

3. При изучении химического состава данных растений мы фракционировали данные экстракты в различных органических растворителях и проводили тонкослойную хроматографию. При этом в экстракте чистотела нами обнаружен полярный алкалоид.

4. Для выявления флаваноида мы проводили сравнение результатов тонкослойной хроматографии с результатами жидкостной хроматографии. При этом установлено, что в фракции этилацетата ревеня и чистотела содержится флаваноид-гликозид рутин.

УДК: 582.26. 27

Б.К. Заядан, Д.К. Кирбаева, А.К. Садвакасова, К. Болатхан
СОДЕРЖАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
(КазНУ имени аль-Фараби, г. Алматы)

В работе представлены экспериментальные данные о совместном культивировании смешанных культур микроводорослей на модифицированных средах. Результаты эксперимента показали, что при культивировании смешанных культур микроводорослей на модифицированных средах наблюдается увеличение скорости роста клеток и, соответственно, с повышением биологически активных веществ по сравнению с контролем.

Создание мощной промышленности микробиологического синтеза способно обеспечить человека и животных белками, аминокислотами и физиологически активными соединениями. В этом аспекте наиболее перспективным и экономичным представляется массовое выращивание микроводорослей, позволяющее осуществлять микробиологический синтез ценных органических соединений за счет энергии света и углекислоты в больших масштабах, т.к. давно доказано, что автотрофный путь биосинтеза является более эффективным в отношении получения биомассы, чем гетеротрофный. Особый интерес заслуживают протококковые водоросли, в частности хлорелла и сцендесмус, обладающие уникальными составами и не требующие особых условий для выращивания [1; 2].

В настоящий момент одним из самых перспективных направлений в области исследования микроводорослей является создание препаратов растительного происхождения, удачно сочетающих высокую активность и мягкое действие на организм человека с минимальными побочными эффектами.

Удобрительные и питательные свойства фототрофных микроводорослей хлореллы, сцендесмуса обусловлены высоким содержанием в них белков жиров витаминов и микроэлементов. Урожайность биомассы микроводорослей чрезвычайно велика [3; 4].

В связи с этим целью исследований являлась разработка технологии массового культивирования производственно-ценных штаммов смешанных культур микроводорослей (*Chlorella vulgaris* Z-1 и *Scenedesmus obliquus* var. *obliquus*) на стандартной и модифицированных средах для получения биологически активных веществ.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись микроводоросли *Chlorella vulgaris* Z-1 и *Scenedesmus obliquus* var. *obliquus* из коллекции из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры микробиологии КазНУ им. аль-Фараби.

Штаммы микроводорослей культивировали на жидких питательных средах 04 в лабораторном фотобиореакторе в контролируемых условиях при освещении лампами интенсивностью 4000-5000 люкс, температуре 23-25⁰С.

С целью перемешивания культуру барботировали воздухом, освобожденным от CO₂ последовательным пропусканием через раствор щелочи. Контроль над темпом роста и размножением микроводорослей в культуре осуществляли на основании учета изменений их численности и биомассы с помощью камеры Горяева [5].

Содержание общего белка в биомассе определяли методом Лоури, пигментов – по спектрам поглощения ацетоновых экстрактов, регистрируемых с помощью спектрофотометра Specord UV-VIS [6, 7].

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента нами изучена динамика роста клеток и накопления биомассы при культивировании смешанных культуры *Chlorella vulgaris* Z-1 и *Scenedesmus obliquus* var. *obliquus* на разных оптимизированных средах в течение 10 суток. Для эксперимента питательная среда 04 была модифицирована внесением концентраций экстракта куриного помета (10%) и бикарбоната натрия 0,2 г.

Смешанные культуры микроводорослей культивировали следующих средах:

Варианты опыта:

№1 вариант стандартная среда 04 (контроль);

№2 вариант среда 04 с экстрактом куриного помета (5%+ 0,2г NaHCO₃);

№3 вариант среда 04 с экстрактом куриного помета (10%+0,2г NaHCO₃);

Исходное число клеток смешанных штаммов *Chlorella vulgaris* Z-1 и *Scendesmus obligus var. obligus* составило 0,1x10⁶ кл/мл (Рисунок 1).

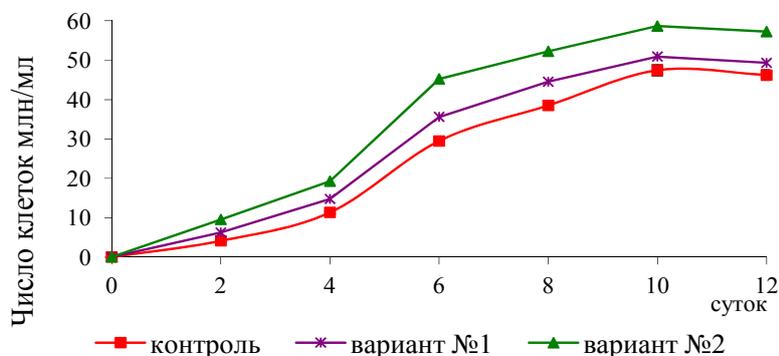


Рисунок 1 - Динамики роста клеток смешанных культуры микроводорослей на оптимизированных средах

Как видно из рисунка 1, на 10 суток выращивания микроводорослей в лабораторной установке число роста клеток в контроле достигло 47,4x10⁶ кл/мл, тогда как в вариантах №1 и №2 эти показатели составляет 50,9x10⁶ и 58,6x10⁶ кл/мл.

В эти же сроки нами определялось накопление биомассы клеток смешанных культур. Установлено, что вес сухой биомассы смешанных штаммов в контроле достиг величины – 3,2 г/л, тогда как в варианте №1 накопление биомассы составило 3,5 г/л, а в варианте №2 этот показатель составил 4,1 г/л.

Таким образом, установлено, что при совместном культивировании клеток микроводорослей на питательной среде 04 с добавлением экстракта куриного помета (10%) и бикарбоната натрия с концентрацией 0,2 мг/л наблюдается увеличение скорости роста клеток по сравнению с контролем.

Далее нами определялось содержание хлорофиллов «а» и «в» в биомассах смешанных культур *Chlorella vulgaris* Z-1 и *Scendesmus obligus var. obligus* за 10 сутки при культивировании в биореакторе (Таблица 1).

Таблица 1 – Накопление хлорофиллов (а и в) в биомассе смешанных культур микроводорослей при массовом культивировании

Варианты	мг/л	
	хлорофилл а	хлорофилл в
контроль	1,9±0,02	1,1±0,01
опыт	2,5±0,06	1,4±0,03

Анализируя состав пигментов можно увидеть, что по сравнению с контрольными вариантам в опытном варианте, наблюдается самое высокое содержание пигментов: хлорофилла «а» - 1,9 мг/л, хлорофилла «в» - 1,1 мг/л, в контроле эти цифры составляют хлорофилла «а» - 2,5 мг/л, хлорофилла «в» - 1,4 мг/л соответственно.

Таким образом, при культивировании смешанных культур микроводорослей на питательной среде с добавлением экстракта куриного помета в концентрации 10% и 0,2 г NaHCO₃ наблюдается увеличение скорости роста клеток и, соответственно, повышение количества хлорофиллов по сравнению с контролем.

Известно, что количество пигментов в клетках находится в тесной взаимосвязи с условиями роста организмов. Особенно его количество увеличивается при внесении азотных удобрений. Среди большого числа биологически активных соединений практический интерес представляют водорастворимые белки и пигменты (каротиноиды, β-каротин), имеющие огромное значение и практический интерес как для фармации и медицины, так и пищевой промышленности и косметологии. Далее нами изучалось содержание общего белка в биомассе при совместном

культивировании микроводорослей. Для получения конечного продукта культивировании смешанных культур микроводорослей проводили на лабораторной установке. Показатели содержания общего белка в смешанных культур клеток микроводорослей - *Chlorella vulgaris* Z-1 и *Scenedesmus obliquus* var. *obliquus* при выращивании их в лабораторном биореакторе, в контролируемых условиях сравнивались с таковыми в контроле на стандартной среде 04 (Рисунок 2)

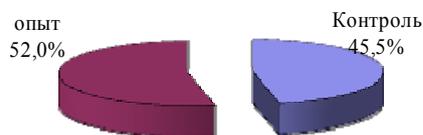


Рисунок 2 – Накопление белка в биомассе смешанных культур микроводорослей на модифицированных средах

Исследование накопления общей биомассы микроводорослей в течение 14 суток при росте на стандартной и на модифицированных средах выявило следующее: в 1-варианте (контроль) белок составляет 45,5%, во 2-варианте – 52,0%

Данные о содержании общей каротиноидов и β-каротина в смешанных культур микроводорослей получавших в течение 14 дня биомассе представлены в рисунке 3.

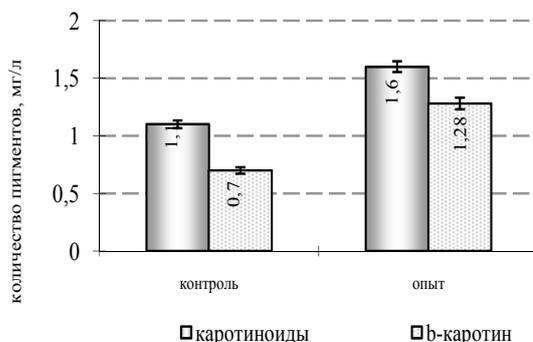


Рисунок 3 – Накопление каротиноидов и β каротина в биомассе смешанных культур микроводорослей. Как видно из рис. 3, химический анализ биомассы показал, что при внесении в среду 10% экстракта куриного помета и бикарбоната натрия в среде 0,2 мг/л наблюдаются значительные изменения.

Так, содержание каротиноидов и β-каротина увеличилось в 2 раза и составило: 1,6 мг/г – каротиноидов, 1,28 мг/г - β-каротина, по сравнению с контролем (каротиноидов -0,9 мг/г и β-каротина - 0,7 мг/г).

Таким образом, в проведенные нами исследования показали, что при совместном культивировании смешанных культур микроводорослей на модифицированных средах может накапливать в своих клетках огромное количество пигментов (каротиноидов и β-каротин) и является самым богатым из известных в настоящее время природных источников провитамина А.

1. Soeder C. J. Massive cultivation of microalgae: results and prospects // Hydro- biologia. - 1980. - Vol. 72. - P.197-209.
2. Селяметов Р.А., Якубов Х.Ф. К изучению витаминного состава хлореллы и сценедесмуса. - В кн.: Культивирование водорослей и высших водных растений в Узбекистане. Ташкент: Фан, 1971, с. 59-60.
2. Жубанова А.А., Заядан Б.К. Перспективы использования микроводорослей в биотехнологии, // Биотехнология. Теория и практика, 2002, N4, стр. 63-70.
4. Мельников С.С. Хлорелла: Физиологически активные вещества и их использование / С.С. Мельников, Е.Е. Мананкина - Минск: Наука тэхніка, 1991. 79 с.
5. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. - Киев: Наукова думка, 1975. - 247с.
6. Becker E. W. Biotechnology and exploitation of the green alga *Scenedesmus obliquus* // Indian Biomass. – 1984. - Vol. 4. - P.1-19.
7. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / Под редакцией Скурихина И.М., Тутельяна В.А. - Москва, 1998. -342 с.

Жұмыста модификацияланған ортада өсірген микробалдырлардың аралас дақылдарының тәжірибелік көрсеткіштері берілген. Тәжірибелік нәтижелер бойынша модификацияланған ортада өскен микробалдырлардың аралас дақылдарының клеткаларының өсу жылдамдығы мен биологиялық белсенді заттары бақылауға қарағанда жоғарылағаны анықталды.

The experimental data combined cultivation of are mixed cultures of microalgae on the modified environments. Presented the results of experiment show that during the cultivation of the mixed cultures of microalgae on the modified environments were observed speed enhancing of cell growth and accordingly with the increase of bioactive substances as compared with control.

А.А. Зорина, Н.С. Степанченко, Г.В. Новикова, Д.А. Лось

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА И ФОСФОПРОТЕОМИКА СТРЕССОВЫХ ОТВЕТОВ У ЦИАНОБАКТЕРИЙ

(Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, e-mail: losda@ippras.ru)

В работе рассматриваются проблемы идентификации систем восприятия и передачи сигналов стрессовых ответов у цианобактерий с применением методов ДНК-микрочипов и фосфопротеомики.

Современные методы исследования экспрессии генов, помимо традиционных РНК-ДНК гибридизации, обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией и др., предполагают использование ДНК-микрочипов для изучения транскрипции генов и масс-спектрометрический анализ белков для изучения и идентификации продуктов трансляции соответствующих генов. Применение ДНК-микрочипов и масс-спектрометрии в сочетании с методами направленного мутагенеза позволяют с высочайшей точностью определять влияние той или иной мутации на транскрипцию генов или на посттрансляционные модификации белков. Это особенно важно при изучении систем восприятия и передачи стрессовых сигналов или сигналов об изменении параметров окружающей среды, которые состоят, как правило, из протеинкиназ и протеинфосфатаз, осуществляющих фосфорилирование и дефосфорилирование белков, и таким образом регулирующих их активность.

Двухкомпонентные системы регуляции состоят из сенсорной гистидинкиназы (Hik) и регулятора ответа (Rre) и формируют центральное ядро фосфатной сигнальной системы у цианобактерий [1]. Сенсорная гистидинкиназа воспринимает изменения в окружающей среде через сенсорный домен. Изменения его конформации приводят к автофосфорилированию Hik по консервативному остатку гистидина с использованием донорной АТФ. Фосфат затем переносится на консервативный аспартат получающего домена белка – регулятора ответа Rre. После фосфорилирования, Rre также меняет свою конформацию, в результате чего приобретает способность связываться с ДНК. Связывается он обычно с промоторами генов, локализованных далее по курсу всей цепочки пути адаптации, связанного с генной экспрессией.

У цианобактерии *Synechocystis* имеется 47 генов, кодирующих гистидинкиназы, и 45 генов регуляторов ответа. Соответствующие этим генам белки являются кандидатами на роль сенсоров и передатчиков сигналов об изменении окружающей среды [2]. Как правило, инактивация генов, кодирующих белки-сенсоры и/или передатчики, приводит к невозможности запуска ряда генов стрессовых ответов, поэтому применение ДНК-микрочипов в данном случае способно дать однозначный ответ на вопрос о том, какие гены контролируются той или иной сенсорной гистидинкиназой. С использованием ДНК-микрочипов были идентифицированы сенсоры низкой (Hik33) и высокой (Hik34) температуры, солевого и гиперосмотического стресса (Hik2, Hik10, Hik16, Hik41), двухкомпонентная система, регулирующая транспорт ионов марганца при их недостатке (Hik27-Rre16) и некоторые другие [3-6].

В отличие от сенсорных гистидинкиназ, серин-треониновые протеинкиназы эукариотического типа у прокариот участвуют в регуляции основных физиологических процессов (подвижность клеток, метаболизм при повышенных температурах и т.п. [2, 7]). Мутации по генам серин-треониновых протеинкиназ редко приводят к видимым нарушениям в транскрипции генов и чаще выражаются в неспособности фосфорилирования отдельных белков. Такие изменения невозможно определить на уровне транскрипции даже с помощью микрочипов, и для их определения более подходят методы фосфопротеомики – определение профилей фосфорилирования по серину и треонину с помощью двумерного электрофореза с последующей идентификацией белков методами масс-спектрометрии.

Примером такого определения может служить фосфопротеомный анализ субстратов серин-треониновых протеинкиназ у *Synechocystis* при тепловом стрессе. В геноме *Synechocystis* имеется 12 генов, кодирующих серин-треониновые протеинкиназы. Мутантные штаммы, полученные по каждому из этих генов, исследовались на предмет их способности фосфорилировать белки по остаткам серина и треонина в нормальных условиях роста и при тепловом стрессе. Методом MALDI-TOF были