

ДОСЛІДЖЕННЯ СИНЬО-ЗЕЛЕНИХ ВОДОРОСТЕЙ ЯК ДЖЕРЕЛА АЛЬТЕРНАТИВНОЇ ЕНЕРГЕТИКИ ШЛЯХОМ ВИЛУЧЕННЯ ЛІПІДІВ

Маненко Л.Л.

Кременчуцький національний університет імені Михайла Остроградського

Науковий керівник – Сакун О.А., кандидат технічних наук,
доцент кафедри біотехнології та біоінженерії
Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського

Водорості – живі організми, які отримують необхідну для життєдіяльності енергію шляхом фотосинтезу, мешкають переважно у водному середовищі чи пристосовуються до життя у ґрунті та інших наземних місцях зростання. Загальний вміст ліпідів у клітинах водоростей коливається у значному діапазоні. У синьо-зелених водоростей він може становити від 2 до 18% від сухої речовини біомаси, у жовто-зелених – 5-10%, у деяких зелених – 37,3%, у діатомових – 35%.

Актуальність проекту полягає у вилученні ліпідів з синьо-зелених водоростей, які є сировиною для отримання альтернативного джерела енергії, та очищення водойми від ціанобактерій як забруднювачів навколишнього середовища.

Мета роботи – встановити можливість вилучення ліпідів з ціаней. Об'єкт дослідження: процеси переробки синьо-зелених водоростей з використанням методу Фолча.

Предмет: розробка оптимального режиму отримання ліпідів.

Методи дослідження: аналітичні та експериментальні дослідження.

Культивування ряду мікроскопічних синьо-зелених і зелених водоростей створило умови для детального дослідження їх розвитку, вивчення морфологічних, фізіологічних, біохімічних особливостей у свою чергу дозволило виявити серед культивованих мікроводоростей окремі види, яким властиві високі темпи росту і які мають здатність синтезувати унікальні біохімічні компоненти. У наш час ряд синьо-зелених і зелених мікроводоростей культивується в спеціально обладнаних приміщеннях наукових і навчальних закладів біологічного й біотехнологічного профілів, де створені та підтримуються колекції їх культур. Здебільшого це представники мікроводоростей класу *Chroococophyceae* – (хроококових одноклітинних або колоніальних) і *Hormogoniophyceae* – гормогонієвих (багатоклітинних) синьо-зелених мікроводоростей а також мікроскопічних зелених (рис. 1).

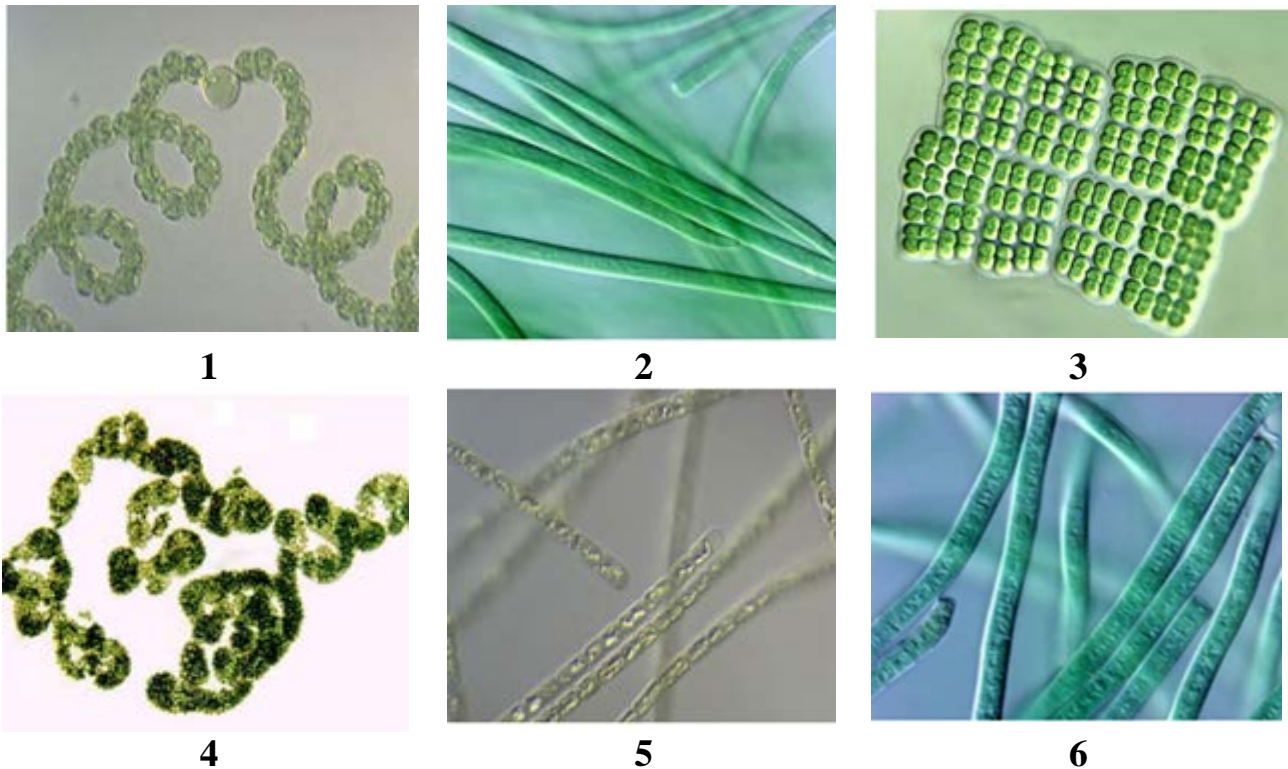


Рис. 1. Збудники «цвітіння» води дніпровських водосховищ – ціанобактерії
 1 – *Anabaena sp.*, 2 – *Oscillatoria sp.*, 3 – *Merismopedia sp.*, 4 – *Microcystis sp.*,
 5 – *Aphanizomenon sp.*, 6 – *Phormidium sp.*

Особливий інтерес представляють ліпіди синьо-зелених водоростей. У формуванні фотосистеми, відповідальної за виділення кисню, значну, хоча ще не з'ясовану роль відіграють поліненасичені жирні кислоти, особливо L-лінолева. Однак деякі види синьо-зелених водоростей, які здійснюють фотосинтез з виділенням кисню, не синтезують поліненасичені жирні кислоти, не здатні фіксувати азот і рости гетеротрофічно. Фосфоліпіди представлені одним компонентом – фосфатдигліцеридом, який також міститься в хлоропластах вищих рослин [23]. Дослідженнями Г. С. Калачова та І. М. Трубочова встановлено, що в клітинах термофільною синьо-зелених водоростей *Synechococcus elongatus* зміст ліпідів коливається від 10,5 до 14,4% на суху речовину в залежності від способу вирощування. В умовах безперервного культивування водорість синтезує дещо більше ліпідів, ніж в умовах періодичного. Якісний склад при цьому змінюється незначно: омилюваного компоненти складають 43,4-44,4% загальних ліпідів, неомильних – 6,2-9,5, а гідрофільні – 47,7-49,1%. Ліпіди цієї водорості представлені в основному полярними компонентами, складовими 57-59% загальних ліпідів [24].

При виділенні ліпідів з біологічного матеріалу може відбуватися їх окислення й деградація, що призводять до утворення побічних продуктів. Виділення ліпідів необхідно проводити швидко за такими чинниками, як підвищені температури, присутність окислювачів, відсутність відповідного

розчинника. Ліпідний екстракт не повинен бути забруднений неліпідними речовинами, такими як цукру й амінокислоти. Суміші розчинників для екстракції ліпідів, що містять спирт, поряд з ліпідами, які містять в клітинах неліпідні речовини. Звільняють ліпіди від неліпідних домішок промиванням екстрактною водою, слабкими сольовими розчинами (KCl, CaCl₂) [29].

У разі екстракції ліпідів з тканин рослин, які містять відносно стабільні ензими, у більшості випадків гідролітичні ферменти (зокрема фосфоліпазу D) слід денатурувати нагріванням. Ліпідний екстракт не слід зберігати надто довго в зв'язку з можливістю їх окислення. При зберіганні ліпідів протягом нетривалого часу, їх розчиняють в суміші свіжеперегнанного хлороформу й метанолу (2:1) або в хлороформі, поміщають у пробірки з притертими пробками, підтримуючи температуру від 0 до -15°C. При тривалих термінах зберігання до розчину ліпідів додають антиоксиданти [18].

Для видалення неліпідних водорозчинних домішок, витягнуті хлорометаноловою сумішшю, ліпідний екстракт промивають дистильованою водою (рис. 2). У невеликий стаканчик, висотою 6-7 см і діаметром 3 см, наливають 10-20 см³ дистильованої води; у цей же стаканчик спеціальною піпеткою об'ємом 10 см³, з'єднаною з гумовою грушею або шприцом, переносять ліпідний екстракт у кількості 10 см³, причому кінчик піпетки повинен бути опущений під воду (при цьому слід уникати бурхливого перемішування рідин). Потім у стаканчик доверху доливають воду й опускають на дно великої посудини, що містить 500-600 см³ води.

Посудину накривають скляною кришкою й залишають на ніч. При цьому водорозчинні домішки дифундують у воду.

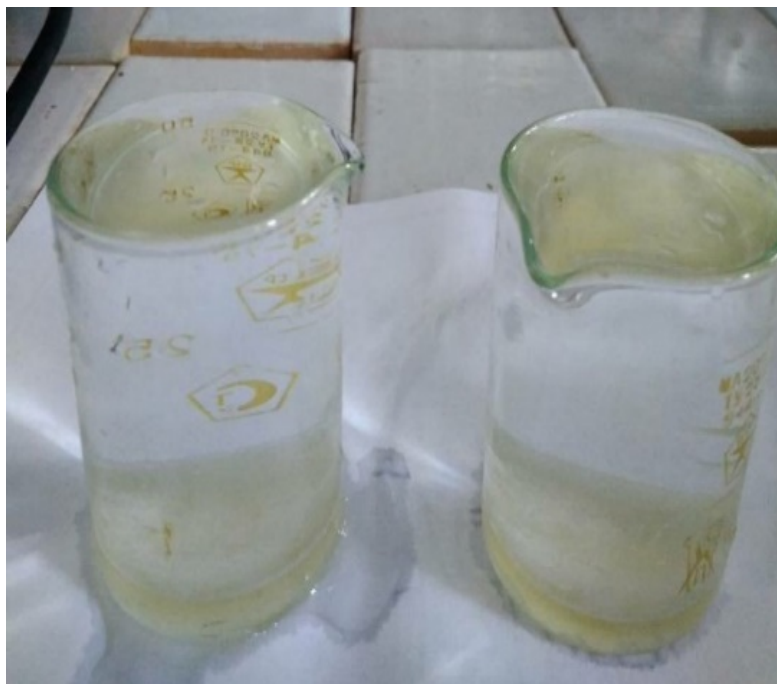


Рис. 2. Промивання ліпідного екстракту

На наступний день в системі чітко розрізняються три фази: верхня – водно-метанолова (прозора), нижня – хлороформна (каламутна), а на кордоні між ними – більш або менш щільна, залежно від досліджуваної тканини, біла плівка, яка містить ліпід (*рис. 3*). Маленький стаканчик виймають з посудини, верхній водно-метаноловий шар обережно відсмоктують за допомогою автоматичної піпетки або піпетки з грушею таким чином, щоб не пошкодити білу плівку; після відсмоктування над плівкою зазвичай залишається шар рідини в 2-3 мм. Слід зазначити, що частина (невелика) ліпідів втрачається з водно-метаноловою фракцією.



Рис. 3. Ліпідна плівка з невідпрацьованого субстрату

У стаканчик доливають по краплях 3 см³ метанолу для розчинення плівки. Якщо при цьому плівка повністю не розчиняється й розчин не стає прозорим, то знову додають метанол по краплях до тих пір, поки каламуть не зникне (*рис. 4*). Після розчинення ліпідної плівки розчин кількісно переносять впопередньо зважений на аналітичних вагах сухий і чистий бюкс, у якому буде проводитися висушення ліпідного екстракту. Спочатку випарювання проводиться на водяній бані, а потім сушать в термостаті при 50–60 °С до постійної маси. Після повторного зважування бюкса з осадом ліпідів визначають масу цього осаду. Вміст ліпідів розраховують в г/кг маси дослідженого субстрату.



Рис. 4. Розчинення ліпідної плівки метанолом

Із застосуванням класичного методу Фолча та його модифікації встановлено відсотковий вміст фракції ліпідів у субстрату. Доведено, що суміш хлороформу та метанолу сприяє руйнуванню клітинної мембрани синьо-зелених водоростей.