

И.А. ИЛЬЮЧИК

старший преподаватель
Полесский государственный университет
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 2 октября 2017г.

**ВЛИЯНИЕ АТФ *IN VITRO* НА РАСЩЕПЛЕНИЕ БЕЛКОВ СУБСТРАТОВ
СУПЕРНАТАНТАМИ ГОМОГЕНАТОВ КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS***

Аннотация. Впервые установлено, что расщепление казеина и фибриногена протеиназами безъядерных супернатантов гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* заметно изменяется в присутствии аденозинтрифосфата (АТФ) в диапазоне концентраций 10^{-2} – 10^{-8} М. Эффект зависит от используемого белка–субстрата и выражен при использовании как казеина, так и фибриногена. Концентрационная зависимость носит сложный характер и включает не только зоны выраженного увеличения интенсивности протеолиза в случае казеина, но и его угнетения в случае фибриногена. Увеличение зон лизиса при расщеплении казеина в присутствии АТФ составила 5,4–38,5%, тогда как активность лизиса фибриногена при данном эффекторе уменьшилась на 2,9–29,2% в сравнении с контролем. Раскрытие такой особенности эффект аденозинтрифосфата требует дальнейших углубленных исследований.

Введение. В последние десятилетия зеленую микроводоросль *Chlorella* рассматривают как богатейший источник белковых веществ, витаминов, микроэлементов и других биологически активных веществ. Она составляет перспективный промышленный биотехнологический ресурс в качестве витаминно–кормовой добавки в рационе питания сельскохозяйственных животных, птицы, для получения препаратов тонкой химии, медицины, парфюмерии, в прикладных исследованиях и т.д. [1; 2; 3; 4; 5]. Белок хлореллы является белком высокого качества, представлен всеми необходимыми аминокислотами, в том числе и незаменимыми для человека, а по энергетической и биологической ценности его можно приравнять к мясокостной муке [6].

В настоящее время в литературе описан ряд оригинальных технологий с учетом биологических и морфологических характеристик выращивания хлореллы, не требующей больших трудозатрат [7]. Однако оптимизация технологий и процессов культивирования данной микроводоросли настоятельно требует раскрытия особенностей регуляции развития хлореллы и ее метаболизма на молекулярном уровне. К одним из важных механизмов регуляции относится система протеолиза. Несмотря на чрезвычайно большую значимость протеолиза в жизнедеятельности всех типов организмов, включая одноклеточные, познание механизмов регуляции протеолитических реакций на молекулярном, клеточном и системном уровнях далеки от решения.

Данные литературы об организации системы протеолиза у *Chlorella vulgaris* немногочисленны. Нами было установлено, что супернатанты хлореллы способны расщеплять казеин, гемоглобин, фибриноген, желатин в нейтральной среде [8]. Между тем, материалы о влиянии эффекторов на уровень протеолитической активности микроводорослей практически отсутствуют.

В живых организмах существует целая группа органических фосфатов, гидролиз которых приводит к освобождению большого количества свободной энергии, среди них и аденозинтрифосфат (АТФ), выступающий в роли донора энергии в эндергонических реакциях многих анаболических процессов в клетке. Кроме того, АТФ является аллостерическим эффектором ряда ферментов, способна усиливать или подавлять их активность [9; 10].

В литературе описано влияние АТФ на расщепление желатина, альбумина, фибриногена быка, фибриногена человека, казеина, гемоглобина госпитальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa*. Причем в экспериментах наблюдалось как усиление, так и угнетение протеолитической активности [11]. Описан ряд случаев ингибирования АТФ в концентрации 10^{-3} М протеолитической активности пепсина, металлопротеиназы бацилл, а при большей концентрации нуклеотида – активности трипсина, химотрипсина, пепсина. Направленность и сила эффекта существенно зависели от белка–субстрата [12].

Какое влияние оказывает АТФ на расщепление белков протеиназами водорослей, еще мало известно, что диктует необходимость дальнейших исследований данного эффекта.

Целью настоящей работы явилось выявление особенностей влияния аденозинтрифосфата на протеолитическую активность безъядерной фракции супернатантов гомогенатов клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris*.

Матодика и объекты исследования. Исследования проводили на культуре микроводоросли *Ch.vulgaris*, штамм *IBCEC-19* из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, предоставленный сотрудниками Республиканского центра альгологии.

В работе использовали казеин по Гаммерстену (Россия), фибриноген человека фирмы «Sigma» (США), АТФ фирмы «Carl Roth» (Германия), бактоагар фирмы «Melford» (США), яичный альбумин «Carl Roth» (Германия), кумаси ярко-голубой (Coomassie Blue Brilliant G-250) «Appli Chem» (Германия) и другие реактивы производства стран СНГ марки «хч»¹.

Ch.vulgaris выращивали в условиях периодической культуры на среде Тамия (*Tamiya*) [13] в сосудах объемом 1 л, при температуре окружающей среды 25–26 °С, толщина слоя 10 см. Культивирование микроводоросли осуществляли при непрерывном барботировании суспензии воздухом со скоростью 25 л/ч с помощью аквариумного компрессора *HAILEA ACO-003*; освещенность на поверхности сосуда (газоразрядные ртутные лампы низкого давления холодного дневного света *PHILIPSTDL 18W/3*) – 32 Вт/м²; продолжительность световых и темновых фаз (12ч/12ч) регулировали автоматически, используя программируемый таймер *PTHWDG 03*. Концентрацию клеток хлореллы определяли визуально под микроскопом Микмед-5 ЛОМО (×40) с помощью камеры Горяева [14].

На 7 сутки культивирования отбирали аликвоты культуры, содержащие по $65 \pm 0,38$ млн/мл клеток, трижды отмывали их дистиллированной водой, центрифугируя в течение 20 мин при 3000 об/мин.

Клетки *Ch.vulgaris* разрушали в гомогенизаторе Поттера–Эльвейема на льду с добавлением 0,5 мл бидистиллированной воды. Экстракцию белка проводили в течение 45–50 мин при 4 °С, перемешивая гомогенат каждые 10 мин. Затем полученный гомогенат центрифугировали 10 минут при 4 °С и 8000 об/мин. Концентрацию белка в супернатантах микроводоросли определяли колориметрическим методом.

Ход определения концентрации белка: супернатант *Ch.vulgaris* объемом 10 мкл прибавляли к 5 мл реактива Bradford [15], перемешивали и оставляли при комнатной температуре строго на 10 мин. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре *Cary 50 Scan* при длине волны 595 нм. В качестве раствора сравнения вместо образца брали аналогичное количество бидистиллированной воды. Содержание белка в пробе (мг/л) определяли по калибровочному графику, который строили, используя яичный альбумин, как описано ранее [16]. Измерения проводили в трех биологических и в трех аналитических повторностях.

Протеолитическую активность полученных супернатантов хлореллы определяли по лизису фибриногена или казеина в тонком слое агарового геля, как было описано ранее [17].

В качестве растворителя при приготовлении белок–агаровых пластин использовали 0,15 М раствор хлорида натрия (рН 7,4), с добавлением АТФ в диапазоне концентраций – 10^{-8} – 10^{-2} М. Контролем служил 0,15 М раствор хлорида натрия (рН 7,4) без добавок АТФ. Концентрация белков в белок–агаровой смеси составила – 10 г/л, агар–агара – 10 г/л.

Объем наносимого образца на готовые белок–агаровые пластины супернатантов клеток хлореллы – 10 мкл. Время инкубирования пластин с нанесенными пробами 20 ч при температуре 37 °С. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок–агаровых пластин 1 н соляной кислотой.

Все эксперименты выполнены не менее чем четырехкратно. Полученные результаты обработаны математически и статистически с использованием программ *MS Excel 2010*, *Statistica 6.0*, *Origin 6.1*.

Результаты исследования представлены как отношение площади расщепления экспериментальных белок–агаровых пластин к контрольным образцам (без присутствия АТФ).

Результаты и их обсуждение. В полученных безъядерных супернатантах гомогенатов клеток *Ch.vulgaris* концентрация белка составила $1,12 \pm 0,001$ мг/л. Данные супернатанты микроводоросли обладали протеолитической активностью при рН 7,4 и способны были расщеплять оба белка–субстрата (казеин и фибриноген), что подтверждает ранее полученные нами данные [18; 19].

¹«хч» – химически чистые.

Площади лизиса белков в контроле отличались незначительно, хотя казеин подвергался гидролизу менее интенсивно, чем фибриноген (таблица).

Введение ионов аденозинтрифосфата оказало заметное действие на интенсивность расщепления супернатантами гомогенатов клеток хлореллы как казеина, так и фибриногена. Причем активность расщепления этих двух белков существенно различались.

Таблица – Расщепление белков–субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* в присутствии АТФ

Концентрация ионов АТФ, М	Площадь лизиса белков–субстратов, мм ²	
	казеина	фибриногена
Контроль	65,5 ± 3,8	66,2 ± 2,8
10 ⁻²	77,4 ± 1,1*	52,0 ± 1,2*
10 ⁻³	76,7 ± 6,7	58,7 ± 2,5
10 ⁻⁴	84,2 ± 4,1*	64,3 ± 1,7
10 ⁻⁵	80,6 ± 4,2*	50,9 ± 0,6*
10 ⁻⁶	69,0 ± 2,4	60,9 ± 3,3
10 ⁻⁷	71,6 ± 3,4	59,4 ± 2,0
10 ⁻⁸	90,7 ± 2,5*	46,8 ± 1,3*

Примечание – *– изменения статистически достоверны при P ≤ 0,05

Фибринолитическая активность супернатантов *Ch. vulgaris* подавлялась в присутствии АТФ при всех исследуемых концентрациях (10⁻²–10⁻⁸ М), а казеинолитическая при данных концентрациях эффектора росла.

Так, изменения активности супернатантов клеток хлореллы при расщеплении казеина в присутствии АТФ носила трехфазный характер. Увеличение зон лизиса на 18,3–23,1%, на 5,4–38,5% наблюдалось при концентрации аденозинтрифосфата 10⁻²–10⁻⁵М, 10⁻⁶–10⁻⁸ М соответственно, в то время как при концентрации эффектора 10⁻⁶ М активность расщепления казеина возросла лишь на 5,4% по сравнению с контролем (таблица, рисунок).

Изменение фибринолитической активности было четырехфазным.

При концентрации АТФ 10⁻²–10⁻⁴ М активность лизиса фибриногена уменьшилась с 21,4 до 2,9%; при 10⁻⁴–10⁻⁵ М – с 2,9 до 23,1%; при 10⁻⁵–10⁻⁷ М – с 23,1 до 10,2%, а при 10⁻⁷–10⁻⁸ М – с 10,2 до 29,2% в сравнении с контролем (таблица, рисунок).

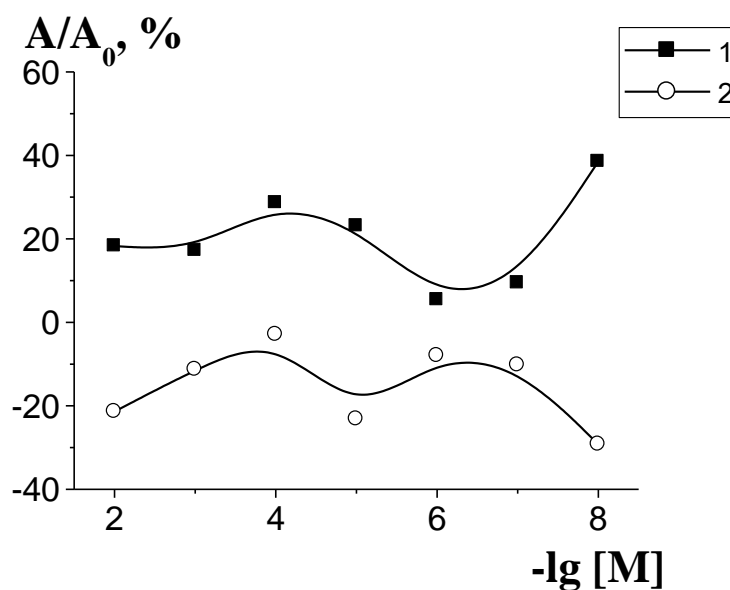


Рисунок – Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления казеина(1) или фибриногена (2) супернатантами гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* при добавлении АТФ, рН 7,4

Выводы. Результаты проведенных исследований показали, что расщепление фибриногена и казеина протеиназами безъядерных супернатантов гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* заметно изменяется в присутствии аденозинтрифосфата. Эффект зависит от используемого белка-субстрата. Концентрационная зависимость носит сложный характер. Зоны выраженного увеличения интенсивности протеолиза наблюдались в случае казеина, а угнетения – в случае фибриногена. Раскрытие такой особенности эффекта АТФ требует дальнейших углубленных исследований.

Список литературы

1. Упитис, В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В.В. Упитис. – Рига: Зинатне, 1983. – 240 с.
2. Минюк, Г.С. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс / Г.С. Минюк, И.В. Дробецкая, И.Н. Чубчикова [и др.] // Морской экологический журнал. – 2008. – Т. 7. – № 2. – С. 5-23.
3. Романенко, В.Д. Биотехнология культивирования гидрибионтов / В.Д. Романенко, Ю.Г. Крот, Л.А. Сиренко, В.Д. Соломатина; НАН Украины, ин-т гидробиологии. – Киев, 1999. – 264 с.
4. Пульц, О. Ценные вещества из водорослей / О. Пульц // Альгология. – 2000. – Т. 10. – № 3. – С. 344-348.
5. Мельников, С.С. Влияние чередования световых и темновых периодов на продуктивность хлореллы / С.С. Мельников, Т.В. Самович, Е.Е. Мананкина // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: междунар. научн. конф.; Десятый съезд белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, 19-21 июня 2012 г., Минск, Беларусь: в 2 ч. Ч. 2 – Минск : БГУ Издательский центр, 2012. – 311 с.
6. Мельников, С.С. Хлорелла: Физиологически активные вещества и их использование / [С.С. Мельников](#), Е.Е. Мананкина // [Институт фотобиологии АН БССР](#). – Минск: Навука і тэхніка, 1991. – 79 с.
7. Гайсина, Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: учебное пособие. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. – 152 с.
8. Ильючик, И.А. Значение исследований организации системы протеолиза хлореллы для целей биотехнологии / И.А. Ильючик, О.Н. Жук, В.Н. Никандров // Биотехнология: достижения и перспективы развития: сборник материалов I междунар. научн.-практ. конф., г. Пинск, 25-26 сентября 2014 г. – Пинск : ПолесГУ, 2014. – С. 16-17.
9. Биохимия: учебник / под ред. Е.С. Северина. – 2-е изд. испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 784 с.
10. Дэвис, Д. Биохимия растений / Д. Дэвис, Дж. Джованелли, Т. Рис; пер. с англ. А.А. Бундель и [др.]; под ред. В.Л. Кретовича. – М.: Мир. – 1966. – 512 с.
11. Пыжова, Н.С. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена / Н.С. Пыжова, В.Н. Никандров // Биоорганическая химия. – 2008. – Т. 34. – № 3. – С. 382–391.
12. Никандров, В.Н. Нетривиальные проявления протеолиза на молекулярном и клеточном уровнях, их фундаментальное и прикладное значение / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // Новости медико-биологических наук: открытия, гипотезы, перспективы — Минск: Институт физиологии НАН Беларуси, 2010. — Т.2. - №3. - С. 14 – 28.
13. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / сост. С.С. Мельников [и др.]. – Минск: Белорусская наука, 2011. – 101 с.
14. Сидоренко, Л.А. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л.А. Сидоренко [и др.]. – Киев: Наукова думка, 1975. – 247 с.
15. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
16. Невмержицкая, Ю.Ю. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты) / Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева. - Казань: Казанский университет, 2012. – 36 с.
17. Никандров, В.Н. Методы исследования протеолиза / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. — Минск: Вышэйшая школа, 2013. —С. 132–157.
18. Ильючик, И.А. Особенности влияния ионов марганца на протеолитическую активность экстрактов *Chlorella vulgaris* / И.А. Ильючик, О.Н. Жук // Физико-химическая биология: материалы

IV Междунар. научн. интернет-конф., Ставрополь, 23-25 ноября 2016 г. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2016. - С. – 123-126.

19. Ильючик, И.А. Влияние ионов марганца *in vitro* на протеолитическую активность в супернатантах гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // Менделеевские чтения 2017: сб. материалов междунар. науч.-практ. конф. по химии и хим. образованию, Брест, 24 февраля 2017 г. – Брест: БрГУ, 2017. - С. 61-63.

ILYUCHYK I.A.

INFLUENCE OF ATP *IN VITRO* ON SPLIT PROTEIN PROTEINS SPLITTING BY SUPERNATANTS OF HOMOGENATES OF CHLORELLA VULGARIS CELLS

Summary. *It was first established that casein and fibrinogen are cleaved in the presence of ATP by proteinases of Chlorella vulgaris cell homogenates. ATP markedly changed the areas of protein lysis in the concentration range of 10^{-2} – 10^{-8} M. The effect depends on the substrate protein. Dependence is complex.*

In the case of casein, proteolysis intensifies. In the case of fibrinogen – weaken. The increase in lysis zones during the cleavage of casein in the presence of ATP was 5,4–38,5%. The decrease in the lysis zones during the cleavage of fibrinogen in the presence of ATP was 2,9–29,2%. The specific features of the effect of adenosine triphosphate need further research.

References

1. Uptis V.V. *Makro- i mikroelementy v optimizatsii mineral'nogo pitaniia mikrovdoroslei* [Macro and microelements in the optimization of mineral nutrition of microalgae]. Riga, Zinatne Publ, 1983. 240 p. (In Russian)
2. Miniuk G.S., Drobetskaia I.V., Chubchikova I.N. et al. *Odnokletochnye vdorosli kak vozobnovliaemyi biologicheskii resurs* [Unicellular algae as a renewable biological resource]. *Morskoi ekologicheskii zhurnal* [Marine ecological journal], 2008, Vol. 7, no 2, pp. 5-23. (In Russian)
3. Romanenko V.D., Krot Iu.G., Sirenko L.A., Solomatina V.D. *Biotekhnologiiia kul'tivirovaniia gidribiontov* [Biotechnology of cultivation of hydrobionts]. Kiev, 1999. 264 p. (In Russian)
4. Pul'ts O. *Tsennye veshchestva iz vdoroslei* [Valuable substances from algae]. *Al'gologiiia* [Algology], 2000, Vol. 10, no 3, pp. 344-348. (In Russian)
5. Mel'nikov S.S., Samovich T.V., Manankina E.E. *Vliianie cheredovaniia svetovykh i temnykh periodov na produktivnost' khlorelly* [The influence of the alternation of light and dark periods on the productivity of chlorella]. *Molekuliarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniia biosistem. Mezhdunarodnaia nauchnaia konferentsiia. Desiatyi s'ezd belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniia fotobiologov i biofizikov, 19-21 iunია 2012 g., Minsk, Belarus'. Chast ' 2* – Minsk : Belorusskii gosudarstvennyi universitet Publ, 2012. 311 p. (In Russian)
6. Mel'nikov S.S., Manankina E.E. *Khlorella: Fiziologicheskii aktivnye veshchestva i ikh ispol'zovanie* [Chlorella: Physiologically active substances and their use]. Minsk, Navuka i tekhnika Publ, 1991. 79 p.
7. Gaisina L.A., Fazlutdinova A.I., Kabirov R.R. *Sovremennye metody vydeleniia i kul'tivirovaniia vdoroslei* [Modern methods of isolation and cultivation of algae: a textbook]. Ufa, Bashkirskii gosudarstvennyi pedagogicheskii universitet Publ, 2008. 152 p. (In Russian)
8. Il'yuchik I.A., Zhuk O.N., Nikandrov V.N. *Znachenie issledovaniia organizatsii sistemy proteoliza khlorelly dlia tselei biotekhnologii* [Research importance of the organization of the chlorella proteolysis system for biotechnology purposes]. *Biotekhnologiiia: dostizheniia i perspektivy razvitiia. Sbornik materialov I mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, g. Pinsk, 25-26 sentiabria 2014 g.* – Pinsk, Poleskii gosudarstvennyi universitet Publ, 2014, pp. 16-17. (In Russian)
9. *Biokhimiia* [Biochemistry]. Ed. E.S. Severin. 2nd ed. Moscow, GEOTAR-Media, 2004. 784 p. (In Russian)
10. Devis D., Dzhovanelli Dzh., Ris T. *Biokhimiia rastenii* [Biochemistry of plants]. Moscow, Mir Publ, 1966. 512 p. (In Russian)
11. Pyzhova N.S., Nikandrov V.N. *Vliianie biogenykh fosfatov na rasshcheplenie belkov proteinazami i funktsiiu aktivatorov plazminogena* [Influence of biogenic phosphates on the protein splitting

with proteinases and the function of plasminogen activators]. *Bioorganicheskaya Khimiya*, 2008, Vol. 34, no 3, pp. 382–391. (In Russian)

12. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. *Netrivial'nye proiavleniia proteoliza na molekuliarnom i kletochnom urovniakh, ikh fundamental'noe i prikladnoe znachenie* [Nontrivial manifestations of proteolysis at the molecular and cellular levels, their fundamental and applied importance]. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk: otkrytiia, gipotezy, perspektivy* [News of Biomedical Sciences], 2010, vol.2, no 3, pp. 14 – 28. (In Russian)

13. Mel'nikov S.S. et al. *Katalog geneticheskogo fonda khoziaistvenno poleznykh vidov vodoroslei* [Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae]. Minsk, Belarusskaia navuka Publ, 2011. 101 p. (In Russian)

14. Sidorenko L.A. *Metody fiziologo-biokhimicheskogo issledovaniia vodoroslei v gidrobiologicheskoi praktike* [Methods of physiological and biochemical study of algae in hydrobiological]. Kiev, Naukova dumka Publ, 1975. 247 p. (In Russian)

15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 1976, Vol. 72, pp 248–254.

16. Nevmerzhitskaia, Iu.Iu., Timofeeva O.A. *Praktikum po fiziologii i biokhimii rastenii (belki i fermenty)* [Workshop on the physiology and biochemistry of plants (proteins and enzymes)]. Kazan', Kazanskii universitet Publ, 2012. 36 p. (In Russian)

17. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. *Metody issledovaniia proteoliza* [Methods for the study of proteolysis]. *Sovremennye problemy biokhimii. Metody issledovaniia*. Minsk, Vysheishaia shkola Publ. , 2013, pp. 132–157. (In Russian)

18. Il'iuchik I.A., Zhuk O.N. *Osobennosti vliianiia ionov margantsa na proteoliticheskuiu aktivnost' ekstraktov Chlorella vulgaris* [Peculiarities of the influence of manganese ions on the proteolytic activity of *Chlorella vulgaris* extracts]. *Fiziko-khimicheskaya biologiya* [Physicochemical biology]. *Materialy IV Mezhdunarodnoi nauchnoi internet-konferentsii, Stavropol', 23-25 noiabria 2016 g.* Stavropol', Stavropol'skii gosudarstvennyi meditsinskii universitet Publ, 2016, pp 123-126. (In Russian)

19. Il'iuchik I.A., Nikandrov V.N. *Vliianie ionov margantsa in vitro na proteoliticheskuiu aktivnost' v supernatantakh gomogenatov kletok Shlorella vulgaris*. [Influence of manganese ions in vitro on proteolytic activity in supernatants of *Chlorella vulgaris* cells homogenates]. *Mendeleevskie chteniia 2017. Sbornik materialov mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii po khimii i khimicheskomu obrazovaniuu, Brest, 24 fevralia 2017 g.* Brest, Brestskii gosudarstvennyi universitet Publ, 2017, pp. 61-63. (In Russian)

Received 2 october 2017