

УДК 577.151.45:582.263:546.712:577.112

И.А. ИЛЮЧИК

старший преподаватель кафедры биотехнологии¹

В.Н. НИКАНДРОВ, доктор биол. наук, профессор,

профессор кафедры биотехнологии¹

¹Полесский государственный университет,

г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 10 октября 2018г.

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОМОГЕНАТОВ КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS* И ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ КУЛЬТУРЫ ПРИ РОСТЕ В ПРИСУТСТВИИ *MnCl₂*

Резюме. Методом лизиса желатина и фибриногена в тонком слое агарового геля изучены изменения протеолитической активности при pH 3,0, 7,4 и 9,0 гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* на 10, 16, 22 и 40-е сутки роста культуры при добавлении в питательную среду хлорида марганца до конечной концентрации 0,025, 1,0 и 10,0 мг/л и сопоставлены со сдвигами уровня внутриклеточного белка. Подтверждено наличие функционально-метаболических перестроек клеток. Показано, что протеолитическая активность и уровень внутриклеточного белка в целом ряде случаев изменяются антибатно. Высказано суждение, что сдвиги протеолитической активности носят регуляторный характер.

Ключевые слова: культура хлореллы, протеолиз, хлорид марганца (II), расщепление белков.

ILYUCHYK I.A.,

senior lecturer of the Department of Biotechnology¹,

NIKANDROV V.N., Doctor of Biol. Sc. Habil., Professor of Biochemistry,

Professor of the Department of Biotechnology¹

¹Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus

PROTEOLYTIC ACTIVITY CHANGES OF HOMOGENATES OF *CHLORELLA VULGARIS* CELLS AND CULTURE FUNCTION-METABOLIC REORGANIZATIONS AT THE GROWTH IN THE *MnCl₂* PRESENCE

Summary. The changes of proteolytic activity at pH 3.0, 7.4 and 9.0 of *Chlorella vulgaris* cell homogenates were studied by gelatin and fibrinogen lysis method in thin-layer gel at 10, 16, 22 and 40 days of culture growth when manganese chloride was added to the medium to final concentration of 0.025, 1.0 and 10.0 mg/l and were compared with shifts of intracellular protein level. The presence of cell functional metabolic reorganizations was confirmed. It has been shown that the cell proteolytic activity and the level of intracellular protein in a number of cases change in antibathic manner. It has been suggested that these proteolytic activity shifts possess regulatory character.

Keywords: chlorella culture, proteolysis, manganese (II) chloride, protein cleavage.

Введение. Проблема масштабного производства «одноклеточного» белка продиктовала использование в качестве его продуцента фотосинтезирующую водоросль *Chlorella vulgaris*, характеризующуюся высоким содержанием белка в биомассе, широким спектром аминокислот и витаминов, низким со-

держанием липидов, экологической чистотой производства и рядом других моментов [1].

Как мы уже отмечали в предыдущей статье, в силу этого возникает насущная потребность изыскания путей обогащения биомассы хлореллы белком, в том числе путем изменения состава питательной среды. К по-

добным путем относится дополнительное введение в питательную среду микроэлементов [2].

Одним из абсолютно необходимых для жизни элементов является марганец. В фотосинтезирующих организмах он чрезвычайно важен для формирования и функции фотосинтезирующего аппарата [3,4]. Тем не менее, несмотря на длительное изучение, механизм его биологического действия остается недостаточно ясным.

Однако нами было показано [2], что добавление хлорида марганца в широком диапазоне концентраций в питательную среду при культивировании фотосинтезирующей водоросли *Chlorella vulgaris* сопровождалось несколькими функционально-метаболическими перестройками, выражающимися в изменениях скорости роста и уровня внутриклеточного белка, что сопряжено с изменениями интенсивности биосинтеза белка, проницаемости клеточной стенки и уровня протеолитических процессов. В отдельных случаях удалось зафиксировать рост уровня внутриклеточного белка.

Вместе с тем, учитывая богатый набор синтезируемых *Ch. vulgaris* витаминов, включая цианкобаламин, антибиотик «хлореллин», иммуномодулятор β -1,3-глюкан [5–7], представляется крайне необходимым исследование сущности упомянутых выше функционально-метаболических перестроек.

Цель настоящей работы – раскрыть особенности изменений внутриклеточной протеолитической активности клеток хлореллы на 10, 16, 22 и 40-е сутки роста культуры при добавлении в питательную среду $MnCl_2$.

Основная часть. В работе использовали фибриноген человека («Sigma», США), желатин («Fluka», Германия), бактоагар («Melford», США), другие реактивы были производства стран СНГ марки «хч»¹.

Исследования проведены на *Chlorella vulgaris*, штамм *IBCE C-19*, из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, любезно предоставленной сотрудниками Республиканского центра альгологии.

Ch. vulgaris выращивали в условиях периодической культуры на среде Тамия (Tamiya), не содержащей ЭДТА и солей марганца (контроль), в сосудах объемом 0,25 л при температуре окружающей среды 23 °С,

непрерывном барботировании суспензии воздухом со скоростью 20-25 л/ч, освещенности на поверхности сосуда – 4500-5000 лк, чередовании световых и темновых фаз 12ч/12ч. Посевная доза составляла $7,8 \pm 0,7$ млн клеток. Концентрацию клеток хлореллы определяли с помощью камеры Горяева. В питательную среду дополнительно вносили раствор хлорида марганца до конечной концентрации 0,025, 1,0 и 10,0 мг/л. В питательную среду контрольного варианта соль марганца не добавляли.

На 10, 16, 22 и 40-е сутки (время проявления перестроек культуры) отбирали аликвоты культуры, содержащие по $50 \pm 0,43$ млн клеток, клетки отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 мин, трижды отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой. Образцы клеток замораживали и хранили при температуре – 20 °С.

Клетки хлореллы разрушали в гомогенизаторе Поттера-Эльвейема при 4 °С в 0,5 мл бидистиллированной воды.

Протеолитическую активность полученных гомогенатов клеток хлореллы определяли по лизису желатина и фибриногена – наиболее интенсивно расщепляемых протеиназами хлореллы в тонком слое агарового геля, как было подробно описано ранее [2, 8].

Все исследования проведены семикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программ *Statistica 6.0* по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Ранее полученные материалы таблицы 1 и рисунка 1 четко показывают наличие перестроек культуры, проявившиеся в сдвигах уровня внутриклеточного белка (таблица 1, рисунок 1). Как было обнаружено ранее, в контрольном варианте в интервале 10→16 сутки уровень внутриклеточного белка возрос на 51% (таблица 1).

Одновременно выявлено падение уровня желатинолитической активности при pH 3,0 на 37% и фибринолитической активности при pH 9,0 – на 28% (таблица 2). Уменьшение концентрации внутриклеточного белка на 32% в интервале роста культуры 16→22 сутки ассоциировалось с усилением расщепления желатина протеиназами клетки хлореллы при pH 3,0 на 32%, а фибринолитической активности протеиназ при pH 7,4 – на 20% и интенсивности расщепления обоих белков при pH 9,0 на 20 и 31% соответственно (таблица 2).

¹ «хч» – химически чистые

Таблица 1 – Содержание белка в клетках хлореллы (мкг/млн клеток) при росте культуры на питательной среде с добавлением $MnCl_2$, (n = 9), приведено по [2]

Концентрация $MnCl_2$, мг/л	Время культивирования, сутки				
	1	10	16	22	40
Контроль	45,89 ± 2,84	39,19 ± 2,78	59,12 ± 2,24	40,19 ± 6,80	57,26 ± 1,45
0,025	23,75 ± 1,47*	24,40 ± 1,67	96,44 ± 2,80*	38,76 ± 1,31	97,80 ± 1,89*
1,000	41,56 ± 1,43	30,33 ± 1,11	96,94 ± 2,38*	53,24 ± 0,63	70,18 ± 2,37*
10,000	105,93 ± 0,91*	35,39 ± 1,77	77,97 ± 1,56*	53,41 ± 0,58	75,86 ± 1,21*

Примечание: * – изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$

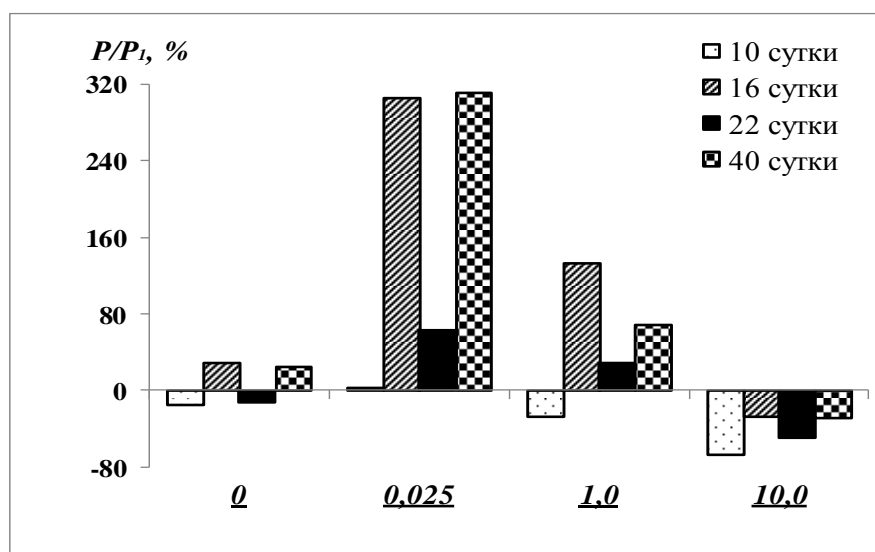


Рисунок 1 – Изменения уровня внутриклеточного белка (% к 1-м суткам культивирования, принятым за 100%) при добавлении в питательную среду $MnCl_2$, (полу жирным курсивом указана концентрация в мг/л)

Казалось бы, увеличение концентрации внутриклеточного белка в этот интервал культивирования обусловлен подавлением активности протеиназ.

Однако нарастание уровня белка в интервале 22→40 сутки на 42% выявлено как раз при значительно большем росте желатинолитической и фибринолитической активностей и при рН 7,4 и при рН 9,0 на 102 и 361% соответственно.

В случае добавления в питательную среду $MnCl_2$ во всех временных интервалах уровень белка изменялся в зависимости от концентрации эффектора (таблица 1, рисунок 1).

Но в интервале 10→16 сутки в зависимости от концентрации $MnCl_2$ уровень белка возрос значительно сильнее, чем в контроле: на 120–295% (максимальный эффект достигался при концентрации эффектора 0,025 мг/л), а при концентрации соли 0,025 мг/л – и в интервале 22→40 сутки – на 152%.

В период роста культуры 16→22 сутки при всех концентрациях хлорида марганца было обнаружено снижение уровня белка на 31–60% (таблица 1, рисунок 1).

Таблица 2 – Расщепление белков субстратов (мм² зон лизиса) гомогенатами клеток хлореллы при росте культуры на питательной среде с добавлением *MnCl₂*, (n = 7)

Концентрация <i>MnCl₂</i> , мг/л	Время культивирования, сутки							
	10		16		22		40	
	фибриногена	желатина	фибриногена	желатина	фибриногена	желатина	фибриногена	желатина
	pH 3,0							
Контроль	не исслед.	69,99 ± 2,68	не исслед.	44,11 ± 1,19	не исслед.	56,13 ± 0,86	не исслед.	63,63 ± 2,86
0,025	не исслед.	53,90 ± 1,36*	не исслед.	49,84 ± 1,32*	не исслед.	57,42 ± 1,41	не исслед.	65,59 ± 1,69
1,000	не исслед.	63,76 ± 0,91	не исслед.	41,87 ± 1,40	не исслед.	50,40 ± 1,89*	не исслед.	85,62 ± 3,52*
10,000	не исслед.	51,56 ± 1,35*	не исслед.	49,94 ± 2,84	не исслед.	50,91 ± 2,02*	не исслед.	48,89 ± 1,35*
pH 7,4								
Контроль	119,39 ± 2,07	110,91 ± 3,53	75,47 ± 0,81	79,54 ± 2,67	60,72 ± 3,10	71,77 ± 2,87	214,45 ± 10,76	194,93 ± 4,45
0,025	108,69 ± 4,02*	94,53 ± 3,35*	73,85 ± 1,35	133,26 ± 4,42*	68,58 ± 3,43	74,95 ± 2,68	81,55 ± 1,59*	131,82 ± 1,67*
1,000	87,82 ± 1,96*	100,61 ± 3,23	77,00 ± 2,90	76,29 ± 2,60	62,04 ± 3,75	67,63 ± 3,47	88,72 ± 1,37*	88,35 ± 2,61*
10,000	79,87 ± 1,61*	102,25 ± 3,53	51,81 ± 0,71*	81,00 ± 2,51	64,81 ± 2,80	169,95 ± 4,10*	52,06 ± 2,67*	59,07 ± 1,96*
pH 9,0								
Контроль	104,51 ± 2,29	90,63 ± 2,82	75,74 ± 1,93	82,17 ± 3,48	59,96 ± 1,03	56,50 ± 2,78	120,86 ± 4,36	260,29 ± 5,43
0,025	86,48 ± 3,74*	86,89 ± 1,32	68,66 ± 3,14	143,85 ± 8,66*	63,07 ± 2,05	58,57 ± 3,08	68,46 ± 2,43*	148,48 ± 4,58*
1,000	85,02 ± 0,80*	91,68 ± 3,60	71,84 ± 1,02	83,10 ± 2,62	67,48 ± 1,97*	68,23 ± 1,36*	67,96 ± 1,34*	91,41 ± 3,36*
10,000	69,05 ± 1,25*	94,80 ± 2,22	54,70 ± 3,22*	96,71 ± 3,79*	68,74 ± 1,02*	159,24 ± 5,21*	49,89 ± 1,42*	59,63 ± 2,56*

Примечание: * – изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$

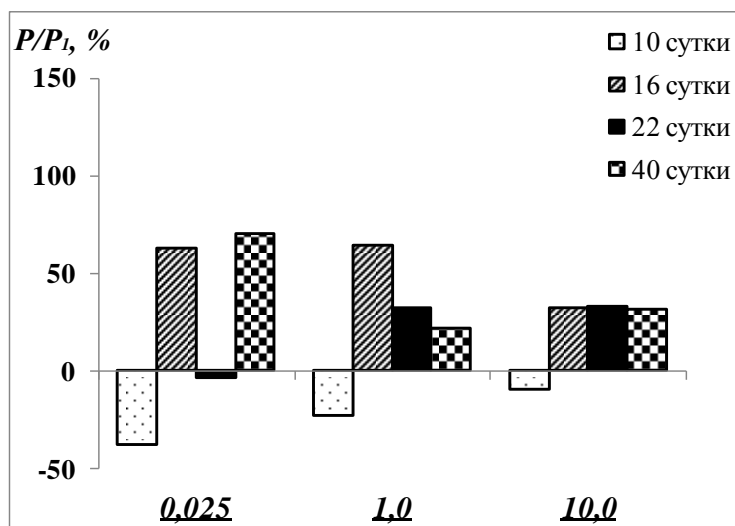


Рисунок 2 – Изменения уровня внутриклеточного белка (% к контролю, принятому за 100%) при добавлении в питательную среду *MnCl₂*, (полу жирным подчеркнутым курсивом указана концентрация в мг/л)

Следует отметить, что анализ изменений уровня белка по отношению к первым суткам роста позволил более рельефно продемонстрировать метаболические сдвиги, тогда как изменения под действием хлорида марганца по отношению к контрольному варианту были менее резки и давали информации о контрольном варианте (рисунок 2).

Изменения всех видов протеолитической активности в присутствии эффектора были гораздо меньшими в сравнении с таковыми контрольного варианта и зависели от концентрации *MnCl₂*.

Так, при добавлении в питательную среду эффектора в концентрации **0,025 мг/л**, согласно полученным нами данным, в интервалах роста культуры 10→16, 16→22 и 22→40 суток уровень внутриклеточного белка возрос в 4 раза, затем уменьшился на 60 и вновь увеличился на 152% соответственно (таблица 1, рисунок 1). Именно в этой концентрации хлорид марганца способствовал проявлению наиболее выраженных метаболических перестроек, судя по сдвигам концентрации внутриклеточного белка (рисунок 1).

Расщепление желатина протеиназами водоросли при pH 3,0 в динамике культивирования существенно не менялось: сдвиги не превышали 14%. Однако интенсивность расщепления желатина при pH 7,4 в интервалах роста 10→16, 16→22 и 22→40 суток возросла на 41, снизилась на 44 и возросла на 76% соответственно, а при pH 9,0 увеличилась на 67% в ранний период, уменьшилась на 41 в

период 16→22 суток и вновь возросла в 2,2 раза в поздний период роста.

Расщепление же фибриногена гомогенатами *Ch. vulgaris* при pH 7,4 в период культивирования 10→16 суток уменьшилось на 31%, в интервале 16→22 суток изменялось мало, а в конечном интервале вновь возросло на 19% соответственно. Фибринолитическая активность при pH 9,0 изменялась подобным образом: в период 10→16 суток снизилась на 21%, в интервале 16→22 суток практически не менялась, но и в интервале 22→40 суток она также практически не менялась (таблица 2).

При увеличении концентрации ***MnCl₂*** **1,00 мг/л**, судя по изменениям концентрации внутриклеточного белка, также заметны перестройки культуры (рисунок 1). В интервале роста культуры 10→16 суток концентрация внутриклеточного белка возросла в 3,2 раза, снижалась в интервале 16→22 суток на 45% и вновь увеличилась на 32% в конечный период роста культуры (таблица 1).

Расщепление желатина гомогенатами хлореллы при pH 3,0 в этих условиях в периоды 10→16, 16→22 и 22→40 суток снизилось на 34, затем выросло на 20 и на 70% соответственно. При pH 7,4 желатинолитическая активность гомогенатов в три периода роста культуры угнеталась на 24, затем – на 11 и возрастала на 31% соответственно. Лизис фибриногена в интервалы 10→16 и 16→22 суток снизился на 12 и 21% соответственно, а в заключительный период – активировался на 43%.

Сдвиги расщепления обоих белков при рН 9,0 в интервалы 10→16 и 16→22 суток, в целом, не превышали 18%. Лишь лизис желатина в заключительный период возрос на 34%, тогда как расщепление фибриногена вообще не изменилось.

Добавление $MnCl_2$ в концентрации 10,00 мг/л приводило к росту уровня внутриклеточного белка в 2,2 раза в период культивирования хлореллы 10→16 суток, снижению показателя к 22-м суткам на 31% и повышению его в заключительный период (к 40-м суткам) на 42% (таблица 1). На рисунке 1 изменения этого показателя не столь демонстративны, как в других случаях из-за высокого уровня внутриклеточного белка в 1-е сутки культивирования (таблица 1).

При рН 3,0 желатинолитическая активность гомогенатов практически не менялась в течение всего эксперимента. В период 10→16 суток выявлено снижение этой активности лишь при рН 7,4 на 21%, а фибринолитической активности – на 35%. При рН 9,0 в этот период только расщепление фибриногена угнеталось на 21%. В последующий интервал роста желатинолитическая активность заметно возросла при обоих значениях рН: в 1,6–2,1 раза, тогда как увеличение лизиса фибриногена составило 25–26%. В заключительные периоды – 22→40 суток резко – на 73–75% угнеталась желатинолитическая активность гомогенатов клеток хлореллы при обоих значениях рН, в то время как лизис фибриногена подавлялся только на 20–27% (таблица 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в большем количестве точек изменялась именно желатинолитическая активность, причем преимущественно наблюдалось повышение ее, тогда как для лизиса фибриногена это нехарактерно.

Более того, как мы указывали в предварительном кратком сообщении, колебания активности внутриклеточных протеиназ, наделенных желатинолитической и фибринолитической активностью при указанных рН, имеют более сложный характер, чем сдвиги уровня внутриклеточного белка. Эти сдвиги в большинстве случаев носят симбатный, а не антибатный характер изменений данных видов протеолитической активности [9].

В изложенных выше материалах достаточно четко видно, что, например, при до-

бавлении в питательную среду хлорида марганца в концентрации 0,025 мг/л в интервале роста культуры 10→16 суток рост уровня внутриклеточного белка совпадает в существенным увеличением желатинолитической активности при рН 7,4 и при рН 9,0, а не снижением таковой. При этом сдвиги данной активности в кислой среде весьма невелики, а снижение фибринолитической активности по величине, несомненно, значительно уступает росту расщепления желатина (–32 против +65%).

Это подтверждает также сопоставление изменений уровня внутриклеточного белка по отношению к контрольному варианту (рисунок 2) с такими же изменениями протеолитической активности (рисунок 3).

Например, снижение содержания внутриклеточного белка при добавлении эффектора в питательную среду в концентрации 0,025 мг/л на 10-е сутки роста совпадает не с увеличением, а со снижением внутриклеточной желатинолитической и фибринолитической активности.

Точно так же на 16-е сутки при росте уровня внутриклеточного белка в большинстве случаев происходило увеличение, а не снижение желатинолитической активности (как можно было ожидать, полагая, что уровень белка непосредственно зависит от уровня протеолитических процессов), тогда как снижение лизиса фибриногена выявлено лишь при рН 9,0.

При внесении в питательную среду хлорида марганца в концентрации 10,00 мг/л на 22-е сутки роста культуры хлореллы увеличение содержания внутриклеточного белка совпадает с нарастанием расщепления желатина при рН 7,4 и 9,0, а также небольшим ростом фибринолитической активности при рН 9,0.

При внесении в питательную среду хлорида марганца в концентрации 10,00 мг/л на 22-е сутки роста культуры хлореллы увеличение содержания внутриклеточного белка совпадает с нарастанием расщепления желатина при рН 7,4 и 9,0, а также небольшим ростом фибринолитической активности при рН 9,0.

Анализ рисунков 2 и 3 позволяет выявить ряд подобных примеров.

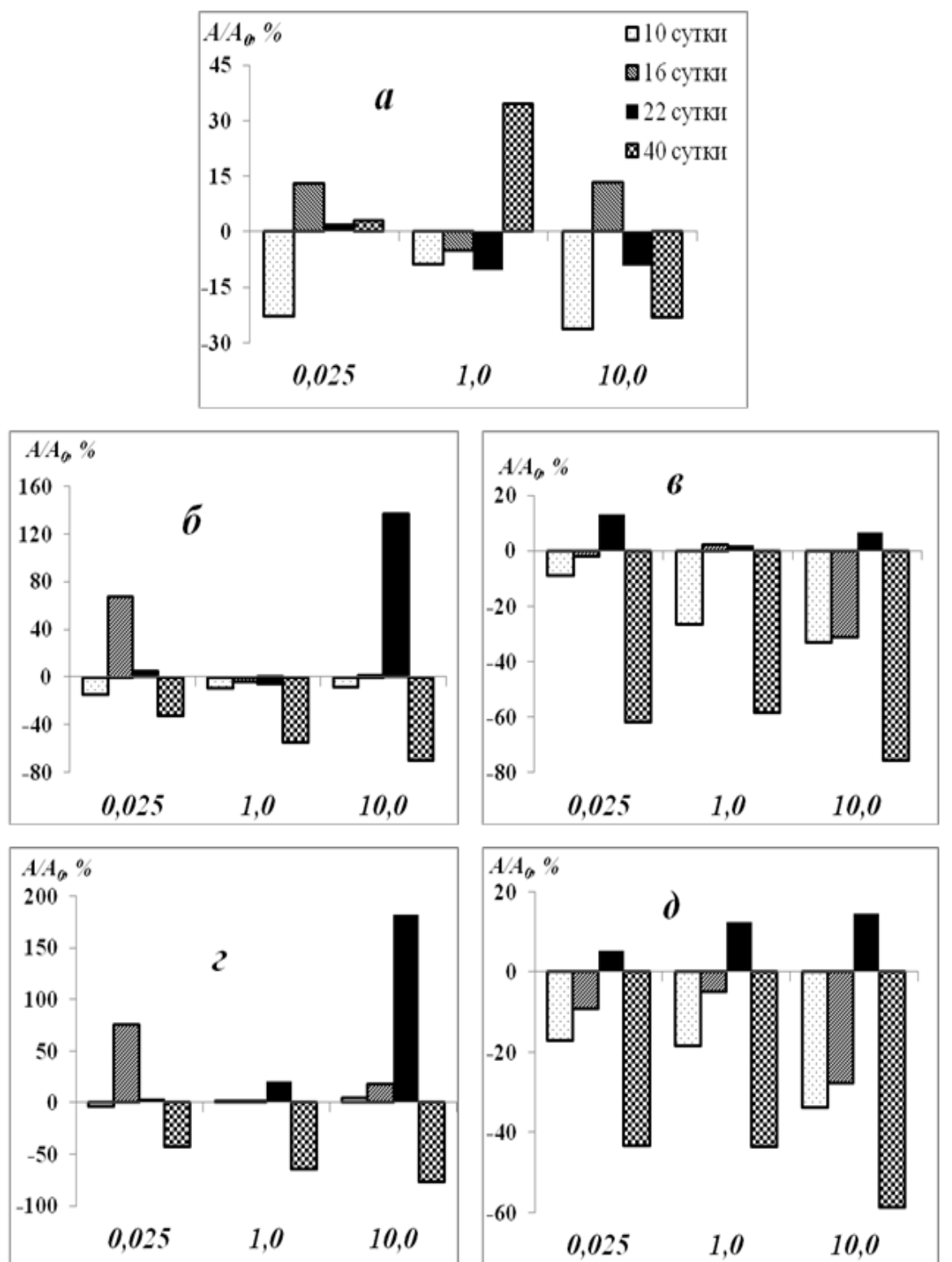


Рисунок 3 – Сдвиги (% к контролю, принятому за 100%) расщепления желатина (а, б, з) и фибриногена (в, д) при pH 3,0 (а), 7,4 (б, з) или 9,0 (в, д) протеиназами клеток хлореллы через 10, 16, 22 и 40 суток роста на питательной среде при добавлении $MnCl_2$ (внизу полужирным курсивом указана конечная концентрация эффектора в мг/л)

Заключение. Представленные материалы достаточно демонстративно свидетельствуют о правомерности ранее изложенного нами в кратком виде положения о том, что культура *Chlorella vulgaris* в процессе роста и развития проходит функционально-метаболические перестройки [9].

Это же позволяют наблюдать сдвиги внутриклеточной протеолитической активности, приведенные в данной статье. Добавление хлорида марганца в питательную среду в зависимости от концентрации способно изменять характер указанных перестроек. Контроль уровня биомассы и внутриклеточного белка позволяет в ранние сроки развития культуры вычленить более продуктивные варианты по белку при добавлении изучаемого эффектора. Колебания же уровня внутриклеточного протеолиза носят, на наш взгляд, скорее регуляторный характер, определяя скорость размножения клеток *Chlorella vulgaris* в культуре и, вполне возможно, продукцию ряда других биологически активных соединений. Выяснение этих аспектов составляет объемную задачу дальнейших исследований.

Список литературы

1. Suman, G. Single cell protein production: A review / G. Suman, M. Nupur, S. Anuradha, B. Pradeep // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2015. – Vol. 4. – P. 251–262.
2. Ильющик, И.А. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду / И.А. Ильющик, В.Н. Никандров // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2018. – № 1. – С. 53–64.
3. Zablocka-Slowinska, K. The role of manganese in etiopathogenesis and prevention of selected diseases / K. Zablocka-Slowinska, H. Grajeta // Postepy Hig. Med. Dosw. (Online). – 2012. – Vol. 66. – P. 549–553.
4. Lin, Y.T. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant // Y.T. Lin, H. Hoang, S.I. Hsieh, N. Rangel, A.L. Foster, J.N. Sampayo, G.J. Lithgow, C. Srinivasan // Free Radic. Biol. Med. – 2006. – Vol. 40, No. 7. – P. 1185–1193.
5. Макарова, Е.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем / Е.И. Макарова, И.П. Отурина, А.И. Сидякин // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2009. – Вып. 20. – С. 120–133.
6. Музафаров, А.М. Культивирование и применение микроводорослей / А.М. Музафаров, Т.Т. Таубаев. – Ташкент: Фан УзССР. – 1984. – 136 с.
7. Bleakley, S. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production / S. Bleakley, M. Hayes // Foods. – 2017. – Vol. 6, No. 5. – P. 33.
8. Никандров, В.Н. Методы исследования протеолиза. Глава 5 / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. – Минск: Выш. шк. – 2013. – С. 132–157.
9. Ильющик, И.А. О роли протеолиза в функционально-метаболических перестройках клеток *Chlorella vulgaris* при действии $MnCl_2$ / И.А. Ильющик, В.Н. Никандров // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: материалы IX междунар. науч. конф., Минск, 24–26 окт. 2018 г. / Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси. – Минск: Колорград, 2018. – С.50.

References

1. Suman G., Nupur M, Anuradha S., Pradeep B. Single cell protein production: A review . Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 2015, Vol. 4, pp. 251-262.
2. Ilyuchik I.A., Nikandrov V.N. Rost kulturyi hlorellyi (*Chlorella vulgaris*) i nakoplenie belka pri dobavlenii $MnCl_2$ v pitatelnuyu sredu [*Chlorella vulgaris* culture growth and protein accumulation at $MnCl_2$ addition in nutrient medium]. *Vesnik Paleskaga dzyarzhaynaga unIversIteta. Seryiya pryrodaznaychyih navuk* [Bulletin of Polesky State University. Series in Natural Sciences], 2018, no. 1, pp. 53-64 (In Russian).
3. Zablocka-Slowinska K., Grajeta H. The role of manganese in etiopathogenesis and prevention of selected diseases. *Postepy Hig. Med. Dosw*, 2012, vol. 66, pp. 549-553. (In Russian).
4. Lin Y.T., Hoang H., Hsieh S.I., Rangel N., Foster A.L., Sampayo J.N., Lithgow G.J., Srinivasan C. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant. *Free Radic. Biol. Med.* 2006. Vol. 40, no. 7p. 1185-1193.

5. Makarova E.I., Oturina I.P., Sidyakin A.I. Prikladnye aspekty primeneniya mikrovodoroslej – obitatelej vodnyh [Applied aspects of the use of microalgae - the inhabitants of water]. *Ehkosistemy, ih optimizaciya i ohrana* [Ecosystems, their optimization and protection], 2009, iss. 20, pp. 120-133. (In Russian).
6. Muzafarov A.M., Taubaev T.T. *Kul'tivirovanie i primenenie mikrovodoroslej* [Cultivation and use of microalgae]. Tashkent, 1984. 136 p. (In Russian)
7. Bleakley S., Hayes M. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, 2017, vol. 6, no. 5, p. 33.
8. Nikandrov V.N., Pyizhova N.S. Metody issledovaniya proteoliza. Glava 5. [Methods for the study of proteolysis. Chapter 5]. *Sovremennyye problemy biohimii. Metody issledovaniy* [Modern problems of biochemistry. Research methods]. Minsk: Visheyshaya shkola, 2013, pp. 132-157. (In Russian).
9. Ilyuchik I.A., Nikandrov V.N. O roli proteoliza v funkcional'no-metabolicheskikh perestrojkah kletok *Chlorella vulgaris* pri dejstvii MnCl₂ [On the role of proteolysis in functional metabolic rearrangements of *Chlorella vulgaris* cells under the action of MnCl₂]. *Regulyaciya rosta, razvitiya i produktivnosti rastenij: materialy IX mezhdunarodnoj nauchoj konferencii*. [Regulation of growth, development and productivity of plants]. Institute of Experimental Botany. V.F. Kuprevich NAS of Belarus. Minsk: Kolorgrad, 2018, p. 50. (In Russian).

Received 10 October 2018