ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОТАНИКИ ИМЕНИ
В. Ф. КУПРЕВИЧА НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 582.263:546.712

ИЛЬЮЧИК
Ирина Анатольевна

ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ МАРГАНЦА (II) НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS* BEIJRINCK

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Минск, 2022

Работа выполнена в учреждении образования «Полесский государственный университет», г. Пинск

Научный руководитель:	**Никандров Виталий Николаевич**, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биотехнологии УО «Полесский государственный университет»
Официальные оппоненты:	**Решетников Владимир Николаевич,** академик Национальной академии наук Беларуси, доктор биологических наук, профессор
	Домаш Валентина Иосифовна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник сектора метаболизма и функций белков растений государственного научного учреждения «Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси»
Оппонирующая организация:	Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси»

Защита диссертации состоится « 4 » октября 2022 г. в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.38.01 в государственном научном учреждении «Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27. E-mail: nan.botany@yandex.by. Телефон: (017) 378-18-51. Факс: (017) 322-18-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Я. Коласа Национальной академии наук Беларуси.

Автореферат разослан 22 августа 2022 года.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
кандидат биологических наук Е. Я. Куликова

ВВЕДЕНИЕ

Одной из глобальных проблем современности является обеспечение различных отраслей народного хозяйства необходимым количеством белков, а также усвояемых источников витаминов и микроэлементов. В настоящее время эта проблема все еще не решена. В мировом производстве ежегодно не достает около 30 млн т кормового белка (В. Загоровская, 2020). Прогнозируемый ООН рост численности населения до 8,3 млрд человек к 2030 г. и до 9,7–10,0 млрд человек к 2050 г. (М. М. Ковалев, Е. А. Червякова, 2017) приведет к усугублению ситуации дефицита белка, ликвидировать который, лишь расширяя посевные площади или увеличивая поголовье скота, станет невозможным (Л. Н. Рождественская и др., 2018). 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 (В. А. Люндышев, 2018). Рационы сельскохозяйственных животных и птиц ряда регионов нашей страны также характеризуются нехваткой белка, витаминов и микроэлементов, что негативно сказывается на продуктивности скота и птицы, а также на резистентности их организмов к целому ряду заболеваний (Т. В. Яковлева, Л. А. Яковлев, 2013; О. Ф. Ганущенко, Д. Т. Соболев, 2016; А. Я. Райхман, 2017).

В последние десятилетия решение данной проблемы усматривают в развертывании производства «одноклеточного» белка – общего белка разнообразных одноклеточных организмов, в том числе и водорослей (G. Suman et al., 2015). Кроме того, водоросли не конкурируют с традиционными продовольственными культурами за место и ресурсы (S. Bleakley, M. Hayes, 2017). Более чем в 60 странах мира, в том числе США, Мексике, Таиланде, Индии, Китае, Японии, Канаде, Австралии, производят в промышленных масштабах свыше тысячи тонн в год биомассы микроводорослей (M. Fradique et al., 2010).

По данным источников литературы, одной из наиболее перспективных микроводорослей, обладающей необходимыми характеристиками для данных целей, является *Chlorella vulgaris*. Основным преимуществом ее использования в качестве сырья является высокая скорость роста, возможность культивирования в полностью контролируемых условиях, способность накапливать значительное количество белков, углеводов, жиров, витаминов (Л. А. Гайсина и др., 2008; В. А. Лукьянов и др., 2013; Н. А. Политаева и др., 2017; Y. Panahi et al., 2019). Витамин B12, который синтезирует хлорелла, не синтезируют ни дрожжи, ни высшие растения (Н. И. Богданов, 2007; Е. И. Макарова и др., 2009; A. V. Ursu et al., 2014; B. Klamczynska, W. D. Mooney, 2017; N. Jalilian et al., 2019). По качеству продуцируемых белка, представленного всеми необходимыми

аминокислотами, в том числе и незаменимыми для человека, и витаминов она превосходит все известные кормовые и пищевые продукты.

Благодаря высокой пластичности метаболизма *Ch. vulgaris* широко используется в качестве витаминно-кормовой добавки в рационе кормления сельскохозяйственных животных, птицы, для получения препаратов тонкой химии, медицины, парфюмерии, в прикладных исследованиях, очистке сточных вод, получении биотоплива и т.д. (Н. И. Богданов, 2007; К. Н. Сорокина и др., 2012; Т. В. Яковлева, Л. А. Яковлев, 2013; В. А. Лукьянов и др., 2013; S. Syed et al., 2015; А. Я. Райхман, 2017; M. I. Khan et al, 2018; E. Martínez-Francés, C. Escudero-Oñate, 2018; M. A. Borowitzka, 2018; N. Jalilian et al., 2019; A. Taubert et al., 2019; N. EA. El-Naggar et al., 2020). Дальнейшая интенсификация технологии культивирования хлореллы требует углубленного изучения механизмов регуляции метаболизма и жизнедеятельности ее клетки, а также введения в питательную среду эффекторов, стимулирующих процессы метаболизма. Одним из таковых эффекторов может служить дополнительное введение в питательную среду микроэлементов, среди которых – марганец.

Марганец – третий среди переходных металлов по распространенности в земной коре после железа и титана. Он является незаменимым микроэлементом. Несмотря на малое количественное содержание в организмах, марганцу принадлежит значительная биологическая роль. Он входит в состав митохондриальных супероксиддисмутазы, пируваткарбоксилазы, а также глутаминсинтетазы, катализирует образование связи глюкозамин-серин при синтезе глюкозаминогликанов хряща, является кофактором окислительного фосфорилирования. Образуя устойчивые комплексы с адениловыми нуклеотидами, марганец участвует в реализации каталитической функции таких ферментов, как аденилаткиназа, аргининкиназа, ФЕП-карбоксилаза, креатинкиназа, глутаматдегидрогеназа, энолаза, изоцитратдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, пентозоизомераза (A. Takeda, 2003; F. H. Nielsen, 2012; A. L. Bukhman, 2014; О. Н. Жук, В. Н. Никандров, 2015). Он является кофактором РНК-полимеразы и ауксиноксидазы, разрушающей 3-индолилуксусную кислоту [В. М. Гольд и др., 2020]. Без марганца невозможны нормальные рост, развитие и продуктивность микроорганизмов, растений и животных. Установлено специфическое его воздействие на важнейшие физиологические процессы, к примеру фотосинтез у растений и цианобактерий, при отсутствии марганца хлорофилл быстро разрушается на свету (В. В. Кузнецов, Г. А. Дмитриева, 2011; S. B. Schmidt et al., 2016). Недостаток марганца у фотосинтезирующих микроорганизмов тормозит деление клеток, вызывая нарушение их физиологических функций, сопровождающееся нарушением в структуре хлоропластов (В. А. Лукьянов, А. И. Стифеев, 2014). При его дефиците у хлореллы образуются необычно большие клетки неправильной формы, а на

полностью освобожденной от марганца среде почти полностью прекращается рост водорослей (В. В. Упитис, 1983). Сильное воздействие марганца на физиологические процессы в организме объясняется тем, что он вступает в теснейшую связь со многими белками и ферментами. Быстро проникая в клетки, способствует значительному увеличению интенсивности фотосинтеза, участвуя в окислении, существенно активизирует полный круг метаболических реакций (О. Г. Белоус, 2011).

Среди механизмов регуляции метаболических и физиологических процессов важное место занимает система протеолиза. Однако в литературе отсутствуют какие-либо материалы об особенностях системы протеолиза *Ch. vulgaris* в культуре, и это несмотря на чрезвычайно большую значимость данной системы в жизнедеятельности всех типов организмов, включая одноклеточные. В источниках литературы практически отсутствуют и материалы о влиянии катионов Mn^{2+} на состояние звеньев одного из важнейших гомеостатических механизмов – протеолиза. Это относится к взаимодействию его с реакциями и компонентами протеолиза – одного из механизмов регуляции метаболизма в целом.

Таким образом, необходимость проведенных исследований продиктована потребностью раскрытия новых аспектов регуляторного действия катионов Mn^{2+} на физиолого-биохимическое состояние клеток микроводоросли *Ch. vulgaris*.

Все изложенное и определило актуальность диссертационной работы по избранной теме.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Исследования, результаты которых вошли в диссертационную работу, выполнялись в рамках следующих научных программ и заданий биотехнологического факультета Полесского государственного университета: НИР кафедры биотехнологии «Особенности регуляции протеолитических реакций в биосистемах и технологических процессах» (утверждена решением научно-технического совета университета, протокол № 10 от 10.12.2014, на период 2013–2017 гг.); НИР кафедры биотехнологии «Эколого-биологические и молекулярно-генетические аспекты состояния и функционирования живых систем как основа развития биотехнологии Пинского (Полесского) региона» (утверждена решением научно-технического совета университета, протокол № 10 от 27.12.2017, на период 2018–2022 гг.); НИР кафедры промышленного рыбоводства «Разработка инновационных методов интенсификации аквакультуры», № госрегистрации 20200104 от 21.01.2020 г., на период 2020–2022 гг.

Тема диссертации соответствует Перечню приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2021–2025 годы утвержденному Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 № 156 «О приоритетных направлениях научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы», пункт 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные)».

Цель и задачи исследования. Цель работы – раскрыть особенности регуляторного действия катионов марганца (II) на физиолого-биохимическое состояние клеток микроводоросли *Ch. vulgaris*.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1) исследовать влияние добавления катионов Mn^{2+} в культуральную среду в диапазоне концентраций 0,01–25,00 мг/л на физиолого-биохимические особенности микроводоросли *Ch. vulgaris*: накопление биомассы, белка и фотосинтетических пигментов.

2) исследовать протеолитическую активность гомогенатов клеток *Ch. vulgaris*, а также ядерной, пластидной, митохондриальной фракций и супернатанта.

3) исследовать влияние катионов Mn^{2+} на протеолитическую активность культур клеток *Ch. vulgaris*, включая проявления фосфатного эффекта и действия АТФ.

4) исследовать влияние $MnCl_2$ в диапазоне концентраций 10^{-8}–10^{-2} М на расщепление белков-субстратов протеиназами различного типа (сериновыми, цистеиновыми, аспартильными, металлопротеиназами).

Объект исследования – *Chlorella vulgaris* (Beijerinck) штамм С 111 IBCE C-19 из коллекции РУП «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Предмет исследования – влияние катионов марганца (II) на физиолого-биохимическое состояние культур клеток *Chlorella vulgaris*.

Научная новизна. Впервые показано, что при добавлении в питательную среду катионов Mn^{2+} и последующем культивировании, клетки культуры *Ch. vulgaris* претерпевают функционально-метаболические перестройки, зависящие от концентрации эффектора в среде и выражающиеся в динамике уровней биомассы, внутриклеточного белка и концентрации фотосинтетических пигментов, при этом сдвиги протеолитической активности носят чаще антибатный характер. Впервые установлены характер изменений протеолитической активности клеток *Ch. vulgaris* в культуре при наступлении состояния хлороза и замедление развития хлороза из-за увеличения объема клеток при концентрации катионов Mn^{2+} в питательной среде равной 137,5 мг/л. Впервые выявлены особенности организации системы протеолиза клетки *Ch. vulgaris*,

включая проявления протеолитической активности субклеточными фракциями (ядерной, пластидной, митохондриальной и супернатанта) гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* при использовании группоспецифических ингибиторов протеиназ; продемонстрировано наличие в клетках водоросли протеиназ различных типов: сериновых, цистеиновых и металлопротеиназ. Впервые продемонстрированы изменения протеолитической активности гомогенататов клеток *Ch. vulgaris* под действием неорганического ортофосфата, АТФ, pH и катионов Mn^{2+}; причем концентрационная зависимость носила сложный характер, выражающийся как в интенсификации протеолиза, так и в его подавлении. Впервые установлено, что катионы Mn^{2+} способны оказывать прямое действие на расщепление белков протеиназами различных типов: сериновыми, цистеиновой, аспартильной и металлопротеиназой; установлено, что характер эффекта зависит не только от концентрации катионов металла и типа протеиназы, но и от белка-субстрата, а также присутствия анионов ортофосфата.

Положения, выносимые на защиту:

1. Добавление в питательную среду катионов Mn^{2+} в диапазоне концентраций 0,01–25,00 мг/л, вызывало в культуре *Ch. vulgaris* три-четыре функционально-метаболические перестройки, зависящие от концентрации эффектора в питательной среде. Они выражались в чередовании колебаний концентрации внутриклеточного белка – возрастании его уровня на 27–295% и спаде на 24–64%, а также колебаний уровня фотосинтетических пигментов – росте на 15–125% и снижении на 20–56%.

2. Система протеолиза клетки *Ch. vulgaris*, включая протеолитическую активность субклеточных частиц, при pH 7,4 и 9,0 представлена протеиназами серинового, цистеинового и металлопротеиназного характера, расщепляющими несколько различных белков-субстратов; влияние катионов Mn^{2+} на активность протеиназ характеризуется сложной концентрационной зависимостью.

3. Влияние ортофосфата на характер действия катионов Mn^{2+} на процессы протеолиза в клетках *Ch. vulgaris* зависело от белка-субстрата и от величины pH реакционной системы: при pH 7,4 совместное действие ортофосфата с катионами Mn^{2+} вело к возрастанию протеолиза на 11–60%, а при pH 9,0 – в ряде случаев к подавлению на 16–38%.

4. Катионы Mn^{2+} способны оказывать прямое действие на расщепление белков протеиназами различных типов, вызывая подавление протеолитической активности на 20–50%. Наиболее чувствительна к действию эффектора активность папаина и пепсина, а наиболее индифферентна – активность субтилизина. При действии катионов Mn^{2+} чаще отмечены изменения расщепления протеиназами гемоглобина, а наиболее редко – желатина.

Личный вклад соискателя ученой степени. Диссертационная работа выполнена лично автором и является законченным научным трудом. Анализ

научной литературы, выбор объекта исследования, планирование и проведение экспериментов, графическая и статистическая обработка, обобщение и анализ полученных результатов исследований проводились лично автором. Выбор темы исследования, постановка задач, теоретическое обсуждение и оформление результатов в виде научных статей осуществлены совместно с научным руководителем Никандровым В. Н.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Основные положения, методика и научные результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на заседаниях кафедры биотехнологии УО «Полесский государственный университет» в период с 2014 по 2018, 2021 гг., на научных семинарах «Актуальные проблемы инновационного развития Республики Беларусь» Полесского государственного университета (Пинск, 2015–2018 гг.), на научном собрании УО «Полесский государственный университет» (2021 г.) и следующих конференциях: I, III и IV Международных научно-практических конференциях «Биотехнология: достижения и перспективы развития» (Пинск, 2014; 2018; 2019); IV и VI Международных научных интернет-конференциях «Физико-химическая биология» (Ставрополь, 2016; 2018), 25-й конференции «Современные аспекты биохимии и биотехнологии»; 2-й конференции молодых ученых отделения биохимии, физиологии и молекулярной биологии Национальной академии наук Украины (Киев, 2017); на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» и XIII съезде Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 2018); IV Международной научно-практической конференции «Биотехнология: взгляд в будущее» (Ставрополь, 2018); Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы разработки, использования биологически активных соединений в научной и практической деятельности» (Брест, 2018); IX Международной научной конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, 2018); Международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы развития животноводства» (Витебск, 2018); VI Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Воронеж, 2018); XIII Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2018).

Опубликование результатов диссертации. По результатам диссертационных исследований опубликованы 22 научные работы. Из них: 5 статей, отвечающих требованиям пункта 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 4 – в научных рецензируемых журналах, 10 – в материалах конференций, 2 – в тезисах конференций, методические рекомендации – 1. Общее количество авторских листов – 9,8 (лично соискателя – 7,0 авторских листа), из них на статьи в

рецензируемых журналах из перечня ВАК приходится 4,6 листа (лично соискателя – 3,4 авторских листа).

Работа соискателя получила практическое подтверждение в Республике Беларусь и была внедрена в научные исследования отраслевой лаборатории «Инновационные технологии в агропромышленном комплексе» биотехнологического факультета Полесского государственного университета (акт №3 от 28.09.2020 г.), в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (акт № 56/3н-2020 от 01.10.2020 г.), в лаборатории УО «Гродненский государственный аграрный университет» (акт от 29.12.2020 г.) и в учебный процесс в вузах: Полесский государственный университет, биотехнологический факультет, кафедра биохимии и биоинформатики (протокол №1 от 28.08.2020 г.); Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка, биологический факультет, кафедра общей биологии и ботаники (протокол №1 от 31.08.2020 г.); Витебский государственный университет им. П. М. Машерова, факультет химико-биологических и географических наук, кафедра зоологии и ботаники (протокол №2 от 11.09.2020 г.) и кафедра экологии и географии (протокол №2 от 11.09.2020 г.); Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина, биологический факультет, кафедра ботаники и экологии (протокол №6 от 05.01.2021 г.).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает введение, общую характеристику работы, обзор литературы, описание объекта и методов исследования, 4 экспериментальные главы, отражающие результаты исследований, заключение, список литературы, содержащий 279 источников (из них 22 – собственные публикации, 129 – русскоязычные, 128 – на иностранных языках), приложения. Текст диссертации изложен на 129 страницах (основной текст – 102, таблицы и рисунки – 27 страниц). Всего в диссертации 29 рисунков, 19 таблиц. Приложения занимают 23 страницы и содержат 6 таблиц, 8 актов внедрения научных результатов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **обзоре литературы** представлен анализ современного уровня знаний о физиологических и биохимических особенностях *Ch. vulgaris*, роли марганца как биогенного элемента, общие сведения о протеолизе как универсальном механизме регуляции биохимических и биологических процессов, обозначены нерешенные проблемы, обоснована научная и практическая значимость работы.

Объекты и методы исследования. В качестве объекта исследования служила *Ch. vulgaris* (Beijerinck) штамм С 111 IBCE C-19 из коллекции РУП «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Концентрацию клеток хлореллы определяли методом визуального прямого подсчета в камере Горяева, количество сухого вещества, доли погибших клеток – по методике (Л. А. Сидоренко и др., 1975); выделение ядерной, пластидной и митохондриальной фракций из гомогенатов клеток методом дифференциального центрифугирования (А. А. Бундель, 1968; Дж. Б. Финдлей, У. Г. Эванз, 1990; Н. С. Белозерова и др., 2009; И. А. Ильючик, В. Н. Никандров, 2020); качество и чистоту полученных органелл оценивали на основании целостности морфологических структур при помощи световой микроскопии, а также с помощью красителей (Н. А. Лемеза, 2008); очистку компонентов клеток хлореллы проводили в градиенте сахарозы (А. А. Бундель, 1968; Н. С. Белозерова и др., 2009; И. А. Ильючик, В. Н. Никандров, 2020); разрушение клеток и органелл осуществляли по методике (Дж. Б. Финдлей, У. Г. Эванз, 1990; И. А. Ильючик, В. Н. Никандров, 2020). Количественное определение содержания белка в растворах оценивали по величине абсорбции при 280 нм, используя соответствующие значения $A^{\%}_{см}$ (D. M. Kirschenbaum, 1975), а также колориметрическим методом с кумасси G-250 (M. M. Bredford, 1976), концентрацию хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов – по методике (В. Ф. Гавриленко, Т. В. Жигалова, 2003); определение протеолитической активности полученных образцов проводили по лизису белков-субстратов в тонком слое агарового геля (В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова, 2013, И. А. Ильючик, В. Н. Никандров, 2020).

Для исследования влияния катионов Mn^{2+} в динамике роста культуры *Ch. vulgaris*, готовили среду Тамийя (С. С. Мельников и др., 2011). Среда Тамийя, не содержащая Mn^{2+}, принималась за контроль 1, контроль 2 – полноценная среда Тамийя, концентрация Mn^{2+} 0,50 мг/л. В среду Тамийя, без Mn^{2+}, дополнительно вносили раствор $MnCl_2$ до конечной концентрации Mn^{2+}, мг/л: 0,010, 0,025, 0,050, 0,10, 0,50, 1,00, 2,50, 5,00, 10,00, 25,00, 50,00, 137,50, 275,00, 412,50. Отбор образцов клеток культуры и культуральной жидкости осуществляли на 1, 4, 7, 10, 13, 16, 22, 28, 34, 40-е или с 1-х по 14-е или на 3, 5, 7-е сутки культивирования.

Для исследования влияния катионов Mn^{2+} *in vitro*, использовали растворы $MnCl_2$, конечная концентрация Mn^{2+} от 10^{-2} до 10^{-8} М. Отбор образцов клеток хлореллы производили на 7-е сутки культивирования.

Для исследования влияния ортофосфата или АТФ, использовали растворы: натрий-калий фосфата 0,100, 0,060, 0,050, 0,045, 0,030, 0,015, 0,009, 0,006, 0,003, 0,001 М или АТФ динатриевой соли, конечная концентрация от 10^{-2} до 10^{-8} М.

В исследованиях измерения осуществляли не менее чем в четырехкратной повторности. Для математической и статистической обработки полученных экспериментальных данных использовали программное обеспечение MS Excel 2010 и Statistica 6.0, для создания рисунков – Origin 6.1. Полученные результаты считали достоверными при заданном уровне значимости: * или # – $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ВЛИЯНИЕ $MnCl_2$ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *CHLORELLA VULGARIS* В ДИНАМИКЕ РОСТА КУЛЬТУРЫ

Влияние $MnCl_2$ на биомассу *Ch. vulgaris.* Установлено, что исключение из среды Тамийя Mn^{2+} (контроль 1) негативно не сказалось на росте культуры. В период с 1-х до 28-х суток уровень биомассы нарастал, увеличиваясь в 6,0 раз. В контроле 2 (среда Тамийя) уровень биомассы в период с 1-х до 34-х суток возрос в 9,2 раза. Активный рост культуры происходил в период с 1-х по 16-е сутки при концентрации эффектора в среде культивирования 0,01–0,50 мг/л. В диапазоне концентраций Mn^{2+} ,010–0,025 мг/л рост хлореллы завершался к 28-м суткам, при 0,05–2,50 мг/л – к 34-м суткам, при 5,00–25,00 мг/л – в целом, на 22-е сутки.

В отсутствие Mn^{2+} и при всех его концентрациях в среде культивирования, в сравнении со средой Тамийя, наблюдалось угнетение роста *Ch. vulgaris* на протяжении всего периода культивирования (за исключением 7, 13, 16-х суток). Особенно заметно это в периоды 1–4-е и 22–40-е сутки – спад на 11–42, 17–78% соответственно (рисунок 1) [1, 19].

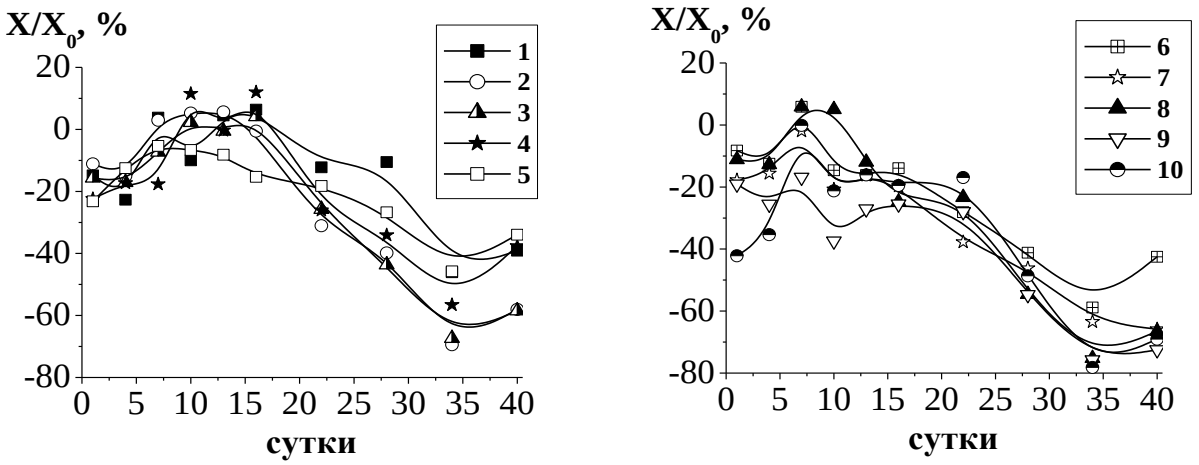


Рисунок 1. – Изменения (% к контролю 2 – среда Тамийя, Mn^{2+} 0,50 мг/л, принятому за 100%) накопления биомассы культурой *Ch. vulgaris* при добавлении в питательную среду катионов Mn^{2+} (мг/л): 1- контроль 1 (без Mn^{2+}); 2 - 0,01; 3 - 0,025; 4 - 0,05; 5 - 0,10; 6 - 1,00; 7 - 2,50; 8 - 5,00; 9 - 10,00; 10 - 25,00

При содержании Mn^{2+} в среде культивирования выше 137,5 мг/л в условиях аэрирования культуры и без нее рост хлореллы угнетался или прекращался. Аэрирование ускоряло созревание культуры и гибель клеток. При отсутствии аэрирования уровень биомассы был в 1,2 раза выше, чем при его наличии [18]. При оценке общего урожая, с целью накопления биомассы, оптимальными явились: среда Тамийя, время роста – 34-е сутки [1].

Влияние $MnCl_2$ на содержание внутриклеточного белка *Ch. vulgaris.* Установлено наличие метаболических перестроек культуры, проявившиеся в

сдвигах уровня внутриклеточного белка в зависимости от концентрации катионов Mn^{2+} в среде и времени культивирования. В контроле 1 (без Mn^{2+}) в интервале 10–16-е сутки уровень белка возрос на 51%, 16–22-е сутки – уменьшился на 32%, 22–40-е сутки – рост на 42%. В контроле 2 (среда Тамийя) к 16-м суткам – рост в 2,3 раза, к 22-м суткам – спад на 35%, к 34-м суткам – рост в 2,6 раза.

В целом, при концентрации Mn^{2+} в среде культивирования 0,01–0,05, 0,10–1,00, 2,50–25,00 мг/л на всем протяжении роста культуры, уровень внутриклеточного белка превышал таковой в контроле 1 на 14–112, 9–81, 10–131% соответственно, а по отношению к контролю 2 на 16, 22 и 40-е сутки почти во всем диапазоне концентраций эффектора превышал на 19–46, 40–144 и 10–50% соответственно (рисунок 2).

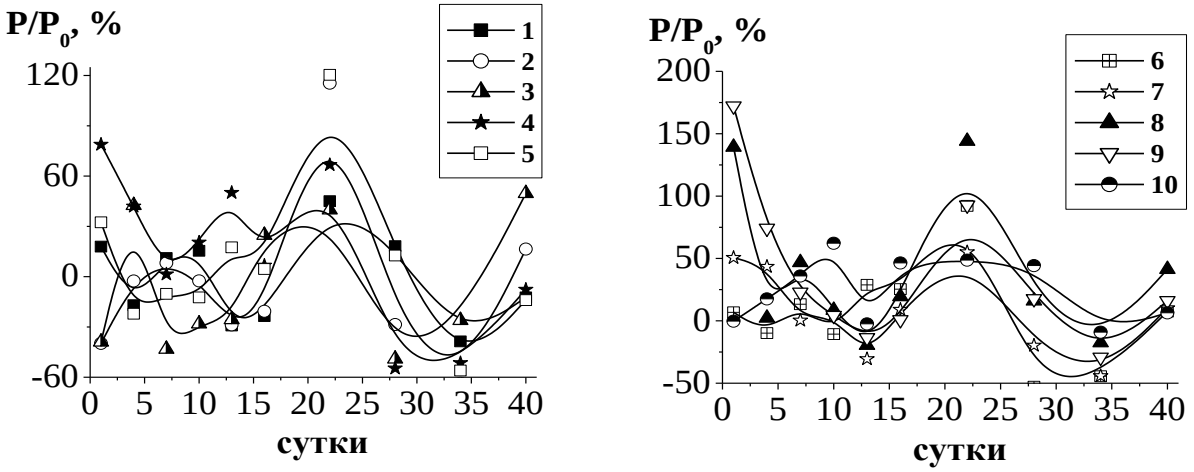


Рисунок 2. – Изменения (% к контролю 2 – среда Тамийя, Mn^{2+} 0,50 мг/л, принятому за 100%) накопления белка клетками *Ch. vulgaris* при добавлении в питательную среду Mn^{2+} (мг/л): 1 - контроль 1 (без $MnCl_2$); 2 - 0,01; 3 - 0,025; 4 - 0,05; 5 - 0,10; 6 - 1,00; 7 - 2,50; 8 - 5,00; 9 - 10,00; 10 - 25,00

С целью культивирования хлореллы для накопления белка, предпочтительной представляется среда Тамийя (Mn^{2+} 0,50 мг/л), 34-е сутки культивирования [1, 2, 16, 19].

Влияние $MnCl_2$ на концентрацию пигментов фотосинтеза *Ch. vulgaris.* Установлено наличие метаболических перестроек культуры хлореллы, связанных с накоплением фотосинтетических пигментов, зависящих от концентрации марганца в среде культивирования. Они совпадают со сдвигами уровня внутриклеточного белка в период 1–40-е сутки и с динамикой накопления биомассы *Ch. vulgaris* в контролях в период 1–22-е сутки [1, 3].

За весь период культивирования концентрация хлорофилла *a* в контрольном варианте 1 возросла в 3,1 раза, а в контрольном варианте 2 – в 1,7 раза. Рост уровня хлорофилла *a* наблюдался в интервалах 10–16-х суток на 15–83% при всех концентрациях эффектора (максимальный при 25,00 мг/л), 22–40-х суток на 86–125% при Mn^{2+} 1,00–25,00 мг/л (максимальный при 5,00 мг/л) и спад в интервале

16–22-х суток на 27–47% при концентрациях Mn^{2+} 1,00–25,00 мг/л (максимальный при 25,00 мг/л). Принципиально близкая динамика от описанной выше для хлорофилла *a* наблюдалась также для хлорофилла *b*, суммы хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов (рисунок 3).

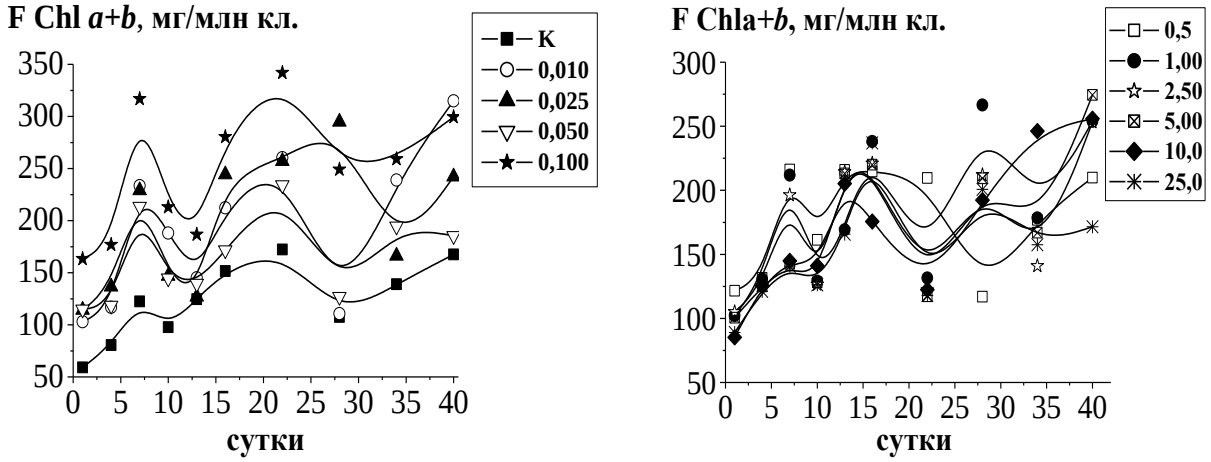


Рисунок 3. – Динамика концентраций (мг/млн клеток) суммы хлорофиллов *a* и *b* в клетках культуры *Ch. vulgaris* при росте на питательной среде без добавления Mn^{2+} (К - контроль 1) или с добавлением катионов Mn^{2+} в пределах 0,01-25,00 мг/л

Зависимости между ростом уровня фотосинтетических пигментов и размножением клеток хлореллы не наблюдалось [3].

Влияние $MnCl_2$ на физиолого-биохимические показатели клеток *Ch. vulgaris* в состоянии хлороза. Установлено, что в условиях культивирования, ведущих к развитию хлороза, в клетках хлореллы наблюдалось уменьшение концентрации общего белка в 1,1–6,9 раза, что не обусловлено избытком катионов Mn^{2+} в питательной среде. Проявление хлороза совпадало с уменьшением количества клеток в культуре (рисунок 4).

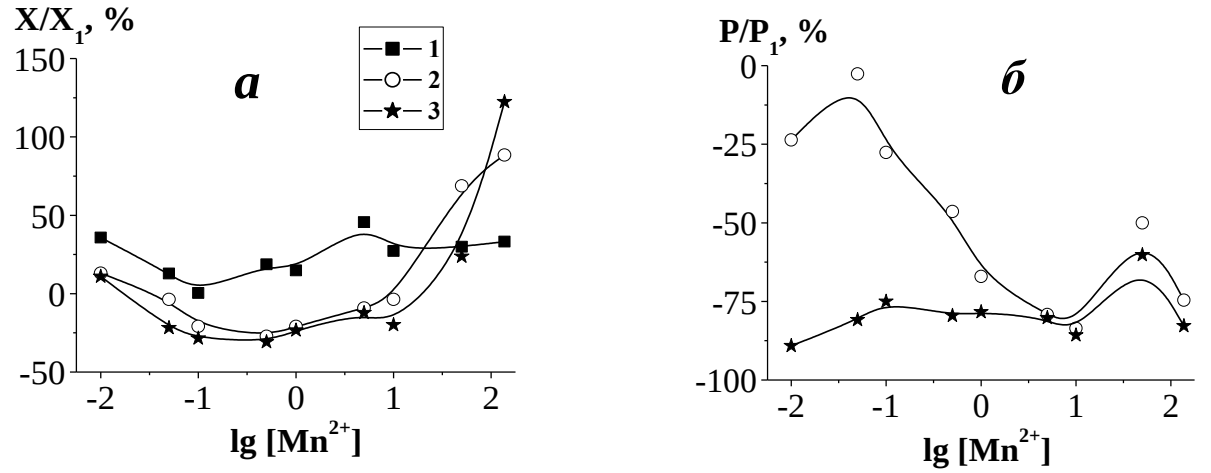


Рисунок 4. – Изменения (% к 1-м суткам культивирования, принятым за 100%) биомассы (*а*), содержания белка в клетках (*б*) *Ch. vulgaris* на третьи (1), пятые (2), седьмые (3) сутки культивирования на питательной среде с добавлением $MnCl_2$

При внесении в среду Mn^{2+} концентрацией 137,50 мг/л хлороз не обнаруживался в период с 5-х по 7-е сутки, а биомасса *Ch. vulg*aris в этот период возрастала на 18%; происходило увеличение объема клеток [8, 17].

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГОМОГЕНАТОВ И СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ *CHLORELLA VULGARIS*

Влияние pH на протеолитическую активность гомогенатов клеток *Ch. vulgaris.* Установлено, что гомогенаты клеток хлореллы способны расщеплять белки-субстраты различного типа [2, 7–15, 20, 21]. Данная способность принципиально зависит от величины pH реакционной системы (таблица 1).

Таблица 1. – Влияние pH реакционной системы на расщепление белков-субстратов гомогенатами клеток *Ch. vulgaris*; растворители – 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0; 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0

Величина pH	Площадь расщепления, мм^2			
	Гемоглобина	Желатина	Казеина	Фибриногена
3,0	0	55,34 ± 0,62	0	0
7,4	следы	73,29 ± 2,13	58,52 ± 1,66	42,02 ± 1,53
9,0	59,49 ± 1,85	85,86 ± 2,52	82,50 ± 3,28	75,10 ± 2,21

Примечание – в таблице приведены средние значения по выборкам, величина среднего квадратичного отклонения не превышала 5%, n = 6

Полученные данные свидетельствуют о сложной системе протеолиза в клетках *Ch. vulgaris,* представленными вариантами ферментов, различающихся по типу активного центра и субстратной специфичности, работающими при значениях pH от нейтральных до щелочных [2, 9, 13, 15, 20, 21].

Протеолитическая активность субклеточных фракций, выделенных из гомогенатов клеток *Ch. vulgaris.* Установлено, что выделенные субклеточные фракции обладают протеолитической активностью и расщепляют белки-субстраты при pH 7,4 и 9,0. При pH 7,4 наиболее интенсивно протеиназы фракций расщепляли казеин, кроме фракции митохондрий. При pH 9,0 протеиназы ядер активнее расщепляли желатин, пластид – фибриноген, митохондрий и супернатанта – гемоглобин (таблица 2).

При замене растворителя (H_2O) на этанол в ряде случаев протеолитическая активность снижалась при pH 7,4 на 33–81%, при pH 9,0 на 38–57% (таблица 2).

Таблица 2. – Протеолитическая активность субклеточных фракций *Ch. vulgaris*

Растворитель	Площадь зон лизиса, мм^2							
	pH 7,4				pH 9,0			
	Я	П	М	С	Я	П	М	С
Гемоглобин								
H_2O	51,25 ± 2,11	50,96 ± 1,41	50,64 ± 1,40	59,01 ± 2,25	69,52 ± 0,63	68,69 ± 2,38	94,43 ± 4,10	66,01 ± 2,40

Окончание таблицы 2.

+ этанол, 25%	18,64 ± 0,88*	79,84 ± 3,56*	54,95 ± 1,07	11,13 ± 0,51*	53,63 ± 1,40*	172,01 ± 6,49*	91,75 ± 3,61	109,77 ± 1,52*
Желатин								
H_2O	76,38 ± 2,38	60,99 ± 1,44	66,46 ± 2,31	66,59 ± 1,75	97,73 ± 1,87	39,49 ± 0,63	35,56 ± 1,38	59,78 ± 0,97
+ этанол, 25%	80,93 ± 1,01	56,36 ± 2,14	44,29 ± 2,15*	55,94 ± 0,85*	60,38 ± 0,62*	38,00 ± 1,80	32,07 ± 0,95	73,80 ± 1,78*
Казеин								
H_2O	149,35 ± 2,61	103,93 ± 3,20	77,32 ± 3,65	99,16 ± 3,08	78,03 ± 2,49	75,52 ± 2,44	47,73 ± 2,20	59,00 ± 2,25
+ этанол, 25%	149,35 ± 1,94	60,17 ± 2,41*	73,95 ± 2,60	95,72 ± 2,67	78,03 ± 1,98	94,20 ± 4,30*	28,89 ± 1,31*	25,51 ± 1,16*
Фибриноген								
H_2O	65,72 ± 1,74	68,03 ± 2,09	93,51 ± 2,14	61,96 ± 2,05	62,17 ± 1,41	82,91 ± 2,38	93,40 ± 0,86	55,79 ± 0,52
+ этанол, 25%	67,65 ± 0,96	84,26 ± 1,83*	124,93 ± 5,86*	67,72 ± 1,63	93,30 ± 4,04*	87,48 ± 4,28	151,78 ± 6,49*	76,60 ± 2,77*

Примечание 1 – Я – ядра, П – пластиды, М – митохондрии, С – супернатант.

Примечание 2 – в таблице приведены средние значения по выборкам, величина среднего квадратичного отклонения не превышала 5%; n = 6.

Примечание 3 – * – изменения статистически достоверны при $p \leq 0,05$

Учитывая концентрацию белка в образцах субклеточных фракций (мкг/мл): ядра – 695,57 ± 0,44; пластиды – 719,73 ± 0,22; митохондрии – 286,23 ± 5,50; супернатант – 48,33 ± 3,13, наиболее высокая удельная активность присуща фракции супернатанта.

По результатам ингибиторного анализа установлено, что все субклеточные фракции клеток хлореллы имеют многоплановый набор протеиназ: сериновых, цистеиновых и металлопротеиназ. При pH 7,4 активность сериновых протеиназ проявлялась активнее при расщеплении гемоглобина протеиназами пластид, супернатанта, в меньшей степени – ядер, а также при расщеплении фибриногена протеиназами митохондрий; менее заметна активность сериновых протеиназ – при использовании пластид. При pH 9,0: выражено расщепление гемоглобина сериновыми протеиназами пластид, расщепление казеина – супернатантом, а расщепление фибриногена – таковыми ядер, митохондрий и супернатанта [4, 20].

ВЛИЯНИЕ $MnCl_2$ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУР КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS*

Влияние катионов Mn^{2+} *in vitro* на протеолитическую активность гомогенатов клеток *Ch. vulgaris*. Установлено, что воздействие Mn^{2+} на протеолитическую активность гомогенатов клеток хлореллы носит сложный концентрационный характер, зависящий от конкретного субстрата и pH реакционных систем (рисунки 5, 6) [2, 9, 13, 15, 20, 21].

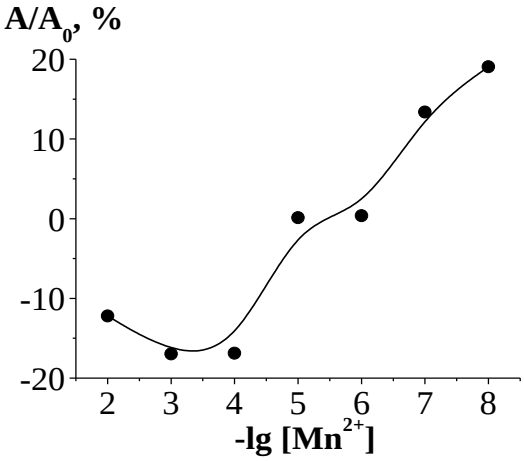
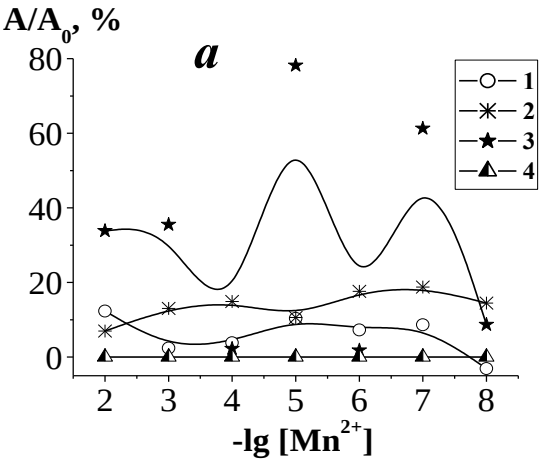


Рисунок 5. – Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления желатина гомогенатами клеток *Ch. vulgaris* под действием $MnCl_2$ *in vitro* при pH 3,0



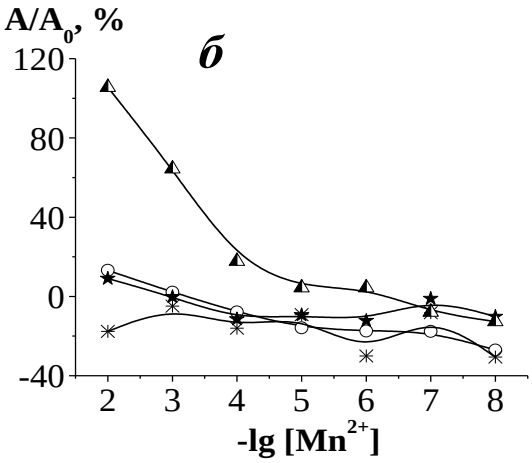


Рисунок 6. – Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления желатина (1), казеина (2), фибриногена (3), гемоглобина (4) гомогенатами клеток *Ch. vulgaris* под действием $MnCl_2$ при pH 7,4 (*а*) или pH 9,0 (*б*)

Протеолитическая активность гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* при росте культуры на питательной среде с добавлением $MnCl_2$. Установлены функционально-метаболические перестройки, связанные с внутриклеточной протеолитической активностью хлореллы. В контроле 1 (без Mn^{2+}) в период 10–16-е сутки выявлено падение желатинолитической активности при pH 3,0 на 37%, а фибриногенолитической активности при pH 9,0 на 28%. В интервале 16–22-е сутки наблюдалось усиление расщепления желатина при pH 3,0 на 32%, угнетение фибриногена при pH 7,4 на 20% и расщепления обоих белков при pH 9,0 на 20 и 31% соответственно. В период 22–40-е сутки наблюдался рост желатинолитической и фибриногенолитической активностей при pH 7,4 и 9,0: увеличение соответственно на 102 и 361%.

Добавление $MnCl_2$ в питательную среду в зависимости от концентрации изменяло характер указанных перестроек. Так, желатинолитическая активность протеиназ гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* активно проявилась на 16 и 22-е сутки при концентрациях Mn^{2+} 0,025 и 10,00 мг/л или при всех его исследуемых

концентрациях при pH 7,4 и 9,0; фибриногенолитическая активность – на 22-е сутки при всех концентрациях эффектора при pH 7,4 и 9,0 (рисунок 7) [2, 21].

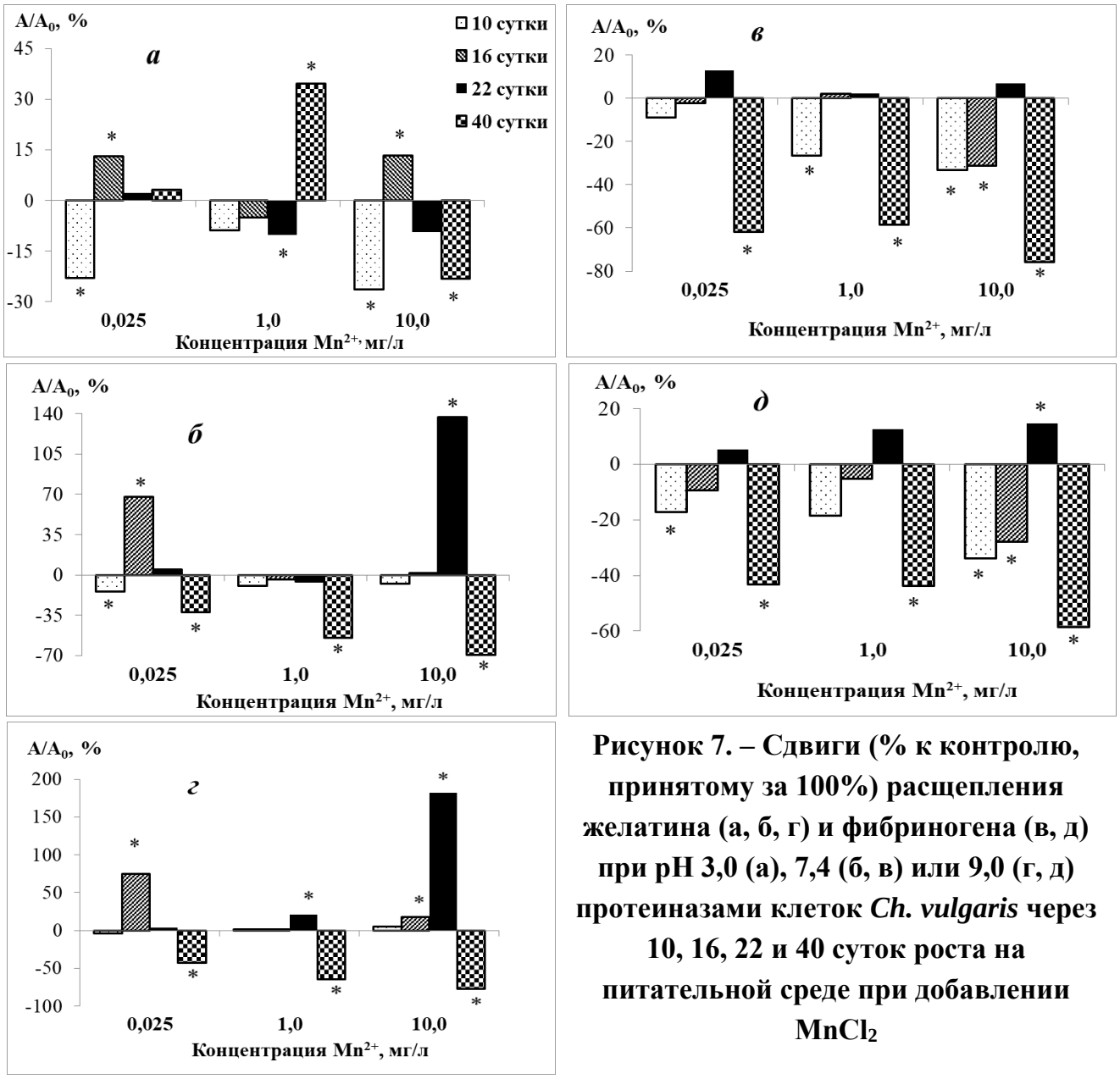


Рисунок 7. – Сдвиги (% к контролю, принятому за 100%) расщепления желатина (а, б, г) и фибриногена (в, д) при pH 3,0 (а), 7,4 (б, в) или 9,0 (г, д) протеиназами клеток *Ch. vulgaris* через 10, 16, 22 и 40 суток роста на питательной среде при добавлении $MnCl_2$

Протеолитическая активность гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* в состоянии хлороза при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду. Было подтверждено, что гомогенаты клеток *Ch. vulgaris* содержат несколько протеиназ, расщепляющих в различной степени желатин, казеин, фибриноген, неоднотипно изменяющих активность в процессе роста хлореллы, в том числе и в состоянии хлороза, и при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду [8, 9, 14].

Влияние ортофосфата на вызванные $MnCl_2$ изменения расщепления белков-субстратов гомогенатами клеток *Ch. vulgaris* при различном значении pH *in vitro*. Установлено, что проявление «фосфатного эффекта», зависит от типа белка-субстрата и величины pH реакционной системы (таблица 3) [9].

Таблица 3. – Расщепление белков-субстратов гомогенатами клеток *Ch. vulgaris* в присутствии 0,05 М KH_2PO_4 и Na_2HPO_4; растворители – 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0, 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0

Величина pH	Площадь расщепления, мм^2			
	Гемоглобина	Желатина	Казеина	Фибриногена
3,0	0	53,45 ± 1,67	0	0
7,4	40,74 ± 1,20	74,13 ± 3,26	51,38 ± 0,64	83,41 ± 2,99
9,0	58,87 ± 1,73	107,55 ± 3,01	63,65 ± 1,00	80,77 ± 3,19

Примечание – в таблице приведены средние значения по выборкам, величина среднего квадратичного отклонения не превышала 5%, n = 6

Особенности влияния ортофосфата – это зоны подавления протеолитической активности. Неорганический фосфат существенно изменял характер действия Mn^{2+} на протеолитиескую активность гомогенатов клеток хлореллы [7, 9, 11]. При pH 7,4 совместное их действие вело к возрастанию протеолитической активности на 11–60%; при pH 9,0 – в ряде случаев к частичному подавлению на 16–38% (рисунки 8, 9) [12].

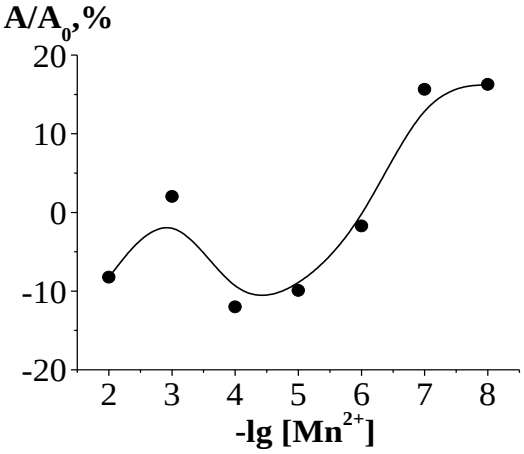
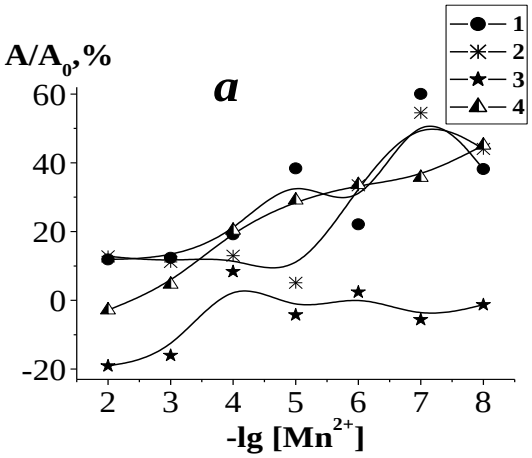


Рисунок 8. – Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления желатина гомогенатами клеток *Chlorella vulgaris* под действием $MnCl_2$ *in vitro* в присутствии ортофосфата при pH 3,0



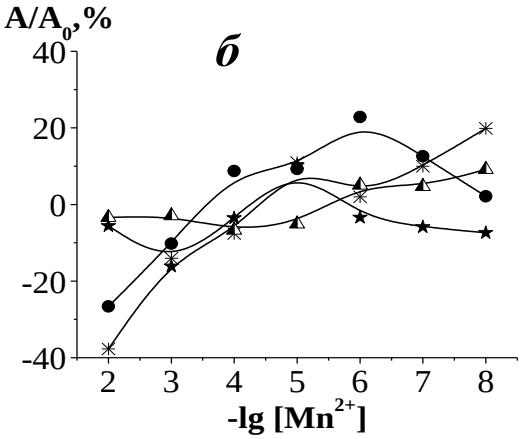


Рисунок 9. – Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления желатина (1), казеина (2), фибриногена (3), гемоглобина (4) гомогенатами клеток *Ch. vulgaris* под действием $MnCl_2$ *in vitro* при pH 7,4 (*а*) или pH 9,0 (*б*) в присутствии ортофосфата

Протеолитическая активность гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* в присутствии АТФ *in vitro*. Установлено, что АТФ умеренно стимулировал расщепление казеина, но угнетал расщепление фибриногена (таблица 4).

Таблица 4. – Расщепление белков-субстратов гомогенатами клеток *Ch. vulgaris* в присутствии АТФ *in vitro*; растворитель – 0,15 М раствор NaCl pH 7,4

Концентрация АТФ, М	Площадь расщепления, мм^2	
	Казеина	Фибриногена
контроль	65,52 ± 2,81	66,22 ± 2,75
10^{-2}	77,42 ± 1,11*	52,03 ± 1,24*
10^{-3}	76,71 ± 3,72	58,71 ± 2,51
10^{-4}	84,24 ± 4,13*	64,31 ± 1,66
10^{-5}	80,60 ± 3,20*	50,94 ± 0,61*
10^{-6}	69,04 ± 2,3	60,92 ± 3,01
10^{-7}	71,61 ± 3,39	59,40 ± 2,04
10^{-8}	90,68 ± 2,51*	46,82 ± 1,32

Примечание 1 – в таблице приведены средние значения по выборкам, величина среднего квадратичного отклонения не превышала 5%, n = 6.

Примечание 2 – * – изменения статистически достоверны при $p \leq 0,05$

В присутствии АТФ в концентрации 10^{-8} М казеинолитическая активность возрастала на 38%, а в концентрационном диапазоне 10^{-5}–10^{-4} М – на 24–29%. Вместе с тем, расщепление фибриногена угнеталось при концентрациях этого эффектора 10^{-8}, 10^{-5} и 10^{-2} М на 29, 23 и 21% соответственно [6, 9].

ВЛИЯНИЕ $MnCl_2$ НА РАСЩЕПЛЕНИЕ БЕЛКОВ-СУБСТРАТОВ ПРОТЕИНАЗАМИ РАЗЛИЧНОГО ТИПА

Установлено, что на расщепление протеинов «стандартными» протеиназами в большинстве случаев Mn^{2+} оказал ингибиторное действие, не превышающее, как правило, 30%. Лишь расщепление гемоглобина пепсином подавлялось на 50%, а расщепление гемоглобина и фибриногена коллагеназой – на 46%. В ряде случаев $MnCl_2$ воздействия на протеолитическую активность не оказал, как например, на активность субтилизина. В отдельных случаях расщепление субстрата усиливалось: фибриногена трипсином и пепсином – на 20–29%.

Эффект зависел от белка-субстрата. Наиболее часто при воздействии марганца наблюдали изменения уровня расщепления протеиназами гемоглобина, а реже всего – желатина. Наиболее чувствительными к действию эффектора оказались папаин и пепсин, а наиболее индифферентна – активность субтилизина. Чаще всего отмечены изменения расщепления гемоглобина, а наиболее редко – желатина.

В присутствии анионов ортофосфата в целом ряде моментов действие катионов Mn^{2+} на активность протеиназ ослаблялось [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Установлено, что при добавлении в питательную среду катионов Mn^{2+} в диапазоне концентраций 0,01–25,00 мг/л при росте *Ch. vulgaris* в течение 40-ка суток, культура претерпевает несколько метаболических перестроек, зависящих от концентрации эффектора в среде. Они выражались в чередовании колебаний концентрации внутриклеточного белка и протеолитической активности – 10–16, 16–22, 22–40-е сутки, возрастание уровня белка в первый и третий периоды на 51–295 и 27–152% соответственно и спад во втором периоде на 24–64%; колебаний уровня фотосинтетических пигментов – 1–4, 10–16, 16–22, 22–40-е сутки, рост концентраций пигментов в первые два и четвертый периоды на 39–118, 15–83, 86–125% соответственно и снижение в третий период на 20–56% [1, 2, 3, 16, 18, 19, 21]. Периоды метаболических перестроек в клетках хлореллы, связанные с уровнями фотосинтетических пигментов, совпадают со сдвигами концентрации белка [3]. Протеолитическая активность клеток *Ch. vulgaris* и уровень белка в целом ряде случаев носят симбатный характер [2, 21].

Активное увеличение биомассы *Ch. vulgaris* происходит в период с 1-х по 16-е сутки при концентрации Mn^{2+} в среде культивирования 0,01–0,50 мг/л [1], при концентрации эффектора равной 137,5 мг/л выявлено угнетение накопления биомассы, а при концентрациях 275 и 412,5 мг/л – рост культуры угасает в 1-е сутки [8]. При отсутствии аэрирования культуры, уровень биомассы в клетках был в 1,2 раза выше, чем при его наличии [18].

При оценке общего урожая биомассы оптимальной явились: концентрация катионов Mn^{2+} в среде культивирования – 0,50 мг/л, время роста – 34-е сутки. Концентрация внутриклеточного белка на 34-е сутки – 4,84 мг/мл [1].

Продемонстрирован характер изменений протеолитической активности клеток *Ch. vulgaris* в культуре при проявлении хлороза и его замедление из-за увеличения объема клеток при концентрации катионов Mn^{2+} в питательной среде равной 137,5 мг/л [8, 17]. В условиях культивирования, ведущих к развитию хлороза, наблюдается уменьшение концентрации внутриклеточного белка в 1,1–6,9 раза. Подобное явление не обусловлено избытком катионов Mn^{2+} в питательной среде [8]. Проявление хлороза совпадает с уменьшением количества клеток в культуре *Ch. vulg*aris [17].

2. Впервые продемонстрированы особенности организации системы протеолиза клетки *Ch. vulgaris*, включая проявления протеолитической активности субклеточными фракциями гомогената клеток водоросли – ядерной, пластидной, митохондриальной и супернатанта; показан характер изменений протеолитической активности гомогенататов клеток при добавлении *in vitro*

анионов ортофосфата, АТФ и катионов Mn^{2+}, а также при росте культуры в присутствии $MnCl_2$ [2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21].

Система протеолиза в клетках *Ch. vulgaris* и каждой из внутриклеточных структур клетки представлена набором ферментов, различающихся по типу активного центра и субстратной специфичности, способных катализировать расщепление белков при pH 7,4 и 9,0: сериновых, цистеиновых и металлопротеиназ [4, 8, 9, 20]. Активность протеиназ зависит от используемого в качестве субстрата белка и величины pH реакционной системы. Влияние катионов Mn^{2+} на протеолитическую активность носит сложный концентрационный характер [2, 9, 13, 15, 20, 21].

3. Впервые продемонстрировано, что в фотосинтезирующем организме микроводоросли *Ch. vulgaris* проявляется «фосфатный эффект», зависящий от типа белка-субстрата и от величины pH реакционной системы [7, 9, 11]. Присутствие ортофосфата существенно изменяет характер действия катионов Mn^{2+} [7, 11]. Установлено также, что действие ионов ортофосфата имеет и зоны подавления протеолитической активности [9]. Проявление «фосфатного эффекта» при расщеплении белков протеиназами гомогенатов *Ch. vulgaris* происходило не только при pH 7,4, но и при pH 9,0; выраженность указанного феномена неодинакова и по величине сдвига, и по манифестации [15].

При pH 7,4 совместное действие катионов Mn^{2+} и ортофосфата вело к возрастанию протеолитической активности на 11–60%, а при pH 9,0 – в ряде случаев к подавлению на 16–38% [12].

АТФ в широком диапазоне концентраций (10^{-8}–10^{-2} М) умеренно стимулировал казеинолитическую активность внутриклеточных протеиназ хлореллы, но угнетал расщепление фибриногена [6, 9].

4. Впервые установлено, что катионы Mn^{2+} способны оказывать прямое действие на расщепление белков протеиназами различных типов: сериновыми, цистеиновой, аспартильной и металлопротеиназой; доказано, что характер эффекта зависит не только от концентрации катионов металла и типа протеиназы, но и от белка-субстрата, а также присутствия анионов ортофосфата.

Добавление катионов Mn^{2+} в реакционную систему ведет к подавлению протеолитической активности на 20–50%. Наиболее чувствительна к действию катионов Mn^{2+} протеолитическая активность папаина и пепсина, а наиболее индифферентна – активность субтилизина. Чаще всего отмечены изменения расщепления гемоглобина, а наиболее редко – желатина. Катионы Mn^{2+} способны оказывать прямое воздействие на протеолитические процессы [5].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Для максимального накопление биомассы и белка в клетках *Ch. vulgaris* рекомендуется вести ее культивирование в течение 16-и суток.

Введение в питательную среду катионов Mn^{2+} в концентрации 0,01–0,05 мг/л позволяет увеличить урожай биомассы *Ch. vulgaris* на 12,5–46,0% и уровень белка в ее биомассе на 32,0–105,0% в сравнении со стандартной средой Тамийя.

В перспективе при культивировании хлореллы в промышленных объемах использование модифицированной по концентрации $MnCl_2$ питательной среды позволит оптимизировать материальные затраты.

На основе полученных результатов изданы методические рекомендации по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*), Пинск, Полес ГУ, 2020, 29 с., внедренные в научно-исследовательскую и учебную работу ряда научно-исследовательских организаций и вузов Республики Беларусь.

Результаты исследований используются в научно-исследовательских отраслевых лабораториях: «Инновационные технологии в агропромышленном комплексе» биотехнологического факультета Полесского государственного университета, в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, в лаборатории учреждения образования «Гродненский государственный аграрный университет» и в учебном процессе в вузах: Полесский государственный университет, биотехнологический факультет, кафедра биохимии и биоинформатики; Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка, биологический факультет, кафедра общей биологии и ботаники; Витебский государственный университет им. П. М. Машерова, факультет химико-биологических и географических наук, кафедра зоологии и ботаники и кафедра экологии и географии; Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина, биологический факультет, кафедра ботаники и экологии, что подтверждено актами внедрения (Приложение Б).

Полученные новые данные о воздействии катионов Mn^{2+} на физиолого-биохимические особенности *Ch. vulgaris* открывают перспективы дальнейшего изучения данных процессов и закономерностей у хлорококковых микроводорослей в присутствии различных ионов металлов, в том числе на процессы протеолиза и на активность протеиназ различного типа.

В перспективе полученные результаты могут быть применены при производстве кормовой хлореллы, биологически активных веществ и хлорофиллсодержащих препаратов на базе различных предприятий Республики Беларусь.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Список публикаций, отвечающих требованиям пункта 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь

1. Ильючик, И. А. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Весн. Палес. дярж. ун-та. Сер. прыродазн. навук. – 2018. – № 1. – С. 53–64.

2. Ильючик, И. А. Изменения протеолитической активности гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* и функционально-метаболические перестройки культуры при росте в присутствии $MnCl_2$ / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Весн. Палес. дярж. ун-та. Сер. прыродазн. навук. – 2018. – № 2. – С. 25–33.

3. Ильючик, И. А. Динамика фотосинтетических пигментов в культуре водоросли *Chlorella vulgaris* штамма С 111 IBCE C-19 при росте на питательной среде с добавлением хлорида марганца / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 299–309.

4. Ильючик, И. А. О протеолитической активности субклеточных фракций клеток *Chlorella vulgaris* штамма С 111 IBCE C-19 / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Доклады Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 6. – С. 694–701.

5. Никандров, В. Н. Влияние ионов Mn (II) на расщепление протеинов-субстратов протеиназами / В. Н. Никандров, И. А. Ильючик // Новости медико-биол. наук. – 2020. – Т. 20, № 4. – С. 62–70.

Статьи в научных рецензируемых журналах

6. Ильючик, И. А. Влияние АТФ *in vitro* на расщепление белков субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* / И. А. Ильючик // Весн. Палес. дярж. ун-та. Сер. прыродазн. навук. – 2017. – № 2. – С. 80–85.

7. 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 ветеринарная медицина. – 2017. – № 4. – С. 67–71.

8. Ильючик, И. А. Влияние $MnCl_2$ на физиолого-биохимические показатели клеток *Chlorella vulgaris* в состоянии хлороза / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Актуальная биотехнология. – 2018. – № 3 (26). – С. 389–394.

9. Никандров, В. Н. Физико-химические особенности реализации протеолитических процессов клетки *Chlorella vulgaris* / В. Н. Никандров,

И. А. Ильючик // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 654–664.

Материалы конференций

10. 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 : сб. материалов I Междунар. науч.-практ. конф., Пинск, 25–26 сент. 2014 г. / Полесс. гос. ун-т ; редкол.: К. К. Шебеко [и др.]. – Пинск, 2014. – С. 16–17.

11. 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. науч. интернет-конф., Ставрополь, 23–25 нояб. 2016 г. / Ставроп. гос. мед. ун-т ; отв. ред.: В. И. Кошель. – Ставрополь, 2016. – С. 123–126.

12. 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 ; под общ. ред. Н. С. Ступень. – Брест, 2017. – С. 61–66.

13. Ильючик, И. А. Особенности расщепления белков-субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* при различном pH / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // 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 ; под общ. ред. Н. Ю. Колбас. – Брест, 2018. – С. 51–55.

14. Ильючик, И. А. Протеолитическая активность супернатантов гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* при добавлении хлорида марганца (II) в питательную среду / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Биотехнология: взгляд в будущее : материалы IV Междунар. науч.-практ. конф. / Ставроп. гос. мед. ун-т ; отв. ред.: В. И. Кошель. – Ставрополь, 2018. – С. 143–148.

15. Никандров, В. Н. Влияние неорганического ортофосфата на вызванные $MnCl_2$ изменения расщепления белков-субстратов супернатантами гомогенатов клеток хлореллы при различном значении pH *in vitro* / В. Н. Никандров, И. А. Ильючик // Состояние и перспективы разработки, использования биологически активных соединений в научной и практической деятельности : сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф., Брест, 4–5 окт. 2018 г. / Брест. гос. ун-т им. А. С. Пушкина ; под ред. С. М. Ленивко. – Брест, 2018. – С. 194–198.

16. Ильючик, И. А. Особенности накопление белка *Chlorella vulgaris* в присутствии ионов марганца (II) / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Проблемы и

перспективы развития животноводства : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию биотехнологического факультета, Витебск, 31 окт. – 2 нояб. 2018 г. ; редкол.: Н. И. Гавриченко (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2018. – С. 81–83.

17. Ильючик, И. А. Содержание сухого вещества в клетках *Chlorella vulgaris* в состоянии хлороза и добавлении $MnCl_2$ в питательную среду / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Биотехнология: достижения и перспективы развития : сб. материалов III Междунар. науч.-практ. конф., Пинск, 22–23 нояб. 2018 г. / Полесс. гос. ун-т ; редкол.: К. К. Шебеко [и др.]. – Пинск, 2018. – С. 53–56.

18. Ильючик, И. А. Влияние аэрации на накопление биомассы *Chlorella* при высоких концентрациях хлорида марганца в среде / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Физико-химическая биология : материалы VI Междунар. науч. интернет-конф., Ставрополь, 27–29 нояб. 2018 г. / Ставроп. гос. мед. ун-т ; отв. ред. В. И. Кошель. – Ставрополь, 2018. – С. 137–141.

19. Ильючик, И. А. Влияние хлорида марганца на физиолого-биохимическое состояние клеток *Chlorella vulgaris* штамма С 111 IBCE C-19 / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Биотехнология: достижения и перспективы развития : сб. материалов V Междунар. науч.-практ. конф., Пинск, 25–26 нояб. 2021 г. / Полесс. гос. ун-т ; редкол.: В. И. Дунай [и др.]. – Пинск, 2021. – С. 74–79.

Тезисы конференций

20. Ильючик, И. А. Особенности организации системы протеолиза в клетках *Chlorella vulgaris* / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. науч. конф. ; Тринадцатый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков : тез. докл., Беларусь, Минск, 27–29 июня 2018 г. / редкол.: И. Д. Волотовский (отв. ред.) [и др.]. – Минск : БГУ, 2018. – С. 112.

21. Ильючик, И. А. О роли протеолиза в функционально-метаболических перестройках клеток *Chlorella vulgaris* при действии $MnCl_2$ / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Регуляция роста, развития и продуктивности растений : материалы IX Междунар. научн. конф., Минск, 24–26 окт. 2018 г. / Ин-т экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси ; редкол.: А. Ф. Судник [и др.]. – Минск, 2018. – С. 50.

Методические рекомендации

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

РЭЗЮМЭ

Ільючык Ірына Анатольеўна

УПЛЫЎ КАТЫЁНАЎ МАРГАНЦУ (II) НА ФІЗІЁЛАГА-БІЯХІМІЧНЫ СТАН КЛЕТАК *CHLORELLA VULGARIS* BEIJRINCK

Ключавыя словы: хларэла, хларыд марганцу, расшчапленне бялкоў, біямаса, бялок, фотасінтэтычныя пігменты.

Мэта працы: раскрыць асаблівасці рэгулятарнага ўздзеяння катыёнаў Mn^{2+} на фізіёлага-біяхімічны стан клетак мікраводарасці *Ch. vulgaris.*

Метады даследавання і апаратура: спектрафотаметрыя, святлавая мікраскапія, пратэоліз *in vitro* ў тонкім пласце агаровага гелю.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Устаноўлена, што культура *Ch. vulgaris* перажывае за 40 дзён росту некалькі метабалічных перабудоў, якія носяць вагальны характар і залежаць ад канцэнтрацыі Mn^{2+} у асяроддзі. Упершыню прадэманстраваны асаблівасці арганізацыі сістэмы пратэолізу клеткі *Ch. vulgaris*, уключаючы праявы пратэялітычнай актыўнасці субклеткавымі фракцыямі гамагенатаў клетак; паказаны характар змяненняў пратэялітычнай актыўнасці гамагенатаў клетак пры даданні *in vitro* аніёнаў неарганічнага артафасфату, АТФ і катыёнаў Mn^{2+}, а таксама пры росце культуры ў прысутнасці $MnCl_2$. Упершыню ўстаноўлена, што ў арганізме *Ch. vulgaris* праяўляецца "фасфатны эфект" які залежыць ад тыпу бялку-субстрату і ад велічыні pH рэакцыйнай сістэмы; яго уздзеянне мае і зоны падаўлення пратэялітычнай актыўнасці. Прысутнасць іонаў артафасфату істотна змяняе характар уздзеяння катыёнаў Mn^{2+}. Прадэманстраваны характар змяненняў пратэалітычнай актыўнасці клетак *Ch. vulgaris* у культуры пры наступе стану хларозу і эфект катыёнаў Mn^{2+} пры гэтым. Упершыню ўстаноўлена, што катыёны Mn^{2+} здольныя аказваць прамое ўздзеянне на расшчапленне бялкоў ферментамі розных тыпаў; даказана, што характар эфекту залежыць не толькі ад канцэнтрацыі катыёнаў металу і тыпу пратэіназы, але і ад бялку-субстрату, а таксама прысутнасці аніёнаў неарганічнага артафасфату.

Рэкамендацыі па выкарыстанні. Атрыманыя новыя дадзеныя могуць быць выкарыстаны пры вывучэнні пытанняў фізіялогіі і біяхіміі фотасінтэзіруючых мікраарганізмаў.

Ступень выкарыстання. Выдадзены метадычныя рэкамендацыі па вывучэнні біяхімічных уласцівасцяў аднаклетачных зялёных водарасцяў (на прыкладзе *Chlorella vulgaris*), укаранёныя ў навукова-даследчую і вучэбную працу шэрагу навукова-даследчых арганізацый і ВНУ Рэспублікі Беларусь.

Галіна выкарыстання: фізіялогія раслін, біяхімія, аквакультура, альгалогія.

РЕЗЮМЕ

Ильючик Ирина Анатольевна

ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ МАРГАНЦА (II) НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS* BEIJRINCK

Ключевые слова: хлорелла, хлорид марганца, расщепление белков, биомасса, белок, фотосинтенические пигменты.

Цель работы: раскрыть особенности регуляторного действия катионов Mn^{2+} на физиолого-биохимическое состояние клеток микроводоросли *Ch. vulgaris*.

Методы исследования и аппаратура: спектрофотометрия, световая микроскопия, протеолиз *in vitro* в тонком слое агарового геля.

Полученные результаты и их новизна. Установлено, что культура *Ch. vulgaris* претерпевает за 40 дней культивирования несколько метаболических перестроек, носящих колебательный характер, зависящих от концентрации Mn^{2+} в среде. Впервые продемонстрированы особенности организации системы протеолиза клетки *Ch. vulgaris,* включая проявления протеолитической активности субклеточными фракциями гомогената клеток; показан характер изменений протеолитической активности гомогенататов клеток при добавлении *in vitro* анионов ортофосфата, АТФ и катионов Mn^{2+}, а также при росте культуры в присутствии $MnCl_2$. Впервые установлено, что в организме *Ch. vulgaris* проявляется «фосфатный эффект» зависящий от типа белка-субстрата и от величины pH реакционной системы; его действие имеет и зоны подавления протеолитической активности. Присутствие ионов ортофосфата существенно изменяет характер действия катионов Mn^{2+}. Продемонстрирован характер изменений протеолитической активности клеток *Ch. vulgaris* в культуре при наступлении состояния хлороза и эффект катионов Mn^{2+} при этом. Впервые установлено, что катионы Mn^{2+} способны оказывать прямое действие на расщепление белков протеиназами различных типов; доказано, что характер эффекта зависит не только от концентрации катионов металла и типа протеиназы, но и от белка-субстрата, а также присутствия анионов ортофосфата.

Рекомендации по использованию. Полученные новые данные могут быть использованы при изучении вопросов физиологии и биохимии фотосинтезирующих микроорганизмов.

Степень использования. Изданы методические рекомендации по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*), внедренные в научно-исследовательскую и учебную работу ряда научно-исследовательских организаций и вузов Республики Беларусь.

Область применения: физиология растений, биохимия, аквакультура, альгология.

SUMMARY

Ilyuchyk Irina Anatolievna

INFLUENCE OF MANGANESE (II) CATION ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STATE OF *CHLORELLA VULGARIS* BEIJRINCK

Keywords: *Chlorella*, manganese chloride, proteolysis, biomass, protein accumulation, photosynthenic pigments.

Objective: to describe the regulatory action of Mn^{2+} cations on the physiological and biochemical state of the cells of the microalga *Ch. vulgaris* in culture.

Research methods and equipment: light microscopy, spectrophotometry, *in vitro* proteolysis of standard proteins in agar plates.

The results obtained and their novelty. It was found that the *Ch. vulgaris* undergoes over of cultivation 40 days several oscillatory metabolic rearrangements, depending on the Mn^{2+} concentration in the medium. The manifestations of proteolytic activity by subcellular fractions of *Ch. vulgaris* cell homogenates were stated and measured, along with the changes in such activities upon the addition of inorganic orthophosphate anions, ATP and Mn^{2+} cations *in vitro*, as well as during culture growth in the presence of $MnCl_2$. It was established for the first time that in the body of *Ch. vulgaris* a "phosphate effect" appears, depending on the type of substrate protein and on the pH of the reaction system; this effect has also zones of suppression of proteolytic activity. The presence of orthophosphate ions significantly changes the nature of the action of Mn^{2+}. The character of changes in the proteolytic activity of *Ch. vulgaris* in culture was demonstrated upon the onset of chlorosis and the effect of Mn^{2+} cations at the same time. It was established also for the first time that Mn^{2+} cations are capable of exerting a direct effect on the cleavage of proteins by various types of proteinases. It was proved that the nature of the effect depends not only on the concentration of metal cations and the type of proteinase, but also on the substrate protein, as well as the presence of inorganic orthophosphate anions.

Recommendations for use. The new data obtained can be used to study the physiology and biochemistry of photosynthetic microorganisms.

Degree of application. Methodological recommendations for the study of the biochemical properties of unicellular green algae (on example of *Chlorella vulgaris*) have been published and introduced into the research and educational work of some research organizations and universities of the Republic of Belarus.

The fields of application: plant physiology, biochemistry, aquaculture, algology.