

Краткий отчет



Университет:	Satbayev University
Название:	Nile Red бояғышын пайдалана отырып, микробалдырлар жасушаларында ТАГ-ты бағалау хаттамасын әзірлеу.
Автор:	Тағайев Асилхан Ибрагимович.
Координатор:	Даурен Ботбаев
Дата отчета:	2019-05-06 05:33:47
Коэффициент подобия № 1: ?	5,5%
Коэффициент подобия № 2: ?	1,7%
Длина фразы для коэффициента подобия № 2: ?	25
Количество слов:	3 539
Число знаков:	27 140
Адреса пропущенные при проверке:	
Количество завершенных проверок: ?	23



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

Количество выделенных слов 1

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы

Тагайев Асилхан Ибрагимович

Nile Red бояғышын пайдалана отырып, микробалдырлар жасушаларында ТАГ-
ты бағалау хаттамасын әзірлеу

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

5B070100 – «Биотехнология» мамандығы

Алматы 2019

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы



ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ

БТ кафедра меңгерушісі

PhD, профессор

Түйебахова З.К.

«06» мамыр 2019 ж.

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Nile Red бояғышын пайдалана отырып, микробалдырлар жасушаларында ТАГ-ты бағалау хаттамасын әзірлеу»

5B070100 – «Биотехнология» мамандығы бойынша

Орындаған

Тагайев А.И.

Ғылыми жетекші

жар. ғыл. магистрі,

Ботбаев Д.М.

«06» мамыр 2019 ж.

Алматы 2019

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Биотехнология» кафедрасы

5B070100 – «Биотехнология»



БЕКІТЕМІН

БТ кафедра меңгерушісі

PhD, профессор

Туйебахова З.К

«06» мамыр 2019 ж.

**Дипломдық жұмыс орындауға
ТАПСЫРМА**

Білім алушы Тағайев Асилхан Ибрагимович

Тақырыбы Nile Red бояғышын пайдалана отырып, микробалдырлар жасушаларында ТАГ-ты бағалау хаттамасын әзірлеу.

Университет ректорының 2018 жылғы « 16 » қазан № 1163-б бұйрығымен бекітілген

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі 06.05.2019 жылы

Дипломдық жұмыстың бастапқы берілістері Диплом алды өнеркәсіптік практикадан алынған материалдар

Дипломдық жобада қарастырылатын мәселелер тізімі:

а) Nile Red бояғышын қолдану арқылы ТАГ бағалау хаттамаларына шолу;

ә) Қолданыстағы хаттамаларды салыстырмалы талдау;

б) Nile Red бояғышын пайдалана отырып, ТАГ бағалау хаттамасын жетілдіру бойынша ұсыныстар;

в) Алынған зерттеу нәтижелерінің практикалық мәнін бағалау.

Ұсынылатын негізгі әдебиет: 20 атау

Дипломдық жұмысты дайындау
КЕСТЕСІ

Бөлімдер атауы, қарастырылатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекші мен кеңесшілерге көрсету мерзімдері	Ескерту
Әдебиетке аналитикалық шолу	қаңтар	
Материалдар мен әдістер	ақпан	
Зерттеу қорытындылары: лабораториялық жұмыстар	наурыз	

Дипломдық жұмыс бөлімдерінің кеңесшілері мен норма бақылаушының аяқталған жұмысқа қойған
қолтаңбалары

Бөлімдер атауы	Кеңесшілер, аты, әкесінің аты, тегі (ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған күні	Қолы
Әдебиетке аналитикалық шолу	жар.ғыл.магистрі Ботбаев Д.М.	6.05.19.	
Материалдар мен әдістер	жар.ғыл.магистрі Ботбаев Д.М.	6.05.19.	
Зерттеу қорытындылары: лабораториялық жұмыстар	жар.ғыл.магистрі Ботбаев Д.М.	6.05.19.	
Норма бақылау	Ғылыми магистрі Тұрғымбаева Қ.Қ.	06.05.19	

Ғылыми жетекші Ботбаев Д.М.

Тапсырманы орындауға алған білім алушы Тагайев А.И.

Күні «06» мамыр 2019 ж.

АНДАТПА

«Nile Red бояғышын пайдалана отырып, микробалдырлар жасушаларында ТАГ-ты бағалау хаттамасын әзірлеу» атты дипломдық жұмыс қағаз түрінде 25 беттен тұрады. Жұмыс кіріспеден, 3 бөлімнен, қорытындыдан, 7 суреттен және 4 кестеден, 22 ғылыми мақалалар мен оқу құралдары көрсетілген тізімнен тұрады.

Мақсаты. Триацилглицерол өндірісі үшін *Dunaliella salina* және *Chlorella vulgaris* дақылдаудың оңтайлы, тиімді жағдайларын анықтау болып табылады.

Бұл жұмыста триацилглицеролдың табиғатта таралуы және қолданылуы туралы шолу жасалады. Микробалдырлардан триацилглицеролды алу жолдары көрсетілген. Оңтайлы культивирлеу жағдайларын анықтау үшін түрлі параметрлер қолданылды.

Нәтижесінде нақты *Dunaliella salina* және *Chlorella vulgaris* культурасын өсіруге арналған температура мен жарықтандыру анықталды.

Түйін сөздер: *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, микробалдырлар, триацилглицерол, дақылдау

АННОТАЦИЯ

Дипломная работа «Разработка протокола оценки содержания ТАГ в клетках микроводорослей с использованием красителя Nile Red» на бумажном носителе состоит из 23 страниц. Работа состоит из введения, 3 разделов, заключения, 7 рисунков и 4 таблиц, списка с указанием 22 научных статей и учебных пособий.

Цель. Определение оптимальных условий культур *Dunaliella salina* и *Chlorella vulgaris* для производства триацилглицерола.

Эта работа делает обзор о распространении и применении триацилглицерола в природе. Показаны способы получения триацилглицерола из микроводорослей. Для определения оптимальных условий культивирования использовались различные виды.

В результате была выявлена электрическая освещенность температуры и результат для выращивания конкретной культуры *Dunaliella salina* и *Chlorella vulgaris*.

Ключевые слова: *dunaliella salina*, *chlorella vulgaris*, микроводоросли, триацилглицерол, культивирование

ANNOTATION

The diploma work "Development of a Protocol for the assessment of TAG content in microalgae cells using Nile Red dye" on paper consists of 23 pages. The work consists of an introduction, 3 sections, conclusion, 7 figures and 4 tables, a list of 22 scientific articles and textbooks.

Purpose. Determination of optimal conditions of *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris* cultures for triacylglycerol production.

This work provides an overview of the distribution and application of triacylglycerol in nature. Methods for obtaining triacylglycerol from microalgae are shown. Different species were used to determine optimal cultivation conditions.

The result was revealed the electrical light and temperature result, for the cultivation of specific cultures *Dunaliella salina* and *Chlorella vulgaris*.

Key words: *dunaliella salina*, *chlorella vulgaris*, microalgae, triacylglycerol, culture

МАЗМҰНЫ

	Кіріспе	9
1	Әдебиетке шолу	10
1.1	ТАГ құрылысы мен қасиеті	10
1.2	ТАГ қолданысы	11
1.3	ТАГ алу жолдары	11
1.4	Микробалдырлардан ТАГ алу кезеңдері	13
1.5	Nile Red және оның қасиеттері	13
1.6	Nile Red қолданысы	13
2	Материалдар мен әдістер	14
2.1	Дақылдауға арналған қоректік орта	14
2.1.1	ТАР қоректік ортасын дайындау	14
2.1.2	HSM қоректік ортасын дайындау	15
2.2	Қолданылатын <i>D.salina</i> және <i>Ch.vulgaris</i> штаммдары	16
3	Зерттеу нәтижелері	19
3.1	<i>D.salina</i> және <i>Ch.vulgaris</i> штаммының зертханалық жағдайдағы өсу динамикасы	19
3.2	Қоректік ортадағы азот концентрациясының ТАГ жиналуына әсер етуі	20
3.3	Nile Red бояғышы көмегімен ТАГ интенсивтілігін бақылау	20
	Қорытынды	22
	Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	23

КІРІСПЕ

Өзектілігі: Қазіргі кезде биотехнологиялық нысан ретінде микробалдырлар өндірісте қолданылуда. Олардан көбінесе терапиялық ақуыздар, биожанармай және биологиялық белсенді заттар (БЗД) алынады. Сонымен қатар, түрлі бір жасушалы балдырлардан пигменттер алу технологиясы қалыптасқан.

XXI ғасырдағы глобальді проблеманың бірі болып, биожанармай және оның өндірісі болып табылады. Осы биожанармай өндіріс бағытындағы негізгі көздерінің бірі болып - триацилглицерол (ТАГ) саналады. Ол табиғи липид болып табылады. Бұл липидті біз микробалдырлардан өндірістік масштабта кеңінен синтездесек болады.

Микробалдырлардан көлікке арналған отынды алу идеясы, 50 жылдан астам уақыт бойы бар. Қазіргі қазбалы отынмен салыстырғанда басқа сұйық отынды іздеудегі қызығушылықтар экономикалық/техникалық дамуға, саяси мүдделер мен энергетикалық дағдарыстарға тығыз бағытталған үлкен қиыншылықтарды көрді.

Зерттеу мақсаты: Nile Red бояғышын пайдалана отырып, ТАГ өндіруші микробалдырлардың оңтайлы жағдайларын анықтау.

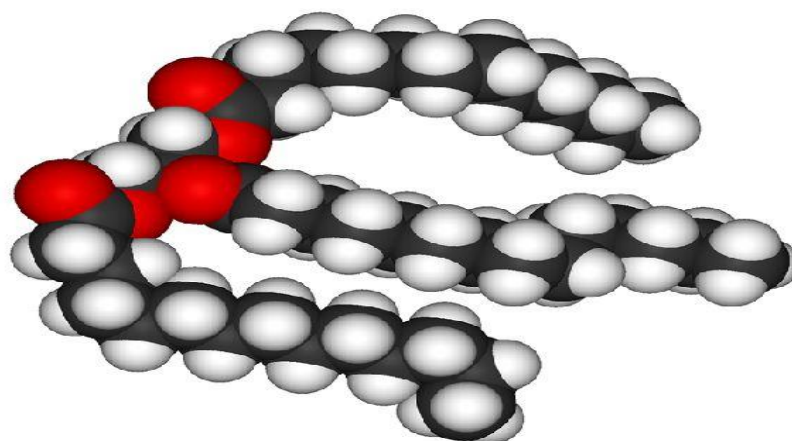
Зерттеу мақсатына сәйкес келесі міндеттер қойылды:

- 1 Nile Red бояғышын қолдану арқылы ТАГ бағалау хаттамаларына шолу.
- 2 Қолданыстағы хаттамаларды салыстырмалы талдау.
- 3 Nile Red бояғышын пайдалана отырып, ТАГ бағалау хаттамасын жетілдіру бойынша ұсыныстар.
- 4 Алынған зерттеу нәтижелерінің практикалық мәнін бағалау.

1 Әдебиетке шолу

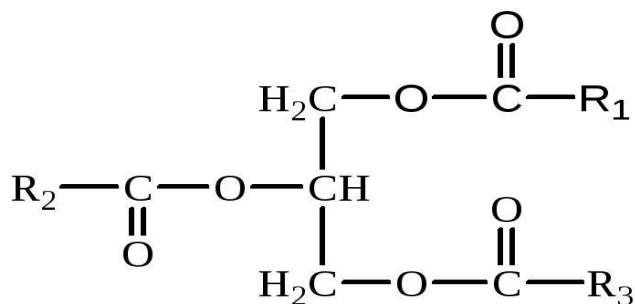
1.1 ТАГ құрылысы мен қасиеті

Триглицерид (ТГ, триацилглицерол, ТАГ немесе триацилглицерид) – күрделі эфир болып табылатын, глицерин мен үш май қышқылынан тұратын қосылыс. Триацилглицерол, адамның және басқа жануарлардың ең басты май жинақтаушы құрылымы болып табылады [1].



1 Сурет – Триглицерид молекуласының моделі.

Триацилглицеролдар - бұл глицериннан тұратын және май қышқылының үш молекуласымен байланысқан триэфир болып табылады. Спирттердің гидроксильді (НО-) тобы бар. Органикалық қышқылдардың карбоксильді (-СООН) тобы бар. Спирттер мен органикалық қышқылдар күрделі эфирге бірігеді. Глицерин молекуласының үш гидроксильді тобы және әрбір май қышқылының карбоксильді (-СООН) бар. Триацилглицеролдарда глицериннің гидроксильді топтары май қышқылының карбоксильді топтарына қосылып, күрделі эфирлі байланыс құрады [2-3].



2 Сурет - Триглицеридтердің құрылымдық формуласы

Үш май қышқылы әдетте әртүрлі болып келеді, бірақ триацилглицеролардың көптеген түрлері бар екені анық. Май қышқылдарының тізбектері табиғи жағдайларда түрлі болып келеді, бірақ олардың көбісі 16, 18 және 20 көміртегі атомдарынан тұрады. Май қышқылдарының көбісі қанықпаған болып келеді (мысалы, линол қышқылы) [4-5].

1.2 ТАГ қолданысы

Триацилглицеролдар энергияның жоғары шоғырланған қоры болып табылады [6].

Триацилглицеролдар метаболикалық энергияның жоғары шоғырланған қоры болып табылады, себебі олар сусыз және кіші. Май қышқылдарының толық тотығуынан 9 ккал г^{-1} (38 кДж г^{-1}), көмірсулар мен ақуыздар үшін 4 ккал г^{-1} (17 кДж г^{-1}) шамасында энергия шығады. Калориялықтағы осы үлкен айырмашылықтың себебі: май қышқылдары әлдеқайда азайған. Сонымен қатар, триацилглицеролдар толық емес, сондықтан олар сусыз түрде сақталады, ал полярлық ақуыздар мен көмірсулар әлдеқайда көп гидратталған. Шын мәнінде, 1 г құрғақ гликогенді 2 г су байланыстырады. Демек, сусыз майдың 1 грамм мөлшері, гидратталған гликогеннен алты есе көп энергияны сақтайды, бұл, бәлкім, гликогендер емес, триацилглицериндер эволюцияда негізгі энергетикалық резервуар ретінде таңдалғанына себеп болып табылады [7].

Сүтқоректілерде триацилглицеролдардың негізгі жиналу орны май жасушаларының цитоплазмасы болып табылады. Триацилглицериндердің тамшылары жасушаның көп бөлігін алады. Май жасушалары триацилглицеролдарды синтездеу, сақтау және олардың отын молекулаларына мобилизацияланып, қанмен басқа тіндерге жеткізуіне мамандандырылған [8].

Триглицеридтердің энергия көзі ретінде пайдалылығы, тағамсыз ұзақ қашықтыққа ұша алатын құстардың қабілетін көрсетеді. Мысалы американдық алтын ржанка және лағыл мойынды торғай болуы мүмкін. Алтын ржанка Аляскадан Оңтүстік Американың шетіне дейін ұшады; құстар тамақтана алмайтын ашық мұхиттағы үлкен ұшу сегменті (3800 км, немесе 2400 миль). Лағыл мойынды торғай, Мексика шығанағы арқылы тоқтаусыз ұша алады [9].

1.3 ТАГ алу жолдары

Триацилглицеролдарды алу жолдары өте көп. Микробалдырлардың басқа түрлерінен сонымен қатар өсімдіктерден, трансгенді өсімдіктерден де ала болады. Мысалы, *Clorella* микробалдырларынан клеткалық қабырғаларын ыдыратып, оған органикалық еріткіштерді қосу арқылы алуға болады. Бұл экспериментте ең алдымен Хлорелла микробалдырларының биомассасын фотобиореакторларды өсіріп алады. Одан кейін арнайы эксперименталды

тұрғыда жасалынған құйын қабатты аппаратта физикалық тұрғыда әсер етеді [10].

Бұл аппараттың ферромагниттік бөлшектері өте тез айналады да, шикізатқа әсер етеді. Осының нәтижесінде клеткалық қабырғалар ыдырайды, және ыдырау 99,8% құрайды. Одан кейін клеткалық қабаты ыдыратылған биомасса көпсатылы экстракцияға ұшыратылады. Экстракция, органикалық еріткіштердің көмегімен жүреді (нефрас-С 2-70/85, хлороформ, метанол, төртхлорлы көміртек) [10-11].

1 Кесте – Органикалық еріткіштерді қолдана отырып шыққан экстракция (құрамында ди- және триацилглицерол бар фракция)

№	Атауы	Масса, г	Экстракция сатылары бойынша шығуы, %		
1	Ch.vulgaris ИФР С-111 биомассасы	100	-	-	
	Нефрас-С 2-70/85	300			
	Липидті фракция	-	60	90	98
2	Ch.vulgaris ИФР С-111 биомассасы	100	-	-	
	Хлороформ	300			
	Липидті фракция	-	65	80	89
3	Ch.vulgaris ИФР С-111 биомассасы	100	-	-	
	Төртхлорлы көміртек	300			
	Липидті фракция	-	55	82	87

Келесі ойлап табылған әдіс биохимия саласына, атап айтқанда трансгендік өсімдік жасушасына, трансгендік өсімдікке, трансгендік өсімдіктің бір бөлігіне және құрамында экзогенді полинуклеотид бар, моноацилглицерол-ацилтрансферазаны (MGAT) кодтайтын және триацилглицеролдың (TAG) жоғары деңгейі бар трансгендік өсімдіктің тұқымына, сондай-ақ олардан экстрагенді липид алу тәсіліне және оларды өнеркәсіптік өнім алу үшін қолдануға жатады [12]. Сондай-ақ, MGAT кодтайтын экзогенді полинуклеотидтің жасушасына немесе тұқымына енгізуді көздейтін TAG жоғары деңгейі бар өсімдік жасушасын немесе ұрықты алу тәсілін ашады. Бұл әдіс сондай-ақ май қышқылдарының алкил эфирлерін, тамақ өнімін алу тәсіліне жатады, олардың әрқайсысы жоғарыда көрсетілген жасушаны, өсімдіктерді, өсімдіктің бөлігін немесе оның ұрығын қолдануды көздейді, сондай-ақ өзі

алынған тамақ өнімдеріне жатады. Жоғарыда аталған өсімдік жасушасын пайдалануды қарастыратын ферментация әдісін ашады. Бұл әдіс өсімдік жасушасында TAG деңгейін тиімді арттыруға және бөліп алуға мүмкіндік береді [13].

1.4 Микробалдырлардан TAG алу кезеңдері.

Микробалдырлардан TAG алу келесідей негізгі кезеңдерден тұрады: дақылдау, биомасса жинау және липидтің экстракциясы [14-15].

Ірі масштабты микробалдырларды дақылдау экстенсивті, яғни жасанды су қоймаларда немесе фотобиореакторларда өсіріледі. Жасанды су қоймалары үлкен ауданға сәйкес масштабталады, ал фотобиореакторларда шағын ауданда, түрлі пішін мен мөлшердегі биореакторлар қолданылады. Фотобиореакторларды қолдану дақылдың өнімділігін тура болжауға және ортаның тазалығын қамтамасыз етуге жағдай жасайды [16].

1.5 Nile Red және оның қасиеттері

Nile Red - липофильді бояғыш. Nile Red жасушаішілік липидті тамшыларын сары түске бояйды. Көптеген полярлық еріткіштерде Nile Red флуоресцирленбейді, алайда липидтерге бай ортада қарқынды флуоресцентті болуы мүмкін. Қатты қызыл түстерден (полярлық мембрананың липидтері үшін) сары алтынның күшті сәулеленуіне дейін (жасушаішілік сақтау орындарында бейтарап липидтер үшін) түрлі түстермен боялады. Бояғыш жоғары сольватохромдылыққа ие, оның сәулелену және қозу толқынының ұзындығы еріткіштің полярлығына байланысты өзгереді, ал полярлық ортада флуоресцирленбейді [17-18].

1.6 Nile Red қолданысы

Nile Red клеткалық биологияда мембрананың бояуы ретінде қолдануға болады. Nile Red сондай-ақ бөтелкедегі сулардың құрамындағы микропластик үшін сезімтал анықтау процесінің бөлігі ретінде қолданылды [19].

Nile Red-ті алу үшін күкірт қышқылы мен Nile blue ерітіндісін қайнатып, қышқыл гидролизі арқылы алуға болады. Бұл процесс иминий тобын карбонил тобымен алмастырады. Сонымен қатар Nile Red және оның аналогтары (нафтооксазинді бояғыштар) қышқыл-катализденетін конденсациямен 5-(диалкаламино)-2-нитрозофенолды 2-нафтолмен алынуы мүмкін. Бұл реакцияда ешқандай тотықтырғыш пайдаланылмауына байланысты шығу мүлдем қалыпты емес [20-22].

2 Материалдар мен әдістер

2.1 Дақылдауға арналған қоректік орталар

Dunaliella salina және *Chlorella vulgaris* дақылын өсіру кезінде микробалдырларды дақылдауға арналған стандартты қоректік орталар – Tris - Acetate Phosphate (TAP) және HSM қоректік орталары қолданылды. Олардың құрамы 2 және 3-кестелерде көрсетілген.

2.1.1 TAP қоректік ортасы

2 Кесте – TAP қоректік ортасының құрамы (1 литр қоректік орта дайындауға арналған шамалар)

Дистилденген H ₂ O	975 мл
Tris	2.42 г
Бейерник 4x тұздары	25 мл
1М (K)PO ₄ pH=7	1 мл
Микроэлементтер ерітіндісі	1 мл
Сірке қышқылы	1 мл pH=7-ге дейін

1) Бейерник 4x тұздары ерітіндісін дайындау үшін 1 литр ddH₂O-да еріту қажет:

- 16 г NH₄Cl
- 2 г CaCl₂
- 4 г MgSO₄

2) Микроэлементтер ерітіндісін жасау үшін:

550 мл ddH₂O-да төменде көрсетілген тұздарды ерітіп, 100⁰С қыздыру қажет:

- 11.4 г H₃BO₄
- 22 г ZnSO₄ · 7H₂O
- 5.06 г MnCl₂ · 4H₂O
- 4.99 г FeSO₄ · 7H₂O
- 1.61 г CoCl₂ · 6H₂O
- 1.57 г CuSO₄ · 4H₂O
- 1.1 г (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O

3) 250 мл ddH₂O-да 50 г ЭДТА натрий тұзын қыздыра отырып, еріту қажет. Үстіне жоғарыда көрсетілген құраммен жасалған ерітіндіні құямыз. 80-

90°C дейін суытып, рН деңгейін 6.5-6.8-ге 20% КОН ерітіндісін қолдана отырып теңейміз.

4) Көлемін 1 литрге жеткізіп, бөлме температурасында ертінідінің түсі қою жасылдан ашық күлгін түске өзгергенше 2 апта бойы инкубациялаймыз.

5) 3 қабат фильтр қағазымен ерітінді мөлдір болмағанша фильтрлеу керек.

Дайын болған ТАР ортасы термотұрақты қақпақпен жабылатын бөтелкелерге құйылды. Оларды автоклавта 20 минут бойы 121°C-та стерилдейміз.

2.1.2 HSM қоректік ортасы

3 Кесте – HSM қоректік ортасының құрамы (1 литр қоректік орта дайындауға арналған шамалар)

Дистилденген H ₂ O	925 мл
Бейерник 4x тұздары	25 мл
2X PO ₄ pH=6.9	50 мл
Микроэлементтер ерітіндісі	1 мл

1) Бейерник тұздары ерітіндісін дайындау үшін 1 литр ddH₂O-да еріту қажет:

- 16 г NH₄Cl
- 2 г CaCl₂
- 4 г MgSO₄

2) Микроэлементтер ерітіндісін жасау үшін:

550 мл ddH₂O-да төменде көрсетілген тұздарды ерітіп, 100°C қыздыру қажет:

- 11,4 г H₃BO₄
- 22 г ZnSO₄ · 7H₂O
- 5,06 г MnCl₂ · 4H₂O
- 4,99 г FeSO₄ · 7H₂O
- 1,61 г CoCl₂ · 6H₂O
- 1,57 г CuSO₄ · 4H₂O
- 1,1 г (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O

3) 250 мл ddH₂O-да 50 г ЭДТА натрий тұзын қыздыра отырып, еріту қажет. Үстіне жоғарыда көрсетілген құраммен жасалған ерітіндіні құямыз. 80-90°C дейін суытып, рН деңгейін 6,5-6,8-ге 20% КОН ерітіндісін қолдан отырып теңейміз.

4) Көлемін 1 литрге жеткізіп, бөлме температурасында ертінідінің түсі қою жасылдан ашық күлгін түске өзгергенше 2 апта бойы инкубациялаймыз.

5) 3 қабат фильтр қағазымен ерітінді мөлдір болмағанша фильтрлеу керек.

6) $2X PO_4$

- 14,34 г K_2HPO_4

- 7,26 г KH_2PO_4

pH көрсеткішін концентрленген KOH-пен 6,9 және 1л-ге ddH₂O-пен жеткізу қажет

2.2 Қолданылатын *D.salina* және *Ch.vulgaris* штаммдары

Зерттеу жұмысында қолданылған *Haematococcus pluvialis* дақылы М.А.Айтхожин атындағы Молекулярлық биология және биохимия институтында сақталған, Ефремова Ю.М. микробалдырларының жеке топтамасынан алынған. 50 мл сұйық *Dunaliella Salina* мен *Chlorella vulgaris* дақылдары мөлшері 100 мл колбаларда бөлме температурасында, төмен жарықтандыру жағдайында өсірілді (3-сурет).



3-сурет. Колбаларға құйылған дақылдар.

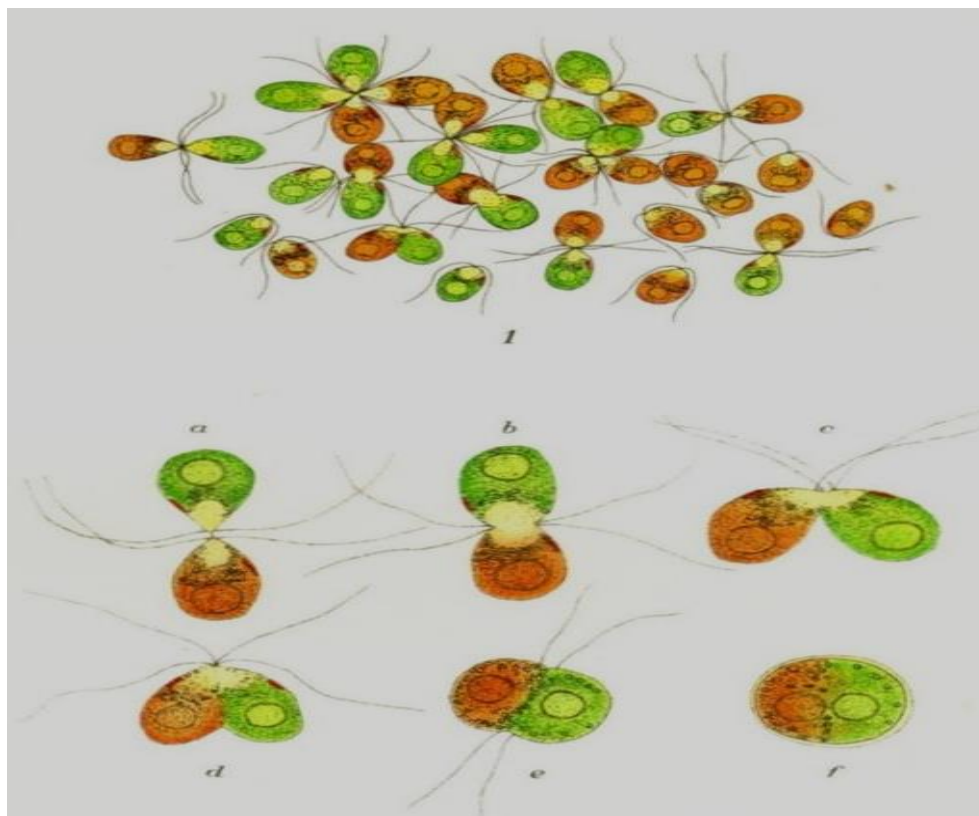
100 мл колбалар тербелмелі сөрелерге қойылды. Дақылдың өсуі үшін әр 4 күн сайын жаңа қоректік ортаға отырғызылып отырды.

Dunaliella salina - бір клеткалы жоғары концентрациялы тұзды ортада табылған жасыл балдыр. Ол тұзды тоғандарға сай ашық қызғылт және қызыл түсті болады. Ол 1838 жылы Францияның оңтүстігінде Мишель Феликс Дюналмен бірінші рет ашылған, алайда ол 1905 жылға дейін Теодорескомен табылмағанша еш атаусыз болған. *Dunaliella* түрлері NaCl түрлі концентрациясының, яғни 0,2% - дан 35% - ға дейінгі диапазонда өмір сүруге қабілетті. Осылайша, *Dunaliella salina* - жоғары тығыздығы бар тұзды көлдерде табылған гипергалотолерантты ағза. *D. salina* осмостық қысымды сақтау үшін глицеролды жинақтау жолымен, жоғары тұзды ортада өмір сүруге бейімделген. *D. salina* сондай-ақ күн радиациясының иондаушы энергиясынан қорғану үшін β-каротинді пайдаланады. Бұл комбинациялар микробалдырды коммерциялық өнімдер үшін биотехнологиялық қолданудағы әлеуетіні ұсынады. *Dunaliella*

salina - балдырлардың тұзды ортаға бейімделу әсерлерін зерттеп, бақылау үшін негізгі модельді организм. Сонымен қатар, зерттеу үлгісі ретінде *D. salina* негізгі органикалық үйлесімді май ретінде глицеролды қолданылады.

Dunaliella salina және оның басқа да түрлері жылжымалы вегетативтік жасушаларды бөлумен қатар, жыныстық көбею мүмкіндігі бар күрделі өмірлік циклдардан өтеді. Зиготаның пайда болуы үшін бірдей өлшемдегі екі гаметаның бірігуі көптеген ерте зерттеулерде құжатталған. Гаметалар цитоплазмалық көпір құрып, бірігеді. Зиготада қалың сыртқы қабаты болады. Ол тұщы судың әсеріне оңай қарсы тұра алады, сондай-ақ қуаңшылықтың ұзақ мерзіміне қарсы тұра алады.

Сонымен қатар *Dunaliella salina* микробалдырларының кейбір түрлері дөңгелек қозғалмайтын жасушалардан тұратын пальмеллоид вегетативтік сатысын дамытуы мүмкін. Лерхе зерттеушісі бұл құбылысты төмен тұздылықта құжаттап алған, ал Брок зерттеушісі осындай пальмеллоидты *Dunaliella Salina* нысандарын Юта штатындағы бентикалық, балдырлы Үлкен Тұзды көлде бақылаған.



4 Сурет – *Dunaliella salina* қызыл және жасыл түсті түрлерінің агрегациясы (жоғары бөлік) және *Dunaliella Salina* зиготасының пайда болуы (төменгі бөлігі).

Chlorella vulgaris - эукариотты бір жасушалы жасыл балдыр. *Chlorella vulgaris*, шамамен, жер бетінде 2,5 миллиард жыл бұрын пайда болған. Балдырдың ең маңызды ерекшеліктерінің бірі болып оның тез өсу қабілеті

болып табылады. Әдетте, практика жүзінде, балдыр популяциясын өсіру фотобиореакторларда жүреді. Фотобиореактордың камералары біртіндеп сілкіп, *Chlorella vulgaris* метаболизмнің белгілі бір аспектілері мен ерекшеліктерін бақылау үшін пайдаланылады. Орта, карбонизация және жарық сияқты айнымалылар культураның оптималды өсуі үшін зерттелінді. 2016 жылы *Chlorella vulgaris* - тің өсу деңгейі әдетте қоректік заттардың (әсіресе азот) сарқылуы, жарықтың төмендеуі, рН-тың өзгерісі, көміртектің шектелуі және фотосинтетикалық оттегінің жиналуымен шектеледі деп пайымдалған. *Ch. vulgaris* бірнеше практикалық қолданулары зерттелген. Біріншіден, оның жоғары минералды және ақуыз деңгейлеріне байланысты, ол витаминдерде пайдаланылады. Тіпті сусыздану кезінде азық-түлік болып саналады (Belasco 1997). Сонымен қатар ол адам денсаулығын нығайтуда күшті әсер тигізеді. Екіншіден, көптеген балдырлар фотосинтез арқылы липидтер бөледі. Бұл ағзалар биоотынның бірден бір көзі ретінде қарастырылады. *Ch. vulgaris* биомассасындағы липидтердің үлесі 42 % құрайды. Бұл соя бұршақтары, қант қамысы және жүгеріге қарағанда көп, сондықтан бұны биодизельге өміршең баламасы ретінде қолдануға болады.

Көптеген жасыл балдырлар сияқты *Ch. vulgaris* - тұщы суда мекен ететін микробалдыр болып табылады. *Ch. vulgaris* вирустар, бактериялар, саңырауқұлақтар және ластаушылардың көптеген түрлеріне қарсы төтеп бере алады, оның себебі белгілі стрессорлардың астында аман қалуы. Бұл ерекшеліктердің себебі болып оның ДНҚ-ның тез қалпына келу қабілеттілігінен шығады. Егер ДНҚ тізбектері үзіліп, организмге қауіп төнген кезде, *Ch. vulgaris* тез мутацияға және ассимиляцияға қабілеттенеді. Осыған байланысты зерттеушілер бұл процесті терең түсінуге тырысады, мүмкін, адамның денсаулығына пайда тигізуі әбден ықтимал. Сонымен қатар, қолдану кезінде ол антибиотик сияқты әрекет етеді. Детоксикацияны қажет ететін емделушілерді кейде хлорелламен (түрлерінің қоспасы көмегімен) емдеуге болады, бұл қасиет балдырды денсаулық сақтау үшін құнды құрал екендігіне қол жеткіздіреді.

3 Зерттеу нәтижелері

3.1 *D.salina* және *Ch.vulgaris* штаммының зертханалық жағдайдағы өсу динамикасы

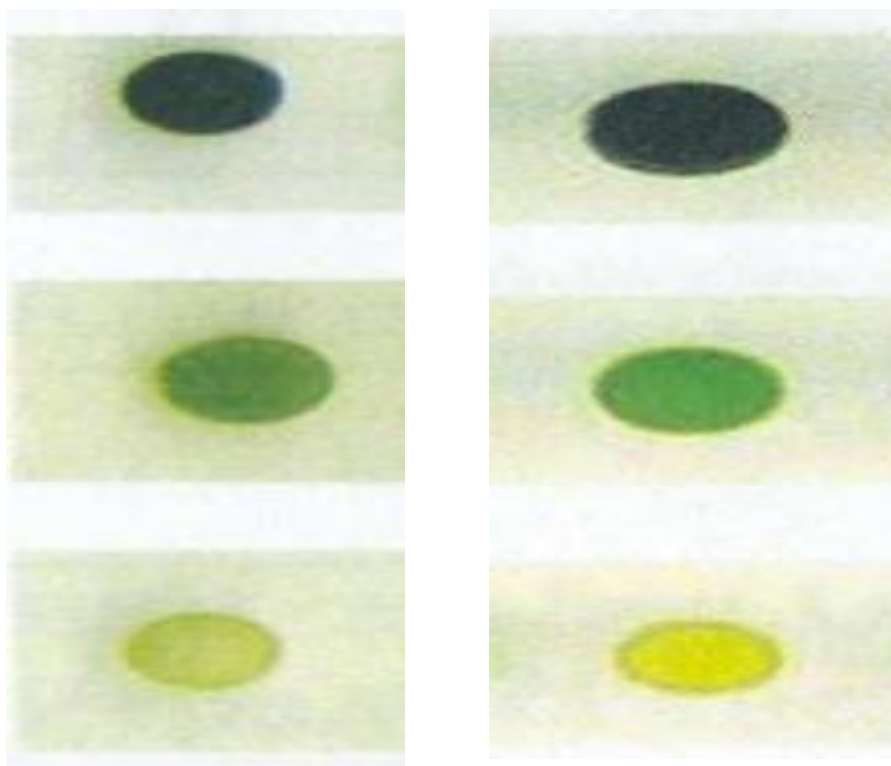
Өндірістік штамм үшін гетеротрофиялық қасиетпен қатар миксотрофиялық қасиет те өте маңызды критерийлердің бірі болып келеді. Себебі, миксотрофтар органикалық заттардың өңделуін, фотосинтетикалық аппараттың қалыпты болуын және гидролитикалық ферменттердің синтезін қамтамасыз ететін ерекше молекулалық механизмдерге ие.

Дақылдырдың өсу динамикасын бақылау үшін, арнайы тест өткізілді. 1 мкл суспензия мөлшері агарланған қоректік ортаға отырғызылды.

Миксотрофияға қасиеттерін бақылау үшін культуралар, көміртегі көзі үшін қосылған құрамында 17,4 мМ ацетаты бар, қалыпты 1500 люкс жарықтандыру жағдайында, қатты ТАР қоректік ортасы бар Петри табақшаларына дақылданды.

Гетеротрофты өсу қасиеттерін бақылау үшін, ТАР қоректік ортасы бар жарық түспеу үшін алюминий фольгасымен оралған Петри табақшаларына культуралар дақылданды. Өсу 25°C температурада 3 күн жүргізілді.

Сонымен қатар, культураларды бақылау үшін HSM қоректік ортасына, ацетатсыз, 1500 люкс жарықтандыру жағдайында культура дақылданды.



5 Сурет – *Dunaliella salina* *Chlorella vulgaris* штаммдарының әртүрлі

культивирлеу жағдайларындағы өсуі.

4 Кесте – Культивирлеудің әртүрлі жағдайларындағы микробалдырлардың өсуі

Штамм	Миксотрофты (+жарық, +ацетат)	Фототрофты (+жарық, -ацетат)	Гетеротрофты (- жарық, +ацетат)
<i>D.salina</i>	+++	++	-
<i>Ch.vulgaris</i>	+++	++	+

3.2 Қоректік ортадағы азот концентрациясының ТАГ жиналуына әсер етуі

Азот - фотосинтездеуші организмге көп мөлшерде қажет минералды элемент. Ол протопласттың негізгі бөлігі ретінде және барлық клеткалық мембраналардың құрамындағы аминқышқылдар, сәйкесінше, ақуыздар құрамына кіреді. Азот, жасушаның бөлінуіндегі регуляцияға қатысатын нуклеин қышқылдары, хлорофилл, полиамин құрамының негізгі бөлігі. Азот жетіспеуі кезінде жасушаның өсу темпі өзгеріп, аминқышқылдар синтезіне қатыса алмайтын көмірсулар жиналады. Осыған байланысты хлорофилл синтезі бұзылуы нәтижесінде, культура өсуіне және клеткалар түсіне әсер ететін фотосинтез интенсивтілігі төмендейді.

Азот концентрациясының биомасса өсуіне және ТАГ жиналуына әсерін бақылау үшін, 7,48мМ NH_4^+ және 10 есе төмендетіліп қосылған NH_4^+ (0,748 мМ) ТАР қоректік ортасында культивациялау жүргізілді және биомасса қатары өсті.

3.3 Nile Red бояғышы көмегімен ТАГ интенсивтілігін бақылау

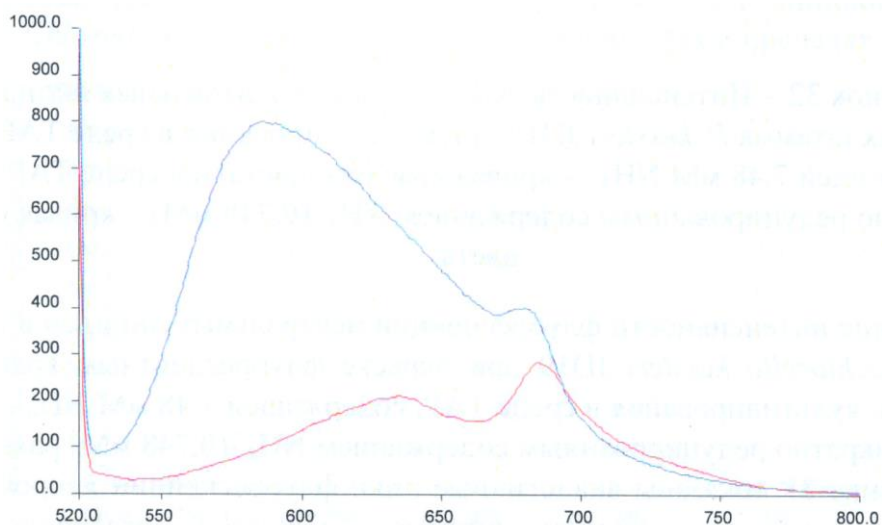
Одан кейін штаммдардың липидті өнімділігін бағалау үшін азот құрамының оптималды және төмендетілген концентрациясында дақылданып, Nile Red бояғышы көмегімен флуоресцентті спектроскопия жүргізілді.

Флуоресценция - электронның мультиплеттілігінің өзгеруінсіз қозу жағдайынан негізгі жағдайға өтуі.

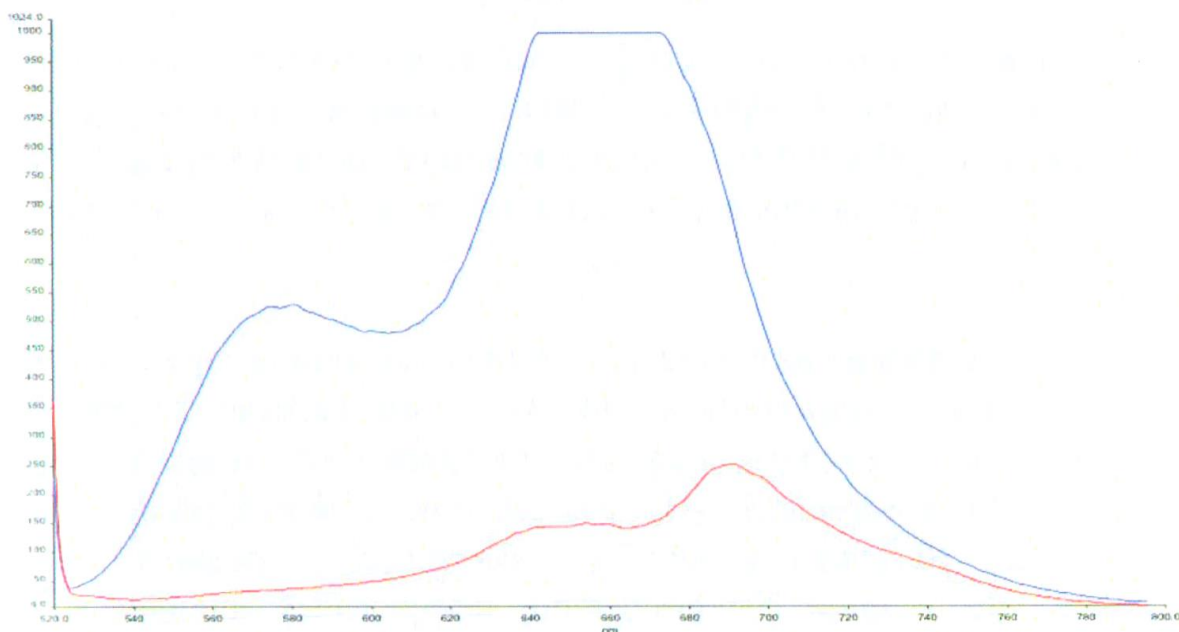
Микробалдырлардың нейтралды липидтерды бөлу қасиеті, азот төмен жағдайда, Nile Red бояғышын қолдана отырып флуоресцентті спектроскопия әдісімен анықталды. Nile Red бояғышы ТАГ-пен байланысы спецификалы.

Штаммдар 5 тәулік ішінде азот қаныққан және азот қанықпаған ТАР қоректік орталарында культивирленді. Клеткалардың боялуы Nile Red-тің 2мг/мл, 25 % диметилсульфоксидтің (ДМСО) концентрациясында жүзеге асырылды. ДМСО - бояғыштың клетка қабырғалары арасынан өтуге

көмектеседі. Флуоресценция интенсивтілігі қозу ұзындығы 510 нм және эмиссионды сканерлеу 520-800 нм интервал арасында, люминесцентті спектрометрмен (Perkin Elmer LS-55) жүзеге асырылды.



6 Сурет – *Dunaliella salina* штамм клеткаларындағы липидтердің (ТАГ) флуоресценция интенсивтілігі. ТАР қоректік ортасына қосылған 7,48мМ NH_4^+ - қызыл түсті қисық және 10 есе редуцирленген (0,748мМ NH_4^+) - көк түсті қисық.



7 Сурет – *Chlorella vulgaris* штамм клеткаларындағы липидтердің (ТАГ) флуоресценция интенсивтілігі. ТАР қоректік ортасына қосылған 7,48мМ NH_4^+ - қызыл түсті қисық және 10 есе редуцирленген (0,748мМ NH_4^+) - көк түсті қисық.

ҚОРЫТЫНДЫ

Зертханалық жағдайларда культураны бірнеше түрлі өсу жағдайында өсірді. Ол жарық және температура сияқты параметрлердің кең ауқымынан басталды, содан кейін нақты *D.salina* және *Ch.vulgaris* штаммдары үшін оңтайлы өсу шарттарын алу мақсатында өзгермелі параметрлердің ауқымы талқыланды. Сонымен қатар, культураның өсуіне CO₂ мен ацетаттың әсері де бақыланды. Әрбір келесі өту алдыңғы өту нәтижелеріне негізделген. ТАГ интенсивтілігі және стресстік жағдайдағы активизациясы 5,6 суреттерде көрсетілген. Сонымен қатар тақырыпқа байланысты басқа да аналогиялық зерттеулер қарастырылып, талқыланып, қорытындыланды.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Megan A. Danielewicz, Lisa A. Anderson, and Annaliese K. Franz. "Triacylglycerol profiling of marine microalgae by mass spectrometry".
- 2 A.K. COWAN P. D. ROSE L. G. HORNE. "Dunaliella salina: A model System for Studying the Response of Plant Cells to Stress".
- 3 Xu C, Andre C, Fan J, Shanklin J. "Cellular Organization of Triacylglycerol Biosynthesis in Microalgae".
- 4 Петри Джеймс, Ванэрк Томас, Шреста Пушкар, Лю Цин, Сингх Суриндер Пал, Чжоу Сюэ-Ронг. "Липидтерді алу тәсілдері".
- 5 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. New York: W H Freeman; 2002. "Biochemistry. 5th edition".
- 6 Stephanie Chandler. "Function of Triglycerides "
- 7 "Nomenclature of Lipids". IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Retrieved 2007-03-08.
- 8 Lampe, M. A.; Burlingame, A. L.; Whitney, J.; Williams, M. L.; Brown, B. E.; Roitman, E.; Elias, M. (1983). "Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations".
- 9 Alfred Thomas (2002). "Fats and Fatty Oils". Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
- 10 Charbonnet, G. H.; Singleton, W. S. (1947). "Thermal properties of fats and oils"
- 11 C.M. Lok, J.P. Ward, D.A. van Dorp (1976). "The synthesis of Chiral Glycerides starting from D- and L-serine".
- 12 White, H., & Venkatesh, B. (2011). Clinical review: ketones and brain injury
- 13 "Boston scientists say triglycerides play key role in heart health". The Boston Globe.
- 14 Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN (2017). "Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases".
- 15 Nordestgaard, BG; Varbo, A (August 2014). "Triglycerides and cardiovascular disease".
- 16 R Plenderleith; T Swift & S Rimmer (2014). "Highly-branched poly(N-isopropyl acrylamide)s with core-shell morphology below the lower critical solution temperature"
- 17 SD Fowler & P Greenspan (1985). "Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O".
- 18 P Greenspan; E. P. Mayer & S. D. Fowler (1985). "Nile Red, A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets".
- 19 Zhi-Yan Du, Cristoph Benning. "Triacylglycerol Accumulation in Photosynthetic Cells in Plants and Algae".

20 Brendan T. Higgins, Alexander Thornton-Dunwoody, John M. Labavitch, Jean S. VanderGheynst. "Microplate assay for quantitation of neutral lipids in extracts from microalgae".

21 GILL, Jason; Sara HERD; Natassa TSETSONIS; Adrienne HARDMAN (Feb 2002). "Are the reductions in triacylglycerol and insulin levels after exercise related?".

22 Park, So-Yeon; Kubota, Y.; Funabiki, K.; Shiro, M.; et al. (2009). "Near-infrared solid-state fluorescent naphthooxazine dyes attached with bulky dibutylamino and perfluoroalkenyloxy groups at 6- and 9-positions".