

Министерство образования Республики Беларусь  
УО «Полесский государственный университет»

**И. А. ИЛЬЮЧИК, В. Н. НИКАНДРОВ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО ИЗУЧЕНИЮ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ  
(на примере *Chlorella vulgaris*)**



Пинск  
ПолесГУ  
2020

УДК 581.19(072)  
ББК 28.572я73  
И48

**Р е ц е н з е н т ы:**

доктор биологических наук, профессор,  
член-корреспондент НАН Беларуси Н. В. Шалыго;  
кандидат биологических наук, доцент Н. А. Чигрин

**У т в е р ж д е н о**

научно-методическим советом ПолесГУ

**Ильючик, И. А.**

И48 Методические рекомендации по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*) / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров. – Пинск : ПолесГУ, 2020. – 29 с.

ISBN 978-985-516-641-3

В методических рекомендациях рассмотрены вопросы по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей на примере хлореллы. Издание знакомит с методами исследования биохимии клеток микроводорослей: подсчет клеток, получение гомогената, разделение компонентов гомогената клеток на фракции, очистка компонентов клеток в градиенте сахарозы, получение гомогенатов компонентов клеток, определение протеолитической активности супернатанта, гомогената клеток или субклеточных фракций, содержания пигментов и белков в клетках.

Методические рекомендации могут быть использованы для выполнения лабораторных работ для дневной и заочной формы обучения студентов по дисциплинам: биохимия, физиология растений, альгология.

Издание позволяет расширить круг биохимических исследований в области альгологии. Оно будет полезно не только для студентов, магистрантов и аспирантов, но и для широкого круга исследователей, работающих в области экспериментальной альгологии.

УДК 581.19(072)

ББК 28.572я73

ISBN 978-985-516-641-3

© УО «Полесский государственный университет», 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОВОДОРОСЛИ <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .....	7
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	11
1. Подсчет клеток.....	11
2. Получение гомогената клеток .....	12
3. Разделение компонентов гомогената клеток на фракции.....	13
4. Очистка компонентов клеток хлореллы в градиенте сахарозы.....	15
5. Получение гомогенатов компонентов клеток хлореллы.....	16
6. Определение протеолитической активности супернатанта, гомогената клеток или субклеточных фракций хлореллы .....	16
7. Определение содержания пигментов в клетках хлореллы.....	18
8. Определение содержания белков в клетках хлореллы....	20
ЛИТЕРАТУРА .....	23
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 .....	27
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 .....	28

## ВВЕДЕНИЕ

В современном мире одной из глобальных проблем является обеспечение различных отраслей народного хозяйства необходимым количеством белков, а также усвояемых источников витаминов и микроэлементов.

В настоящее время эта проблема все еще далека от полного решения. В мировом производстве ежегодно недостает около 30 млн т кормового белка [1]. Прогнозируемый ООН рост численности населения до 8,3 млрд человек к 2030 г. и до 9,7–10,0 млрд человек к 2050 г. приведет к увеличению потребления продукции сельского хозяйства, в том числе потреблению продукции животноводства [2]. В связи с этим почти во всех странах мира уделяют огромное внимание увеличению производства высокобелковых и витаминных продуктов, поиску богатых и дешевых источников белков и других питательных веществ. Отечественное животноводство также испытывает нехватку белков, витаминов и микроэлементов в кормовых рационах, что негативно сказывается на продуктивности скота, птицы и рыбы, а также на резистентности их организмов к целому ряду заболеваний [3].

В последние десятилетия решение данной проблемы усматривают в разворачивании производства «одноклеточного» белка (single cell protein) – общего белка разнообразных одноклеточных организмов, в том числе и водорослей. Кроме того, водоросли не конкурируют с традиционными продовольственными культурами за место и ресурсы [4]. Более чем в 60 странах мира, в том числе США, Мексике, Таиланде, Индии, Китае, Японии, Канаде и Австралии и др., производят в промышленных масштабах свыше тысячи тонн в год биомассы микроводорослей [5]. Согласно отчетам о продовольственном балансе, опубликованным Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (ФАО), Республика Корея является крупнейшим потребителем водорослей (22,41 кг на душу населения в год в 2013 году), за ней следуют Китай и Япония [6].

Основным преимуществом использования микроводоросли хлореллы в качестве сырья является высокая скорость ее воспроизводства, способность накапливать значительное количество белков, углеводов, жиров, витамины. По качеству продуцируемых белка и витаминов она превосходит все известные кормовые и пищевые продукты. По мнению некоторых исследователей [7], состав белка хлореллы идентичен составу структурного белка хлоропластов, изолированных из листьев высших растений. Витамин В12, который синтезирует хлорелла, не синтезируют ни дрожжи, ни высшие растения [8].

Для хлореллы характерна высокая эффективность фотосинтеза [9]. Она способна улавливать более 70% солнечного света, тогда как большинство высших растений – до 3%, и превращать 9–10% солнечной энергии в биомассу с теоретическим выходом около 280 т/га в год [10]. При этом один килограмм этой водоросли выделяет в сутки до 270 литров кислорода [11]. Хлорелла синтезирует пигменты – хлорофилл а, хлорофилл в, каротиноиды:  $\alpha$ -каротин,  $\beta$ -каротин, лютеин, зеаксантин [12]. Эти пигменты имеют ряд таких свойств, как антиоксидантная активность, защитное действие против дегенерации сетчатки, регуляция холестерина в крови, профилактика сердечно-сосудистых заболеваний и рака толстой кишки, укрепление иммунной системы.

В макро- и микроэлементный состав суспензии хлореллы входят кальций, фосфор, магний, калий, медь, железо, сера, цинк, кобальт, марганец, цирконий, молибден, рубидий, йод и др. [13]. В хлорелле обнаружен антибиотик хлореллин и арахидоновая кислота, которая относится к условно незаменимым органическим кислотам; регуляторы роста и развития растений – ауксины и гибберелины [12].

Благодаря относительно простой организации, большой скорости размножения, возможности культивирования в полностью контролируемых условиях, высокая пластичность метаболизма делает хлореллу уникальным и перспективным объектом для проведения разноплановых научных исследований в области ряда биологических наук, включая космическую биологию и промышленную биотехнологию. Она нашла

широкое применение в различных областях деятельности человека: сельском хозяйстве, медицине, пищевой промышленности, парфюмерии, очистке сточных вод, получении биотоплива и т. д. [14].

В последнее время в мире, в том числе и в нашей стране, активизировались исследования, направленные на изучение водорослей в различных направлениях, что потребовало усовершенствования существующих методов их исследований. К сожалению, в настоящее время в области альгологии недостаточно научно-методической литературы, отражающей современные тенденции изучения морфофизиологических и биохимических особенностей водорослей. В литературе также отсутствуют методические источники, посвященные особенностям изучения биохимии одноклеточных зеленых водорослей, несмотря на то, что таковые особенности, как выяснено, имеются по сравнению с диатомовыми, жгутиковыми и т. д.

Настоящие методические рекомендации «Изучение биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*)» содержат краткую характеристику микроводоросли *Ch. vulgaris* и экспериментальную часть, в которой описываются методики получения, разделения, отмывки и ресуспендирования фракций гомогената клеток хлореллы в градиенте сахарозы; получение гомогенатов органоидов ее клеток; определение содержания пигментов и белков в клетках хлореллы; определение протеолитической активности гомогената клеток. Изложенные приемы, отработаны экспериментально на практике со штаммом *Ch. vulgaris* С 111 ИВСЕ С-19.

В приложениях приведены паспорт штамма *Ch. vulgaris* С 111 ИВСЕ С-19 и состав питательной среды Тамия для выращивания хлореллы.

Издание позволит расширить круг биохимических исследований в области альгологии. Оно будет полезно не только для студентов, магистрантов и аспирантов, но и для широкого круга исследователей, работающих в области экспериментальной альгологии.

## КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS*

Хлорелла – древнейший эукариотический фотосинтезирующий организм, широко распространенный по всему земному шару, ведущий свободный и симбиотический образ жизни.

Хлорелла – род одноклеточных зелёных водорослей относится к типу зеленых водорослей (*Chlorophyta*), порядку хлорококковых (*Chlorococcales*) и семейству хлорелловых (*Chlorellaceae*).

*Chlorella vulgaris* была открыта в 1890 году М. В. Бейеринком как первая микроводоросль с ярко выраженным ядром [15].

Морфологические признаки. Клетки хлореллы шаровидной или сферической формы диаметром от 1,5 до 15 мкм (Рисунок 1).

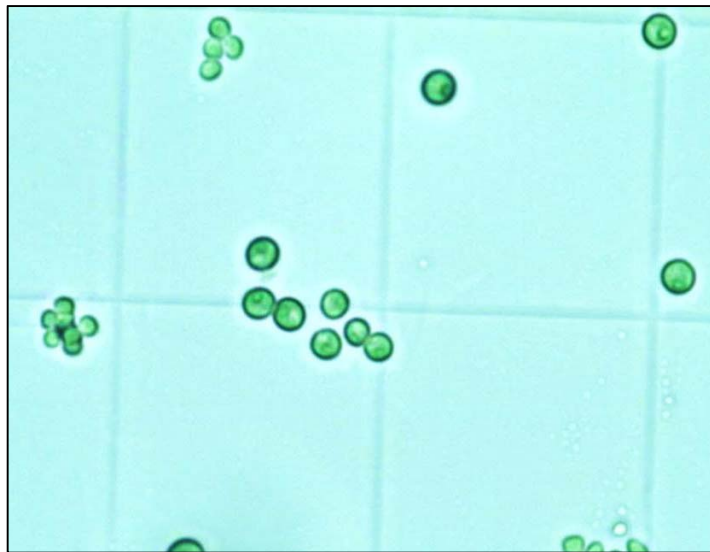
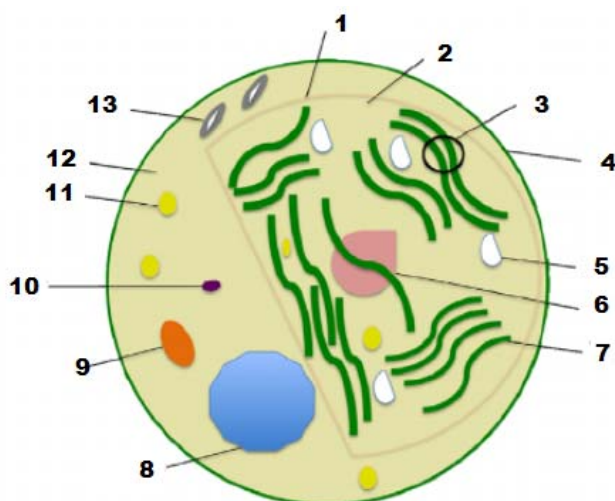


Рисунок 1 – Клетки *Chlorella vulgaris* под световым микроскопом

Стенки клетки прочные трехуровневые. Клеточная стенка *Ch. vulgaris* состоит из целлюлозы, гемицеллюлозы, пектиноподобных веществ [16], а также белков, уроновых кислот, маннозы, ксилозы. Качественный состав клеточной стенки хлореллы непостоянен и зависит от условий окружающей среды [17].



1 – мембрана хлоропласта; 2 – хлоропласт;  
 3 – хлорофилл и каротиноиды; 4 – клеточная стенка; 5 – крахмальное зерно; 6 – пиреноид; 7 – тилакоид; 8 – ядро; 9 – вакуоль; 10 – аппарат Гольджи; 11 – липидная капля; 12 – цитоплазма; 13 – митохондрия

**Рисунок 2 – Внутреннее строение *Chlorella vulgaris* [18]**

В каждой клетке находится гомогенная протоплазма, одно ядро и хлоропласт (Рисунок 2). Цитоплазма представляет собой гелеобразную субстанцию. Ядро *Ch. vulgaris* содержит 16 хромосом [18]. Хлоропласт широкопоясковидный, незамкнутый, окрашен в зеленый цвет. Он включает в себя структуру, называемую пиреноидом. Кроме того, в нем содержатся крахмальные зёрна и липидные капли. В тилакоидах хлоропласта присутствуют пигменты: хлорофилл а, хлорофилл в и каротиноиды.

Жгутиков, сократительных вакуолей и глазков хлорелла не имеет.

Физиологические признаки. Для хлореллы характерно бесполое размножение. Клетки в основном делятся на 2–8 автоспор. Стойкого цикла развития не имеет, в культуре развивается асинхронно.

Клетки *Ch. vulgaris* способны свободно распределяться в среде культивирования, они не оседают в состоянии покоя на протяжении 6–15 суток. Культура хлореллы не требовательна к питательной среде и наличию углекислого газа



в ней, при культивировании не требует механического перемешивания.

Оптимальная температура для роста 24–28 °С, при более высокой температуре возможно проявление хлороза.

*Ch. vulgaris* хорошо растет как при естественном, так и искусственном освещении. Ее культивирование в лабораторных условиях не зависит от сезона года.

При достижении плотности клеток трех млн/мл проявляются антагонистические свойства к другой альгофлоре, бактериям и инфузориям, по данной причине при культивировании *Ch. vulgaris* не требуются стерильные условия.

Нет необходимости также следить за изменениями рН-среды или искусственно её регулировать, так как отклонения величин рН наступают в результате протекающих в культуре естественных физиологических процессов и не превышают допустимых значений [19].

Химический состав хлореллы. В сухой биомассе микроводоросли, выращенной на обычных минеральных средах, содержится 55% белка, 25% углеводов, 12% липидов и до 8% минеральных веществ. При изменении концентрации компонентов среды можно получить биомассу следующего состава: 9–88% белка, 5–86% липидов, 6–38% углеводов.

Белок *Ch. vulgaris* по качеству не уступает известным растительным белкам, так как содержит все необходимое аминокислоты, в том числе незаменимые. В 100 г общего азота хлореллы содержится: 6,4 г аспарагиновой аминокислоты; 6,2 г глицина; 7,7 г аланина; 7,8 г глутаминовой аминокислоты; 3,3 г серина; 2,8 г триозина; 5,8 г пролина; 0,2 г цистина; 5,5 г валина; 15,8 г аргинина; 3,3 г гистидина; 3,5 г изолейцина; 6,1 г лейцина; 10,2 г лизина; 1,4 г метионина; 2,8 г фенилаланина; 2,9 г треонина; 2,1 г триптофана [12]. Около половины аминокислот входят в состав белков водоросли, остальные ≈30% являются свободными и их количество изменяется в зависимости от роста и условий культивирования *Ch. vulgaris*.

В 1 г массы сухого вещества хлореллы содержится: каротина (провитамина А) — 1000–1600 мкг (в 10 раз больше,

чем в шиповнике или сухих абрикосах), тиамин — 2–18 мкг, рибофлавин — 21–28 мкг, пиридоксин — 9 мкг, цианкобаламин — 0,025–0,1 мкг, аскорбиновой кислоты — 1300–5000 мкг, провитамина D — 1000 мкг, филлохинона — 6 мкг, никотиновой кислоты — 110–180 мкг, токоферола — 10–350 мкг, пантотеновой кислоты — 12–17 мкг, фолиевой кислоты — 485 мкг, биотин — 0,1 мкг, лейковорин (производное тетрафолиевой кислоты) — 22 мкг. Среди внеклеточных продуктов метаболизма водоросли также обнаружены: тиамин, рибофлавин, пантотеновая кислота, никотиновая кислота, пиридоксин, цианкобаламин, фолиевая кислота и ее производные, парааминобензойная кислота, биотин, инозит. Содержание этих витаминов в среде значительно превосходит их количество в клетках *Ch. vulgaris*.

Для липидов хлореллы характерно высокое 80% содержание ненасыщенных жирных кислот, являющихся предшественниками простагландинов, обладающих очень высокой биологической активностью. *Ch. vulgaris* характеризуется значительным содержанием незаменимых ненасыщенных жирных кислот – арахидоновой, линолевой и линоленовой, а также наиболее ценных для человека и животных полиненасыщенных – эйкозапентаеновой и докозагексаеновой [17].

Среди углеводов хлореллы значительная часть принадлежит крахмалу, также встречаются целлюлоза, ксилан, глюкофруктозан, гемицеллюлоза и пектиновые вещества.

В минеральной части хлореллы обнаружены 4,79% кальция, 2,51% фосфора, 4,70% железа, 0,47% марганца, 0,009% кобальта, 0,048% меди, а также магний, калий, сера, цинк и йод, что в 6–10 раз превышает содержание минеральных веществ в люцерне и клевере.

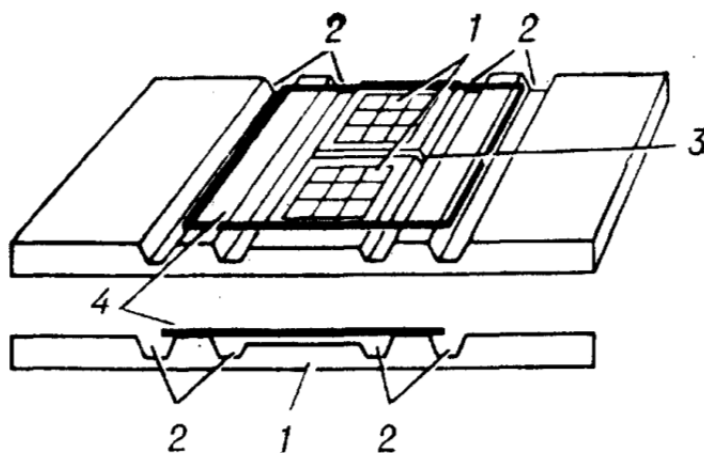
Хлорелла содержит природные соединения, обладающие свойствами антибиотиков. Например, синтезируемый ею хлореллин уничтожает патогенную микрофлору: в концентрации 1:500000 и 1:1000000 он эффективен против стрептококков, стафилококков, кишечной палочки и возбудителя туберкулеза [20].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 1. Подсчет клеток

Для определения количества клеток хлореллы в 1 мл суспензии, производят их подсчет под микроскопом в счетной камере Горяева. В отличие от турбидиметрии – процесса измерения потери интенсивности проходящего света из-за эффекта рассеяния взвешенных в нем частиц, подсчет в камере Горяева позволяет учесть все клетки культуры, в том числе различных по размеру, делящиеся, подвергшиеся хлорозу.

Счетная камера имеет вид толстого предметного стекла, в центре которого находится стеклянная пластинка с выгравированной на ней сеткой. По краям от центральной пластинки располагаются две другие с уровнем на 0,1 мм выше (Рисунок 3).



1 – пластинки с выгравированными сетками; 2 – продольные желобки;  
3 – поперечные желобки; 4 – покровное стекло

**Рисунок 3 – Камера Горяева [21]**

После тщательного перемешивания суспензии водоросли берут ее образец и наносят на сетку счетной камеры, накрывают покровным стеклом, которое притирают к боковым

пластинкам камеры до образования колец Ньютона. Высота слоя жидкости в камере 0,1 мм.

Камеру Горяева помещают на столик микроскопа и находят в его поле зрения сетку. Подсчитывают все клетки водоросли, находящиеся внутри большого квадрата, а также на пограничных линиях сверху и справа. Клетки, на пограничных линиях внизу и слева не подсчитывают. В каждом случае подсчитывают клетки в пяти больших квадратах, например, по углам и в центре сетки или по диагонали. Суспензии с большим содержанием клеток следует разбавлять водой, пользуясь такими разведениями, при которых количество клеток в одном большом квадрате будет не более 30.

Подсчет клеток проводят в трех повторностях. Для того чтобы результат подсчета был достоверен, необходимо сосчитать не менее 600 клеток водоросли во всех образцах.

Число клеток в 1 мл исследуемой суспензии определяют по формуле:

$$n = N \cdot 0,25 \cdot 10^6,$$

где  $n$  – количество клеток на мл;

$N$  – среднее количество клеток над большими квадратами.

## 2. Получение гомогената клеток

Для получения гомогената клеток *Ch. vulgaris* первоначально производят их подсчет в камере Горяева. Затем, после взятия определенного объема (мл) суспензии хлореллы, содержащего необходимое для исследования количество клеток (млн), их осаждают центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 мин.

Отмывают от культуральной жидкости клетки в дистиллированной воде трижды, тщательно перемешивая и центрифугируя в течение 20 мин при 3000 об/мин.

Разрушают клетки хлореллы в гомогенизаторе Поттера-Эльвейема или растирают со стеклом в фарфоровой ступке

пестиком при 4 °С в 0,5 мл 0,25 М растворе сахарозы или дистиллированной воды в течение 5–10 мин.

Полученная однородная масса – это гомогенат клеток (хранят при 4 °С).

### **3. Разделение компонентов гомогената клеток на фракции**

Для разделения полученного гомогената клеток *Ch. vulgaris* на фракции используют метод дифференциального центрифугирования или фракционирования. Принцип метода состоит в том, что при центрифугировании развивается центробежная сила, под воздействием которой взвешенные частицы седиментируют (оседают) на дно центрифужной пробирки.

Дифференциальное центрифугирование основано на различии в размерах и плотности субклеточных органелл. При высокоскоростном центрифугировании крупные компоненты клетки (например, ядра) быстро оседают при относительно низких скоростях (100–400 g) и образуют осадок на дне центрифужной пробирки. При более высоких скоростях (5 000–20 000 g) в осадок выпадают более мелкие компоненты (например, хлоропласты, митохондрии) и при очень высоких скоростях – выше 20 000 g (например, рибосомы).

Для осаждения клеточных компонентов, их отмывки и ресуспендирования используют центрифугу с охлаждением.

Все операции проводят при температуре 0–4 °С.

Разделение гомогената клеток хлореллы на фракции (ядра, пластиды, митохондрии и надосадочная фракция) – это смесь растворимой фазы цитоплазмы с растворимым содержимым вакуоли и любых других разрушившихся органелл методом дифференциального центрифугирования (Рисунок 4) осуществляют следующим образом:

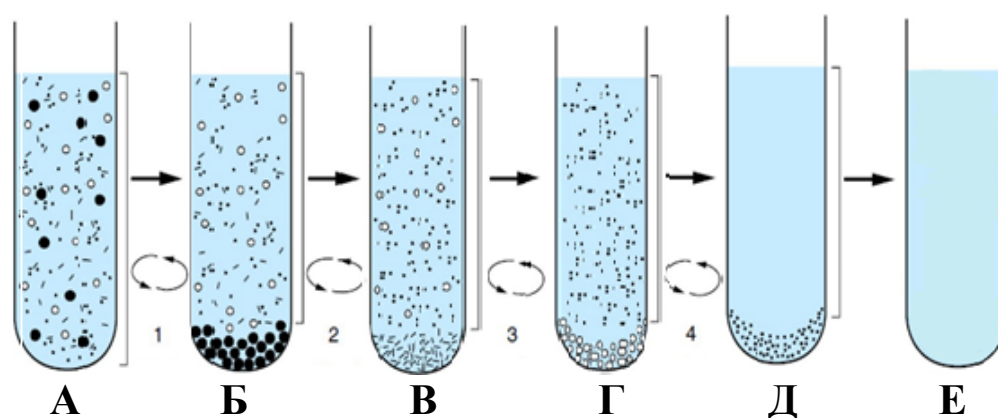
- 1) из гомогената А при 30 g в течение 15 мин осаждают обрывки клеток и клетки, оставшиеся после гомогенизации;
- 2) полученный супернатант Б, содержащий ядра и другие органеллы, осторожно, т. к. осадок рыхлый, сливают

в чистую центрифужную пробирку и центрифугируют при 400 g в течение 20 мин для осаждения ядер;

3) супернатант В осторожно сливают в чистую центрифужную пробирку и центрифугируют при 6 000 g в течение 20 мин для осаждения хлоропластов;

4) полученный супернатант Г осторожно сливают в чистую центрифужную пробирку и центрифугируют при 20 000 g в течение 15 мин для осаждения митохондрий;

5) супернатант Д – надосадочная фракция (супернатант) сливают в чистую центрифужную пробирку (Е).



А – гомогенат, Б – осаждение обрывков клеток, В – осаждение ядер,  
Г – осаждение хлоропластов, Д – осаждение митохондрий,  
Е – надосадочная фракция

скорость: 1 – 30 g, 15 мин; 2 – 400 g, 20 мин; 3 – 6 000 g, 20 мин;  
4 – 20 000 g, 15 мин

**Рисунок 4 – Схема дифференциального центрифугирования гомогената клеток *Chlorella vulgaris***

Таким образом, получают четыре субклеточные фракции клеток хлореллы из гомогената – ядра, хлоропласты, митохондрии и супернатант.

#### **4. Очистка компонентов клеток хлореллы в градиенте сахарозы**

Реактивы: растворы сахарозы: 60, 51, 47, 34, 35, 25% и 0,25 М.

Полученные методом дифференциального центрифугирования ядра, хлоропласты, митохондрии клеток хлореллы отмывают и ресуспендируют в градиенте сахарозы.

Все операции проводят при температуре 0–4 °С в тот же день.

1. Осадок ядер осторожно отмывают дважды с 6 мл 0,25 М сахарозы, центрифугируя при 800 g в течение 10 мин.

Микроскопический контроль чистоты получаемых ядер проводят с помощью микроскопа. Ядра должны иметь ненарушенную оболочку и не содержать примесей пластид и митохондрий.

2. Очистку хлоропластов проводят, используя ступенчатый градиент сахарозы: нижний слой (1 мл) – 51%, средний слой (3 мл) – 34%, верхний слой (2 мл) – 25% сахарозы.

Суспензию хлоропластов с помощью пипетки осторожно наслаивают на градиент сахарозы и центрифугируют 30 мин при 4000 g.

Суспензия хлоропластов с большим числом средних и примесью крупных хлоропластов составляет среднюю фракцию, а крупные целые хлоропласты с небольшой примесью средних – нижнюю фракцию.

Эти две фракции объединяют и центрифугируют 20 мин при 6 000 g.

Очищенные пластиды сохраняют в темноте при температуре 4 °С.

Микроскопический контроль чистоты и целостности получаемых пластид проводят с помощью микроскопа.

3. Очистку митохондрий проводят, используя ступенчатый градиент сахарозы: нижний слой (1,5 мл) – 60%, следующий слой (1,5 мл) – 47%, затем слой (1,5 мл) – 35%, верхний слой (1,5 мл) – 25% сахара.

Суспензию митохондрий наслаивают на градиент сахарозы и центрифугируют при 24 000 g в течение 10 мин. Очищенные митохондрии находятся в 35 и 47% слоях сахарозы.

Эти две фракции объединяют и центрифугируют при 24 000 g в течение 10 мин.

Микроскопический контроль чистоты и целостности получаемых митохондрий оценивают с помощью микроскопа.

Для определения качества и чистоты полученных оргanelл также можно использовать маркерные ферменты или красители.

## **5. Получение гомогенатов компонентов клеток хлореллы**

Полученные после очистки ядра, пластиды или митохондрии разрушают, используя стеклянный пестик в стеклянной пробирке в 0,2 мл 0,25 М раствора сахарозы при 4 °С в течение 1–2 мин.

Полученные очищенные субклеточные фракции и их гомогенаты можно использовать при необходимости и для определения активности энзимов или содержания компонентов.

## **6. Определение протеолитической активности супернатанта, гомогената клеток или субклеточных фракций хлореллы**

Реактивы: 0,15 М раствор хлорида натрия, буферные растворы: ацетатный, фосфатный, боратный, трис-НСl и т. д., агар-агар; белки: желатин, казеин, фибриноген, дистиллированная вода, растворы 1 н трихлоруксусной, хлорной или соляной кислот.

Протеолитическую активность полученных супернатанта, гомогената клеток или субклеточных фракций хлореллы определяют по лизису (расщеплению) белков-субстратов в тонком слое агарового геля [24, 25].

В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин используют 0,15 М раствор хлорида



натрия, дистиллированную воду или буферные растворы (ацетатный, фосфатный, боратный, трис-НСl и т. д.).

Для приготовления белок-агаровой пластины чашку Петри (не имеющую дефектов дна) помещают на строго горизонтальную поверхность, быстро смешивают содержимое двух пробирок (в одной пробирке – раствор белка, во второй – раствор агара), повторно переливая содержимое первой пробирки во вторую, а затем – содержимое второй в первую и аккуратно выливают в центр чашки Петри. Белок-агаровая смесь должна равномерно распределиться по всей поверхности чашки.

Концентрации белков и агар-агара в белок-агаровой смеси по 10 г/л.

После образования геля пластины выдерживают 30–60 мин при комнатной температуре, затем на поверхность геля наносят по 10 мкл исследуемых образцов. На одну пластину в зависимости от активности исследуемых образцов можно нанести 4–6–8 образцов (пипетдозатор держим строго вертикально по отношению к чашке, касаться геля недопустимо).

Чашку Петри закрывают верхней половиной, в которую предварительно помещают диск фильтровальной бумаги.

Инкубируют пластины в термостате при 37 °С в течение 20 часов на строго горизонтальной поверхности.

Зоны расщепления визуализируют обработкой белок-агаровых пластин 1 н трихлоруксусной, хлорной или соляной кислотой (Рисунок 5). Затем учитывают площадь зон лизиса. В этих целях проецируют зоны лизиса при подсветке лампой на миллиметровую бумагу и находят площадь в мм<sup>2</sup> (можно вырезать диски и взвесить на аналитических весах, зная вес 1 мм<sup>2</sup> бумаги, рассчитывают площадь расщепления).



**Рисунок 5 – Визуализация зон расщепления**

Кроме того, есть еще одна важная деталь. Новые чашки Петри следует обработать хромовой смесью и тщательно выполоскать водопроводной, а затем дистиллированной водой.

Использованные в подобных анализах чашки следует механически (губкой) очистить от геля, вымыть с применением соды, после чего тщательно сполоснуть 0,1 н раствором соляной кислоты (HCl), затем вымыть водопроводной и дистиллированной водой. Чашки можно кипятить в дистиллированной воде, использование при этом моющих средств недопустимо.

## **7. Определение содержания пигментов в клетках хлореллы**

Реактивы: 100% ацетон, бидистиллированная вода, карбонат кальция.

Для определения содержания пигментов в культуре хлореллы используют ацетоновые экстракты ее клеток. Для этого три аликвоты одного и того же образца по 50 млн клеток хлореллы измельчают в гомогенизаторе Поттера-Эльвейема при 4 °C в 0,5 мл бидистиллированной воды с добавлением на кончике иглы карбоната кальция (CaCO<sub>3</sub>) для предотвращения окисления пигментов. Затем в гомогенат добавляют холодный ацетон «хч», содержимое встряхивают, центрифугируют при 4 °C 2 мин при 4000 об/мин, надосадочную жид-

кость, которая представляет собой вытяжку пигментов, быстро переливают в кварцевую кювету и спектрофотометрируют.

Процедуру повторяют до полного обесцвечивания осадка. Общий объем использованного ацетона составляет 2 мл.

Для количественных определений хлорофиллов и каротиноидов полученный экстракт фотометрируют при длине волны соответствующей максимуму абсорбции пигментов: хлорофилла *a* – 663 нм, хлорофилла *b* – 645 нм, каротиноидов – 470 нм. Максимум абсорбции при 750 нм используют для введения поправки на неспецифическую абсорбцию и рассеяние света экстрактом.

Концентрацию исследуемых пигментов (мг/л) (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) в клетках хлореллы определяют по формулам при экстрагировании пигментов в 80% ацетоне (концентрация с учетом содержащейся воды в гомогенате) [26]:

$$C_a = 12,7 \times E_{663} - 2,69 \times E_{645},$$

$$C_b = 22,9 \times E_{645} - 4,68 \times E_{663},$$

$$C_{a+b} = 8,02 \times E_{663} + 20,2 \times E_{645},$$

$$C_{\text{кар}} = \frac{1000 \times E_{470} - 3,27 \times c_a - 100 \times c_b}{229},$$

где  $C_a$  – концентрация хлорофилла *a*, мг/л;

$C_b$  – концентрация хлорофилла *b*, мг/л;

$C_{\text{кар}}$  – концентрация каротиноидов, мг/л.

Расчет концентраций пигментов (мг/млн клеток) проводят по формуле:

$$F = C \times V / X,$$

где  $F$  – концентрация пигмента в клетках культуры, мг/млн клеток;

$C$  – концентрация пигмента, мг/л;

V – объем экстракта, л;  
X – количество клеток хлореллы взятых для исследования, млн.

## **8. Определение содержания белков в клетках хлореллы**

Реактивы: яичный или бычий сывороточный альбумин (БСА), бидистиллированная вода, красителя Кумасси ярко-голубого (Coomassie Blue BrilliantG-250), этанол 96%, фосфорная кислота 85%.

Для количественного определения белка в клетках хлореллы используют спектрофотометрический метод Bradford. Метод основан на прямом связывании Кумасси G-250 с аминокислотными остатками аргинина, триптофана, тирозина, гистидина и фенилаланина в белке.

При постановке реакции Bradford используют соотношение объёма реактива Bradford к образцу, равное 50:1 [27].

Для определения общего белка в гомогенате клеток хлореллы берут его объем 10 мкл и прибавляют к 5 мл реактива Bradford, перемешивают и оставляют при комнатной температуре строго на 10 мин. Оптическую плотность определяют на спектрофотометре при длине волны 595 нм. В качестве раствора сравнения (контроля) вместо образца берут аналогичное количество бидистиллированной воды. Содержание белка в пробе (мкг/л) определяют по калибровочному графику. Измерения проводят в трех повторностях [28]. Данный метод позволяет определять от 10 до 100 мкг/мл белка в исследуемых образцах. При более высокой концентрации белка в образцах следует их развести в бидистиллированной воде в соотношении 1:1 или 1:2.

Построение калибровочной кривой. Калибровочную кривую строят, используя яичный альбумин или БСА.

Для приготовления раствора альбумина берут 10 мг белка, растворяют в 10 мл бидистиллированной воды – концентрация раствора 1 мг/мл (первый стандартный раствор). Затем готовят второй стандартный раствор, для этого к 1 мл первого стандартного раствора добавляют 9 мл бидистилли-

рованной воды. Концентрация второго стандартного раствора 0,1 мг/мл. Из второго стандартного раствора готовят серию разведений в соответствии со схемой (таблица).

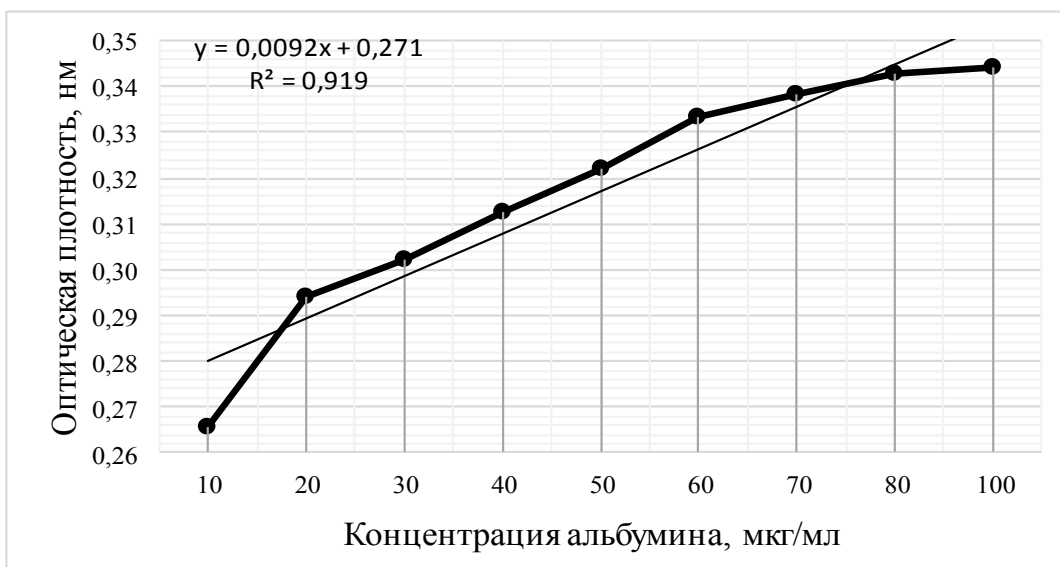
**Таблица – Приготовление растворов белка для построения калибровочного графика**

№ пробирки	Концентрация раствора белка, мкг/мл	Количество исходного раствора белка, мкл	Количество воды, мкл
1	10	100	900
2	20	200	800
3	30	300	700
4	40	400	600
5	50	500	500
6	60	600	400
7	70	700	300
8	80	800	200
9	100	1000	0

Для построения калибровочного графика берут по 10 мкл соответствующего раствора белка, помещают в пробирки (всех 9 пробирок), прибавляют в каждую из них по 5 мл реактива Bradford, перемешивают и оставляют при комнатной температуре в течение одинакового времени в интервале 10 мин.

Оптическую плотность измеряют в кювете на спектрофотометре при длине волны 595 нм. Следует отметить, что для измерения лучше использовать стеклянные кюветы, так как на стенках кварцевых и пластиковых кювет адсорбируется значительное количество красителя. После определения оптической плотности по полученным цифрам строят калибровочную кривую. На оси абсцисс откладывают значения концентрации, по оси ординат – значения экстинкции (Рисунок 6).

Эксперименты проводят троекратно.



**Рисунок 6 – Калибровочная кривая**

Приготовление реактива Bradford. 100 мг красителя Кумасси ярко-голубого растворяют в 50 мл 96% этанола. Затем к этому раствору, постоянно помешивая, добавляют 100 мл 85% фосфорной кислоты (цвет раствора из синего переходит в коричневый).

В стакан объёмом 1 л наливают 500–700 мл дистиллированной воды и, медленно помешивая, добавляют раствор, содержащий краситель Кумасси ярко-голубой, этанол и фосфорную кислоту. Доводят раствор до 1 л дистиллированной водой и оставляют на ночь при комнатной температуре в темноте. Далее полученный раствор профильтровывают и хранят в холодильнике в посуде из темного стекла с притертой пробкой (срок хранения 1 месяц).

При длительном хранении (более 1 месяца) реактив необходимо повторно калибровать.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Загоровская, В. Новый белок. Готов ли российский рынок к альтернативным кормовым белкам / В. Загоровская // *Агротехника и технологии*. – 2020 – № 1. – С. 50–54.
2. Ковалев, М. М. Прогнозирование развития белорусского агропромышленного комплекса до 2030 г. На фоне глобальных агротрендов / М. М. Ковалев, Е. А. Червякова // *Экономика сельского хозяйства и природных ресурсов. Экономика окружающей среды и экологии*. – 2017. – № 2. – С. 120–139.
3. Ляндышев, В. А. Технологии производства продукции животноводства / В. А. Ляндышев. – Минск : БГАТУ, 2018. – 292 с.
4. Bleakley, S. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production / S. Bleakley, M. Hayes // *Foods*. – 2017. – Vol. 6. – No. 33. – P. 3–34. Doi: 10.3390/foods6050033 foods
5. Fradique, M. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: preparation and evaluation / M. Fradique, A. P. Batista, M. C. Nunes // *J. Sci. Food Agric.* – 2010. – № 90. – P. 1656–1664.
6. Food and Agriculture Organization. Food Balance Sheets. Food and Agriculture Organisation of the United Nations; Rome, Italy: 2013. [Google Scholar].
7. Яковлев, Н. И. Источники пищевого белка / Н. И. Яковлев. – М. : Колос, 1979. – 302 с.
8. Jalilian, N. Enhanced Vitamin B12 Production using *Chlorella vulgaris* / N. Jalilian, G.D. Najafpour, M. Khajouei // *International Journal of Engineering. IJE TRANSACTIONS A: Basics*. – 2019. – Vol. 32. – No. 1. – P. 1–9.
9. Lakaniemi, A.–M. Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors / A.–M. Lakaniemi et al. // *Microb. Biotechnol.* – 2012. – Vol. 5, No. 1. – P. 69–78. doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00298.x
10. Khan, M. I. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewa-

ble industry for biofuels, feed, and other products / M. I. Khan, J. H. Shin, J. D. Kim // *Microb. Cell Fact.* – 2018. – Vol. 17, No. 1. – P. 1–21. doi: 10.1186/s12934-018-0879-x.

11. Богданова, А. А. Влияние различных концентраций питательной среды на увеличение биомассы микроводоросли штамма ИФР № С-111 / А. А. Богданова, Е. А. Флерова // Сб. науч. тр. по материалам XVI Междунар. науч.-практ. конф. аспирантов и молодых ученых ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА». – Ярославль: Ярославская ГСХА, 2013. – С. 18–22.

12. Буймова, С. А. Комплексная оценка качества родниковых вод на примере Ивановской области / С. А. Буймова, А. Г. Бубнов ; под ред. А. Г. Бубнова. – Иваново : Иван. гос. хим.-технол. ун-т., 2012. – 464 с.

13. Уникальные экологические решения по возврату природных ресурсов в хозяйственный оборот «ЭКОФОРВАРД» [Электронный ресурс] / Руководство по использованию суспензии хлореллы для восстановления здоровья человека. Режим доступа: <http://ecoforward.pro>. – Дата доступа: 15.05.2020.

14. Лукьянов, В. А. Научно обоснованное культивирование микроводорослей / В. А. Лукьянов, А. И. Стифеев, С. Ю. Горбунова // Теоретический и научно-практический журнал «Вестник». – Курск : Изд-во Курская ГСХА. –2013. – № 9. – С. 55.

15. Safi, C. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. / C. Safi, M. Charton, O. Pignolet, F. Silvestre, C. Vaca-Garcia, P.-Y. Pontalier // *Journal of Applied Phycology*, Springer Verlag. – 2013. – Vol. 25, No. 2 – P. 523–529.

16. Dvoretzky, D. Defining optimal conditions for chlorella vulgaris microalgae biomass cell walls disruption in the process of biofuel production / D. Dvoretzky et al. // *Renewable Energy*. – 2016. – Vol. 1. – P. 174–86.

17. Мельников, С. Использование хлореллы в кормлении сельскохозяйственных животных / С. Мельников, Е. Мананкина // *Наука и инновации*. – 2010. – № 8 (90). – С.40–43.



18. Microbe Wiki [Electronic resource]. – Mode of access: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Chlorella\\_vulgaris](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Chlorella_vulgaris) – Date of access: 05.04.2020.

19. Olivieri, G. Advances in photobioreactors for intensive microalgal production: configurations, operating strategies and applications / G. Olivieri, P. Salatino, A. Marzocchella A. // J. Chem. Technol. Biotechnol, 2014. – Vol. 89. – P. 178–195.

20. Рекомендации по использованию суспензии хлореллы в птицеводстве / Н. В. Шалыго [и др.]. – Минск : Право и экономика, 2012. – 37 с.

21. Методика подсчета общего количества микроорганизмов [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.atm-ractica.ru/promishlennost/metodikapodschetaobshchegokolichestvamikroorganizmov.html>, свободный. Дата доступа: 10.04.2020.

22. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей : научное издание / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточной инженерии; сост. С. С. Мельников [и др.]. – Минск : Беларуская навука, 2011. – 101 с.

23. Романенко, В. Д. Биотехнология культивирования гидрибионтов / В. Д. Романенко, Ю. Г. Крот, Л. А. Сиренко. – Киев : НАН Украины, 1999. – 264 с.

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

25. Никандров, В. Н. Физико-химические особенности реализации протеолитических процессов клетки *Chlorella vulgaris* / В. Н. Никандров, И. А. Ильючик // Актуальные вопросы биологической физики и химии : научный журнал. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 654–665.

26. Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по фотосинтезу / В. Ф. Гавриленко, Т. В. Жигалова ; под ред. И. П. Ермакова. – М. : Изд. центр «Академия», 2003. – 256 с.

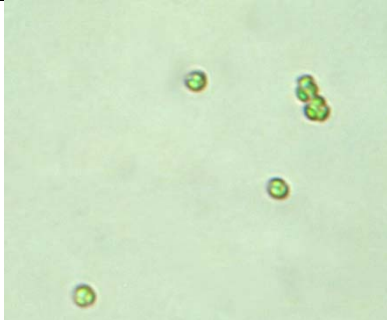
27. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты) : учебно-методическое пособие /

Ю. Ю. Невмержицкая, О. А. Тимофеева. – Казань : Казанский университет, 2012. – 36 с.

28. Ильючик, И. А. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении  $MnCl_2$  в питательную среду / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Веснік Палескага дзяржаўнага універсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук : навуčno-практычны журнал. – 2018. – № 1. – С. 53–64.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Паспорт штамма *Chlorella vulgaris* C 111 IBCE C-19 [22]

Научное наименование вида	<i>Chlorella vulgaris</i> C 111 Bogd
Таксономия	<i>Chlorophyta; Protococcophyceae; Chlorococcales; Oocystaceae</i>
Учреждение, где хранится	Институт биофизики и клеточной инженерии НАНБ, лаборатория биофизики и биохимии растительной клетки
Происхождение штамма	Получен от оригинатора штамма Н. И. Богданова в 2006 году. Выделен из Нурекского водохранилища, Таджикистан, 1977 г.
Характеристика	Одноклеточная зеленая водоросль, автотроф. В 1990 г. штамм идентифицирован В. М. Андреевой (БИН РАН, Санкт-Петербург) и принят на депонирование в коллекцию IPPAS, зарегистрирован за номером C-111
Морфология	Морфологические признаки штамма <i>Chlorella vulgaris</i> C-111 не имеют существенных различий от аналогичных признаков вида <i>Chlorella vulgaris</i> . Хлоропласт широкопоясковидный, незамкнутый, окрашен в зеленый цвет
Морфометрия	Молодые клетки слабо эллипсоидной формы, размером от 1,5 до 2,0 мкм. Взрослые – шаровидные 6-9 мкм в диаметре
Среда для культивирования	Тамийя
Область применения	Используется для промышленного получения суспензии в качестве витаминно-кормовой добавки к рационам кормления сельскохозяйственных животных, а также для очистки сточных вод
Библиография	Богданов Н. И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных. Монография. Пенза. 2006. Шацких Е. В., Гафаров Ш. С., Бояринцева Г. Г., Сафронов С. Л. Использование кормовых добавок в животноводстве. Учебное пособие. Екатеринбург. 2006.
Фигура, к которой приравнивается форма клетки	Молодые клетки – эллипсоидной формы, взрослые – шаровидные
	
<i>Chlorella vulgaris</i> C 111 из коллекции IBCE	

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

### Состав среды Тамия [23]

Макроэлементы (на 1 л дистиллированной воды):

- $\text{KNO}_3$  – 5 г;
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 2,5 г;
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,25 г;
- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,032 г.

Микроэлементы (состав по Арнону, 1 мл на 1 л питательной среды):

Раствор А:

- $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 2,86 мг/л;
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 1,81 г/л;
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,222 г/л.

Раствор В:

- $\text{MoO}_3$  – 17,64 мг/л;
- $\text{NH}_4\text{VO}_3$  – 22,96 мг/л.

Растворы А и В готовят отдельно.

Учебное издание

Ильючик Ирина Анатольевна  
Никандров Виталий Николаевич

**Методические рекомендации  
по изучению биохимических свойств  
одноклеточных зеленых водорослей  
(на примере *Chlorella vulgaris*)**

Ответственный за выпуск *П. Б. Пигаль*

Публикуется в авторской редакции

Подписано в печать 28.09.2020 г. Формат 60x84/16.  
Бумага офсетная. Гарнитура «Таймс». Ризография.  
Усл. печ. л. 1,68. Уч.-изд. л. 0,95.  
Тираж 70 экз. Заказ № 187.

Отпечатано в редакционно-издательском отделе  
Полесского государственного университета  
225710, г. Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23.