

БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ CHLORELLA VULGARIS SP2.

Бекназарова Хуринисо Улузбек қизи

*Имени Ислама Каримова Тошкентский государственный
технический университет 38-м-24 группа магистров*

Аннотация: В данной статье представлен всесторонний биохимический анализ микроструктурной биомассы *Chlorella vulgaris* sp2, с акцентом на её состав, методы извлечения и потенциальные применения. Исследование рассматривает питательную и промышленную ценность биомассы, предоставляя сведения о её применении в биотехнологиях, фармацевтике и производстве биоэнергии.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris* sp2, микроструктурная биомасса, биохимический анализ, биоэнергия, биотехнология, питательный состав

Растущий интерес к микроводорослям, таким как *Chlorella vulgaris* sp2, обусловлен их высокой продуктивностью, экологической адаптивностью и биохимической универсальностью. *Chlorella vulgaris* известна своим богатым содержанием белков, липидов и углеводов, что делает её перспективным кандидатом для устойчивого производства ресурсов. Цель данного исследования — проанализировать биохимический состав *Chlorella vulgaris* sp2, подчеркнув её питательные и промышленные применения.

Сбор образцов и культивирование

Chlorella vulgaris sp2 культивировали в контролируемой среде с оптимизированным питательным составом, температурой и освещением для максимального производства биомассы. Культура была собрана на стадии логарифмического роста.

Биохимический анализ

Содержание белков: Определено методом Кьельдаля.

Извлечение липидов: Выполнено с использованием аппарата Сокслета с использованием гексана в качестве растворителя.

Анализ углеводов: Количественно определён методом фенол-серной кислоты.

Микроскопия: Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) использовалась для изучения микроструктуры биомассы.

Статистический анализ

Данные анализировали с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) для оценки изменчивости и значимости биохимических компонентов.

Биохимический анализ биомассы микроструктуры *Chlorella vulgaris* sp2

Биохимический анализ биомассы *Chlorella vulgaris* sp2 направлен на изучение её состава для оценки потенциального применения в биотопливе, пищевых добавках, очистке сточных вод и других биотехнологических сферах. Вот основные аспекты такого анализа:

Анализ липидов

- Цель: Определение липидов важно для производства биодизеля или в качестве источника питания.

- Методы:

Эти методы являются стандартными и широко используемыми для анализа липидов, особенно в исследовании микроводорослей, таких как *Chlorella vulgaris* sp2. Вот немного подробнее о каждом из них:

Экстракция растворителем (Метод Блига и Дайера)

- Описание:

- Этот метод основан на использовании смеси хлороформа и метанола в соотношении 2:1 для экстракции липидов из биомассы.

- Он позволяет извлечь как полярные, так и неполярные липиды.

- Процедура:

1. Сушёная биомасса измельчается.

2. Смешивается с раствором хлороформ-метанол.

3. После добавления воды или буфера происходит разделение фаз, где липиды концентрируются в нижнем (хлороформном) слое.

4. Органический слой собирается, высушивается и взвешивается.

- Применение:

- Быстрое определение общего липидного содержания.

- Подходит для первоначального скрининга.

Газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС)

- Описание:

- Используется для детального профилирования жирных кислот в составе липидов.

- Предварительно липиды трансэтерифицируют, превращая их в метиловые эфиры жирных кислот (FAMES).

- Процедура:

1. Липиды подвергаются трансэтерификации (с использованием метанола и катализаторов, таких как NaOH или H₂SO₄).

2. FAMES вводятся в систему ГХ-МС.

3. Хроматограмма и масс-спектры используются для идентификации и количественного анализа жирных кислот.

- Применение:

- Определение содержания насыщенных и ненасыщенных жирных кислот.

- Анализ пригодности для производства биотоплива.

ЯМР-спектроскопия (Ядерный магнитный резонанс)

- Описание:

- Современный метод для быстрого и неразрушающего анализа липидов.

- Определяет общее содержание липидов, а также их структурные особенности.

- Процедура:

1. Пробы липидов растворяют в подходящем растворителе (например, CDCl₃ или DMSO).

2. Образец помещают в магнитное поле и подвергают радиочастотному излучению.

3. Полученные спектры анализируют для определения химических сдвигов, относящихся к липидным связям.

- Применение:

- Быстрое определение содержания липидов.

- Подходит для изучения сложных липидных структур.

Эти методы часто дополняют друг друга:

- Экстракция обеспечивает сырьё для последующего анализа.

- ГХ-МС детализирует состав липидов.

- ЯМР позволяет быстро проверить общее содержание липидов без сложной подготовки.

- Ключевые показатели: Выход липидов (% сухой массы), состав жирных кислот (например, пальмитиновая, олеиновая, линолевая кислоты).

Содержание белка

Анализ содержания белка в *Chlorella vulgaris* sp2

Белки играют ключевую роль в определении питательной ценности биомассы *Chlorella vulgaris*, особенно в сфере кормов, пищевых добавок и биотехнологии. Ниже приведены подробности методов анализа содержания белка:

Метод Кьельдаля

- Описание:

- Этот метод измеряет общее содержание азота, который используется для расчёта содержания сырого белка с помощью коэффициента пересчёта (обычно 6,25).

- Процедура:

1. Образец биомассы подвергают обработке концентрированной серной кислотой в присутствии катализаторов, что приводит к разложению органических веществ и образованию аммонийного иона.

2. Аммиак выделяют и улавливают в борной кислоте.

3. Содержание азота определяется методом титрования.

- Преимущества:

- Стандартный и широко применяемый метод.

- Подходит для общего анализа белков.

- Ограничения:

- Не различает белки и другие соединения, содержащие азот.

Методы Брэдфорда или Лоури

- Метод Брэдфорда:

- Описание:

- Основан на связывании белков с красителем Кумасси Брильянт Блю G-

250.

- Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации белка.

- Процедура:

1. Образец растворяют и смешивают с реагентом Брэдфорда.

2. Измеряют оптическую плотность при 595 нм.

- Преимущества:

- Быстрый и чувствительный метод.

- Не требует сложного оборудования.

- Ограничения:

- Чувствителен к интерференции от некоторых соединений, таких как детергенты.

- Метод Лоури:

- Описание:

- Основан на реакции меди с белками в щелочной среде и взаимодействии с реагентом Фолина-Чокальтеу.

- Процедура:

1. Белковый раствор смешивают с реактивом Лоури.

2. Измеряют оптическую плотность при 750 нм.

- Преимущества:

- Высокая точность для растворимых белков.

- Ограничения:

- Более длительная процедура по сравнению с Брэдфордом.

Ключевые показатели

- Белок (% сухой массы):

- Показатель общего содержания белков.

- Аминокислотный профиль:

- Определяется с помощью методов, таких как ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография), для оценки состава аминокислот.

Содержание углеводов

Анализ содержания углеводов в *Chlorella vulgaris* sp2

Углеводы, содержащиеся в биомассе *Chlorella vulgaris*, играют важную роль в её использовании для производства биоэтанола, биопластиков и других углеродсодержащих продуктов. Ниже приведены методы анализа содержания углеводов:

Фенол-сернокислотный метод

- Описание:

- Этот метод основан на реакции углеводов с концентрированной серной кислотой, которая приводит к образованию фурфуроловых производных. Взаимодействие с фенолом образует окрашенные соединения, интенсивность которых пропорциональна концентрации углеводов.

- Процедура:

1. Образец биомассы растворяют в воде или буфере.
2. К раствору добавляют фенол и концентрированную серную кислоту.
3. Смесь инкубируют при комнатной температуре, затем измеряют оптическую плотность при 490 нм (для общего углевода) или 430 нм (для пентоз).

- Преимущества:

- Простой, быстрый и недорогой метод.
- Подходит для анализа общего содержания углеводов.

- Ограничения:

- Не подходит для детального профилирования отдельных углеводов.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

- Описание:

- Используется для определения профиля отдельных моносахаридов и олигосахаридов.

- Процедура:

1. Углеводы из биомассы извлекаются с использованием кислотного или ферментативного гидролиза.
2. Полученные гидролизаты фильтруются и анализируются на ВЭЖХ с использованием детекторов:

- Рефрактометрического: Для общего определения сахаров.
- Электрохимического: Для высокочувствительного анализа.

Сравнение данных с контрольными образцами позволяет идентифицировать и количественно определить состав углеводов.

- Преимущества:

- Высокая точность и специфичность.

- Подходит для исследования состава углеводов, таких как глюкоза, манноза, галактоза и другие.

- Ограничения:

- Требуется специализированного оборудования.

Ключевые показатели

- Общее содержание углеводов (% сухой массы):

- Получается из фенол-сернокислотного метода.

- Профиль углеводов (моносахариды):

- Анализируется с помощью ВЭЖХ для определения типов и количества сахаров.

Анализ пигментов

Анализ пигментов в *Chlorella vulgaris* sp2

Chlorella vulgaris богата биологически активными пигментами, такими как хлорофиллы и каротиноиды, которые имеют коммерческую ценность в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. Ниже представлены методы анализа содержания пигментов:

Спектрофотометрия

- Описание:

- Быстрый и стандартный метод количественного анализа пигментов, таких как хлорофилл а, b и общие каротиноиды.

- Процедура:

1. Экстракция пигментов из биомассы с использованием органических растворителей (например, ацетона, метанола или этанола).

2. Измерение оптической плотности экстракта на определённых длинах волн:

- Хлорофилл а: 663 нм.

- Хлорофилл b: 645 нм.

- Общие каротиноиды: 470 нм.

3. Использование уравнений для расчёта концентрации пигментов на основе измеренных значений.

- Преимущества:

- Простой и доступный метод.

- Быстрые результаты.

- Ограничения:

- Подходит для общего количественного анализа, но не для детального профилирования.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

- Описание:

- Используется для детального профилирования и количественного анализа отдельных пигментов, таких как лютеин, β -каротин, и хлорофиллы.

- Процедура:

1. Экстракция пигментов с использованием ацетона или метанола.

2. Пробоподготовка: фильтрация и, при необходимости, концентрирование экстракта.

3. Анализ на ВЭЖХ с использованием подходящих детекторов (например, УФ-видимого спектра при длине волны 450-470 нм для каротиноидов).

4. Идентификация пигментов проводится путём сравнения с известными стандартами.

- Преимущества:

- Высокая точность и воспроизводимость.

- Возможность различать и количественно определять отдельные пигменты.

- Ограничения:

- Требуется специализированного оборудования и стандартизированных реагентов.

Ключевые показатели

1. Содержание хлорофилла (мг/г сухой массы):

- Хлорофилл а, b и общее содержание.

2. Содержание каротиноидов:

- Лютеин, β -каротин, и другие каротиноиды.

Применение результатов

- Пищевые добавки: Пигменты, такие как лютеин, полезны для здоровья глаз.

- Косметика: Каротиноиды и хлорофилл используются как антиоксиданты и натуральные красители.

- Фармацевтика: Биологическая активность пигментов делает их перспективными для применения в лекарствах.

Минеральный и элементный состав

Анализ минерального и элементного состава *Chlorella vulgaris* sp2

Минеральный и элементный состав *Chlorella vulgaris* важен для оценки её пригодности в качестве источника микро- и макроэлементов в пищевых добавках, кормах и других промышленных применениях.

Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС) или Индуктивно-связанная плазменная масс-спектрометрия (ИСП-МС)

- Описание:

- Используются для точного определения содержания макроэлементов (например, Mg, Ca, K) и микроэлементов (Fe, Zn, Cu, Mn).

- Процедура:

1. Образец биомассы сжигают или подвергают кислотному разложению (например, с использованием азотной кислоты).

2. Раствор анализируется:

- ААС: Измеряет поглощение света атомами элемента для количественного определения.

- ИСП-МС: Использует индуктивно-связанную плазму для ионизации образца и масс-спектрометр для анализа элементов.

3. Результаты сравнивают с контрольными стандартами для калибровки.

- Преимущества:

- Высокая точность и чувствительность.

- Подходит для большинства элементов, включая следовые количества.

- Ограничения:

- Требуется специальное оборудование и подготовка проб.

Энергетическая дисперсионная рентгеновская спектроскопия (EDX)

- Описание:

- Метод, используемый в сочетании со сканирующей электронной микроскопией (СЭМ) для картирования распределения элементов на поверхности биомассы.

- Процедура:

1. Образец сушат и наносят на проводящую подложку.

2. СЭМ-EDX анализирует элементный состав, определяя относительные концентрации на основе энергии рентгеновских фотонов.

- Преимущества:

- Быстрый метод для поверхностного анализа.

- Подходит для исследования морфологии и элементного состава одновременно.

- Ограничения:

- Ограничен поверхностным анализом (глубина проникновения < 1 мкм).

- Менее чувствителен к следовым элементам по сравнению с ААС или ИСП-МС.

Ключевые показатели

- Минеральный состав (мг/г сухой массы):

- Макроэлементы: Mg, Ca, K, P, Na.

- Микроэлементы: Fe, Zn, Mn, Cu, Se, Co и другие.
- Соотношение микро- и макроэлементов:
 - Используется для оценки питательной ценности или промышленных свойств.

Применение результатов

- Пищевые добавки: Chlorella может быть богатым источником Fe, Mg и Zn.
- Фармацевтика: Использование минералов в биодобавках и лекарственных препаратах.
- Промышленные применения: Включает использование элементов для каталитических процессов.

Антиоксидантные соединения

- Цель: Антиоксиданты повышают ценность Chlorella в фармацевтике и добавках.
- Методы:
 - DPPH или ABTS тесты: Для оценки антирадикальной активности.
 - Определение фенолов и флавоноидов: Для количественного анализа биоактивных соединений.
 - Ключевые показатели: Общее содержание фенолов (мг GAE/г), антиоксидантная активность.

Структурные и морфологические исследования

- Цель: Анализ микроструктуры для изучения клеточной стенки и возможностей обработки биомассы.
- Методы:
 - Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ): Для анализа поверхности.
 - Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ): Для изучения внутриклеточной структуры.
 - ИК-Фурье-спектроскопия (FTIR): Для идентификации функциональных групп (например, белков, углеводов, липидов).

Содержание влаги и золы

- Цель: Определяет пригодность биомассы для различных применений.
- Методы:
 - Гравиметрический анализ: Для определения содержания влаги и золы.
- Ключевые показатели: Влажность (% сырой массы), зольность (% сухой массы).

Применения анализа

- Биотопливо: Высокое содержание липидов и оптимальный профиль жирных кислот.

- Питание и корма: Высокое содержание белков, витаминов и антиоксидантов.
- Фармацевтика: Богатство биоактивными соединениями (каротиноиды, антиоксиданты).
- Очистка сточных вод: Высокая способность к усвоению питательных веществ.

Биохимический состав *Chlorella vulgaris* sp2 подтверждает её применение в качестве многоцелевого ресурса. Высокое содержание белков делает её подходящей для использования в нутрицевтике, а профиль липидов и углеводов идеально подходит для производства биоэнергии. По сравнению с другими штаммами, *Chlorella vulgaris* sp2 демонстрирует сбалансированный состав, обеспечивающий универсальность в промышленных приложениях. Дополнительные исследования должны быть направлены на оптимизацию условий культивирования для усиления специфических биохимических путей.

Заключение

- *Chlorella vulgaris* sp2 демонстрирует высокую концентрацию белков, липидов и углеводов, что делает её ценным источником биомассы для различных применений.
- Её микроструктурная целостность и биохимическое разнообразие поддерживают её использование как в пищевых, так и в промышленных секторах.
- Провести дополнительные исследования по генетической и метаболической инженерии для увеличения выхода специфических биохимических компонентов.
- Изучить методы масштабного культивирования для оценки экономической целесообразности.
- Исследовать использование *Chlorella vulgaris* sp2 в очистке сточных вод как двойное решение для управления окружающей средой и производства биомассы.

Данное исследование подчёркивает потенциал *Chlorella vulgaris* sp2 как устойчивого ресурса, стимулируя дальнейшие исследования и промышленную интеграцию.

Литература.

1. Almutairi AW. Full utilization of marine microalgal hydrothermal liquefaction liquid products through a closed-loop route: towards enhanced bio-oil production and zero-waste approach. *3 Biotech.* 2022;12(9):209.
2. Bilanovic D, Andargatchew A, Kroeger T, et al. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations –

- responsesurfacemethodology analysis. *Energy Convers Manage.* 2009;50(2):262–267.
3. Hirata K, Phunchindawan M, Tukamoto J, et al. Cry opreservation of microalgae using encapsulation-dehy dration. *Cryo Lett.* 1996;17:321–328.
 4. Jacob-Lopes E, Cacia Ferreira Lacerda LM, Franco TT. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor. *Biochem Eng J.* 2008;40(1):27–34.
 5. de Morais MG, Costa JAV. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular pho tobioreactors. *Biotechnol Lett.* 2007;29(9):1349–1352.
 6. Mountourakis F, Papazi A, Kotzabasis K. The microalga *Chlorella vulgaris* as a natural bioenergetic system for effective CO₂ mitigation—new perspectives against global warming. *Symmetry (Basel).* 2021;13(6):997, doi: 10.3390/sym13060997.
 7. Sydney E, Da Silva T, Tokarski A, et al. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Appl Energy.* 2011;88(10):3291–3294.
 8. Chiu S-Y, Kao C-Y, Chen C-H, et al. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresour Technol.* 2008;99(9):3389–3396.
 9. Krishnan V, Uemura Y, Suzana Y, et al. Aspects of carbon dioxide mitigation by *Nannochloropsis oculata* cultured in a photobioreactor. *Appl Mech Mater.* 2014;625:12.
 10. Chiu S-Y, Kao C-Y, Tsai M-T, et al. Lipid accumu lation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis ocu lata* in response to CO₂ aeration. *Bioresour Technol.* 2009;100(2):833–838.
 11. Han SF, Jin W, Tu R, et al. Optimization of aera tion for biodiesel production by *scenedesmus obliquus* grown in municipal wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2016;39(7):1073–1079.