

ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ У ВОДОРΟΣЛИ *PINNULARIA DIATOMOPHYTA*

А.И. Ничипорук, 2 курс

Научный руководитель – **И.А. Ильючик**, к.б.н., доцент

Полесский государственный университет

Диатомовые водоросли (*Bacillariophyta*), включая представителей рода *Pinnularia*, являются ключевыми участниками водных экосистем, обеспечивая первичную продукцию и участвуют в биогеохимических циклах углерода, кремния и азота [1, с. 96]. *Pinnularia bacillariophyta* часто встречается в сообществах водорослей с кислой средой обитания [2, с. 29].

Их метаболическая активность не только поддерживает экологическое равновесие, но и играет важную роль в деградации органического вещества, что делает изучение их ферментативного потенциала особенно актуальным [3, с. 13].

Протеазы могут быть важны для адаптации диатомей к изменяющимся условиям среды, а также для их участия в круговороте белков.

Несмотря на значительный прогресс в изучении диатомовых водорослей, исследования протеолитической активности *P. diatomophyta*, остается мало изученной, что создает проблемы в понимании их особенностей в контексте влияния pH на активность ферментов. Большинство существующих работ направлены на обитание в нейтральных и щелочных условиях, тогда как влияние кислых сред на протеолиз у диатомовых водорослей требует дополнительного изучения. Де Нико-лане пересмотрел весь состав кислых диатомовых водорослей, обитающих в средах обитания с $\text{pH} < 2,5$. Среди них хорошо задокументировано появление *pinnularia* в экстремальных условиях. В Италии исследование водорослей, связанных с серными источниками и серными рудниками при $\text{pH} < 3$, показало, что пиннулярии распространены в нескольких районах, что может быть связано либо с простой устойчивостью к широкому диапазону pH, либо с активацией определенных метаболических путей, либо с селекцией [2, с. 31].

Целью данной работы является выявление протеолитической активности гомогенатов клеток *P. diatomophyta* в отношении желатина и казеина при различных значениях pH.

Исследования проведены на культуре диатомовой водоросли *P. diatomophyta*. Водоросль выращивали на среде Тамия при непрерывном барботаже суспензии культуры воздухом, температуре окружающей среды $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, при световом режиме 16 ч/8 ч день-ночь [4, с. 138].

На 14-е сутки культивирования производили забор биомассы культуры, используя центрифугирование в течение 10 минут при 8000 об/мин, дважды отмывая клетки дистиллированной водой. Вес биомассы $0,03 \pm 0,01$ г.

Биомассу гомогенизировали 4 минуты с добавлением 1 мл дистиллированной воды на льду. Протеолитическую активность полученных гомогенатов клеток определяли по лизису казеина и желатина в тонком слое агарового геля [5, с. 136]. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовала буферные растворы: раствор 0,15 М NaCl, pH 7,5; 0,15 М трис-HCl, pH 7,5 или 9,0; 0,2 М ацетатный, pH 5,5 или 3,0 [6].

Объем наносимых образцов на готовые белок-агаровые пластины гомогенатов клеток – 10 мкл. Инкубировали пластины при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 ч на строго горизонтальной поверхности.

Количество белка в гомогенатах клеток определяли по методу Бредфорд [7, с. 20]. Его концентрация составляла $0,42 \pm 0,01$ мкг/мл.

Полученные результаты подвергали статистической обработке при помощи компьютерной программы Excel.

Полученные результаты демонстрируют, что наибольшая желатинолитическая и казеинолитическая активность наблюдалась в нейтральной и слабощелочной средах, тогда как в кислых (pH 3,0) расщепление белков-субстратов угнеталось (таблица).

Таблица – Площади зон расщепления белков-субстратов гомогенатами клеток *Pinnularia diatomophyta* при различном значении pH, $n = 4$

Растворитель	Площадь зон лизиса, мм ²	
	желатин	казеин
буферный раствор 0,15 М трис-HCl, pH=9,0	$98,0 \pm 24,8$	$102,5 \pm 33,2$
раствор 0,15 М NaCl, pH=7,5	$163,5 \pm 6,0$	$87,3 \pm 6,85$
буферный раствор 0,15 М трис-HCl, pH=7,5	$158,0 \pm 41,3$	$50,5 \pm 16,1$
буферный раствор 0,2 М ацетатный, pH=5,5	$149,8 \pm 38,5$	$65,3 \pm 21,0$
буферный раствор 0,2 М ацетатный, pH=3,0	$85,5 \pm 3,3$	$58,7 \pm 18,8$

Максимальная площадь зон расщепления желатина зафиксирована в растворе NaCl, pH 7,5, что указывает на высокую эффективность протеаз в нейтральной среде. При использовании трис-HCl, pH 7,5 или ацетатного буфера, pH 5,5 их активность снизилась по сравнению с раствором NaCl незначительно. В щелочной среде желатинолитическая активность снизилась в 1,7 раза, а в кислой – в 1,9 раза по сравнению с раствором хлорида натрия (таблица, рисунок).

Пик казеинолитической активности отмечен при pH 9,0, что на 17,4% выше, чем в нейтральном растворе NaCl. В трис-HCl, pH 7,5, в ацетатном при pH 5,5 или 3,0 буферах наблюдалось снижение

активности протеаз на 42,2%, 25,2% или 32,8% соответственно по отношению к раствору хлорида натрия. В нейтральной среде, pH 7,5, желатин расщеплялся интенсивнее казеина: разница в активности составила 87,5% при NaCl и 21,3% при трис-HCl. Однако при pH 9,0 казеинолитическая активность превысила желатинолитическую незначительно (менее 10%) (таблица, рисунок).

Существенные различия выявлены при pH 5,5 и pH 3,0: желатинолитическая активность превышала казеинолитическую в 2,3 и 1,5 раза соответственно, что, указывает на инактивацию ферментативной активности в кислых и слабокислых средах (таблица).

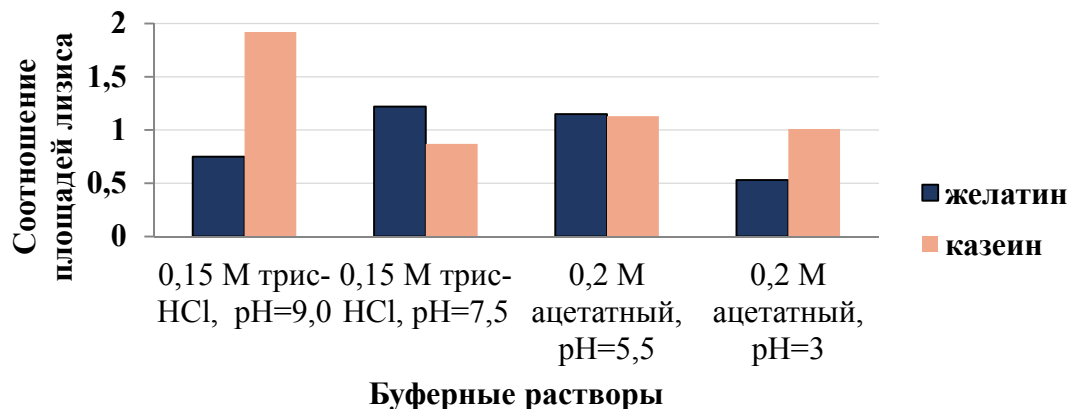


Рисунок – Сравнение активности протеиназ *P. diatomophyta* при различных pH по отношению к раствору NaCl, pH 7,5

Полученные данные подтверждают, что протеолитическая активность *Pinnularia* зависит как от кислотности среды, демонстрируя широкий pH-диапазон активности, так и от природы белка-субстрата.

Выявлено, что гомогенаты клеток *P. diatomophyta* проявляют выраженную субстрат-специфичную активность протеаз. Желатинолитическая активность высокая в нейтральных средах, а казеинолитическая – в щелочной. Резкое снижение активности при pH 3,0 подчеркивает чувствительность ферментов водоросли к кислотности. Обнаруженная активация нейтральных и щелочных протеаз при лизисе желатина и казеина подчеркивает наличие специфических ферментных систем у *P. diatomophyta*.

Список использованных источников

1. The diatom molecular toolkit to handle nitrogen uptake / A. Rogato, A. Amato, D. Iudicone [et al.] // Marine Genomics. – 2015. – Vol. 24, Pt 1. – P. 95–108.
2. *Pinnularia obscura* Krasske (Bacillariophyceae, Bacillariophyta) from acidic environments: characterization and comparison with other acid-tolerant *Pinnularia* species / C. Ciniglia, P. Cennamo, M. De Stefano [et al.] [Электронный ресурс] // Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie. – 2007. – September. – URL: https://www.researchgate.net/profile/Antonino-Pollio/publication/233634495_Pinnularia_obscura_Krasske_Bacillariophyceae_Bacillariophyta_from_acidic_environments_Characterization_and_comparison_with_other_acid-tolerant_Pinnularia_species/links/0c960525967a9d7b4d000000/Pinnularia-obscura-Krasske-Bacillariophyceae-Bacillariophyta-from-acidic-environments-Characterization-and-comparison-with-other-acid-tolerant-Pinnularia-species.pdf?__cf_chl=tk=U7_fHJToXNi208GKIZfz20iyVoNJeGwvEWauVwtq2to-1744363144-1.0.1.1-yhXcKPZ6m2v2B2ZetZifuM8tXZY7kjFZjg5nRAG6a0o (дата обращения: 11.04.2025).
3. Ода, К. Новые семейства карбоксильных пептидаз: серин-карбоксильные пептидазы и глутаминовые пептидазы / К. Ода // Журнал биохимии. – 2012. – Т. 151, № 1. – С. 13–25.
4. Гайсина, Л. А., Фазлутдинова, А. И., Кабиров, Р. Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: учебное пособие / Л.А. Гайсина, А.И. Фазлутдинова, Р.Б. Кабиров. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. – 152 с.
5. Никандров, В. Н. Методы исследования протеолиза / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований : учебное пособие / Е.В. Барковский [и др.] ; под ред. А. А. Чиркина. – Минск : Выш. школа, 2013. – Гл. 5. – С. 132–157.
6. ГОСТ 4919.2-77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов. – Москва: Стандартинформ, 2005. – 11 с.

7. Ильючик, И.А. Методические рекомендации по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorellavulgaris*) / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров ; Министерство образования Республики Беларусь, УО «Полесский государственный университет». – Пинск : ПолесГУ, 2020. – 29 с.