

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ДЕГИДРОГЕНАЗ ЛАКТАТА И МАЛАТА В ХЛОРЕЛЛЕ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ

Н. Р. Комарова, М. И. Фалалеева, А. В. Миткевич, Е. В. Ковалёва, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 15.02.2019 г.

Аннотация. В данной работе в качестве объекта исследования была выбрана одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella vulgaris*. Спектр использования хлореллы очень широк: пищевая промышленность, сфера здравоохранения, научные исследования, для получения биотоплива и очистки сточных вод. Эта микроводоросль имеет быстрый темп роста и реагирует на каждый набор условий роста, изменяя выход конкретного компонента. Изучена динамика изменения активности ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) и малатдегидрогеназы (МДГ, КФ 1.1.1.37) из *Chlorella vulgaris*, культивируемой в аэробных и микроаэробных условиях. Установлена зависимость работы данных ферментов от содержания кислорода в среде. В условиях гипоксии общая активность энзимов ЛДГ и МДГ менялась на протяжении всего времени экспозиции: наблюдался стабильный рост активности ЛДГ до окончания эксперимента. Так, например, активность на 8 день роста была выше в 2 раза активности на 7 день роста. Максимальная активность этого фермента наблюдалась на 10 день роста. Показатели ее активности в этот момент превышали более чем в 5 раз среднее значение этой величины в контрольной группе растений. В то же время, отмечено снижение активности МДГ в микроводоросли, выращенной микроаэробно, по сравнению с контрольными образцами: в хлорелле активность МДГ в контрольном варианте практически не менялась в течение всего времени экспозиции. В то же время, активность на свету была ниже, чем в темноте, примерно в 1.5-1.6 раза. Величина активности МДГ в условиях гипоксии снижалась на протяжении всего времени эксперимента в микроаэробных условиях, при этом ее величина на 10 день роста была в 2.5 раза ниже аналогичного значения на 7 день роста. Также, в «гипоксической» группе активность МДГ была ниже в среднем в 3.5 раза таковой в контрольной группе.

Ключевые слова: гипоксия, динамика, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, микроводоросль

Хлорелла, род зеленых водорослей (семейство *Chlorellaceae*), встречается отдельно или в скоплениях в пресной или соленой воде, а также в почве. Хлорелла широко используется в исследованиях фотосинтеза, экспериментах массового производства и очистки сточных вод. Поскольку водоросли быстро размножаются, богаты белками и витаминами группы В, некоторые виды также были изучены как потенциальный пищевой продукт для людей как на Земле, так и в космосе [1-2].

Хлорелла является представителем одного из самых привлекательных видов водорослей для производства биотоплива. Годовой объем производства хлореллы в 2009 году достиг 2000 т (в сухом весе), а основными производителями являются Япония, Германия и Тайвань [3-4]. Эта микроводоросль имеет быстрый темп роста и

реагирует на каждый набор условий роста, изменяя выход конкретного компонента. Исследуемая зеленая водоросль используется в качестве добавки в сельском хозяйстве для обогащения кормов и в пищевой промышленности в качестве биодобавки, поскольку *Chlorella* содержит большое количество полиненасыщенных жирных кислот. В настоящее время исследуется роль *C. vulgaris* в очистке сточных вод и отдельных водоемов от нефтезагрязнений (снижение химической потребности в кислороде и биоремедиация) [5], а также в медицине для исследования применения водорослевой суспензии для профилактики и лечения рака.

Малатдегидрогеназа (МДГ КФ 1.1.1.37) – один из ферментов ЦТК, функционирующий в кислородных условиях. Измерения активности МДГ в данной работе служили контролем достижения микроаэробных условий посева хлореллы. Фер-

мент лактатдегидрогеназа (ЛДГ КФ 1.1.1.27) выбран для изучения адаптивной реакции микроводоросли на гипоксию [6-7], т.к. он активируется, когда цикл Кребса работает не в полном объеме и роль гликолиза возрастает.

Цель работы – изучение динамики активности и функциональной роли ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) и малатдегидрогеназы (МДГ, КФ 1.1.1.37) у *Chlorella vulgaris* (хлорелла обыкновенная), культивируемых в разных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта исследований использовали одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. var. *vulgaris* из коллекции IPPAS ИФО РАН им. К.А. Тимирязева. Для культивирования использовали среду следующего состава (г/л): KNO_3 - 5; KH_2PO_4 - 1.25; $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2.5; KCl - 125; вода дистиллированная - 1 л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.009, ЭДТА - 0.037, раствор микроэлементов - 1 мл (H_3BO_3 - 2.86 г/л, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1.81 г/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.222, MoO_3 - 0.018, NH_4VO - 0.023) [8-9]. pH среды перед посевом доводили до 7.5. Инкубировали при температуре 27 °С. Интервал между пересевами составлял 10-14 суток.

Для создания микроаэробных условий микроводоросли культивировали во флаконах емкостью 0.5 л. С этой целью флаконы наполняли свежепрокипяченной средой [10].

Получение ферментативных экстрактов. Определение ферментативной активности проводили в супернатанте клеточного экстракта из культуры на восьмой, девятый и десятый день роста. При этом одна часть растений находилась в нормальных по содержанию кислорода условиях, другая выращена микроаэробно.

Супернатант использовали для определения активности ЛДГ и МДГ.

Измерение активности ферментов. Активность фермента ЛДГ измеряли спектрофотометрически при 340 нм по скорости окисления NADH на спектрофотометре ЛОМО СФ-56 (Россия). Реакционная среда состояла из 2 мл 50 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7.4), 0.06 мМ NADH, 1 мМ пирувата натрия. Реакцию запускали добавлением пирувата натрия [11].

Активность фермента МДГ измеряли спектрофотометрически при 340 нм по изменению оптической плотности реакционной смеси, определяемой скоростью расходования NADH на

спектрофотометре ЛОМО СФ-56 (Россия). Реакционная среда состояла из 2 мл 50 мМ Tris-HCl-буфера (pH 8.0), 0.15 мМ NADH, 1.5 мМ оксалоацетата [11-13].

Активность ферментов выражали в единицах ферментативной активности (Е) на 1 мл среды и удельную – на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли методом Лоури [14].

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили в 3-4 биологических повторностях. Рассчитывали среднее арифметическое среднееквадратическое отклонение каждой выборки [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В микроводоросли *Chlorella vulgaris* активность фермента ЛДГ в контрольном варианте оставалась практически неизменной относительно исходной точки (7 день с момента посева) как в темноте, так и на свету, на протяжении всего эксперимента. В условиях гипоксии общая активность ферментов ЛДГ и МДГ менялась на протяжении всего времени экспозиции: наблюдался стабильный рост активности ЛДГ до окончания эксперимента. Так, например, активность на 8 день роста была выше в 2 раза активности на 7 день роста. Максимальная активность этого фермента наблюдалась на 10 день роста. Показатели ее активности в этот момент превышали более чем в 5 раз среднее значение этой величины в контрольных растениях (рис. 1). Величина удельной активности также возросла к окончанию эксперимента в 1.3 раза.

В хлорелле активность МДГ в контрольном варианте практически не менялась в течение всего времени экспозиции (рис. 1). В то же время, активность на свету была ниже, чем в темноте, примерно в 1.5-1.6 раза. Величина активности МДГ в условиях гипоксии снижалась на протяжении всей экспозиции в микроаэробных условиях, при этом ее величина на 10 день роста была в 2.5 раза ниже аналогичного значения на 7 день роста. Также, в «гипоксической» группе активность МДГ была ниже в среднем в 3.5 раза таковой в контрольной группе.

Интересно отметить, что снижение общей активности МДГ происходит сопряженно с повышением активности ЛДГ: по мере угнетения активности малатдегидрогеназы, роль ЛДГ в метаболизме при гипоксии возрастает (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что гипоксия приводит к резкому снижению кислородного дыхания [16-18], в ци-

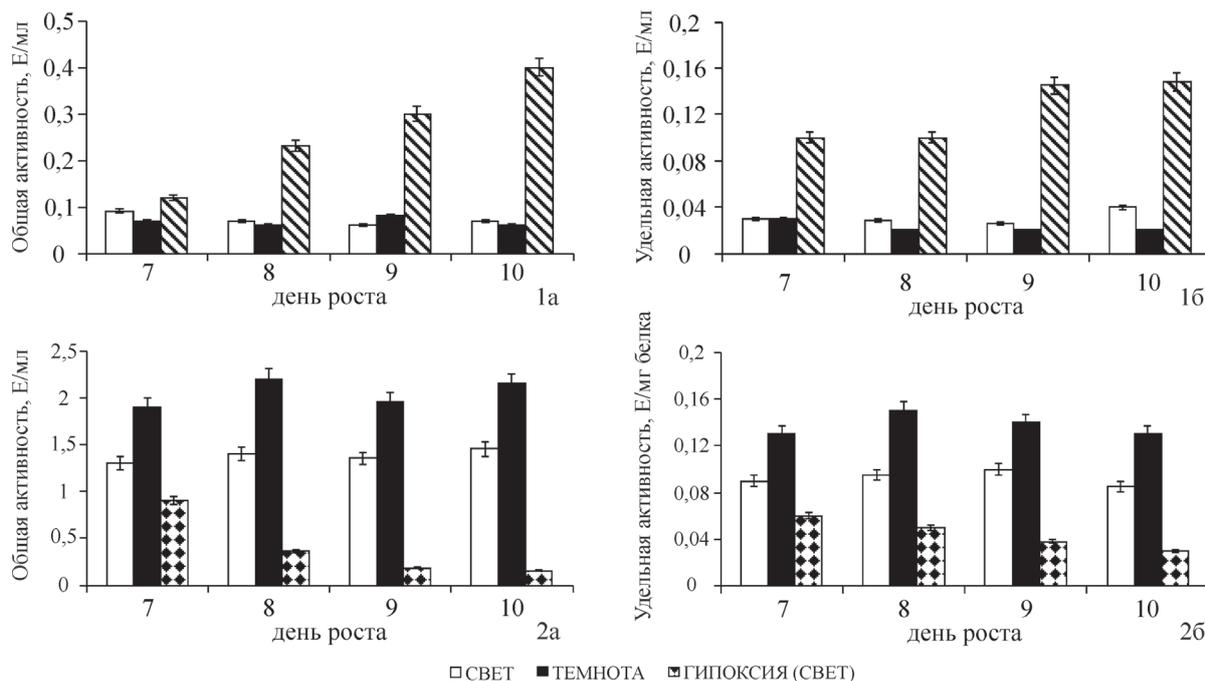


Рис. 1. Динамика общей (а) и удельной (б) активности ферментов лактатдегидрогеназы (1) и малатдегидрогеназы (2) хлореллы обыкновенной в разных условиях.

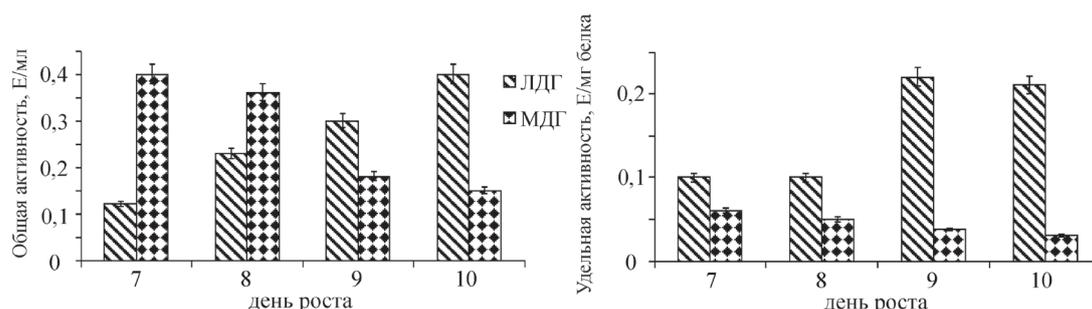


Рис. 2 Сравнение динамики общей (а) и удельной (б) активности ЛДГ и МДГ при гипоксии

топлазме индуцируется работа ЛДГ. С помощью МДГ – фермента ЦТК, в этом эксперименте было достоверно установлено наличие гипоксии.

В наших опытах получены данные об изменении активности лактатдегидрогеназы, участвующей в адаптивной реакции клеточного метаболизма к пониженному содержанию кислорода. При этом было показано максимальное увеличение активности ЛДГ хлореллы к 10 дню экспозиции в микроаэробных условиях. Активность ЛДГ повышалась более, чем в 5 раз по сравнению с контролем. Специфические различия для динамики активности позволяют предложить, что механизм адаптации хлореллы к гипоксии сопоставим с таковым у высших растений, показанным в работах [7, 19-20]. Таким образом, активное функционирование ферментативной системы ЛДГ обеспечивает реокисление гликолитического NADH, что возможно, способствует поддержанию энергетического баланса клетки при недостатке кислорода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Masojidek J. Mass cultivation of freshwater microalgae // Encyclopedia of ecology. 2008. pp. 2226-2235.
2. Yamamoto M., Fujishita M., Hirata A., Kawano S. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the auto spore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // J. Plant Res. 2004. Vol. 117. № 4, pp. 257-64.
3. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // Renewable & Sustainable Energy Reviews. 2010. Vol. 14. № 2, pp. 557-577.
4. Amit Kumar Sharma, Pradepta Kumar Sahoo, Shailey Singhal, Alok Patel Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. // 3 Biotech. 2016. Vol. 6. № 2, pp. 116.
5. Макарова Е.И., Отурина И.П., Сидякина А.И. Прикладные аспекты применения микро-

водорослей – обитателей водных экосистем // Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2009. Т.1. №20. С. 120-133.

6. Епринцев А.Т., Гагаулина М.О. Выделение и очистка пероксисомальной малатдегидрогеназы из мезофилла листьев кукурузы и ее характеристика // ПБМ. 2018. Т. 54. №3. С. 1-5.

7. Епринцев А.Т., Комарова Н.Р., Фалалева М.И. Физико – химические и регуляторные свойства лактатдегидрогеназы из листьев гороха в условиях дефицита кислорода (*Pisum sativum*) // ПБМ. 2019. Т. 55. № 2. С. 159–164.

8. Кузнецов Е.Д., Владимирова М.Г. Железо как фактор, лимитирующий рост хлореллы на среде Тамия // Физиология растений. 1964. Т. 11. № 4. С. 615-619.

9. Владимирова М.Г., Барцевич Е.Д., Жолдаков И.А., Епифанова О.О, Маркелова А.Г., Маслова И.П., Купцова Е.С. IPPAS – коллекция культур микроводорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН СССР // Каталог культур коллекций СССР, М., 1991. С. 8-61.

10. Chernecky C.C., Berger B.J. Tests and diagnostic procedures // Saunders Elsevier. 2008. Vol. 5, pp. 1232.

11. Sweetlove L.J., Dunford R., Ratcliffe R.G., Kruger N.J. Lactate metabolism in potato tubers deficient in lactate dehydrogenase activity // Plant Cell Environ. 2000. Vol. 23, pp. 873–881.

12. Setsuko K., Takahiro M., Hiroshi Y. Proteomic and biochemical analyses of the cotyledon and root of flooding-stressed soybean plants // PLoS One. 2013. Vol. 8, No. 6.

13. Hoffman N.E., Hanson A.D. Purification and properties of hypoxially induced lactate dehydrogenase from barley roots // Plant Physiol. 1986. Vol. 82, pp. 664–670.

14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. №1, pp. 265–275.

15. Ивченко Г.И., Медведев Ю.И. Математическая статистика. М.: ЛИБРОКОМ. 2014. С. 23–58.

16. Куличихин К.Ю., Чиркова Т.В., Фагерстедт К.В. Активность ферментов биохимического рН-стата в кончиках корней злаков в условиях кислородной недостаточности // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 3. С. 418–430.

17. Engqvist M.K.M., Schmitz J., Gertzmann A., Florian A., Jaspert N., Arif M., Balazadeh S., Mueller-Roeber B., Fernie A.R., Maurino V.G. Glycolate oxidase 3, a glycolate oxidase homolog of yeast L-lactate cytochrome c oxidoreductase, supports L-lactate oxidation in roots of Arabidopsis // Plant Physiology. 2015. Vol. 169, pp. 1042–1061.

18. Narsai R., Whelan J. How unique is the low oxygen response? An analysis of the anaerobic response during germination and comparison with abiotic stress in rice and Arabidopsis // Front Plant Sci. 2013. Vol. 4, pp. 349–363.

19. Унжаков А.Р., Илюха В.А., Мацук Н.В., Белкин В.В. // Труды КарНЦ РАН. 2007. № 11. С. 118–126.

20. Jain V., Singla N.K., Jain S., Gupta K. Activities of enzymes of fermentation pathways in the leaves and roots of contrasting cultivars of sorghum (*Sorghum Bicolor* L.) during flooding // Physiol Mol Biol Plants. 2010. Vol. 16. № 3, pp. 241–247.

*Воронежский государственный университет
Комарова Н. Р., аспирант кафедры биохимии
и физиологии клетки*

*Voronezh State University
Komarova N. R., postgraduate student,
Department of Biochemistry and Cell Physiology*

Фалалева М. И., к.б.н., доцент кафедры биохимии и физиологии клетки

*Falaleeva M. I., lecturer of the Department of
Biochemistry and Cell Physiology*

Миткевич А. В., магистр 2 года, кафедра биохимии и физиологии клетки

*Mitkevich A. V., Master 2 years Master 2 years,
Department of Biochemistry and Cell Physiology*

Ковалёва Е. В., магистр 2 года, кафедра биохимии и физиологии клетки

*Kovaleva E. V., Master 2 years, Department of
Biochemistry and Cell Physiology*

Епринцев А. Т., д.б.н., профессор, кафедра биохимии и физиологии клетки

*Eprintsev A. T., head of the Department of
Biochemistry and Cell Physiology*

FUNCTIONING FEATURES OF DEHYDROGENASES OF LACTATE AND MALATE IN CHLORELLA IN DIFFERENT CONDITIONS

N. R. Komarova, M. I. Falaleeva, A. V. Mitkevich, E. V. Kovaleva, A. T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. In this study, the unicellular green alga *Chlorella vulgaris* was chosen as the object of study. The range of use of chlorella is very wide: food industry, health care, research, to obtain biofuels and wastewater treatment. This microalgae has a rapid growth rate and responds to each set of growth conditions, changing the yield of a particular component. The dynamics of changes in the activity of enzymes lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) and malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) from *Chlorella vulgaris*, cultivated under aerobic and microaerobic conditions, was studied. The dependence of the work of these enzymes on the oxygen content in the medium was established: under hypoxic conditions, the total activity of LDH and MDH enzymes changed throughout the entire exposure time: a steady increase in LDH activity was observed until the end of the experiment. For example, the activity on the 8th day of growth was 2 times higher than the activity on the 7th day of growth. The maximum activity of this enzyme was observed on the 10th day of growth. The indicators of its activity at this moment exceeded more than 5 times the average value of this value in the control group of plants. At the same time, there was a decrease in the activity of MDH in a microaerobic microalgae compared to the control samples: in chlorella, the MDH activity in the control variant remained almost unchanged during the entire exposure time. At the same time, activity in the light was lower than in the dark, about 1.5–1.6 times. The magnitude of MDH activity under hypoxic conditions decreased throughout the experiment in microaerobic conditions, while its value at 10 days of growth was 2.5 times lower than the same value at 7 days of growth. Also, in the "hypoxic" group, the MDH activity was lower, on average, by 3.5 times that in the control group.

Keywords: hypoxia, dynamics, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, microalgae

REFERENCES

1. Masojidek J. Mass cultivation of freshwater microalgae. *Encyclopedia of ecology*, 2008, pp. 2226-2235.
2. Yamamoto M., Fujishita M., Hirata A., Kawano S. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the auto spore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J. Plant Res.*, 2004, Vol. 117, № 4, pp. 257-64.
3. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2010, Vol.14, № 2, pp. 557-577.
4. Amit Kumar Sharma, Pradeepta Kumar Sahoo, Shailey Singhal, Alok Patel Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella* spp. *3 Biotech.*, 2016, Vol. 6, № 2, pp.116.
5. Makarova E.I., Oturina I.P., Sidyakin A.I. Applied aspects of application of microwave area – aquaters of water ecosystems. *Ekosistemy*, 2009, № 1 (20), pp. 120-133.
6. Eprintsev A.T., Gataullina M.O.. Physicochemical and catalytic properties of Nad⁺-dependent malate dehydrogenase isoforms from maize mesophyll. *App. Biochem. Microbiol.*, 2018, Vol. 54, №3, pp. 1-5.
7. Eprintsev A.T., Komarova N.R., Falaleeva M.I. Physicochemical and regulatory properties of lactate dehydrogenase from Pea (*Pisum sativum* L.) leaves under oxygen deficiency. *App. Biochem. Microbiol.*, 2019, Vol. 55, №2, pp. 159-164.
8. Kuznetsov E.D., Vladimirova M.G. Iron as a factor limiting the growth of chlorella on Tamiya medium. *Plant Physiology*, 1964, Vol. 11, No. 4, pp. 615-619.
9. Vladimirova M.G., Bartsevich E.D., Zholdakov I.A., Epifanova O.O., Markelova A.G., Maslova I.P., Kuptsova E.S. IPPAS is a collection of microalgae cultures of the Institute of Plant Physiology. K.A. Timiryazev Academy of Sciences of the USSR. *Catalog of cultures of collections of the USSR*, Moscow, 1991, pp. 8-61.
10. Chernecky C.C., Berger B.J. Tests and diagnostic procedures. *Saunders Eslevier*, 2008, Vol. 5, pp. 1232.
11. Sweetlove L.J., Dunford R., Ratcliffe R.G., Kruger N.J. Lactate metabolism in potato tubers deficient in lactate dehydrogenase activity. *Plant Cell Environ.*, 2000, Vol. 23, pp. 873–881.

12. Setsuko K., Takahiro M., Hiroshi Y. Proteomic and biochemical analyses of the cotyledon and root of flooding-stressed soybean plants. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, No. 6.
13. Hoffman N.E., Hanson A.D. Purification and properties of hypoxially induced lactate dehydrogenase from barley roots. *Plant Physiol.*, 1986, Vol. 82, pp. 664–670.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, Vol. 193, №1, pp. 265–275.
15. Ivchenko G.I., Medvedev Yu.I. *Mathematical statistics*. M.: LIBROKOM, 2014, pp. 23–58.
16. Kulichikhin K.Yu., Chirkova T.V., Fagerstedt K.V. Biochemical pH-stat enzyme activity in the tips of the roots of cereals under conditions of oxygen deficiency. *Plant Physiology*, 2009, Vol. 56, № 3, pp. 418–430.
17. Engqvist M.K.M., Schmitz J., Gertzmann A., Florian A., Jaspert N., Arif M., Balazadeh S., Mueller-Roeber B., Fernie A.R., Maurino V.G. Glycolate oxidase 3, a glycolate oxidase homolog of yeast L-lactate cytochrome c oxidoreductase, supports L-lactate oxidation in roots of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2015, Vol. 169, pp. 1042–1061.
18. Narsai R., Whelan J. How unique is the low oxygen response? An analysis of the anaerobic response during germination and comparison with abiotic stress in rice and Arabidopsis. *Front Plant Sci.*, 2013, Vol. 4, pp. 349–363. DOI: 10.3389 / fpls.2013.00349.
19. Unzhakov A.R., Ilyukha V.A., Matsuk N.V., Belkin V.V. *Proceedings of the KarRC of RAS*, 2007, No. 11, pp. 118–126.
20. Jain V., Singla N.K., Jain S., Gupta K. Activities of enzymes of fermentation pathways in the leaves and roots of contrasting cultivars of sorghum (*Sorghum Bicolor L.*) during flooding. *Physiol Mol Biol Plants*, 2010, Vol. 16, № 3, pp. 241–247.