

ӨЖ 633.1

Г.А. Утегенова, С.Б. Оразова, С.А. Джокебаева, Т.А. Карпенюк, А.В. Гончарова, Я.С. Цуркан
 Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
 *E-mail: altyn-ai91@bk.ru

Практикалық қолданылуын бағалау үшін Қазақстан суқоймаларынан бөліп алынған микробалдырлар липидтерін талдау

Қазақстанның әртүрлі суқоймаларынан бөліп алынған және зертханалық жағдайда тұрақты белсенді өсуімен ерекшеленген микробалдырлардың 16 штамының липидтік фракциясы майқышқылдық құрамының салыстырмалы талдауы жасалды. Жасыл микробалдырлардың үш түрі (*Oocystis rhomboideus*, *Chlorococcum infusionum*, *Dictyochlorella globosa*) және диатомды балдырлардың 3 түрі (*Synedra* sp., *Nitzshia* sp., *Pleurosigma attenuatum*) липидтердің жоғары мөлшерімен сипатталады және полиқанықпаған май қышқылдарының көзі ретінде зерттеу үшін болашағы зор деп есептеледі.

Түйін сөздер: жасыл микробалдырлар, диатомды балдырлар, липидтер, май қышқылдары, полиқанықпаған май қышқылдары.

G.A. Utegenova, S.B. Orazova, S.A. Dzhokebaeva, T.A. Karpenyuk, A.V. Goncharova, Ya.S. Tzurkan
Analysis of microalgae lipids isolated from basin of Kazakhstan, to assess the prospects of practical use

It was analyzed of fatty acid composition of 16 strains of microalgae lipid fractions isolated from different basins of Kazakhstan and characterized by stable active growth in the laboratory. Three species of green microalgae (*Oocystis rhomboideus*, *Chlorococcum infusionum*, *Dictyochlorella globosa*) and three species of diatoms (*Synedra* sp., *Nitzshia* sp., *Pleurosigma attenuatum*) are characterized by a high content of lipids and are promising for further study as a source of polyunsaturated fatty acids.

Keywords: green microalgae, diatoms, lipids, fatty acids, polyunsaturated fatty acids.

Г.А. Утегенова, С.Б. Оразова, С.А. Джокебаева, Т.А. Карпенюк, А.В. Гончарова, Я.С. Цуркан
Анализ липидного состава микроводорослей, выделенных из различных водоемов Казахстана, для оценки их практического применения

Проведен сравнительный анализ жирнокислотного состава общей липидной фракции 16 штаммов микроводорослей, выделенных из различных водоемов Казахстана и отличавшихся активным ростом в лабораторных условиях. Установлено, что три вида зеленых микроводорослей (*Oocystis rhomboideus*, *Chlorococcum infusionum*, *Dictyochlorella globosa*) и 3 вида диатомей (*Synedra* sp., *Nitzshia* sp., *Pleurosigma attenuatum*) отличались повышенным содержанием общих липидов и полиненасыщенных жирных кислот, поэтому рекомендуются для дальнейших исследований.

Ключевые слова: зеленые микроводоросли, диатомовые микроводоросли, липиды, жирные кислоты, полиненасыщенные жирные кислоты.

Микробалдырлар метаболизмінің ерекшелігіне байланысты биотехнологияның маңызды объектілерінің бірі болып табылады [1]. Тіршілік ету барысында балдырлар әртүрлі биологиялық белсенді заттарды синтездейді және жинақтайды. Мұндай заттардың көптегені, негізінде, витаминдер, липидтер, белоктар, көмірсулар – маңызды тағамдық және фармакологиялық өнімдер. Көптеген балдырлардың липидтері биологиялық белсенділікке ие – микробқа қарсы, вирусқа қарсы, қабынуға қарсы, антиокси-

данттар. Балдырлар липидтері адам ағзасы үшін бағалы полиқанықпаған май қышқылдарының көзі ретінде қызығушылық туғызады.

Микробалдырлардың құрылымдық-функционалдық ерекшеліктері және энергетикалық потенциалын белгілейтін липидтер микробалдырлар негізін құрайды [2,3]. Культивирлеудің белгілі бір жағдайларында микробалдырлардың кейбір түрлері құрғақ массасына есептегенде 80%-ға дейін липид жинақтай алады. Бұл көрсеткіш көптеген майлы дәнді-дақылдар құрамындағы липид

мөлшерінен жоғары. Липидтер құрамындағы поликанықпаған май қышқылдары және олардың өнімдері физиологиялық белсенділікке ие, сүтқоректілер үшін ауыстырылмайтын болып табылады және тек микробалдырларда синтезделеді [4]. Липидтердің май қышқылдық құрамы көптеген микробалдырлар түрлерінде анықталған, әсіресе әртүрлі микробалдырлар түрлері мен класс өкілдері қаныққан, моноенді және полиенді май қышқылдық құрамы бойынша ажыратылады. Осыған байланысты және микробалдырлар биомассасын өндірістік көлемде өндіру мақсатымен липидтік құрамды зерттеу көптеген зерттеушілер назарын тартады. Жергілікті климаттық жағдайларға жақсы бейімделген, қосылыстардың үлкен көлемін өндіруге қабілетті, биотехнологиялық қызығушылықты туғызатын, тұрақты және тез өсетін жоғары өнімділікке ие микробалдырлар штамдарын іздеу өзекті міндеттердің бірі.

Зерттеу материалдары және әдістері

Зерттеу объектілері Қазақстанның әртүрлі суқоймаларынан бөліп алынған және әл-Фараби атындағы ҚазҰУ Экология проблемалары институтындағы бірклеткалы балдырлар коллекциясында сақталатын микробалдырлар культуралары болып табылады.

Зерттеу жұмысында пайдаланылған микробалдырлар түрлері:

Жасыл микробалдырлар:

Oocystis rhomboideus, *Selenastrum gracilis*, *Nautococcopsis constricta*, *Scenodermus acutiformis*, *Chlorococcum infusionum*, *Dictyochlorella globosa*, *Chlorella sp.*, *Cladophora globulina*, *Chlorococcum sp.*

Диатомды микробалдырлар:

Pinnularia sp., *Pleurosigma attenuatum*, *Nitzshia sp.*, *Navicula sp.*, *Achanthes hauckiana*, *Synedra sp.*, *Fragillaria sp.*

Бірге болатын бактериялардан балдырларды тазартуға цефазолин, стрептомицин, пенициллин, гентамицин, линкомицин және меркацин қолданылды [5,7]. Тәжірибе үшін алынған культуралар 16 сағаттық фотопериодта, жинақтаушы режимде өсірілді. Ерітінді бетіндегі жарық қарқындылығы 8 кЛк болды. Органың температурасы +20-25°C аралығында ауытқыды. Қоректік орта ретінде Фитцджеральд ортасы пайдаланылды.

Тәжірибе соңында культуралардың құрғақ массасы, тәжірибе алынатын күні 750 нм (жасыл микробалдырлар) және 420 нм (диатомды микробалдырлар) толқын ұзындығында культураның оптикалық тығыздығы анықталды. Оптикалық тығыздық бірлігін абсолюттік құрғақ масса өлшеміне (АҚМ) ауыстыру үшін $k = 0,78 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{бірлік.опт. тығызд.}^{-1}$ коэффициенті, яғни $АСВ = k \cdot D$ қолданылды [8].

Микробалдырлар клеткаларынан липидтерді экстракциялау модифицирленген М. Кейтс әдісімен іске асырылды [9]. Балдырлар клеткалары кептірілді, содан кейін ферменттерді салмағы 0,1-0,2 г. сынамаларда 15 минут бойы +80°C температурада изопропил спиртпен алдынала дезактивтендірді. Сынамалар хлороформ-метанол (1:1) қоспасымен гомогенизделді.

Жалпы липидтер бейтарап, глико- және фосфолипидтерге силикагельдегі бағаналы хроматография әдісімен ажыратылды [10].

Газ хроматографияны жасау үшін май қышқылдарының этил эфирлері пайдаланылды [11,12]. Май қышқылдарының эфирлерін хроматографиялық ажырату GC-2010 Plus (Shimadzu Жапония) газ хроматографында жүргізілді. Буландырғыш температурасы +250°C, детектордікі +250°C, бағаналардікі +90°C болды. Бағдарламалау 5°C /мин 240 дейін, изотерма 40 мин. Хроматограммаларды өңдеу – GC Solution.

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Зерттеуге зертханалық жағдайда тұрақты белсенді өсуімен ерекшеленген альгологиялық таза 9 жасыл және 7 диатомды микробалдырлар алынды. Олар Қазақстан суқоймаларынан алынған су үлгілерінен бөліп алынды. Микробалдыр штамдарының аксеникалық культураларын алу үшін антибиотиктердің бірнеше түрі (цефазолин, стрептомицин, пенициллин, гентамицин, линкомицин, меркацин) пайдаланылды. Антибиотиктердің эффективті концентрациясы әрбір штам үшін таңдап алынды. Биомассаны жинақтап алу үшін балдырлар бірдей жағдайларда люминостапта 14 тәулік бойы өсірілді. Бұл уақыт бастапқы стационарлы өсу фазасына сәйкес. Содан кейін жасыл және диатомды микробалдырлар культураларының жалпы липидтік құрамы анықталынды (1-кесте). Нәтижелерді талдау липидтердің ең көп мөлшері келесі микробалдыр культураларында

анықталғандығын көрсетті: диатомды – *Nitzshia sp.*, *Synedra sp.*, *Pleurosigma attenuatum*, жасыл – *Oocystis rhomboideus*, *Chlorococcum infusionum*, *Dictyochlorella globosa*.

Липидтердің төмен мөлшері *Navicula sp.*,

Pinnularia sp. диатомды микробалдырлары культураларында белгіленді. Зерттелген басқа микробалдыр түрлерінде липид мөлшері $16,31 \pm 1,1$ (*A. hauckiana*) бастап $5,50 \pm 1,1$ г/100 г құрғақ салмағына (*C. globulina*) дейін ауытқып тұрды.

1-кесте – 14 тәулік өсірілгеннен кейінгі диатомды және жасыл микробалдырлар клетка культураларындағы липидтердің әртүрлі кластарының мөлшері

| Микробалдыр түрлері | 100 г құрғақ биомассасына есептегендегі липидтер мөлшері, г | | | |
|-------------------------|---|-------------------|---------------|---------------|
| | жалпы липидтер | бейтарап липидтер | гликолипидтер | фосфолипидтер |
| Диатомды | | | | |
| <i>A. hauckiana</i> | 16,31±1,1 | 5,23±1,9 | 4,31±0,7 | 0,31±0,05 |
| <i>Navicula sp.</i> | 0,50±0,01 | 0,20±0,01 | 0,10±0,01 | 0,10±0,01 |
| <i>Pinnularia sp.</i> | 0,42±0,02 | 0,20±0,04 | 0,10±0,05 | 0,09±0,01 |
| <i>Nitzshia sp.</i> | 21,62±2,3 | 9,45±0,2 | 1,98±0,03 | 0,24±0,06 |
| <i>Synedra sp.</i> | 22,45±1,3 | 11,74±2,1 | 2,04±0,2 | 0,51±0,01 |
| <i>P. attenuatum</i> | 20,58±2,4 | 4,53±0,7 | 4,94±0,5 | 0,41±0,01 |
| <i>Fragilaria sp.</i> | 6,34±0,9 | 2,84±0,5 | 1,87±0,01 | 0,97±0,04 |
| Жасыл | | | | |
| <i>S. acutiformis</i> | 16,09±0,5 | 9,56±0,9 | 2,38±0,2 | 1,67±0,06 |
| <i>O. rhomboideus</i> | 26,72±3,1 | 17,68±2,1 | 2,13±0,01 | 1,11±0,01 |
| <i>C. globulina</i> | 5,50±1,1 | 2,25±0,8 | 1,13±0,03 | 0,13±0,07 |
| <i>Chlorella sp.</i> | 5,60±0,8 | 1,90±0,01 | 0,84±0,05 | 0,21±0,09 |
| <i>Ch. infusionum</i> | 22,83±2,1 | 12,61±0,5 | 5,04±0,07 | 1,13±0,04 |
| <i>D. globosa</i> | 23,4±2,7 | 11,74±0,7 | 0,50±0,06 | 0,8±0,02 |
| <i>Chlorococcum sp.</i> | 8,85±0,9 | 4,47±0,01 | 1,87±0,09 | 1,11±0,01 |
| <i>N. constricta</i> | 13,9±1,4 | 8,21±2,3 | 3,21±1,1 | 1,1±0,07 |
| <i>S. gracilis</i> | 12,5±1,1 | 7,65±2,7 | 2,13±0,8 | 1,1±0,08 |

Тәжірибе арқылы диатомды микробалдырлардың үш түрі (*Oocystis rhomboideus*, *Chlorococcum infusionum*, *Dictyochlorella globosa*) және жасыл микробалдырлардың үш түрі (*Synedra sp.*, *Nitzshia sp.*, *Pleurosigma attenuatum*) липидтердің жоғары мөлшерімен (құрғақ массасына есептегенде 20%-дан астам) ерекшеленетіндігі анықталды.

Кейінгі талдауларға алынған микробалдырлар липидтік фракциясының ішіндегі маңыздылары – фосфолипидтер мен гликолипидтер

мембраналардың негізгі компоненттері, сондай-ақ бейтарап резервтік липидтерде май қышқылдары жинақталады. Бұл май қышқылдары клеткалық бөліну процестерін, мембрандық статус және басқа метаболиттік алмасуларды энергетикалық қамтамасыз ету үшін қажет. Микробалдырлардың липидтік фракцияларындағы функционалды маңыздылары екі немесе одан да көп байланыстары бар полиқаньқаған май қышқылдары болып табылады. Сондықтан талдауға алынған

культуралардағы липидтердің жеке топтары анықталды. *Dictyochlorella globosa*, *Nautococopsis constricta*, *Selenastrum gracilis* және микробалдырлардың басқа түрлерінің клетка культураларынан экстракцияланған липидтерден жеке кластарды ажырату үшін силикагельдегі бағаналы хроматография әдісі пайдаланылды. Әртүрлі ерітінділердің көмегімен бейтарап липидтердің, фосфо- және гликолипидтердің фракциялары алынды (1-кесте). Зерттелген барлық микробалдырлардың липидтерінде басым бөлігі бейтарап липидтер, содан кейін мөлшері жағынан гликолипидтер фракциялары, ал ең төменгі пайыздық көрсеткіш фосфолипидтер үлесінде болды. Жалпы липидтер мөлшерінің көптігімен сипатталатын диатомды балдырлардың клеткаларында бейтарап липидтер: гликолипидтер:

фосфолипидтер арақатынасы *Nitzshia sp.*-да 39:8:1, *Synedra sp.*-да 23:4:1, *Pleurosigma attenuatum* – 10:10:1 болды. Жалпы липидтерінің мөлшері жоғары жасыл балдырлардың үш түрі үшін бұл арақатынас 17:2:1 (*O. rhomboideus*), 14,6:0,6:1 (*D. globosa*) және 12:5:1 (*C. infusionum*) көрсетті.

Жалпы липидтерінің мөлшері жоғары 6 микробалдырлардың 3-еуінде, сондай-ақ *Scenodesmus acutiformis* культурасында биомассадағы жалпы липидтердің мөлшері 16 г/100 г құрғақ салмағына деп белгіленді. Майқышқылдық құрамының талдауы газ хроматография әдісімен анықталды. Май қышқылдық құрам, сондай-ақ микробалдырлардан бөліп алынған май қышқылдарын липидтердің әртүрлі топтарына ажырату бойынша алынған мәліметтер 2-кестеде берілген.

2-кесте – Микробалдырлар липидтерінің жалпы және жеке фракцияларындағы май қышқылдарының салыстырмалы мөлшері (%)

| Липидтер фракциясы | | Май қышқылдары | | | |
|--------------------|----------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| | | қаныққан | қанықпаған | моноенді | полиенді |
| Жалпы липидтер | <i>O.rhomboideus</i> | 35,78±1,3 | 64,22±1,9 | 22,39±1,4 | 41,84±1,9 |
| | <i>S.acutiformis</i> | 40,09±2,3 | 59,06±1,9 | 34,90±1,5 | 24,15±1,7 |
| | <i>Ch.infusionum</i> | 49,07±1,9 | 50,93±2,1 | 38,80±1,7 | 12,12±1,5 |
| | <i>Synedra sp.</i> | 36,05±2,1 | 63,95±2,9 | 50,45±3,1 | 13,50±1,9 |
| Бейтарап липидтер | <i>O.rhomboideus</i> | 25,02±0,9 | 74,98±1,5 | 36,16±1,1 | 38,82±0,8 |
| | <i>S.acutiformis</i> | 11,65±0,5 | 88,35±1,9 | 12,46±0,9 | 75,88±1,5 |
| | <i>Ch.infusionum</i> | 10,10±1,5 | 89,90±2,1 | 19,74±1,4 | 70,16±1,9 |
| | <i>Synedra sp.</i> | 6,29±0,1 | 93,71±3,1 | 18,33±1,2 | 75,38±2,4 |
| Фосфолипидтер | <i>O.rhomboideus</i> | анықтамадық | анықтамадық | анықтамадық | анықтамадық |
| | <i>S.acutiformis</i> | 28,83±0,9 | 71,18±1,9 | 50,97±2,1 | 20,21±1,9 |
| | <i>Ch.infusionum</i> | 24,07±2,0 | 75,93±3,1 | 59,76±2,4 | 16,17±1,1 |
| | <i>Synedra sp.</i> | 17,91±1,9 | 82,09±2,3 | 64,88±2,9 | 17,21±1,4 |
| Гликолипидтер | <i>O.rhomboideus</i> | анықтамадық | анықтамадық | анықтамадық | анықтамадық |
| | <i>S.acutiformis</i> | 36,12±2,0 | 63,88±2,9 | 41,54±1,9 | 22,34±1,3 |
| | <i>Ch.infusionum</i> | 37,43±1,9 | 62,57±2,9 | 34,57±1,5 | 28,01±1,1 |
| | <i>Synedra sp.</i> | 35,56±2,3 | 64,44±2,9 | 47,25±1,5 | 17,19±1,6 |

Алынған мәліметтер липидтердің жалпы фракциясында май қышқылдарының басым бөлігі қанықпаған қышқылдар екенін көрсетеді. Олардың үлесіне жалпы май қышқылдарынан

64% (*O.rhomboideus*, *Synedra sp.*), 59% (*S.acutiformis*) және 51% (*Ch.infusionum*) тиеді. Түрлер жалпы липидтер фракциясында берілген моно- және полиенді май қышқылдарының

арақатынасы бойынша ажыратылады. Мысалы, *O.rhomboides* түрінде басым бөлігі полиенді қышқылдар, ал басқа түрлерінде – моноенді май қышқылдары.

S.acutiformis, *Ch.infusionum*, *Synedra sp.* түрлерінің бейтарап липидтер фракциясында полиенді май қышқылдары көп (қанықпаған май қышқылдарының 70-75 %). Осы балдырлардың

липидтерінің қалған фракцияларында моноенді май қышқылдары басым кездеседі.

Алынған нәтижелер тәжірибеге алынған культуралар қанықпаған май қышқылдарының көзі ретінде кейінгі зерттеулер үшін болашағы бар екендігін көрсетеді.

Жұмыс Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің қаржылық қолдауымен орындалды.

Әдебиеттер

- 1 Hempel F., Bozarth A.S., Lindenkamp N., Klingl A., Zauner S., Linne U., Steinbüchel A., Maier U.G. Microalgae as bioreactors for bioplastic production // Microbial Cell Factories. – 2011. – No.10. – P.81-102
- 2 Gordon J.M., Polle J.E. Ultrahigh bioproductivity from algae // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – No.76. – P. 969-975.
- 3 Wenk M.R. The emerging field of lipidomics // Nature Reviews Drug Discovery. – 2005. – No.4. – P. 594-610.
- 4 Pahl S.L., Lewis D.M., Chen F., King K.D. Growth dynamics and the proximate biochemical composition and fatty acid profile of the heterotrophically grown diatom *Cyclotella cryptica* // Journal of Applied Phycology. – 2010. – No. 22. – P.165-171
- 5 Spencer C.P. On the use of antibiotics for isolating bacteria-free cultures of marine phytoplankton organisms // Journal of the marine biological association of the United Kingdom. – 1952. – Vol. 31, No. 1. – P. 97-106.
- 6 Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наукова думка, 1975. – 245 с.
- 7 Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: МГУ-Наука, 2004. – 525 с.
- 8 Тренкеншу Р.П., Геворгиз Р.Г., Боровков А.Б. Основы промышленного культивирования *Dunaliella salina* Теод.). – Севастополь : ЭКОСИ – Гидрофизика, 2005. – 103 с.
- 9 Кейтс М. Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 234 с.
- 10 Куксис А. Липиды. В кн. Хроматография. Практическое приложение метода / под ред. Э. Хефтмана. – М., 1986. – Ч.1. – С. 130.
- 11 ГОСТ Р 51486-99. Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот.
- 12 ГОСТ Р 51483-99. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме.