УДК 579.811.41:579.238.79

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: +38 067 492 76 81, e-mail: m_gorishniy @ukr.net

НАГРОМАДЖЕННЯ БІЛКА У КЛІТИНАХ *CHLOROBIUM LIMICOLA* ІМВ К-8 ЗА РІЗНИХ УМОВ МІНЕРАЛЬНОГО ТА ОРГАНІЧНОГО ЖИВЛЕННЯ

Мета *досліджень – встановити особливості нагромадження білка у клітинах C. limicola ІМВ К-8 залежно від мінерального та органічного типу живлення мікроорганізмів.* ***Методи.*** *В роботі використані загальноприйняті мікробіологічні методи досліджень, стандартний метод визначення концентрації білка за методом Лоурі, біохімічний метод визначення концентрації глюкози за допомогою аналітичного набору "Діаглюк-2", проведена статистична обробка даних.* ***Результати.*** *Встановлено, що стимулюючий ефект на процеси нагромадження білкових молекул в клітинах C. limicola ІМВ К-8 виявляє внесення L-глутаміну, L-глутамату, L-аспартату та* α*-кетоглутарату. Досліджено, що голодування по катіонах* Fe^{2+} *за умов відсутності катіонів амонію в середовищі культивування призводить до пригнічення процесів нагромадження біомаси та білка у клітинах досліджуваного штаму. Встановлено, що в анаеробних умовах зелені сіркові бактерії C. limicola ІМВ К-8 ефективно здійснюють азотфіксацію, як за умов темряви так і при освітленні.*

Ключові слова: C. limicola ІМВ К-8, L-глутамін, L-глутамат, L-аспартат, глюкоза, глікоген.

Фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії родини *Chlorobiaceae* є облігатними анаеробами які використовують діоксид карбону як основне джерело вуглецю. Представники *Chlorobiaceae*є суттєво відрізняються за здатністю метаболізувати різні джерела нітрогену. Зелені сіркові бактерії *C. limicola* ІМВ К-8 ефективно нагромаджують біомасу збагачену вуглеводами [1, 2] та іншими полімерними молекулами на дешевих мінеральних субстратах [7, 8]. Перетворення амінного нітрогену в клітинах зелених сіркобактерій *C. limicola* ІМВ К-8 та механізми його регуляції досліджені недостатньо. Раніше нами було встановлено, що за умов культивування зелені сіркобактерії можуть нагромаджувати значні кількості органічного карбону [1, 2], що може бути використано у біотехнологічних цілях.

Натомість метою цієї роботи було дослідити особливості нагромадження білка у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 за різних умов мінерального та органічного живлення.

© М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, 2013

Матеріали і методи

Дослідження були проведені з використанням культури зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій *C. limicola* IMB K-8 [2]. Бактерії культивували у рідкому середовищі GSB протягом 8—10 діб при температурі 27—29 °С. Біомасу бактерій визначали фотоелектроколориметрично [1, 2]. Вміст глюкози у неклітинних екстрактах визначали ферментативно за допомогою аналітичного набору "Діаглюк-2" [2]. Концентрацію глікогену розраховували за глюкозою після проведення кислотного гідролізу [5]. Концентрацію білка визначали методом Лоурі [5]. Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням програми "Origin 6.0". Вибір тактики статистичного опрацювання і підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [4] за рівня достовірності $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Згідно отриманих результатів [2] штам зелених сіркових бактерій *C. limicola* IMB K-8 використовує для нагромадження біомаси лише певний спектр амінокислот: L-глутамат, L-аспартат, L-пролін, L-триптофан, L-глутаміну і L-аспарагін (в концентрації 0,1%). Інші амінокислоти не стимулюють ріст штаму, або інколи навіть його пригнічують.

Проведено визначення впливу вищевказаних амінокислот на процеси нагромадження білка в клітинах досліджуваного штаму (рис. 1). Слід зазначити, що стимулюючий ефект спричиняло внесення таких амінокислот: L-глутаміну, L-глутамату та L-аспартату, проте найвищий рівень білка спостерігали у паралелі, що містила одночасно L-глутамін, L-глутамат і L-аспартат (250 мг/г.с.в., що на 25% вище ніж у контролі).

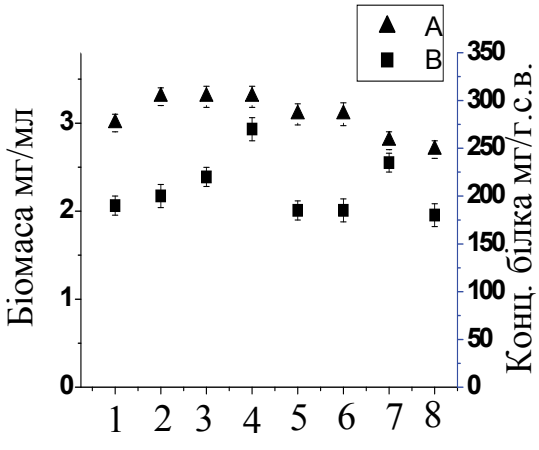

Рис. 1. Вплив органічних екзогенних субстратів на біосинтез білка у клітинах *C. limicola* IMB K-8.
А — біомаса, В — білок: 1 — (контроль — к), 2—(к + L-глутамат), 3 — (к +L-аспартат), 4 — (к + L-глютамін + L-глутамат + L-аспартат), 5 — (к + L-пролін), 6 — (к + L-триптофан), 7 — (к + L-глутамін), 8 — (к + L-аспарагін).

Fig. 1. Effect of exogenous organic substrates upon protein biosynthesis in the cells of *C. limic*ola IMB K-8.
A — biomass, B — protein 1 — (control — c), 2 — (c + L-glutamate), 3 — (c + L-aspartate), 4 — (c + L-glutamine + L-glutamate + L-aspartate), 5 — (c + L-proline), 6 — (c + L-tryptophane), 7 — (c + L-glutamine), 8 — (c + L-asparagine).

Також нами була перевірена можливість вирощування досліджуваного штаму на різних органічних джерелах карбону, які стимулювали нагромадження біомаси [2] з подальшим визначенням білка в клітинах зелених сіркових бактерій (рис. 2).

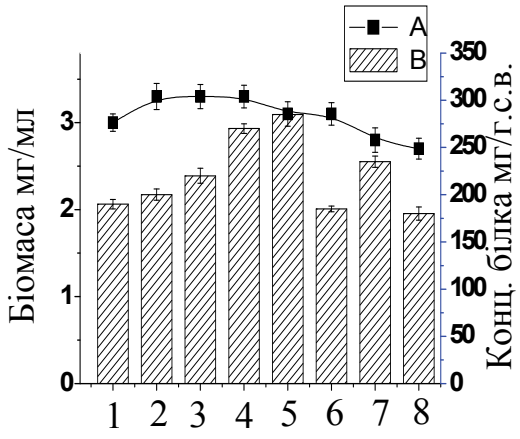

Рис. 2. Вплив органічних екзогенних субстратів на біосинтез білка у клітинах *C. limicola* IMB K-8.
А — біомаса, В — білок: 1 — (контроль — к), 2 — (к + ацетат), 3 — (к + піруват), 4 — (к + оксалоацетат), 5 — (к + α—кетоглутарат), 6 — (к + цитрат), 7 — (к + L—сукцинат), 8 — (к + фумарат).

Fig. 2. Effect of exogenous organic substrates upon protein biosynthesis in the cells of *C. limicola* IMB K-8.
A — biomass, B — protein: 1—(control — c), 2 — (c + acetate), 3 — (c + pyruvate), 4 — (c + oxaloacetate), 5 — (c + α—ketoglutarate), 6 — (c + citrate), 7 — (c + L—succinate), 8 — (c + fumarate).

В результаті проведеної роботи встановлено, що найвищий стимулюючий ефект на процеси нагромадження білка виявляв α-кетоглутарат. Слід зазначити, що за цих умов культивування спостерігалося зростання кількості білка до 270 мг/г.с.в., що на 30–35% більше порівняно з мінеральним середовищем GSB (контроль).

Для встановлення співвідношення у нагромадженні відмитими клітинами *C. limicola* IMB K-8 ендогенних вуглеводів та білка, клітини одночасно вирощували за умов зростання кількості ендогенних вуглеводів, на модифікованому середовищі GSB: ацетат 0,1% + піруват 0,1% + ізоцитрат 0,05% + α-кетоглутарат 0,05% + 50% нітрогенне + 50% фосфорне голодування + 50% мінеральне голодування + 80% CO_2 *без внесення* NO_3^- [1, 2] з подальшим визначенням концентрації ендогенних вуглеводів та білка (рис. 3).

Слід зазначити, що за оптимальних умов органічного та неорганічного живлення *C. limicola* IMB K-8, нам вдалось нагромадити біомасу у якій концентрація глікогену становила 240–250 мг/г.с.в. при одночасному зниженні концентрації білка до 80–100 мг/г.с.в. Отримані результати можуть бути корисними при біотехнологічному використанні цього штаму.

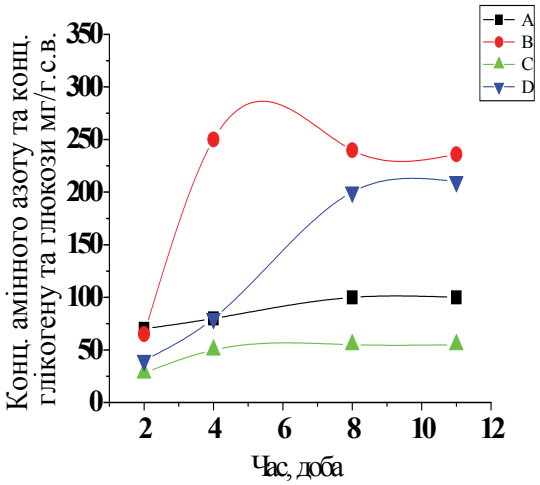

Рис. 3. Нагромадження білкових молекул, глюкози та глікогену у клітинах *C. limicola* IMB K-8.
A — дослідний зразок (концентрація білка), B — дослідний зразок (концентрація глікогену). C — нагромадженя глікогену за умов контролю (мінеральне GSB), D — концентрація білка за умов контролю (мінеральне GSB).

Fig. 3. Accumulation of protein molecules, glucose and glycogen in the cells of *C. limicola* IMB K-8.
A — prototype (protein concentration), B — prototype (the concentration of glycogen), C — acumulated glycogen in control (mineral GSB), D — protein concentration in control (mineral GSB).

Також було проведено досліджень із відмитими клітинами *C. limicola* IMB K-8 за умов внесення інгібітора глюконеогенезу монойод ацетату в інкубаційну суміш та наявності в різних паралелях проміжних метаболітів циклу Арнона (фумарату, малату, сукцинату, цитрату та α-кетоглутарату). Через 48 годин інкубації встановили кількісні зміни білка в кітинах *C. limicola* IMB K-8 (рис. 4).

Слід зазначити що внесення монойод ацетату в інкубаційну суміш *C. limicola* IMB K-8 (рис. 4 паралель номер 6) призводило до зростання концентрації білка на 50% порівняно з контролем. Інші органічні джерела карбону стимулювали нагромадження білка за цих умов у менших кількостях. Стимулюючий ефект монойод ацетату на процеси нагромадження білка можна, очевидно, пояснити інгібуванням глюконеогенезу.

Згідно з літературними даними [4, 5, 6] переважна більшість прокаріотних нітрогеназ належить до трьох основних типів, у яких коферментна частина включає таку комбінацію мінеральних елементів — ферум-молібден перший тип, ферум-ванадій другий тип і ферум-ферум третій тип [5, 6]. Для штаму *C. limicola* IMB K-8 було проведено дослідження закономірностей нагромадження біомаси та білкових молекул на мінеральному середовищі GSB, без внесення джерела нітрогену NH_4^+ та одночасної відсутності Fe^{2+}, V і Mo у різних паралелях.

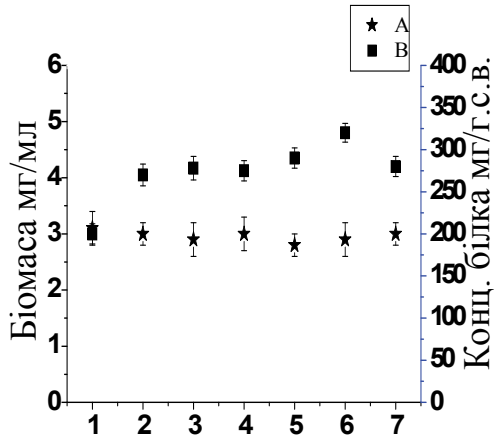

Рис. 4. Вплив монойод ацетату на процеси нагромадження білка *C. limicola* IMB K-8.

A — біомаса, B — білок: 1 — (контроль — к), 2 — (к + L-глутамін + L-глутамат + L-аспартат — 3L), 3 — (контроль + 3L + монойод ацетат), 4 — (к + 3L + монойод ацетат + оксалоацетат), 5 — (к + 3L + монойод ацетат + сукцинат), 6 — (к + 3L + монойод ацетат + α—кетоглутарат), 7 — (к + 3L + монойод ацетат + цитрат).

Fig . 4. Effect of monoiodine acetate on the processes of accumulation of protein in the cells *C. limicola* IMB K-8.

A — biomass, B — protein: 1 — (control — c), 2 — (control + L-glutamine + L-glutamate + L-aspartate — 3L), 3 — (c + 3L +monoiodine acetate), 4 — (c + 3L + oxaloacetate + monoiodine acetate), 5 — (c + 3L + monoiodine acetate + succinate), 6 — (c + 3L + monoiodine acetate + *a*—ketoglutarate), 7 — (c + 3L + monoiodine acetate citrate).

Слід зазначити, що за цих умов культивування використовували виключно воду першого класу для приготування середовища GSB (рис. 5) .

Встановлено, що за умов внесення Fe^{2+} спостерігається ріст культури та нагромадження білка, навіть за відсутності джерела нітрогену NH_4^+ в середовищі культивування. Слід зазначити, що ідентичні показники біомаси спостерігалися і за відсутності, навіть одночасної Mo і V. Натомість одночасна відсутність катіонів Fe^{2+} та NH_4^+ в середовищі культивування призводила до загибелі мікроорганізмів. Отримані результати дають можливість припустити, що, очевидно, у клітинах *C. limicola* IMB K-8 домінувальним є третій тип нітрогеназного комплексу — ферум-ферум залежна форма, інгібуючий ефект на яку спричиняє, і/або внесення NH_4^+, і/або відсутність Fe^{2+} в середовищі культивування.

Дослідженнями [3, 5] встановлено, що не усі штами зелених сіркових бактерій здатні до анаеробної азотфіксації як при освітлені так і у темряві. Для перевірки цих властивостей проведено такі дослідження. Відмиті клітини *C. limicola* IMB K-8 з логарифмічної фази були поміщені в інкубаційну суміш яка не містила джерела нітрогену, як за умов освітлення так і в темряві. Після 48 годин інкубації було проведено визначення біо-

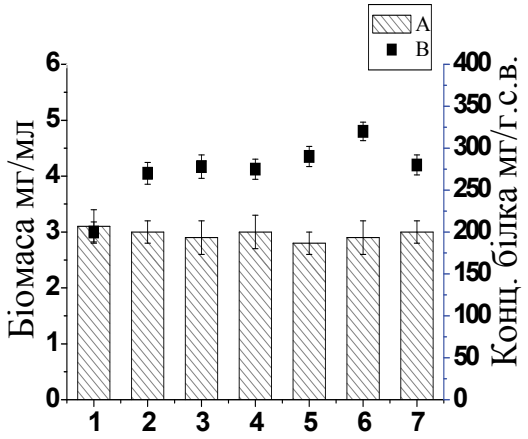

Рис. 5. Вплив різного типу мінерального живлення на утворення біомаси зеленими сірковими бактеріями та нагромадження білка.
А — біомаса, В — білок: 1 — (контроль — мінеральне GSB), 2 — (контроль — NH_4^+ — Fe^{2+}), 3 — (контроль — NH_4^+ — Mo + Fe^{2+}), 4 — (контроль — NH_4^+ — V + Fe^{2+}), 5 — (контроль — NH_4^+ — V — Mo + Fe^{2+}), 6 — (контроль — NH_4^+ + V + Mo + Fe^{2+})

Fig. 5. Effect of different types of mineral nutrition on the formation of biomass by green sulfur bacteria and accumulation of proteins.
A — biomass, B — protein: 1 — (control — mineral GSB), 2 — (control — NH_4^+ —Fe^{2+}), 3 — (control — NH_4^+ — Mo + Fe^{2+}) 4 — (control — NH_4^+ — V + Fe^{2+}), 5 — (control — NH_4^+ — V — Mo + Fe^{2+}), 6 — (control — NH_4^+ + V + Mo + Fe^{2+}).

маси та концентрації білка (рис. 6). Встановлено, що концентрація білка знаходилася практично на одному рівні, як за умов освітлення так і за умов темряви. Проте за умов темряви біомаса знизилася на 30% (рис. 6)

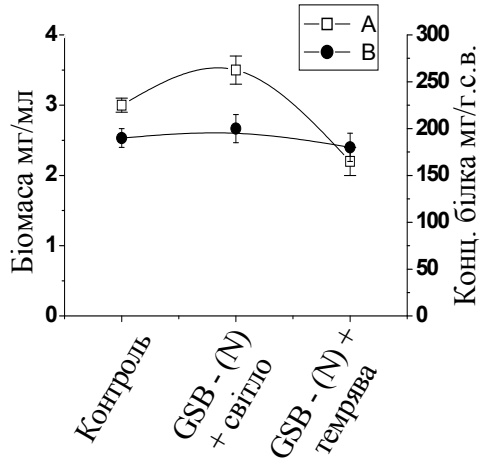

Рис. 6. Вплив освітлення та темряви на процеси нагромадження білка у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8. А — біомаса, В — білок.

Fig. 6. Effect of light and darkness on the processes of accumulation of protein in the cells *C. limicola* IMB K-8. A — biomass, B — protein.

Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено, що зелені сіркові бактерії *C. limicola* IMB K-8 ефективно здійснюють азотфіксацію в анаеробних умовах, як за умов темряви так і при освітленні. Досліджено, що, очевидно, домінувальною формою нітрогеназного комплексу у клітинах *C. limicola* IMB K-8 є ферум-ферум залежна форма. Також встановлено, що стимулюючий ефект на процеси нагромадження білка у клітинах зелених сіркобактерій виявляє одночасне внесення низькомолекулярних інтермедіатів L-глутамату, L-глутаміну, L-аспартату та *a*-кетоглутарату в інкубаційну суміш за умов наявності інгібітора глюконеогенезу моно-йод ацетату.

M.B. Gorishnyi, S.P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Grushevskoho str., Lviv, 79005, Ukraine, tel.: +38067492 76 81, e-mail: m_gorishniy@ukr.net

ACCUMULATION OF PROTEIN IN *CHLOROBIUM LIMICOLA* IMB K-8 CELLS

Summary

The purpose of research — to investigate certain features of protein accumulation in *C. limicola* IMB K-8 cells, depending on the type of mineral and organic nutrition. **Methods.** The paper used conventional microbiological methods of research, the standard method for determining the protein concentration by the method of Lowry, biochemical method for determining glucose concentration using analytical set "Diagluk-2", statistical analysis of data is performed. **Results.** Stimulating effect on the processes of accumulation of protein molecules in *C. limicola* IMB K-8 cells has L-glutamine, L-glutamate, L-aspartate and α-ketoglutarate. Fasting on Fe^{2+}ions in the absence of ammonium ions in the culture medium caused inhibition of the processes of biomass and protein accumulation in the cells of the test strain. It is shown that green sulfur bacteria *C. limicola* IMB K-8 efficiently perform nitrogen fixation under anaerobic conditions, both in the terms of darkness and light.

Key words: *C. limicola* IMB K-8, L-glutamine, L-glutamate, L-aspartate, glucose, glycogen.

М.Б. Горишный, С.П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел.: +38067492 76 81, e-mail: m_gorishniy@ukr.net

НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА В КЛЕТКАХ *CHLOROBIUM LIMICOLA* IMB K-8

Реферат

Цель исследований — изучить особенности накопления белка в клетках *C. limicola* IMB K-8 в зависимости от минерального и органи-

ческого типа питания микроорганизмов. **Методы.** В работе использованы общепринятые микробиологические методы исследований, стандартный метод определения концентрации белка по методу Лоури, биохимический метод определения концентрации глюкозы с помощью аналитического набора "Диаглюк-2», проведена статистическая обработка данных. **Результати.** Установлено, что стимулирующее влияние на процесы накопления белковых молекул в клетках *C. limicola* IMB K-8 оказывает L-глутамин, L-глутамат, L-аспартат и *a*-кетоглутарат. Исследования голодания по катионам Fe^{2+} в отсутствие катионов аммония в культуральной среде вызывает ингибирование процесов накопления биомасы и белка в клетках исследуемого штамма. Установлено, что зеленые серные бактерии *C. limicola* IMB K-8 эффективно выполняют фиксацию азота в анаэробных условиях, как при освещении так и в темноте.

Ключевые слова: *C. limicola* IMB K-8, L-глутамин, L-глутамат, L-аспартат, глюкоза, гликоген.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Горішний М.Б., Гудзь.С.П., Гнатуш С.О.* Метаболізм вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 // "Український біохімічний журнал"— 2009. — N. 5. T 81. — С. 26—33.

2. *Гудзь С. П., Горішний М. Б., Гнатуш С. О.* Бактеріальний фотосинтез — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2011. — 180 с.

3. *Современная* микробиология / Под. ред. Й. Ленгера, Г. Древса, Г. Шлегеля — М.: Наука, 2005. — 449 с.

4. *Лапач С.И.* Статистические методи в медико-биологических исследований с использованием Excel / Лапач С.И., Чубенко А.В., Бабич П.Н. — К.: Морион, 2001. — 408с.

5. *Blankenship M. T. Madigan C. E.* Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. — Boston: Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 1997.

6. *Castenholz R. W., Pierson B. K.* The prokaryotes. — New York: Springer, 1978.

7. *Sireveg R., Buchanan B.* Mechanisms of CO2 fixation in bacterial photosynthesis studied by carbon isotope fractionation technique // Arch. Microbiol. — 1977. — Vol. 16, N 112. — P. 35—38.

8. *Mas J., Gemerden H.* Storage products in purple and green sulfur bacteria. In: Anoxygenic photosynthetic — D.: KmwerAcad. Pub. (Netherlands), 1995.

Стаття надійшла до редакції 5.09.2013 р.