығы – мөлдір. Түсі – ақ. Шеті-тегіс. Құрылысы– біртекті.	
М1		Колония пішіні-дөңгелек, түсі- ақшыл, беті- тегіс, шеті-тегіс, құрылымы-біртекті болды. Клетка пішіні сопақша формалы, ашытқылар	
T17		Колония пішіні-дөңгелек, шеңбер тәрізді. мөлшері- 1 мм, нүктелік, тегіс, томпақ, мөлдірлігі- колония жарқыраған, мөлдір.түсі-ақшыл сары, шеті- тегіс, толқынды. құрылымы- ұсақ н/е ірі түйіршікті. Консистенциясы-шырышты, созылмалы.	
SH1		Ашытқы колониялары ұсақ, пішіні- дөңгелек, түсі- ақшыл, беті- тегіс, шеті-тегіс, құрылымы-біртекті болды.	

1-кестеде ашытқы дақылдарының микроскопиялық көрінісі көрсетілген, Микроскоптау барысында ашытқы клеткаларының бір-біріне жақын орналасқаны және клеткалардың формалары сопақша, жұмыртқа тәрізді болатындығы анықталды.

Зерттеудің мәні зерттеу объектісі ретінде алынған сүт өнімдерінде ашытқылардың кездесетіндігін анықтау мақсатында жүргізілді. Бөлініп алынған ашытқы дақылдарының морфология-культуральдық қасиеттері зерттелінді. Нәтижесінде, зертеу объектісі ретінде

алынған сиыр сүті өнімінен –SH1, құрттан - M1, қаймақтан - A11 ашытқы штамдары бөлініп алынды.

Өртүрлі сүт өнімдерінен бөлініп алынған ашытқылардың 3 таза дақылдарының молекулалық-гентикалық қасиеттер ізерттелініп. ПТР әдісі арқылы түрлерге дейін идентификация жүргізілді.

Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) - биологиялық материалда (сынамада) нуклеин қышқылының белгілі бір фрагменттерінің (атап айтқанда ДНҚ) шағын концентрациясының айтарлықтай өсуіне қол жеткізуге мүмкіндік беретін молекулалық биология әдісі. ДНҚ-ны күшейтуден басқа, ПТР нуклеин қышқылдарымен көптеген басқа манипуляциялар жасауға мүмкіндік береді (мутацияларды енгізу, ДНҚ фрагменттерін біріктіру) және биологиялық, медициналық тәжірибеде кеңінен қолданылады, мысалы, ауруларды диагностикалау (тұқым қуалайтын, жұқпалы), әке болуды анықтау, гендерді клондау, жаңа гендерді оқшаулау [12].

Ашытқы дақылдарын идентификациялау барысында анықталған ITS аймақтың нуклеотидтік тізбектері көрсетілген.

Kluyveromyces marxianus A11

CGTCTGAACAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCAGTTCTTGATTCTCTGCTAT
CAGTTTTCTATTTCTCATCCTAAACACAATGGAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCC
TGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAATATTTTGTATTATGAAAA
ACTATTATACTATAAAAATTTAATATTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTG
AATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCAGGGGGGCATGCCTG
TTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTCTCG
GGTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAG
TCTATGGACTCGACTCTTGACATCTACGTCTTAGGTTTTCGCCAATTCGTGGTAAGC
TTGGGTCATAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAG
GCATACGGCTTTAACCAAACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCC
GCTGAACTTAAGCATATCAATAG

Saccharomyces cerevisiae M1

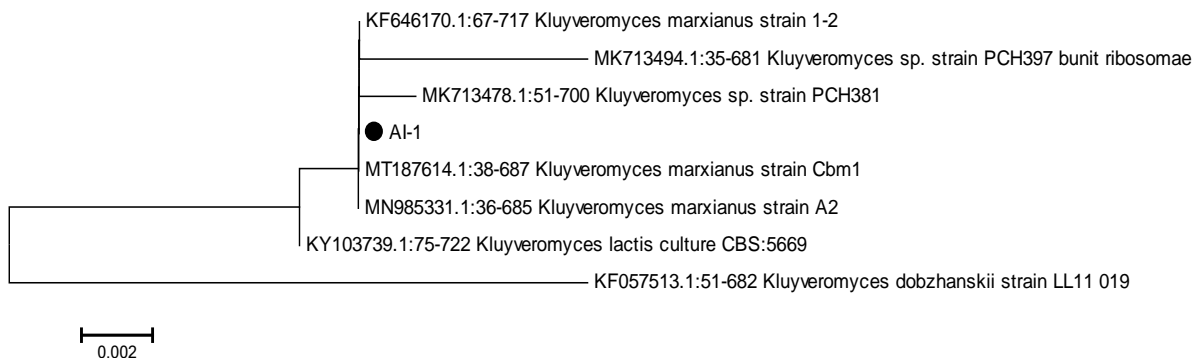
CGTCTGAACAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCAGTTCTTGATTCTCTGCTAT
CAGTTTTCTATTTCTCATCCTAAACACAATGGAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCC
TGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAATATTTTGTATTATGAAAA
ACTATTATACTATAAAAATTTAATATTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTG
AATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCAGGGGGGCATGCCTG
TTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTCTCG
GGTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAG
TCTATGGACTCGACTCTTGACATCTACGTCTTAGGTTTTCGCCAATTCGTGGTAAGC
TTGGGTCATAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAG
GCATACGGCTTTAACCAAACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCC
GCTGAACTTAAGCATATCATA

Kluyveromyces marxianus SH1

CGTCTGAACAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCAGTTCTTGATTCTCTGCTAT
CAGTTTTCTATTTCTCATCCTAAACACAATGGAGTTTTTTCTCTATGAACTACTTCCC
TGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAATATTTTGTATTATGAAAA
ACTATTATACTATAAAAATTTAATATTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTG
AATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCAGGGGGGCATGCCTG
TTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTCTCG

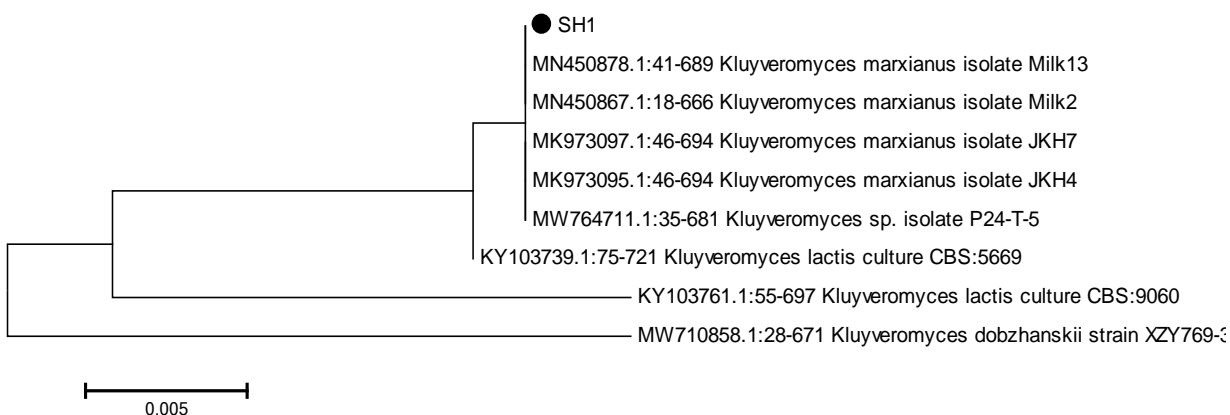
GGTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAG
 TSTATGGACTCGACTCTTGACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGC
 TTGGGTCATAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAG
 GCATACGGCTTTAACCSSAAACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCC
 GCTGAACTTAAGCATATCATA

Филогеникалық талдау жүргізіліп, ашытқы дақылдары түрге дейін анықталды (Сурет 2, 3, 4).



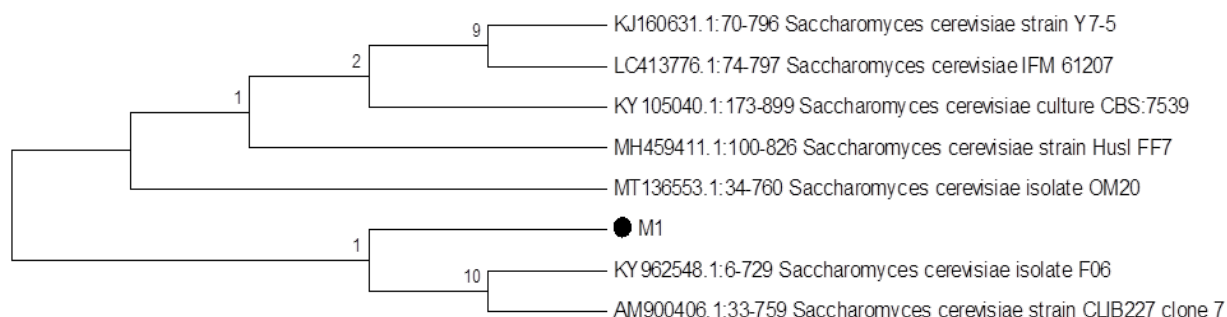
Сурет 2 – *Kluyveromyces marxianus* AI1 штамының филогенетикалық ағашы

2 суретте көрсетілгендей, айран өнімінен бөлініп алынған AI1 ашытқы штамының *Kluyveromyces marxianus* түріне жататындығы анықталды.



Сурет 3 – *Kluyveromyces marxianus* SH1 штамының филогенетикалық ағашы

3 суретте сиыр сүтінен бөлініп алынған SH1 ашытқы штамының филогенетикалық ағашы көрсетілген. SH1 ашытқы дақылының *Kluyveromyces marxianus* түріне жататындығы анықталды.



Сурет 4 – *Saccharomyces cerevisiae* M1 штамының филогенетикалық ағашы

4 суретте *Saccharomyces cerevisiae* ашытқы штамының филогенетикалық ағашы көрсетілген. M1 ашытқы дақылының *Saccharomyces cerevisiae* түріне жататындығы анықталды.

Зеттеу жұмыстардың нәтижесінде сүт өнімдерінен бөлініп алынған ашытқылардың 3 таза дақылдары молекула-генетикалық ПТР әдістері арқылы түрге дейін идентификацияланды, қорытындысы 2 - кестеде көрсетілген.

Кесте 2 – Сүт өнімдерінен бөлініп алынған ашытқылардың таза дақылдарының молекулалық-генетикалық идентификациясы

№	Сынаманың атауы	Түрдің атауы
1	АІІ	<i>Kluveromyces marxianus</i> - АІІ
2	М1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - М1
3	SH1	<i>Kluveromyces marxianus</i> - SH1

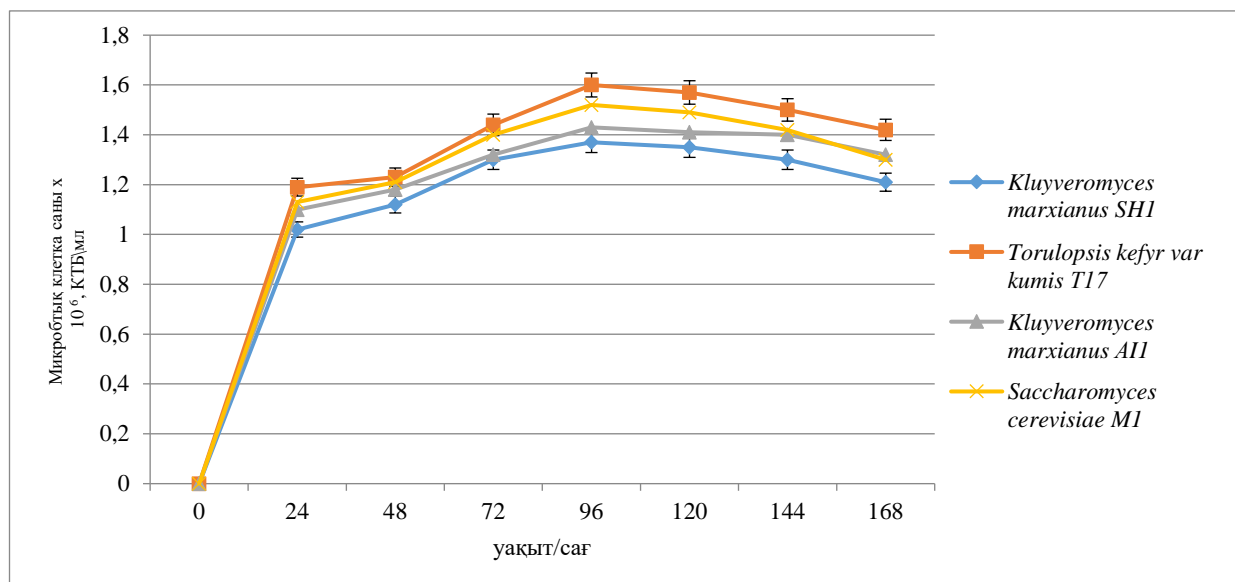
Ашытқы дақылдарының морфология-культуральдық қасиеттері дәстүрлі әдістер және молекула-генетикалық қасиеттері ПТР-анализі бойынша зерттелініп және осы әдістердің нәтижесі бойынша ашытқы штамдары *Kluveromyces marxianus* - АІІ, *Saccharomyces cerevisiae* - М1, *Kluveromyces marxianus* - SH1 түрге дейін идентификацияланды.

Ашытқы дақылдарының сүт сарысуында өсу динамикасын зерттеу

Сүт сарысуы – сүтті өңдеу арқылы сүзбе мен ірімшікті ажыратып, бөліп алғаннан кейін қалатын қалдық өнім. Сүт сарысуының құрамы шамамен 93%-ы судан тұрады.

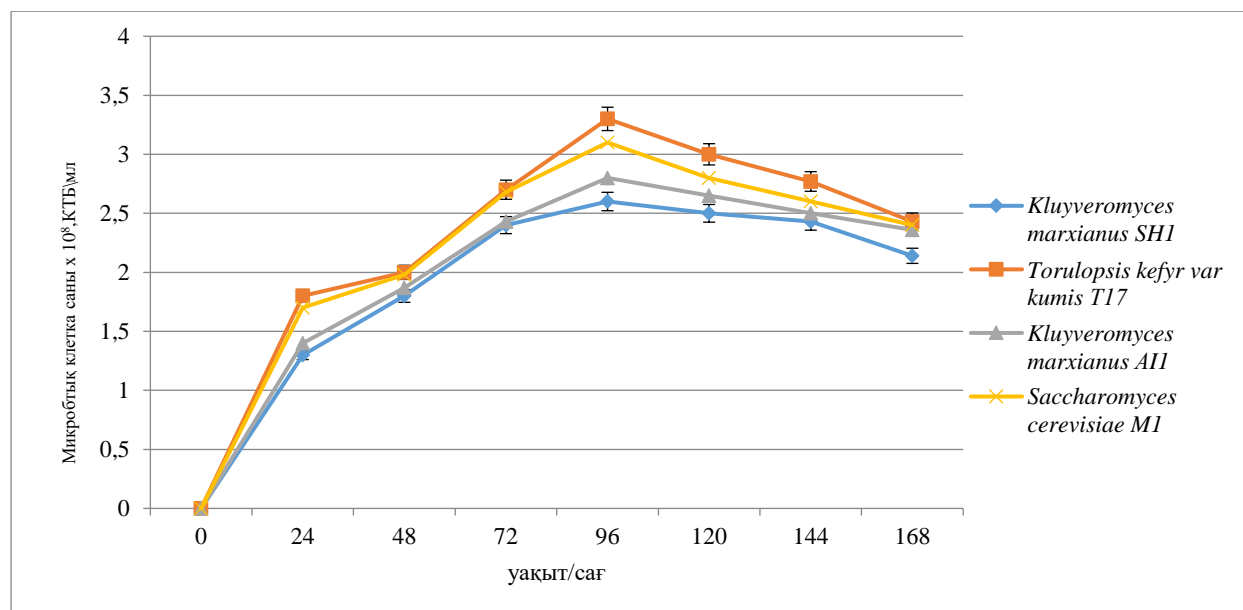
Сарысудың құрғақ заты негізінен лактозадан немесе сүт қантынан тұрады. Сүт сарысуының құрамында никотин қышқылы, холин, биотин, В тобының, А, Е, С дәрумендері және кальций, магний кездеседі. Сүт сарысуының бай биологиялық құндылығына байланысты оны өндірістік мақсатта субстрат ретінде тиімді пайдалануға болады [7].

Зерттеу барысында сүт қышқылды өнімдерден бөлініп алынған - *Kluveromyces marxianus* SH1, *Kluveromyces marxianus* АІІ, *Saccharomyces cerevisiae* М1 ашытқы таза дақылдарының және ҚазҰУ биотехнология кафедрасының коллекциялық штамы – *Torulopsis kefir var kumis* T17 қалыпты және оптимизацияланған сүт сарысуында өсу динамикасы 7 тәулік бойы зерттелінді(Сурет 5, 6).



Сурет 5 – Ашытқы дақылдарының қалыпты сүт сарысуында өсу динамикасы

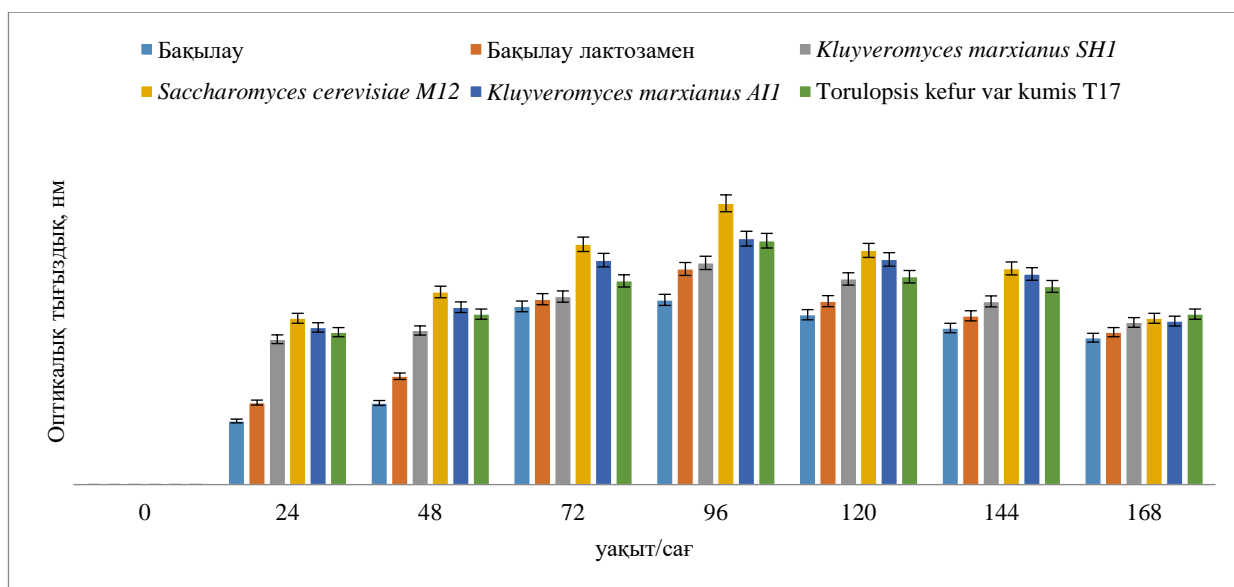
5 суретте зерттеуге алынған ашытқы штамдарының қалыпты сүт сарысуында өсу динамикасы көрсетілген. Суреттен көргеніміздей, ашытқы штамдары үшін ең белсенді өсу уақыты – 96 сағатта тіркелді. *Kluyveromyces marxianus SH1* ашытқы штамы үшін ең максималды мән – $1,37 \times 10^6$ КТБ\мл, *Kluyveromyces marxianus A11* – $1,43 \times 10^6$ КТБ\мл, *Saccharomyces cerevisiae M1* – $1,52 \times 10^6$ КТБ\мл, *Torulopsis kefir var kumis T17* – $1,6 \times 10^6$ КТБ\мл құрады.



Сурет 6 – Ашытқы дақылдарының оптимизацияланған сүт сарысуында өсу динамикасы

6 суретте ашытқы дақылдарының оптимизацияланған сүт сарысуында өсу динамикасы көрсетілген. Ашытқы дақылдарның барлығы 96 сағатта белсенді өсу динамикасын көрсетті. Оптимизацияланған сүт сарысуында *Kluyveromyces marxianus SH1* ашытқы штамы үшін ең максималды мән – $2,6 \times 10^8$ КТБ\мл, *Kluyveromyces marxianus A11* – $2,8 \times 10^8$ КТБ\мл, *Saccharomyces cerevisiae M1* – $3,1 \times 10^8$ КТБ\мл, *Torulopsis kefir var kumis T17* – $3,3 \times 10^8$ КТБ\мл құрады құрады.

Ашытқы дақылдарының оптимизацияланған сүт сарысуында биомасса жинау қабілеттілігі 7-тәулік аралығында, бөлме температурасында тербеткіш жағдайында жүргізілді (Сурет 7).



Сурет 7 – Ашытқы дақылдарының оптимизацияланған сүт сарысуында биомасса жинау қарқындылығы

7 суретте көрсетілгендей, барлық ашытқы дақылдарының 96 сағатта ең белсенді биомасса жинау қабілеттілігіне ие екенін байқай аламыз. Ең белсенді биомасса жинау қабілеттілігін - *Saccharomyces cerevisiae* M1 2,03 нм тең болды.

Зерттеу нәтижесінде ашытқы дақылдарының қалыпты жағдайдағы сүт сарысуына қарағанда, оптимизацияланған сүт сарысуында белсенді өсу динамикасын көрсететіні анықталды.

Соңғы жылдары экологияның шамадан тыс ластануы, мұнай бағасының артуы және шикізат қорының азаюы биоэтанол өндірісінің сұранысын арттыруда. Қазіргі кезде биоэтанол өндірісі дамып, оны өндірудің әртүрлі технологиялары, шикізат, субстрат көздері табылуда.

Қорытынды

Зерттеу объектілері ретінде алынған сүт өнімдерінен бөлініп алынған ашытқы дақылдарының және сүт сарысуын биоэтанол өндірісінде тиімді қолдануға болады.

Алынған нәтижелер келесі қорытындыларды жасауға мүмкіндік береді:

1. Сүт өнімдерінің жалпы микрофлорасы зерттелініп, сиыр шикі сүтінің жалпы микробтық саны - $4,6 \times 10^6$ КТБ/мл, ашытқылардың саны - $3,5 \times 10^6$ КТБ/мл құрады, қаймақ өнімінде жалпы микробтық саны - $4,3 \times 10^6$ КТБ/мл, ашытқылардың саны - $2,8 \times 10^6$ КТБ/мл болатындығы анықталды. Сүт өнімдерінен ашытқылардың 3 таза дақылдары бөлініп алынды.

2. Сүт өнімдерінен бөлініп алынған таза ашытқы дақылдарын *Kluveromyces marxianus* SH1, *Kluveromyces marxianus* A11, *Saccharomyces cerevisiae* M1 түрге дейін идентификацияланды.

3. Ашытқы дақылдарының оптимизацияланған сүт сарысуда *Saccharomyces cerevisiae* M1 штамының өсу динамикасы *Kluveromyces marxianus* SH1 мен *Kluveromyces marxianus* A11, *Torulopsis kefir* var kumis T17 штамдарына қарағанда белсенді екені анықталды.

Қаржыландыру

Зерттеу жұмысы әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-де жүзеге асырылып жатқан AP09258285 «Иммобилизацияланған ашытқы дақылдары негізінде сүт сарысуында ашытқыларды үздіксіз ферментациялау жолымен биоэтанол алу» жобасы аясында жүргізілді (2021-2023).

Әдебиеттер:

- 1 Zafar S, Owais M. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem Eng J*, 2006, 27:295-298 (<https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.05.009>)
- 2 Mabel K., Nafisatu B., Oluwaseyi A. Probiotics Potential of Yeast and Lactic Acid Bacteria Fermented Foods and the Impact of Processing: A Review of Indigenous and Continental Food Products. *Advances in Microbiology*, 2020, 10(9), (<https://doi.org/10.4236/aim.2020.109037>)
3. Marlene B., Lucília D. *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation. *Biotechnology Advances*, 2020, 60: 65-220 (<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108027>)
- 4 Arora R., Behera S., Sharma N.K., Kumar S. A new search for thermotolerant yeasts, its characterization and optimization using response surface methodology for ethanol production. *Front. Microbiol.*, 2015, 6:1-16 (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00889>)
- 5 Adnan, N. A., Suhaimi, S. N., Abd-aziz, S., Hassan, M. A., and Phang, L.Y. Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. *Renew. Energy*, 2014, 66: 625–633 (<https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.032>)
- 6 Netrusov A.I. *Praktikum po mikrobiologii*. M.: Akademiya, - 2005. - 608. (<https://library.tou.edu.kz/fulltext/buuk/b3190.pdf>)
- 7 Scully, S. M., and Orlygsson, J. Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. *Bioenergies*, 2015, 8:1–30 (<https://doi.org/10.3390/en8010001>)
- 8 Tofighi, A., Assadi, M. M., Asadirad, M. H. A., and Karizi, S. Z. Bio-ethanol production by a novel autochthonous thermo-tolerant yeast isolated from wastewater. *J. Environ. Health Sci. Eng.*, 2014, 12:1–6 (<https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-107>)
- 9 Gabardo S, Rech R, Rosa CA, Ayub MAZ. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renew Energy*, 2014, 69:89-96 (<https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.03.023>)
- 10 Kaur R, Panesar P.S, Singh R.S. Utilization of Whey for the Production of β -Galactosidase Using Yeast and Fungal Culture. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2015, 9:690-694 (<http://scholar.waset.org/1307-6892/10001706>)
- 11 Avchar R., Lanjekar V., Baghela A. Bioprospecting thermotolerant yeasts from distillery effluent and molasses for high-temperature ethanol production. *J. Appl. Microbiol.*, 2022, 132: 1134-115 (<https://doi.org/10.1111/jam.15288>)
- 12 Cabañas. K.T., Peña-Moreno I.C., Parente D.C., García A.B., Gutiérrez R.G. de Morais M.A. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* isolates for ethanol production in the presence of inhibitors. *Biotech*, 2019, 9:1-11 (<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1541-3>)