

**ЖЕЛАТИНОЛИТИЧЕСКАЯ И КАЗЕИНОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТИ
ГОМОГЕНАТОВ КЛЕТОК СПИРУЛИНЫ**

Е.Н. Манько, В.А. Новикова, 2 курс
Научный руководитель – **И.А. Ильючик**, к.б.н., доцент
Полесский государственный университет

В наше время огромную известность набирают производство и продажа микроводорослей, наиболее популярными являются спирулина и хлорелла. Актуальность исследований, связанных с культивированием и использованием микроводорослей, а также продуктов их переработки обусловлено их богатым на полезные вещества составом, которые могут решить проблемы дефицита этих веществ в рационе не только человека, но и в кормовых рационах животноводства и птицеводства [1, с. 2].

Спирулина (*Spirulina platensis*) представляет собой нитевидную сине-зеленую водоросль (цианобактерию). Её клетки образуют трихомы длиной в несколько сотен микрометров, которые закручены в спирали. *S. platensis* богата большим количеством различных питательных веществ, витаминами группы В, С и минералами. Всего лишь в 100 г данного продукта может содержаться более 24 г углеводов, 8 г жиров и 57,5 г белков, плюс множество аминокислот, в число которых входят и незаменимые [2, с. 3–4].

Спирулина содержит пигменты, которые могут быть полезны и биодоступны, в том числе β-каротин, зеаксантин, хлорофилл *a*, ксантофилл, эхиненон, миксоксантофилл, кантаксантин, диатоксантин, 3'-гидроксиэхиненон, бетакриптоксантин и осциллаксантин, а также фикобилипротеины (ФБП) – С-фикоцианин, аллофикоцианин и фикоэритрин [3, с. 2].

Для дальнейшего развития биотехнологических процессов, связанных с использованием спирулины, прежде всего, необходимо углубленное изучение процессов, происходящих в её клетках. Одним из таких процессов является система протеолиза. В литературе описаны исследования изучения протеолитической активности микроводорослей *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus ecornis* [4, 5], но практически нет материалов, описывающих протеолиз клеток спирулины. Это говорит об необходимости начать исследования в данном направлении, а также раскрытия роли отдельных протеолитических реакций в жизнедеятельности клеток этой водоросли.

Цель работы – выявить протеолитическую активность гомогенатов клеток водоросли *Spirulina platensis* при различном значении рН среды.

Материалы и методы. Объектом исследования служила культура сине-зелёной водоросли *S. platensis* штамм IBCE S-2 из коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Водоросль выращивали в стеклянных ёмкостях объёмом 100 мл на питательной среде Заррука при освещении светом люминесцентной лампы в течение 8-ми суток [6]. Продуктивность спирулины определяли по накоплению сухой биомассы на 8-е сутки роста.

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

Количество белка в гомогенатах клеток определяли по методу Бредфорд. Протеолитическую активность гомогенатов клеток спирулины определяли по лизису казеина и желатина в тонком слое агарового геля [7, с. 16–18].

В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали буферные растворы: а) 0,15 М раствор хлорида натрия (NaCl) pH 7,4; б) 0,06 М К-На фосфатный pH 7,4 [8]; в-г) 0,05 М трис-НСl pH 7,4 и 9,0 [9]; д) 0,2 М ацетатный pH 3,0; е) 0,2 М буферный раствор NaCl и KCl pH 12,0 [10, с. 8, 10].

Концентрация белков-субстратов в пластине составляла – 10 г/л, бактоагара – 10 г/л. Объем наносимых образцов на готовые белок-агаровые пластины гомогенатов клеток спирулины – 10 мкл.

Эксперимент проводили трехкратно. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью программного продукта *Microsoft Excel*.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований свидетельствуют о способности гомогенатов клеток *S. platensis* интенсивно расщеплять белки-субстраты при pH 7,4, 9,0 и 12,0. В кислой среде при pH 3,0 протеолитическая активность отсутствовала или была слабо выявлена (таблица).

Таблица – Протеолитическая активность гомогенатов клеток *Spirulina platensis*

Растворитель	Площадь расщепления, мм ²	
	Желатин	Казеин
0,2 М ацетатный буфер pH 3,0	не выявлено	частичное расщепление
0,15 М раствор NaCl pH 7,4	197,3 ± 15,2	177,1 ± 13,6
0,05 М трис-НСl pH 7,4	165,1 ± 6,6	154,4 ± 12,7
0,06 М К-На фосфатный буфер pH 7,4	249,6 ± 9,4	116,0 ± 3,3
0,05 М трис-НСl pH 9,0	218,0 ± 4,4	129,3 ± 3,4
0,2 М раствор NaCl и KCl pH 12,0	342,2 ± 19,9	157,8 ± 9,9

В обоих вариантах наиболее интенсивно расщеплялся желатин, чем казеин. При pH 7,4 желатинолитическая активность была самой высокой при использовании фосфатного буфера. Наблюдался рост активности протеиназ на 26,5% и 51,2% в сравнении с раствором NaCl и трис-НСl буфером. Данное различие можно объяснить влиянием неорганического фосфата на протеолитическую активность нейтральных протеиназ цианобактерии.

При использовании растворов NaCl и трис-НСl буфера различия в активности расщепления желатина составило 19,5%.

Казеинолитическая активность при pH 7,4 была другой, чем желатинолитическая. Ряд активности протеиназ можно представить так: раствор NaCl > трис-НСl > фосфатного буфер: уменьшение на 12,9% и 43,6% соответственно.

При pH 9,0 желатинолитическая активность была выше казеинолитической в 1,7 раза, а при pH 12,0 – в 2,2 раза. Активность протеиназ спирулины при pH 12,0 была самой высокой в сравнении с протеиназами активными при pH 7,4 и 9,0 в обоих случаях эксперимента.

Вывод. Гомогенатов клеток *S. platensis* содержат протеиназы, которые интенсивно расщепляют желатин и казеин. Их желатинолитическая и казеинолитическая активность заметно изменяется при сдвиге pH от 7,4 до 12,0. Наиболее активно протеолиз белков протекал при pH 12,0, а при pH 3,0 – практически не наблюдался. Во всех случаях наиболее интенсивно расщеплялся желатин. При расщеплении желатина проявился «фосфатный эффект», который наблюдался ранее при исследовании протеиназ хлореллы [4].

Список использованных источников

1. Микроводоросль спирулина: культивирование и особенности ее биохимического состава [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://alley->

science.ru/domains_data/files/4November2020/МИКРОВОДОРОСЛЬ%20SPIRULINA%20КУЛЬТИВИРОВАНИЕ%201%20ОСОБЕННОСТИ%20ЭКОЛОГИИ%20БИОХИМИЧЕСКОГО%20СОСТАВА.pdf. – Дата доступа: 05.04.2023.

2. Спирулина суперфуд [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://alley-science.ru/domains_data/files/3June2021/SPIRULINA-SUPERFUD.pdf. – Дата доступа: 05.04.2023.

3. Исследование пигментов сине-зеленой водоросли спирулины платенсис для практического использования в технологиях кондитерских изделий [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.vestnik-vsuet.ru/vguit/article/viewFile/2235/3042>. – Дата доступа: 06.04.2023.

4. 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.

5. Ильючик, И.А. Влияние ионов марганца (II) на рост и казеинолитическую активность микроводоросли *Scenedesmus ecornis* / И.А. Ильючик, О.Н. Жук, В.Н. Никандров // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : междунар. науч. конф.; XII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 28-30 июня 2016 г. : сборник статей : в 2 ч. / Мин-во образования Республики Беларусь, Белорусский гос.ун-т, Нац. Акад. наук Беларуси [и др.]; редкол. И.Д. Волотовский [др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2016. – Ч. 2. – С. 161–164.

6. Среда Заррука [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://cellreg.org/Catalog_2020/Catalog%20NEW/media/zarruka.html – Дата доступа: 08.04.2023.

7. 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.

8. Рабинович, В.А. Краткий химический справочник / В.А. Рабинович, З.Я. Хавин ; под общ. ред. А.А. Потехина, А.И. Ефимова. – 3-изд., перераб. и доп. – Л. : Химия, 1991. – 432 с.

9. Кочетов, Г.А. Практическое руководство по энзимологии [Для биол. спец. ун-тов] / Г.А. Кочетов ; под общ. ред. С.Е. Северина. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. Школа, 1980. – 272 с.

10. ГОСТ 4919.2-77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов. – М.: Стандартинформ, 2005. 11с.