

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 581.198:582.263:577.151

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-6-694-701>

Поступило в редакцию 04.06.2020

Received 04.06.2020

И. А. Ильючик, В. Н. Никандров*Полесский государственный университет, Пинск, Республика Беларусь***О ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ КЛЕТОК
CHLORELLA VULGARIS ШТАММА *C 111 IBCE C-19****(Представлено академиком В. Н. Решетниковым)*

Аннотация. Установлено, что выделенные методом дифференциального центрифугирования и в градиенте плотности сахарозы субклеточные частицы клетки *Chlorella vulgaris* штамма *C 111 IBCE C-19* способны расщеплять казеин, желатин, фибриноген и гемоглобин при pH 7,4 и 9,0. С использованием группоспецифических ингибиторов протеиназ выявлено присутствие в клетках хлореллы сериновых, цистеиновых и металлопротеиназ. Однако выявление этого набора протеолитических энзимов возможно лишь при использовании в качестве субстратов нескольких разных белков. В отдельных случаях практически весь использованный арсенал группоспецифических ингибиторов протеиназ оказался малоэффективен. Это дает основания полагать, что существуют протеиназы иного плана, чем перечисленные выше, что требует дальнейших исследований в перспективе.

Ключевые слова: хлорелла, субклеточные фракции, расщепление белков субстратов, группоспецифические ингибиторы

Для цитирования. Ильючик, И. А. О протеолитической активности субклеточных фракций клеток *Chlorella vulgaris* штамма *C 111 IBCE C-19* / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 6. – С. 694–701. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-6-694-701>

Irina A. Ilyuchyk, Vitaliy N. Nikandrov*Polesky State University, Pinsk, Republic of Belarus***ON PROTEOLYTIC ACTIVITY OF SUBCELLULAR FRACTIONS
OF *CHLORELLA VULGARIS* STRAIN *C 111 IBCE C-19* CELL***(Communicated by Academician Vladimir N. Reshetnikov)*

Abstract. Subcellular particles of *Chlorella vulgaris* C 111 IBCE C-19 were isolated by differential centrifugation in sucrose density gradient. It was stated for the first time, that these particles can cleave casein, gelatin, fibrinogen and hemoglobin at pH 7.4 and 9.0. Using group-specific proteinase inhibitors, a set of serine-, cysteine- and metalloproteinases was identified in this material. However, the detection of this set of proteolytic enzymes is only possible when several different proteins are used as substrates. In some cases, virtually all of the used arsenal of group-specific proteinase inhibitors proved to be little effective. This suggests that these are proteinases of a different nature than those listed above, which requires further perspective research.

Keywords: chlorella, subcellular fractions, protein substrates cleavage, group-specific inhibitors

For citation: Ilyuchyk I. A., Nikandrov V. N. On proteolytic activity of subcellular fractions of *Chlorella vulgaris* strain C 111 IBCE C-19 cell. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 6, pp. 694–701 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-6-694-701>

Введение. Одной из наиболее актуальных проблем современности является обеспечение растущего народонаселения и сельскохозяйственных животных достаточным количеством белка. По данным экспертов проекта «Протеин России», недостаток кормовых белков составляет 770 тыс. т, а общий дефицит белков в России – 2 млн т/год. Ликвидировать дефицит белка, лишь расширяя посевные площади или увеличивая поголовье скота стало невозможно, что выдвигает проблему поиска альтернативных источников белка [1].

Это породило в биотехнологии направления так называемого одноклеточного белка. Среди продуцентов белка заметное место занимают одноклеточные водоросли, в том числе рода

Chlorella. США, Япония, Китай, Тайвань и Индонезия производят более 2,5 тыс. т высушенной хлореллы в год [2]. Она является одним из перспективных возобновляемых ресурсов органического сырья [3].

Интенсификация технологии получения биомассы хлореллы настоятельно диктует необходимость уяснения биологии этого продуцента и, в частности, систем регуляции метаболизма и жизнедеятельности.

Одним из генеральных механизмов такой регуляции является протеолиз. О протеолитической системе хлореллы данные мировой литературы практически отсутствуют.

Ранее нами было показано, что осветленные гомогенаты клеток *Chlorella vulgaris* расщепляют ряд белков субстратов [4; 5]. В краткой тезисной форме были также изложены результаты исследования протеолитической активности клетки хлореллы [6]. Однако они не позволяют оценить особенности организации системы внутриклеточного протеолиза *Chlorella vulgaris*.

Цель настоящего исследования – раскрыть особенности проявления протеолитической активности субклеточными фракциями клетки *Chlorella vulgaris*.

Материалы и методы исследования. Исследования выполнены на альгологически чистом штамме *Chlorella vulgaris* C III IBCE C-19, полученном из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси и любезно предоставленном сотрудниками института.

В работе использовали желатин свиньи (Fluka, Германия), гемоглобин быка, фибриноген человека, диизопропилфторфосфат (Sigma, США), фенолметилсульфонилфторид, диэтилдитиокарбамат, *p*-хлормеркурибензоат (Carl Roth, Германия), 1,10-фенантролин, этилендиаминтетрацетат (Alfa Aesar, Германия), 8-оксихинолин (Chem-impex, Германия), бактоагар (Melford, США), кумасси ярко-голубой G-250 (Appli Chem, Германия), казеин по Гаммерстену и остальные реактивы были производства стран СНГ марки «хч».

Микроводоросль выращивали в условиях периодической культуры на среде Tamiya как описано ранее [4]. В фазу логарифмического роста на 7-е сутки культивирования, используя камеру Горяева, отбирали аликвоты культуры по $100 \pm 4,70$ млн клеток, трижды отмывали от культуральной среды дистиллированной водой, центрифугируя в течение 20 мин при 3000 об/мин. Клетки замораживали и хранили при -20 °С.

Клетки *Ch. vulgaris* разрушали в гомогенизаторе Поттера–Эльвейема при 4 °С в 0,5 мл 0,25 М растворе сахарозы [7] в течение 5 мин.

Субклеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования. При 30 г в течение 15 мин осаждали обрывки клеток. Фракцию ядер отделяли центрифугированием при 400 г в течение 20 мин, фракцию пластид – при 6000 г в течение 20 мин, фракцию митохондрий – при 20000 г в течение 15 мин.

Осадок ядер отмывали дважды с 6 мл 0,25 М сахарозы и центрифугировали при 800 г в течение 10 мин. Очищенные ядра сохраняли на льду. Очистку хлоропластов проводили центрифугированием, используя ступенчатый градиент сахарозы: 51, 35 и 25 % сахарозы, центрифугировали при 4000 г в течение 30 мин. Очистку митохондрий – в ступенчатом градиенте сахарозы: 60, 47, 35 и 25 % сахарозы, центрифугировали при 24000 г в течение 10 мин [8; 9].

Все исследования с органеллами проводили при температуре 4 °С в тот же день.

Качество и чистоту полученных органелл оценивали на основании целостности морфологических структур при помощи световой микроскопии, а также с помощью красителей, как описано в [10]. Полученные после очистки ядра, пластиды и митохондрии разрушали в 0,2 мл раствора 0,25 М сахарозы при 4 °С в течение 1–2 мин.

Концентрацию общего белка в гомогенатах органелл клеток хлореллы и супернатанте определяли колориметрическим методом [11].

Протеолитическую активность полученных гомогенатов ядер, пластид, митохондрий и супернатанта определяли по лизису белков в тонком слое агарового геля как подробно описано ранее [12]. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0.

Все растворы в данном эксперименте готовили на бидистиллированной воде. Диизопропил-фторфосфат, фенилметилсульфонилфторид и 8-гидроксихинолин растворяли в 50 %-ном этаноле. Конечная концентрация ингибиторов составляла 10^{-3} М.

Исследования проведены шестикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (t) для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что все субклеточные фракции клеток хлореллы обладали протеолитической активностью и расщепляли все использованные белки субстраты при обоих значениях рН (таблица). Учитывая концентрацию белка в образцах субклеточных фракций (мкг/мл): ядер – $695,57 \pm 0,44$; пластид – $719,73 \pm 0,22$; митохондрий – $286,23 \pm 5,50$; супернатанта – $48,33 \pm 3,13$ становится ясно, что наиболее высокая удельная активность присуща фракции супернатанта.

Протеолитическая активность (мм² площади зон лизиса белков) субклеточных фракций *Chlorella vulgaris* ($n = 6$)

Proteolytic activity (protein lysis zone area, mm²) of subcellular particles *Chlorella vulgaris* ($n = 6$)

Растворитель Solvent	Площадь зон лизиса, мм ² Lysis zone area, mm ²							
	рН 7,4				рН 9,0			
	Я	Пл	Мх	Сн	Я	Пл	Мх	Сн
<i>Гемоглобин</i>								
H ₂ O	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
+ этанол, 25 %	18,64 ± 0,98*	79,84 ± 3,56*	54,95 ± 1,07	11,13 ± 0,71*	53,63 ± 1,40*	172,01 ± 6,49*	91,75 ± 3,61	109,77 ± 1,52*
<i>Желатин</i>								
H ₂ O	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 м ± 1,01	56,36 м ± 2,14	44,29 м ± 2,55*	55,94 ± 0,85*	60,38 ± 0,62*	38,00 ± 1,80	32,07 ± 0,95	73,80 ± 1,78*
<i>Казеин</i>								
H ₂ O	149,35 ± 2,61	103,93 м ± 5,20	77,32 м ± 3,65	99,16 ± 3,08	78,03 ± 2,49	75,52 ± 2,44	47,73 ± 3,20	59,00 ± 2,25
+ этанол, 25 %	149,35 м ± 1,94	60,17 м ± 3,41*	73,95 м ± 2,60	95,72 ± 2,67	78,03 ± 1,98	94,20 ± 4,30*	28,89 ± 3,31*	25,51 ± 1,96*
<i>Фибриноген</i>								
H ₂ O	65,72 ± 1,74	68,03 ± 2,09	93,51 ± 2,14	61,96 ± 4,05	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 ± 8,49*	76,60 ± 2,77*

Примечание: Я – ядра, Пл – пластиды, Мх – митохондрии, Сн – супернатант; * – здесь и далее изменения статистически достоверны, $p \leq 0,05$.

Note: Я – cores, Пл – plastids, Мх – mitochondria, Сн – supernatant; * – hereinafter the changes are statistically significant, $p \leq 0.05$.

Оказалось, что при рН 7,4 наиболее интенсивно протеиназы фракций расщепляли казеин. Исключением стала фракция митохондрий, протеиназы которой проявили наиболее высокую активность при расщеплении фибриногена. Во всех случаях гемоглобин как субстрат подвергался наименьшему протеолизу.

Ситуация существенно менялась при рН 9,0. В щелочной среде протеиназы ядер наиболее интенсивно расщепляли желатин, а хуже всего – фибриноген. Протеиназы пластид при этом рН проявили наибольшую активность при использовании в качестве субстрата фибриногена, а самую низкую – в случае желатина. Фракции митохондрий и супернатанта проявили наибольшую протеолитическую активность на гемоглобине, а минимальную – на желатине и фибриногене соответственно.

Далее оказалось, что в присутствии этанола в целом ряде случаев протеолитическая активность снижалась при pH 7,4 на 33,36–81,14 % (особенно в супернатанте при лизисе гемоглобина), тогда как при pH 9,0 угнетение активности составило 38,22–56,76 % (также наиболее заметно в случае супернатанта, но при расщеплении казеина).

Однако в целом ряде случаев частичное замещение воды этанолом сопровождалось ростом протеолитической активности. Особенно часто такие явления наблюдались при pH 9,0. Так, расщепление гемоглобина пластидами в присутствии этанола возрастало в 2,5 раза. В остальных пяти случаях литическая активность протеиназ супернатанта, пластид и митохондрий увеличилась на 23,45–66,29 %.

Причины этого нуждаются в дальнейшем исследовании, выходящем за рамки данного сообщения. Можно лишь отметить, что ранее на очищенных образцах протеиназ был продемонстрирован существенный рост фибринолитической активности при частичном замещении воды органическими растворителями [13]. Кроме того, при исследовании протеолитической активности образцов белковых ингибиторов протеиназ в отдельных случаях было установлено появление протеолитической активности в присутствии этанола [14].

Материалы таблицы свидетельствуют о представительстве в каждой из внутриклеточных структур клетки хлореллы нескольких протеиназ.

Характеризуя в целом эффекты группоспецифических ингибиторов (рисунок), следует отметить довольно сложную, пеструю и неоднозначную картину сдвигов расщепления белков субстратов. При этом выявленные изменения активности зависели не только от фракции субклеточных частиц, но и от белка субстрата.

Активность так называемых нейтральных протеиназ (pH 7,4) ядер по большинству белков субстратов была малочувствительна к использованным ингибиторам. Так, расщепление казеина и желатина угнеталось не более, чем на 16,35 %, а фибриногена – в пределах 36 % и только в присутствии диэтилдитиокарбамата (DEDTC), фенолметилсульфонилфторида (PMSF), *p*-хлормеркурибензоата (*p*-CMB), и 8-гидроксихинолина (8-hQui). И лишь расщепление гемоглобина полностью подавляли последние три ингибитора, угнетали на 57–89 % диизопропилфторфосфат (DFP), *o*-фенантролин (*o*-phe), DEDTC и слабо – ЭДТА.

Казеинолитическую активность пластид на 59 % подавлял DFP, практически не изменяли *p*-CMB, PMSF, ЭДТА и 8-hQui. Остальные эффекторы угнетали активность не более чем на 35 %. Близкая картина выявлена и при расщеплении желатина с той лишь разницей, что эффект *p*-CMB составил 36 %. В отличие от этого, расщепление фибриногена подавлялось на DFP и на *p*-CMB на 45 и 85 % соответственно. На гемоглинолитическую активность не действовал лишь ЭДТА. Она на 85 % угнеталась *p*-CMB, а остальными ингибиторами – полностью.

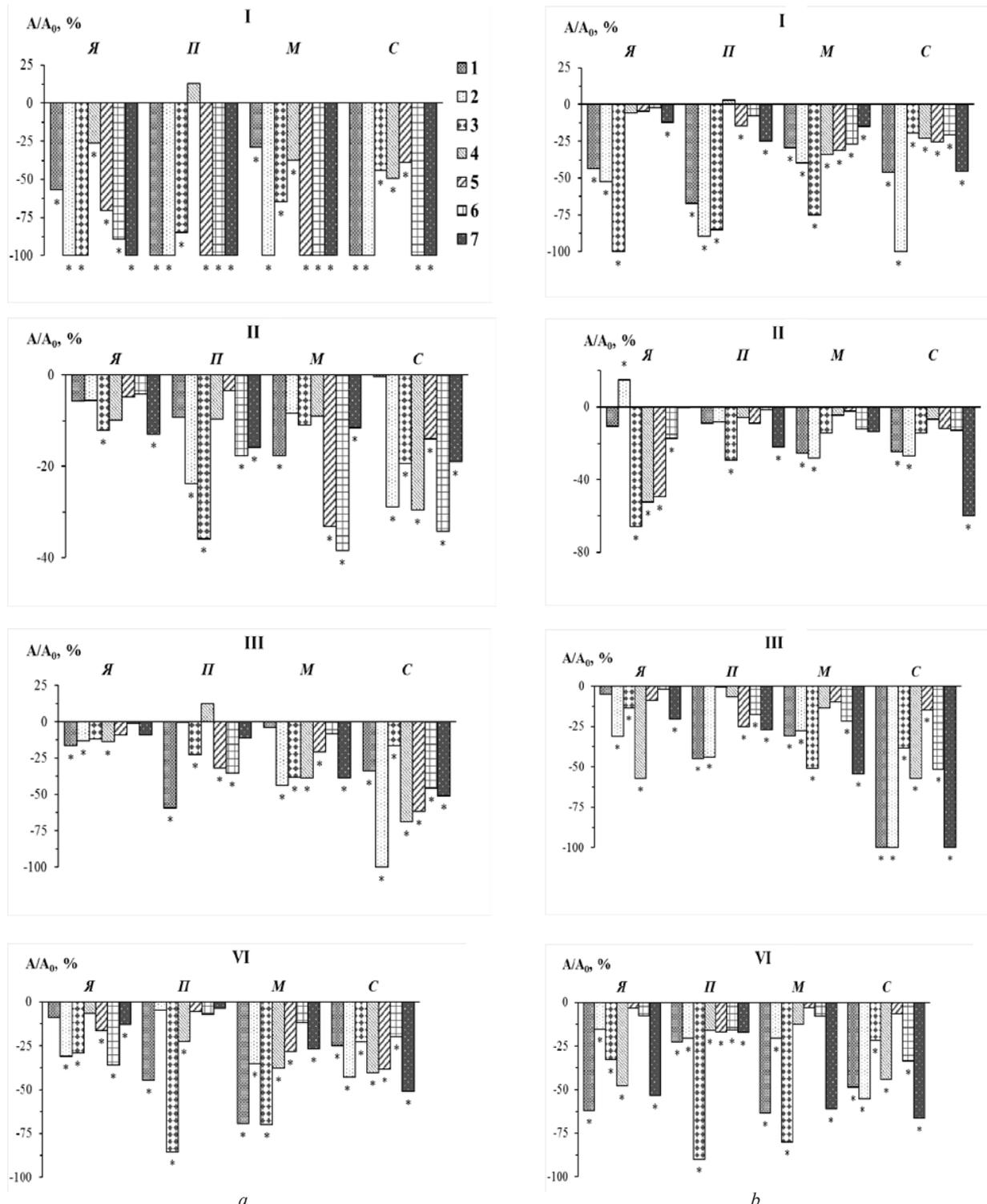
Казеинолитическую активность митохондрий подавляли на 50–55 % лишь *p*-CMB и 8-hQui, тогда как эффект DFP и PMSF не превысил 30 %. Сильнее – на 70 % ингибировал расщепление фибриногена *p*-CMB, но в этом случае сходный эффект вызвал и DFP. Расщепление гемоглобина угнетали полностью все ингибиторы, за исключением DFP, *p*-CMB и ЭДТА.

Казеинолитическую активность супернатанта полностью выключал PMSF, тогда как металл-связывающие эффекторы (кроме ЭДТА) – на 46–69 %. Слабее (на 29–34 %) расщепление желатина подавляли PMSF, ЭДТА и DEDTC. Наиболее заметно расщепление фибриногена подавляли PMSF – на 43 %, а также *o*-phe, ЭДТА и 8-hQui – на 38, 40 и 51 % соответственно. Расщепление же гемоглобина полностью ингибировали DFP, PMSF, DEDTC и 8-hQui. Эффект остальных соединений не превышал 50 %.

На активность щелочных протеиназ (pH 9,0) использованные ингибиторы оказали несколько иной эффект.

Протеолитическую активность ядер ингибиторы подавляли умеренно: на 65,87 %. И только расщепление гемоглобина угнеталось полностью *p*-CMB.

Не превысил 45 % эффект ингибиторов в большинстве случаев на расщепление белков пластидами. Лишь расщепление фибриногена подавлял на 90 % *p*-CMB, а гемоглинолитическая активность падала на 67 % в присутствии DFP, на 90 и 85 % – в присутствии PMSF и *p*-CMB соответственно.



Действие ингибиторов (% к контролю, принятому за 100 %) на расщепление гемоглобина (I), желатина (II), казеина (III), фибриногена (IV) фракциями клеток *Chlorella vulgaris*: ядерной – Я, пластидной – II, митохондриальной – M, супернатанта – C при pH 7,4 (а) и pH 9,0 (б); ингибиторы: 1 – DFP, 2 – PMSF, 3 – *p*-CMB, 4 – EDTA, 5 – *o*-phe, 6 – DEDTC, 7 – 8-hQui

The action of inhibitors (% to the control taken to 100 %) on the cleaving of hemoglobin (I), gelatin (II), casein (III), fibrinogen (IV) by the cellular particles of *Chlorella vulgaris*: core – Я, plastid – II, mitochondria – M, supernatant – C at pH 7.4 (a) and pH 9.0 (b); inhibitors: 1 – DFP, 2 – PMSF, 3 – *p*-CMB, 4 – EDTA, 5 – *o*-phe, 6 – DEDTC, 7 – 8-hQui

Весьма умеренное, в целом, действие (20–30 %) ингибиторы оказали на расщепление белков протеиназами митохондрий. Однако расщепление казеина угнеталось *p*-СМВ и 8-hQui на 51–54 %, а расщепление фибриногена DFP, *p*-СМВ и 8-hQui на 63, 80 и 61 % соответственно. Гемоглинолитическая активность пластид *p*-СМВ подавлял на 75 %, тогда как эффект остальных ингибиторов не превышал 40 %.

Расщепление казеина супернатантом полностью угнетали DFP, PMSF и 8-hQui, эффект ЭДТА и DEDTC составил 57 и 52 % соответственно. Желатинолитическая активность супернатанта мало чувствительна к действию ингибиторов, лишь 8-hQui на 60 % снижал ее.

Судя по ингибиторному анализу, субклеточные фракции хлореллы наделены достаточно разнообразным набором протеиназ, особенно активных при pH 7,4. Причем, только использование нескольких белков в качестве субстратов позволяет это разнообразие выявить. В этом отношении можно упомянуть результаты прежних исследований, в которых было показано, что эффект биогенных фосфатов, а также неорганических ортофосфата и пирофосфата на активность разнообразных протеиназ зависел от используемого в качестве субстрата белка [15]. Повидимому, подобная особенность проявилась и в данном исследовании.

Примечателен слабо выраженный эффект практически всех группоспецифических ингибиторов на расщепление казеина и желатина при pH 7,4 протеиназами фракции ядер, хотя именно эти белки в данном случае расщеплялись наиболее заметно. Близкая картина выявлена при расщеплении желатина протеиназами пластид и митохондрий, а казеина – протеиназами ядер и пластид при pH 9,0. Это дает основания предположить возможность существования иных протеиназ, кроме известных в настоящее время. Ранее при исследовании протеолитической активности очищенных образцов ингибитора протеиназ белковой природы – овоингибитора была обнаружена фибринолитическая активность при добавлении стрептокиназы. Однако такая система не расщепляла специфический хромогенный субстрат плазмина [14].

В настоящее время мы не располагаем собственными результатами или информацией литературы, проливающей свет на этот вопрос.

В целом же, судя по результатам ингибиторного анализа, наиболее заметно действие цистеиновых и металлов протеиназ (возможно, также SH-протеиназ). При pH 7,4 активность сериновых протеиназ особенно заметно проявлялась при расщеплении гемоглобина протеиназами пластид, супернатанта, в меньшей степени – ядер, а также при расщеплении фибриногена протеиназами митохондрий. И менее заметно активность сериновых протеиназ зарегистрирована при использовании пластид. В щелочной же среде было выражено расщепление гемоглобина сериновыми протеиназами пластид, расщепление казеина – супернатантом, а расщепление фибриногена – таковыми ядер, митохондрий и супернатанта.

Заключение. Следовательно, все субклеточные частицы клетки *Chlorella vulgaris* имеют достаточно многоплановый набор протеиназ, способных катализировать расщепление белков при pH 7,4 и 9,0: сериновых, цистеиновых и металлопротеиназ. Выявление этого набора протеолитических энзимов возможно лишь при использовании в качестве субстратов нескольких разных белков. Вместе с тем в отдельных случаях практически весь использованный арсенал группоспецифических ингибиторов протеиназ оказался малоэффективен, несмотря на достаточно демонстративное расщепление белков протеиназами субклеточных частиц. Это позволяет полагать, что существуют протеиназы иного плана, чем перечисленные выше.

Список использованных источников

1. Рождественская, Л. Н. Анализ вызовов и современных тенденций развития технологий на рынке белков / Л. Н. Рождественская, Е. С. Бычкова, А. Л. Бычков // Пищевая промышленность. – 2018. – № 5. – С. 42–47.
2. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa* / A. G. Waghmare [et al.] // Bioresources and Bioprocessing. – 2016. – Vol. 3, N 16. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0094-8>
3. Потенциал применения микроводорослей в качестве сырья для биоэнергетики / К. Н. Сорокина [и др.] // Катализ в промышленности. – 2012. – № 2. – С. 63–72.
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. Изменения протеолитической активности гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* и функционально-метаболические перестройки культуры при росте в присутствии $MnCl_2$ / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Вестн. Полесского гос. ун-та. Сер. природоведения. – 2018. – № 2. – С. 25–33.
6. Ильючик, И. А. Особенности организации системы протеолиза в клетках *Chlorella vulgaris* / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Тез. докл. Междунар. науч. конф., тринадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». – Минск, 2018. – С. 112.
7. Финдлей, Дж. Б. Биологические мембраны. Методы / Дж. Б. Финдлей, У. Г. Эванз. – М., 1990. – 424 с.
8. Биохимия растений / пер. с англ. А. А. Бундель; под ред. В. Л. Кретовича. – М., 1968. – 624 с.
9. Метод изучения интенсивности транскрипции индивидуальных митохондриальных генов у растений / Н. С. Белозерова [и др.] // Вестн. РУДН. Сер. агрономия и животноводство. – 2009. – № 1. – С. 65–72.
10. Лемеза, Н. А. Альгология и микология. Практикум / Н. А. Лемеза. – Минск, 2008. – 200 с.
11. Kirschenbaum, D. M. Molar absorptivity and $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible region. XI / D. M. Kirschenbaum // Anal. Biochem. – 1975. – Vol. 68, N 2. – P. 465–484. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90642-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90642-9)
12. Никандров, В. Н. Методы исследования протеолиза / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. – Минск, 2013. – С. 132–157.
13. Никандров, В. Н. Влияние органических растворителей на иницируемый стрептокиназой фибринолиз / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова, В. И. Вотяков // Вопр. мед. химии. – 1987. – Т. 33, № 1. – С. 84–87.
14. Никандров, В. Н. Регуляторные белки: функциональные свойства молекул и механизмы их биологического действия / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук. – 2003. – № 3. – С. 75–89.
15. Пыжова, Н. С. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена / Н. С. Пыжова, В. Н. Никандров // Биоорганическая химия. – 2008. – Т. 34, № 3. – С. 382–391.

References

1. Rozhdestvenskaya L. N., Bychkova E. S., Bychkov A. L. Analysis of challenges and current trends in development technology in the protein market. *Pishcheyaya promyshlennost' = Food processing Industry*, 2018, no. 5, pp. 42–47 (in Russian).
2. Waghmare A. G., Salve M. K., Leblanc J. G., Arya S. S. Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2016, vol. 3, no. 16, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0094-8>
3. Sorokina K. N., Yakovlev V. A., Piligaev V. A., Kukushkin R. G., Pel'tek S. E., Kolchanov N. A., Parmon V. N. Potential of microalgae as a source of bioenergy. *Catalysis in Industry*, 2012, vol. 4, no. 3, pp. 202–208. <https://doi.org/10.1134/s2070050412030117>
4. Nikandrov V. N., Ilyuchik I. A. Physico-chemical features of proteolytic processes realization of *Chlorella vulgaris* cell. *Aktual'nye voprosy biologicheskoi fiziki i khimii* [Topical issues of biological physics and chemistry], 2018, vol. 3, no. 3, pp. 654–664 (in Russian).
5. Ilyuchik I. A., Nikandrov V. N. Proteolytic activity changes of homogenates of *Chlorella vulgaris* cells and culture function-metabolic reorganizations at the growth in the $MnCl_2$ presence. *Vestnik Poleskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya prirodovedeniya = Bulletin of Polesky State University. Series in natural sciences*, 2018, no. 2, pp. 25–33 (in Russian).
6. Ilyuchik I. A., Nikandrov V. N. Features of the organization of the proteolysis system in *Chlorella vulgaris* cells. *Tezisy докладov Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii, trinadtsatogo s'ezda Belorusskogo obshchestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov «Molekulyarnye, membrannye i kletochnye osnovy funktsionirovaniya biosistem»* [Abstracts of the International Scientific Conference, the Thirteenth Congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists “Molecular, membrane and cellular bases of the functioning of biosystems”]. Minsk, 2018, p. 112 (in Russian).
7. Findlay J. B. C., Evans W. H. *Biological membranes. A practical approach*. IRL Press, 1987. 425 p.
8. Bonner A., Varner J. E., eds. *Plant Biochemistry*. New York, 1965. 1072 p. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-12490-7>
9. Belozerova N. S., Zubo Y. O., Shugaev A. G., Kuznetsov V. V. Method for studying of individual mitochondrial gene transcription in plants. *Vestnik RUDN, seriya Agronomiya i zhivotnovodstvo = RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*, 2009, no. 1, pp. 65–72 (in Russian).
10. Lemeza N. A. *Algology and mycology. Workshop*. Minsk, 2008. 200 p. (in Russian).
11. Kirschenbaum D. M. Molar absorptivity and $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible region. XI. *Analytical Biochemistry*, 1975, vol. 68, no. 2, pp. 465–484. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90642-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90642-9)
12. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. Methods for the study of proteolysis. *Sovremennye problemy biokhimii. Metody issledovaniy* [Modern problems of biochemistry. Research methods]. Minsk, 2013, pp. 132–157 (in Russian).
13. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S., Votyakov V. I. Effect of organic solvents on the streptokinase initiated fibrinolysis. *Voprosy medicinskoj khimii* [Questions of Medical Chemistry], 1987, vol. 33, no. 1, pp. 84–87 (in Russian).
14. Nikandrov V. N., Pyzhova N. S. Regulatory proteins: functional properties of molecules and mechanisms of their biological action. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2003, no. 3, pp. 75–89 (in Russian).
15. Pyzhova N. S., Nikandrov V. N. The effects of biogenic phosphates on proteinase-induced protein cleavage and functioning of plasminogen activator. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2008, vol. 34, no. 3, pp. 344–352. <https://doi.org/10.1134/s1068162008030163>

Информация об авторах

Ильючик Ирина Анатольевна – аспирант, старший преподаватель. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, Пинск, Республика Беларусь). E-mail: irina.iliuchik@mail.ru.

Никандров Виталий Николаевич – д-р биол. наук, профессор. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, Пинск, Республика Беларусь). E-mail: nikandrov.vitaly@gmail.com.

Information about the authors

Ilyuchyk Irina A. – Postgraduate student, Senior lecturer. Polesky State University (23, Dnieprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: irina.iliuchik@mail.ru.

Nikandrov Vitaliy N. – D. Sc. (Biology), Professor. Polesky State University (23, Dnieprovskaya Flotiliya Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: nikandrov.vitaly@gmail.com.