

Учреждение образования
«Брестский государственный университет имени А.С. П; на»

Менделеевские чтения - 2018

Сборник материалов
Республиканской научно-практической конференции
по химии и химическому образованию

Брест, 2 марта 2018 года

Под общей редакцией Н.Ю. Колбас

Брест
БрГУ имени А.С. Пушкина
2018

УДК 37+54+57+61+66+371+372+373+378+502+524+538+539+541+542+
543+544+546+547+574+577+581+631+634+636+661+666+667+691
ББК 24.1+24.2+24.4+24.5
М 50

*Рекомендовано редакционно-издательским советом Учреждения образования
«Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина»*

Рецензенты:

кандидат технических наук, доцент **С.В. Басов**
кандидат биологических наук, доцент **Н.М. Матусевич**

Редакционная коллегия:

кандидат технических наук, доцент **Э.А. Тур**
кандидат биологических наук, доцент **Н.Ю. Колбас**
старший преподаватель **В.В. Коваленко**

М 50 Менделеевские чтения - 2018: сб. материалов Респ. науч.-
практ. конф. по химии и хим. образованию, Брест, 2 марта 2018 г. /
Брест, гос. ун-т им. А. С. Пушкина ; редкол.: Э. А. Тур,
Н. Ю. Колбас, В. В. Коваленко ; под общ. ред. Н. Ю. Колбас. -
Брест :БрГУ, 2018.-229 с.
ISBN 978-985-555-810-2.

В материалах сборника освещаются актуальные проблемы химии и экологии, а также отражен опыт преподавания соответствующих дисциплин в высших и средних учебных заведениях.

Материалы могут быть использованы научными работниками, аспирантами, магистрантами, преподавателями и студентами высших учебных заведений, учителями химии и другими специалистами системы образования.

УДК 37+54+57+61+66+371+372+373+378+502+524+538+539+541+542+
543+544+546+547+574+577+581+631+634+636+661+666+667+691
ББК 24.1+24.2+24.4+24.5

ISBN 978-985-555-810-2

© УО «Брестский государственный
университет имени А.С. Пушкина», 2018

И.А. ИЛЬЮЧИК, В.Н. НИКАНДРОВ

Беларусь, Пинск, ПТУ

**ОСОБЕННОСТИ РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКОВ СУБСТРАТОВ
СУПЕРНАТАНТАМИ ГОМОГЕНАТОВ КЛЕТОК
CHLORELLA VULGARIS ПРИ РАЗЛИЧНОМ pH**

В последние десятилетия одной из проблем является нарастание дефицита белка в рационе населения и кормах для животных. В связи с этим большое внимание в биотехнологии уделено разработке приемов получения полноценного белка для пищевых целей и как добавки в корм сельскохозяйственным животным. Наиболее масштабно в этом плане развивается направление получения т.н. «одноклеточного» белка, продуцентами которого являются разнообразные одноклеточные организмы, в том числе и водоросли.

К числу последних относится одноклеточная зеленая водоросль *Chlorellavulgaris*, которая рассматривается как перспективный промышленный биотехнологический ресурс в качестве витаминно-кормовой добавки в рационе питания сельскохозяйственных животных, птицы, рыбы и т.д. Белок хлореллы является белком высокого качества, содержит все протеиногенные аминокислоты, в том числе и незаменимые [1]. Кроме того, водоросль синтезирует также ряд витаминов.

Интенсификация технологии культивирования хлореллы требует углубленного знания механизмов регуляции ее метаболизма. Одним из таких важных механизмов является реакции протеолиза. Однако данные литературы об особенностях организации этой системы у одноклеточных водорослей, и в частности у хлореллы, крайне малочисленны.

Ранее было установлено, что расщепление фибриногена и казеинов протеиназами супернатантов гомогенатов клеток *Chlorellavulgaris* заметно изменяется в присутствии анионов неорганического ортофосфата в диапазоне концентраций 0,001-0,060 М. Этот эффект зависел от используемого белка-субстрата и был значительно более выражен в случае казеина. Концентрационная зависимость носила сложный характер, включающий не только зоны выраженного увеличения интенсивности протеолиза на 58,6-122,7 %, но и его угнетения на 37 %. В присутствии 0,1 М неорганического ортофосфата существенно изменялся характер действия $MnCl_2$ в диапазоне концентраций 10^{-8} — 10^{-2} М: в целом расщепление обоих белков под действием $MnCl_2$ усиливалось на 31-52 % [2; 3].

Было показано также, что в трис-НСl буфере $MnCl_2$ вызвал снижение фибринолитической активности на 27-35 %, а изменения казеинолитической активности не превышали 12 %. Было выдвинуто предположение о возможности присутствия в супернатанте по меньшей мере двух протеиназ, одна из которых Mn-независимая, а вторая подавляется этим катионом в низких концентрациях [4].

Эти материалы являются фактически лишь первыми «шагами» в изучении особенностей системы протеолиза клеток хлореллы.

Цель работы - раскрыть особенности расщепления белков субстратов протеиназами безъядерных супернатантов гомогенатов клеток фотосинтезирующей водоросли *Chlorellavulgaris* при различной величине рН

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на культуре зеленой одноклеточной водоросли *Ch. vulgaris*, штамм *IBCEC-li* из альгологической коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

В работе использовали казеин по Гаммерстену (Россия), фибриноген человека и гемоглобин быка («Sigma», США), желатин («Fluka», Германия), бактоагар («Melford», США), другие реактивы были производства стран СНГ марки «хч».

Водоросль выращивали в условиях периодической культуры на среде Тамия при непрерывном барботаже суспензии культуры воздухом - 25 л/ч, температуре окружающей среды - 25 °С, освещенности на поверхности сосуда - 5 000 лк, фотопериоде (свет/темнота) - 12 ч/12 ч.

На 7 сутки культивирования микроводоросли отбирали аликвот культуры, содержащие по $120 \pm 6,19$ млн/мл клеток, отмывали их бидистиллированной водой, гомогенизировали 5 минут при 4 °С с добавлением бидистиллированной воды, гомогенат центрифугировали в течение 10 минут при 8 000 об/мин при 4 °С.

Протеолитическую активность полученных супернатантов клеток *Ch. vulgaris* определяли по лизису казеина, желатина, гемоглобина и фибриногена в тонком слое агарового геля [5].

В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали ацетатный буфер pH 3,0, трис-HCl буфер pH 7,4 и pH 9,0. Концентрация белков-субстратов в пластине составляла 10 г/л, агар-агара - 10 г/л, объем наносимых образцов на готовые белок-агаровые пластины супернатантов клеток хлореллы - 10 мкл.

Пластины инкубировали при температуре 37 °С 20 часов. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 1 М хлорной кислотой.

Все эксперименты выполнены не менее чем пятикратно, результаты обработаны статистически.

Результаты и их обсуждение. Безъядерные супернатанты гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* не содержат протеиназы, способные расщеплять использованные белки субстраты в кислой среде (таблица). Это суждение, однако, не является исчерпывающим, поскольку исследования проведены в отсутствие каких-либо эффекторов, тогда как для выявления активности ряда протеиназ, в том числе и «кислых», таковые требуются.

Таблица - Влияние pH на расщепление белков субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* (n = 5)

Растворитель	Площадь зон лизиса белков, мм ²			
	желатин	казеин	фибриноген	гемоглобин
0,2 М ацетатный буфер pH 3,0	0	0	0	0
0,05 М трис-HCl буфер pH 7,4	следы	80,07 ± 2,94	51,34 ± 2,53	следы
0,1 М трис-HCl буфер pH 7,	0	33,37 ± 3,52	26,64 ± 3,45	0
0,1 М фосфатный буфер pH 7,4	0	41,56 ± 1,94	41,28 ± 1,40	0
0,05 М трис-HCl буфер pH 9,0	96,48 ± 2,14	64,06 ± 2,34	57,27 ± 2,10	60,68 ± 3,39

При pH 7,4 супернатанты гомогенатов клеток хлореллы расщепляли только казеин и фибриноген, причем в 0,05 М трис-HCl буфере интенсивность расщепления казеина в 1,6 раза превышала таковую фибриногена. Однако с увеличением молярности буферного раствора эта разница уменьшалась и не превышала 1,25 раза.

Следует заметить, что замена 0,1 М трис-HCl буфера фосфатным такой же концентрации сопровождалась увеличением казеинолитической и особенно фибринолитической активности супернатантов на 25 и 55 % соответственно.

Это в целом соответствует представлениям о проявлении «фосфатного эффекта» в протеолизе [6-8]. Так, например, выявление фибринолитической активности ряда условно-патогенных микроорганизмов воз-
фа*⁰™ только в присутствии неорганических ортофосфата или пирофос-

Картина существенно изменялась при pH 9,0: протеолизу супернатантами гомогенатов клеток хлореллы подвергались все четыре белка (таблица). По интенсивности расщепления белки образовывали следующий ряд: желатин > казеин > гемоглобин > фибриноген.

В целом интенсивность расщепления желатина превосходила так* I вую трех остальных белков в 1,5-1,7 раза. При этом в 0,05 М трис-НС буфере в щелочной среде по сравнению с расщеплением при pH 7,4 интенсивность протеолиза фибриногена практически не менялась, а казеиновая I тическая активность снижалась на 20 %.

Изложенные результаты достаточно четко показывают, что способность безъядерных супернатантов гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* расщеплять белки-субстраты различного типа принципиально зависит от величины pH реакционной системы.

Судя по полученным данным, в супернатантах отсутствуют протеиназы, проявляющие активность в кислой среде. Однако, как уже отмечено! выше, это заключение носит предварительный характер, поскольку в ряде случаев для обнаружения активности протеиназ в реакционную систему^ требуется внесение эффектора, а с другой стороны, нельзя исключить присутствие в супернатанте компонентов клетки, обладающих ингибиторными I ми свойствами в отношении протеиназ данного типа.

Относительно присутствующих в супернатантах гомогенатов клеток водоросли «нейтральных» протеиназ складывается впечатление, что эти гидролазы проявляют активность к весьма ограниченному спектру белков. Тем не менее отмеченное выше для «кислых» протеиназ вполне справедливо и для «нейтральных»: возможно, требуется внесение какого-ли¹ эффектора и нельзя исключить присутствие в супернатанте ингибиторных субстанций.

Активность этих протеиназ достаточно заметно возрастала в присутствии неорганического ортофосфата. Не исключено, что добавление его в реакционную систему может усилить расщепление белков супернатантами гомогенатов клеток водоросли также в кислой и щелочной среде, но для этого необходимо проведение дальнейших исследований.

Наиболее интересны результаты исследования активности протеиназ при pH 9,0. В этом случае расщеплению подвергались все четыре белка/ хотя уровень протеолитической активности по казеину несколько снижался, и в систему также не вводили какие-либо эффекторы. Логически возникает вопрос о значении протеиназ подобного типа для жизнедеятельности хлореллы, создающий самостоятельный фронт работы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс / Г. С. Минюк [и др.] // Морской экол. журн. - 2008. - Т. 7, № 2. - С. 5-

2. Никандров, В. Н. Изменения расщепления белков субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* при действии анионов неорганического ортофосфата и хлорида марганца (II) *in vitro* / В. Н. Никандров, И. А. Ильючик, О. Н. Жук // Животноводство и ветеринар, медицина. - 2017. - № 4. - С. 67-71.

3. Il'yuchik, I. A. Orthophosphate effect on proteolytic activity of supernatants of *Chlorella vulgaris* cell homogenates / I. A. Il'yuchik, V. N. Nikandrov // Joint Meeting of the 25th Annual Conference "Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology", The Ukrain. // Biochem. J. - 2017. - Vol. 89, № 3. - P. 105.

4. 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 февр. 2017 г. / Брест гос. ун-т им. А. С. Пушкина ; редкол.: Н. С. Ступень [и др.]. - Брест : БрГУ, 2017. - С. 61-66.

5. Никандров, В. Н. Методы исследования протеолиза / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. - Минск : Выш. шк, 2013. - С. 132-157.

6. Никандров, В. Н. Регуляция протеолиза: новые данные о роли активных форм кислорода и биогенных фосфатов / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Актуальные вопросы гепатологии : третий симп. гепатологов Беларуси. - Минск, 1998. - С. 39.

7. Nikandrov, V. N. Some unusual manifestation of proteolysis / V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova // Cell, and Mol. Biol. - 2006. - Vol. 52, № 4. - P. 30-39.

8. 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.

9. Способ оценки фибриногенлитической активности условно-патогенных микроорганизмов : пат. 16957 Респ. Беларусь, МПК 7 С 12Q 1/02, G 01N 33/50 / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова ; заявитель Полес. гос. Ун-т ; № 20100849; заявл. 31.05.10 ; опубл. 30.04.13 // Афш. бюл. / Нац. Цэнтр штэлектуал. уласнасщ. - 2013. - № 2. - С. 109.

Ю. Способ оценки фибриногенлитической активности условно-патогенных микроорганизмов : пат. 16958 Респ. Беларусь, МПК 7 С 12Q 1/02, G 01N 33/50 / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова ; заявитель Полес. гос. Ун-т ; № 20100850 ; заявл. 31.05.10 ; опубл. 30.04.13 // Афш. бюл. / Нац. Цэнтр штэлектуал. уласнасщ. - 2013. - № 2. - С. 109.