

ВПЛИВ МЕТАНОЛУ НА ВМІСТ NAD(P)H, ВІЛЬНИХ АМІНОКИСЛОТ І ПРОТЕЇНУ В КЛІТИНАХ *Chlamydomonas reinhardtii*

С. С. СТЕПАНОВ, О. К. ЗОЛОТАРЬОВА

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ;
e-mail: serhiy1986@ukr.net

Відомо, що додавання метанолу в середовище культивування стимулює фотосинтетичну продуктивність деяких видів мікроводоростей, проте вплив його на біохімічний склад їхньої біомаси не вивчено. Метою роботи було визначення впливу метанолу (50 мМ) на вміст протеїну, вільних амінокислот, а також відновлених нікотинамідних коферментів NAD(P)H в культурі одноклітинної зеленої мікроводорості *Chlamydomonas reinhardtii*. Показано, що в умовах освітлення *C. reinhardtii* метанол підвищує внутрішньоклітинний вміст NAD(P)H в чотири рази ефективніше, ніж у темряві. Також збільшується загальний кількісний вміст амінокислот, змінюється їх співвідношення. Зростає вміст глутамінової кислоти, глутаміну, аланіну, серину та тирозину. Вміст метіоніну знижується. Ріст культури з метанолом супроводжується збільшенням вмісту внутрішньоклітинного протеїну на 30% після 20 год культивування. Одержані дані свідчать, що метанол стимулює ріст *C. reinhardtii* не лише внаслідок додаткової утилізації карбону, але й в зв'язку з покращенням асиміляції нітрогену та впливом на енергетичний обмін клітин.

Ключові слова: метанол, *Chlamydomonas reinhardtii*, вільні амінокислоти, загальний протеїн.

В останні роки метанол привертає увагу дослідників як стимулятор росту вищих рослин і мікроводоростей. Метанол значно дешевший за органічні стимулятори росту і позбавлений їхніх недоліків, зокрема не підтримує ріст сторонніх мікроорганізмів [1]. Показано, що стимуляція росту деяких видів мікроводоростей відбувається завдяки утилізації карбону метанолу їх клітинами [1–4]. В літературі існує декілька гіпотез щодо механізмів стимулюючого ефекту метанолу [5, 6]. Згідно з гіпотезою, запропонованою Теодорідоу, метанол окислюється до CO₂ в клітинах мікроводоростей, внаслідок чого підвищується карбоксилуюча активність рибулозо-1,5-дифосфат карбоксилази (Рубіско) і, відповідно, зростає продуктивність фотосинтезу [4]. Однак ця загальноприйнята гіпотеза не узгоджується з результатами досліджень, в яких показано синергічну дію метанолу і високих концентрацій CO₂ (1–3%) на стимуляцію росту мікроводоростей [1, 2]. Отже, не лише окислення метанолу до CO₂ і утилізація останнього в процесі фотосинтезу є причиною стимуляції росту.

Певна роль у стимуляції росту мікроводоростей метанолом, можливо, належить додатковій кількості NADH, який утворюється під час його метаболізації [7]. Від рівня відновленості NAD(P)⁺ залежить,

як відомо, асиміляція нітрогену, біосинтез амінокислот та протеїнів. Біохімічний склад клітин мікроводоростей за культивування з метанолом раніше не вивчався. Метою роботи було визначення впливу стимулюючої ріст концентрації метанолу на вміст протеїну, вільних амінокислот, а також відновлених нікотинамідних коензимів (NAD(P)H) в культурі одноклітинної зеленої мікроводорості *Chlamydomonas reinhardtii*.

Матеріали і методи

Альгологічний матеріал і умови росту. Одноклітинну зеленуводорість *C. reinhardtii* було отримано з колекції культур мікроводоростей відділу мембранології і фітохімії Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (IBASU-B – 163). Накопичувальну автотрофну культуру вирощували в стерильних умовах на рідкому мінімальному поживному середовищі Кеслера [8] в колбах об'ємом 0,5 л з перемішуванням при кімнатній температурі і цілодобовому освітленні білими флуоресцентними лампами з інтенсивністю фотосинтетично активної радіації (ФАР) на поверхні колб 100 мкмоль фотонів·м⁻²·с⁻¹. Попередні досліди показали, що культура *C. reinhardtii* за початкової концентрації клітин 1 млн./мл виходить на експоненційну фазу росту через 3 доби і досягає стаціонарної фази через 7–10

діб культивування. Дослідження з додаванням метанолу проводили в експоненційній фазі росту накопичувальної культури.

Дослідження відновлених форм нікотинамідних коферментів (NAD(P)H). Зміну вмісту NAD(P)H визначали на флуориметрі ХЕ-РАМ (Walz, Німеччина) з використанням набору світлофільтрів, які забезпечують індукцію флуоресценції світлом з довжиною хвилі 366 нм і реестрацію флуоресценції з довжиною хвилі 460 нм [9]. Вимірювання здійснювали в скляній кюветі за постійного перемішування при кімнатній температурі (20–22 °С). У кювету додавали 2 мл досліджуваної культури і визначали початковий рівень флуоресценції NAD(P)H. Далі додавали 20 мкл метанолу і реестрували зміну флуоресценції NAD(P)H. Для калібрування в культуру вносили NADH (SERVA, Німеччина) відомої концентрації (0,005 нМ). За пропорцією розраховували зміну вмісту NAD(P)H за додавання метанолу. Дослід проводили в темряві і під час освітлення мікроводоростей світлом інтенсивністю 100 мкмоль фотонів·м⁻²·с⁻¹. У контрольному варіанті (без мікроводоростей) метанол не змінював флуоресценцію розчину NADH, додавання дистильованої води замість метанолу також не змінювало флуоресценцію NAD(P)H в суспензії мікроводоростей.

Визначення внутрішньоклітинного вмісту протеїну. Проведення аналізу складалося з послідовних етапів:

1) *Підготовка проб для аналізу.* Перед відбором проб культури концентрували до 15–20 млн клітин/мл. Для аналізу використовували 10 мл концентрованої культури. Водорості осаджували центрифугуванням (3000 г, 5 хв). Супернатант зливали і додавали 1 мл екстрагента;

2) *Екстракція протеїну.* Як екстрагент використовували водний розчин 0,1 М С₂Н₄(ОН)₂ в 0,1 М трис-НСІ, рН = 8. Для руйнування клітин і виходу з них протеїну проби поміщали в ультразвукову баню на 10 хв. Після першої екстракції проби залишали на 20 хв при кімнатній температурі. Після відстоювання залишки клітин осаджували центрифугуванням (10 000 г, 10 хв). Супернатант переносили в чисту пробірку, а до осаду, що залишився, знову додавали 1 мл екстрагента і повторювали процедуру екстракції. Другий екстракт об'єднували з першим. Повноту виходу протеїну в екстракт визначали за негативною реакцією на протеїн в третьому екстракті мікроводоростей.

Протеїн виділяли шляхом додавання до об'єданого екстракту 100 мкл чистої

трихлороцтової кислоти. Далі проби поміщали на льодяну баню на 10 хв. Протеїн осаджували центрифугуванням (3000 г, 20 хв). Супернатант зливали і промивали осад дистильованою водою для видалення залишків трихлороцтової кислоти.

До промитого осаду додавали 1 мл ацетону для видалення хлорофілу. Безхлорофільний осад в пробах осаджували центрифугуванням (3000 г, 5 хв). Ацетон із хлорофілом зливали, а осаджений протеїн використовували для аналізу.

До осаду додавали 1 мл 0,1 М NaOH. Проби переносили на киплячу водяну баню на 3 хв для розчинення осаду.

Після охолодження проб кількість протеїну визначали за Лоурі [10], за абсорбцією зразків – при $\lambda = 750$ нм. Кількість протеїну знаходили за калібрувальним графіком. Для калібрування використовували розчин бичачого сироваткового альбуміну (Sigma, США) певної концентрації.

Кількісне визначення пулу вільних амінокислот. Найбільш м'які умови фіксації без пошкодження мембран клітин забезпечує 40%-й водний розчин метанолу, охолоджений до -32 °С [11]. Культури мікроводоростей концентрували центрифугуванням (1500 г, 3 хв). До осаду клітин додавали семикратний об'єм фіксуєчого розчину (40%-й метанол), охолодженого до -32 °С. Фіксовані метанолом клітини переносили в охоложені стакани для центрифугування, центрифугували за 2500 г, 3 хв. Супернатант зливали і залишки розчину відтягували фільтрувальним папером. Як екстрагент використовували суміш метанол : хлороформ : вода в співвідношенні 10 : 3 : 1, охоложену до -32 °С [11]. До пелети додавали 3 мл попередньо охолодженого екстрагента і ресуспендували клітини протягом 2 хв. Для визначення концентрації клітин відбирали 50 мкл. Для покращення екстракції суміш клітин і екстрагента пропускали через голку шприца (5 мл) однакову кількість разів для кожного варіанта. У шприц на 5 мл набирали 3 мл екстракту, вичікували 10 хв і кількісно переносили в центрифужні пробірки, чекали ще 10 хв, перемішуючи вміст пробірки однакове число раз. Для розділення залишків клітин і екстракту проводили центрифугування (9000 г, 10 хв). Супернатант відбирали шприцом (2 мл) і переносили в бюкс для випаровування при кімнатній температурі з метою отримання сухого залишку.

Кількісне визначення амінокислотного складу *C. reinhardtii* проводили методом

колонкової іонообмінної хроматографії на автоматичному аналізаторі амінокислот Т339 (Чехія) з використанням стандартів амінокислот (Sigma, США). Для дослідження впливу метанолу на вміст вільних амінокислот фіксацію культури проводили після 5 год культивування з метанолом (50 мМ), а в контролі без додавання метанолу. Перерахунок робили на певну кількість клітин.

Статистична обробка результатів досліджень. Експерименти проводили не менше ніж у 3 біологічних повторностях (n), їх кількість у межах однієї біологічної також не менше ніж 3. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного (M) зі стандартною похибкою ($m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$). Оцінку значущості різниці

між вибірками проводили за допомогою двовибіркового t -тесту з різними дисперсіями.

Результати і обговорення

Зміну флуоресценції NAD(P)H в культурі *C. reinhardtii* визначали відразу після додавання метилового спирту в середовище культивування до концентрації 100 мМ. Додавання меншої кількості метанолу суттєво не впливало на флуоресценцію NAD(P)H мікродоростей. За освітлення мікродоростей додавання метанолу підвищувало концентрацію NAD(P)H в пробі на 0,003 нМ, в темряві додавання метанолу підвищувало концентрацію NAD(P)H лише на 0,0008 нМ (рис. 1). Тобто на світлі метанол стимулює накопичення відновних еквівалентів в чотири рази ефективніше, ніж у темряві.

Одержані дані підтверджують наше припущення щодо збільшення внутрішньоклітинної концентрації відновлених форм нікотин-

амідних коензимів внаслідок дії метанолу. Також наші дані свідчать на користь світлозалежного характеру метаболізму метанолу [8].

Освітлення мікродоростей, ймовірно, необхідне для швидкого перебігу першої реакції окислення метанолу до формальдегіду. На світлі також збільшується утворення H_2O_2 у хлоропластах внаслідок реакції Мелера [12, 13]. Тому світлозалежний характер метаболізму метанолу можна пояснити його взаємодією з H_2O_2 . Є дані, що метанол спричинює підвищення внутрішньоклітинної концентрації H_2O_2 в культурі клітин *Oncidium* [14]. Додавання інгібіторів алкогольоксидази і NADPH-оксидази знижувало підвищення концентрації H_2O_2 під впливом метанолу. Автори пояснюють збільшення утворення H_2O_2 як наслідок окислення метанолу до формальдегіду за участю алкогольоксидази. Наявність алкогольоксидази в *C. reinhardtii* не доведено. Першу реакцію окислення метанолу до формальдегіду каталізує каталаза, яка використовує ендогенний H_2O_2 як окисник [7]. Таким чином, H_2O_2 може відігравати роль каталізатора окислення метанолу і швидкість метаболізму метанолу може визначатись концентрацією H_2O_2 .

Раніше було показано, що ефективність світлових і темнових стадій фотосинтезу (А) не змінюється під впливом стимулюючої рідт концентрації метанолу [15]. Проте метанол підвищує швидкість темнового мітохондріального дихання (R). Ці дані дозволяють вважати, що внутрішньоклітинна концентрація NADH у присутності метанолу підвищується. Наслідком цього можуть бути зміни у вмісті речовин, утворення яких зале-

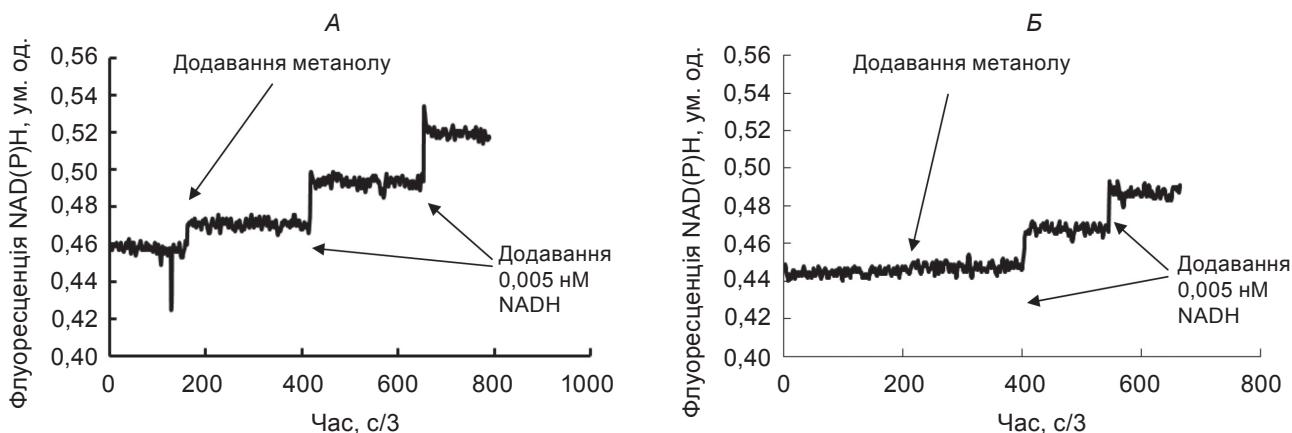


Рис. 1. Зміна флуоресценції NAD(P)H внаслідок додавання метанолу і за відомого вмісту NADH. А – освітлення, Б – темрява

жить від рівня відновленості NAD^+ , зокрема вільних амінокислот і протеїну.

Мивизначали зміну внутрішньоклітинного вмісту протеїну після додавання метанолу в порівнянні з контролем. Використання ультразвукової екстракції для гомогенізації клітин *C. reinhardtii* дає найкращий результат порівняно з розтиранням у ступці чи екстракції за допомогою детергентів. За результатами досліджень, проведених за допомогою світлового мікроскопу, ультразвук руйнує до 90% клітин. Тому подвійна екстракція зразків дозволяла кількісно визначити внутрішньоклітинний вміст протеїну мікроводоростей. В екстракт переходили протеїни водної фракції компартментів клітини. Вивчення впливу метанолу на вміст протеїну проводили в динаміці шляхом відбору проб на 1-, 6-, 20- і 46-у год після додавання 50 мМ метанолу в середовище культивування (рис. 2).

Відразу після додавання метанолу (1 год) вміст протеїну в контрольному і дослідному зразках відрізняється в межах похибки дослідження. Після 6 год з моменту внесення метанолу вміст протеїну в клітинах водорості дещо вище, ніж у контролі. Максимум підвищення вмісту протеїну внаслідок дії метанолу припадає на 20-у год, порівняно з контролем він підвищується на 30%. Але через 46 год відбувається його зниження у варіанті з метанолом на 8% порівняно з контролем.

Такий вплив метилового спирту на внутрішньоклітинний вміст протеїну *C. reinhardtii* досить передбачуваний. Підвищення вмісту протеїну після 20 год з моменту додавання метанолу узгоджується з одержаними даними стосовно підвищення експоненційної швидкості росту наступної доби з моменту додавання метанолу [15]. Поступове підвищення вмісту протеїну свідчить про активізацію метаболізму клітин *C. reinhardtii* у відповідь на метанол. Метанол в концентрації 50 мМ не впливає на проникність мембран та їхню структуру, оскільки відразу після внесення метанолу вміст протеїну не змінюється порівняно з контрольним варіантом. За даними літератури найбільше генів активується після 22 год з моменту обробки листків *A. thaliana* метанолом [16]. Підвищення активності каталази у відповідь на метанол свідчить про активізацію антиоксидантної системи захисту *C. reinhardtii* [17]. Всі наведені вище зміни обміну речовин відбуваються внаслідок підвищення експресії генів відповідних ензимів, що виявляється

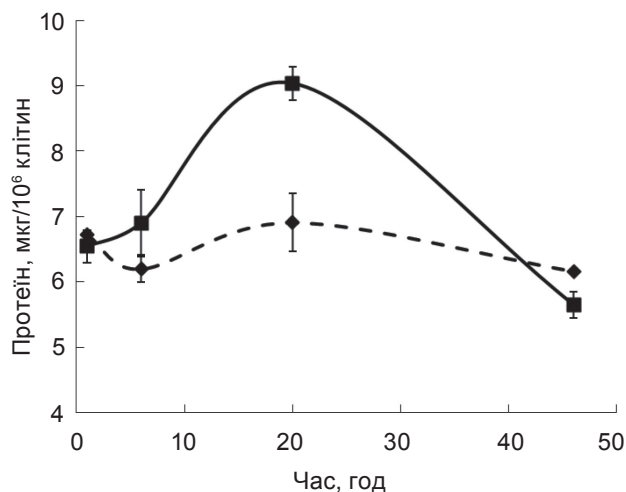


Рис. 2. Внутрішньоклітинний вміст протеїну *C. reinhardtii*. Суцільна крива — з додаванням метанолу 50 мМ, штрихова — контроль. ($M \pm m$, $n = 3$)

у збільшенні внутрішньоклітинного вмісту протеїну.

Кількісний вміст вільних амінокислот визначали в екстрактах клітин *C. reinhardtii* методом колонкової іонообмінної хроматографії. Дослідження виконували на культурах мікроводорості після додавання 50 мМ метанолу в середовище культивування, а в контролі — без додавання метанолу (таблиця). Після 5 год інкубації з метанолом внутрішньоклітинний вміст амінокислот на 23% вище, ніж у контролі за однакових умов. Амінокислоти за типом біосинтезу поділяють на похідні від глутамінової кислоти, аспарагінової кислоти, амінокислоти циклу фотодихання, аліфатичні (розгалужені) і циклічні амінокислоти.

Амінокислоти — похідні глутамінової кислоти. Додавання метанолу вірогідно підвищує вміст глутамінової кислоти, глутаміну і аланіну, але не впливає на вміст аспарагінової кислоти. Найістотніше (в два рази) підвищується вміст глутаміну, який утворюється на першій стадії глутаматсинтазного шляху, тому підвищення вмісту цієї амінокислоти може свідчити про активізацію роботи циклу внаслідок підвищення надходження амонію або підвищення вмісту АТР. Амоній і АТР є субстратами глутамінсинтетази. У *C. reinhardtii* цей ензим представлений двома цитозольними і двома хлоропластними формами [18].

Вміст глутамінової кислоти (глутамату) внаслідок дії метанолу зростає на 47%. Глутамат утворюється на другому етапі глутаматсинтазного циклу внаслідок приєднання кетоглутарату до глутаміну з використан-

Внутрішньоклітинний вміст вільних амінокислот *C. reinhardtii* в контролі та у разі додавання метанолу (50 мМ); мкг/10⁸ клітин

Аміно-кислоти	Контроль	За додавання метанолу
<i>Похідні від глютамінової кислоти</i>		
Glu	0,3387 ± 0,0169	0,4965 ± 0,0248*
Gln	0,0556 ± 0,0088	0,1244 ± 0,0175*
Ala	0,0585 ± 0,0026	0,0718 ± 0,0015*
Arg	0,1711 ± 0,03	0,2044 ± 0,0193
<i>Циклу фотодихання</i>		
Ser	0,0485 ± 0,0041	0,0595 ± 0,0026*
Gly	0,0384 ± 0,0066	0,0461 ± 0,0065
<i>Похідні від аспарагінової кислоти</i>		
Asp	0,0844 ± 0,0216	0,0593 ± 0,0184
Thr	0,0417 ± 0,0074	0,0662 ± 0,024*
Lys	0,0399 ± 0,0026	0,0483 ± 0,0075
Met	0,0083 ± 0,0014	0,0031 ± 0,0001*
<i>Аліфатичні (розгалужені)</i>		
Val	0,0166 ± 0,0009	0,0126 ± 0,0021
Ile	0,0149 ± 0,0019	0,0119 ± 0,0029
Leu	0,0145 ± 0,0087	0,02 ± 0,0007
<i>Ароматичні</i>		
Tyr	0,0163 ± 0,0014	0,0339 ± 0,0059*
Phe	0,0138 ± 0,0054	0,0145 ± 0,0038
<i>Інші</i>		
Cys	0,0073 ± 0,0006	0,0049 ± 0,001
His	0,0083 ± 0,0033	0,0043 ± 0,0013

* Різниця за *t*-тестом вірогідна ($P \leq 0,05$, $n = 8$).

ням енергії NADH або відновленого ферредоксину. Глутамат бере участь у більшості амінотрансферазних реакцій і є донором аміногрупи в реакціях біосинтезу амінокислот і вторинних метаболітів. Тому підвищення вмісту глутамату не таке значне як глутаміну, оскільки він відіграє роль каналу для подальшої утилізації амонію. Глутамат також утворюється завдяки реасиміляції амонію, утвореного в мітохондріях за декарбоксілювання гліцину в процесі фотодихання.

Вміст аланіну зростає на 23% за дії метанолу. Вміст аспарагінової кислоти (аспартату) змінюється незначно. Було показано, що підвищення внутрішньоклітинного вмісту глутамату, аспартату та аланіну відбувається у разі вирощування *C. reinhardtii* в атмосфері,

збагаченій CO₂ [19]. Автори повідомляють про реципрокне підвищення вмісту глутаміну і аспартату в таких умовах.

Амінокислоти циклу фотодихання. Коли мова йде про амінокислоти циклу фотодихання, мають на увазі серин і гліцин, хоча глутамат і аланін також беруть участь у фотодиханні. Гліцин утворюється із гліоксилату в мітохондріях *C. reinhardtii* під час трансамінування із глутаматом. В цитоплазмі гліцин може утворюватись із серину за оберненої серингідроксиметилтрансферазної реакції у присутності H₄-фолату [20]. Гліцин також може утворюватись у мітохондріях внаслідок трансамінування серину із гліоксилатом. Одна молекула серину утворюється із двох молекул гліцину внаслідок послідовної дії гліциндекарбоксілазного комплексу і серингідроксиметилтрансферази в мітохондріях. Крім реакцій циклу фотодихання, серин утворюється шляхом фосфорилування у хлоропластах [21].

Вміст гліцину в клітинах після додавання метанолу підвищується неістотно. Очевидно, метаболізм метанолу не впливає на накопичення гліцину. Під час фотодихання відбувається постійне надходження гліцину в мітохондрії і відтік серину в цитоплазму. У цитоплазмі гліцин і серин взаємно перетворюються завдяки серингідроксиметилтрансферазній реакції, і напрям потоку вуглецевих скелетів цих амінокислот в циклі фотодихання визначається швидкістю утворення гліколату внаслідок оксигеназної активності Рубіско. Було показано, що за адаптації *C. reinhardtii* до зниженого вмісту CO₂ найістотніше збільшується вміст гліцину відповідно до збільшення вмісту гліколату [19]. Наші дані про відсутність впливу метанолу на гліцин дозволяють вважати, що метанол не активізує роботу циклу на рівні утворення гліколату.

Вміст серину в клітинах підвищується порівняно з контролем на 23% завдяки додаванню метанолу. Серин забезпечує потребу клітин в одновуглецевих сполуках, котрі далі використовуються в анаболічних реакціях таких, як біосинтез пуринових нуклеотидів, тимідилату, пантотенату [22]. Підвищення вмісту серину в разі обробки клітин метанолом свідчить про насичення C₁ метаболізму одновуглецевими сполуками завдяки метаболізму метанолу. За цих умов, як відомо, знижується доступність H₄-фолату [22], що призводить до зміни серингідроксиметилтрансферазної реакції в напрямку синтезу серину із гліцину і 5,10-метилентетрагідрофолату. Також

відбувається збільшення відношення серин/гліцин з 1,26 у контролі до 1,3 у присутності метанолу, що свідчить про підвищення ефективності фотодихання в зв'язку з асиміляцією карбону метанолу в циклі фотодихання у формі 5,10-метилентетрагідрофолату [5].

Амінокислоти – похідні аспарагінової кислоти. Біосинтез треоніну, метіоніну і лізину починається з аспартату за розгалуженим шляхом, подібним такому у *C. reinhardtii* і вищих рослин [23]. Внаслідок послідовного фосфорильовання і відновлення аспартату утворюється треонін.

Вміст треоніну в клітинах підвищується на 59%, а метіоніну знижується на 63% за додавання метанолу, а лізину не змінюється. Треонін є попередником у біосинтезі лізину й ізолейцину. У біосинтезі треоніну з аспартату беруть участь АТФ і NADPH, тому підвищення треоніну може відбуватись внаслідок підвищення концентрації цих сполук. Біосинтез треоніну в рослин індукується у відповідь на осмотичний стрес, завдяки чому треонін, подібно до проліну, бере участь у біосинтезі осмолітів [24]. Для вищих рослин відмічають підвищення посухостійкості внаслідок обробки їх метанолом, що виявляється в покращенні врожайності в умовах водного дефіциту [25]. Таке підвищення посухостійкості може відбуватись за активації біосинтезу амінокислот, зокрема треоніну. Зниження внутрішньоклітинного вмісту вільного метіоніну може відбуватись внаслідок активації біосинтезу протеїнів. Додавання метанолу може активувати реакції метилування, відповідальні за біосинтез осмолітів, фосфатидилхоліну і фосфатидилетаноламіну [22, 26], завдяки чому підвищується вміст S-аденозилметіоніну і знижується – метіоніну.

Аліфатичні (розгалужені) амінокислоти. Біосинтез аліфатичних амінокислот у *C. reinhardtii* локалізовано у хлоропластах [27]. Ізолейцин і валін синтезуються паралельними шляхами з використанням однакових ензимів.

В нашому дослідженні додавання метанолу в середовище культивування не впливає на внутрішньоклітинний вміст аліфатичних амінокислот.

Циклічні амінокислоти. Біосинтез циклічних амінокислот у *C. reinhardtii*

відбувається шляхом, подібним до шляху у вищих рослин. Циклічні амінокислоти триптофан, тирозин і фенілаланін утворюються зі спільного попередника хоризмату.

Вміст тирозину підвищується в клітинах *C. reinhardtii* в два рази, а фенілаланіну і гістидину не змінюється. Метанол вибірково підвищує вміст тирозину в клітинах і не впливає на вміст фенілаланіну. Такий вибірковий вплив можна пояснити активацією специфічних ензимів біосинтезу тирозину, наприклад, гідроксилази ароматичних амінокислот. Активація біосинтезу тирозину може відбуватись завдяки реорганізації клітинної оболонки *C. reinhardtii*, в склад якої входить збагачений тирозином глікопротеїн [28].

Отже, додавання метанолу підвищує внутрішньоклітинний вміст амінокислот. Найістотніше зростає концентрація амінокислот, похідних від глутамінової кислоти та циклічних амінокислот. Профіль зміни амінокислотного складу *C. reinhardtii* у відповідь на метанол не характерний для зміни амінокислотного профілю у відповідь на зміну концентрації CO₂. Поступове підвищення внутрішньоклітинного вмісту водорозчинного протеїну та збільшення частки амінокислот глутаматсинтазного циклу може свідчити про активацію асиміляції нітрогену у формі нітрату клітинами *C. reinhardtii*. Підвищення вмісту NADH за рахунок окислення метанолу може підвищувати активність нітратредуктази і, таким чином, впливати на асиміляцію нітрогену. Тому для визначення ролі екзогенного метанолу в стимулюванні асиміляції нітрогену потрібні подальші дослідження з метою визначення зміни активності ключових ензимів обміну нітрогену, таких, як нітрат-, та нітритредуктаза, глутамінсинтетаза, аспаратамінотрансфераза та ін.

У наших дослідженнях встановлено, що додавання метанолу в культуру *C. reinhardtii* підвищує внутрішньоклітинний вміст NAD(P)H, водорозчинних протеїнів і вільних амінокислот. Таким чином, метанол використовується рослинами не лише як джерело карбону, але і як джерело енергії. Тому додавання метанолу створює оптимальні умови для росту мікрородостей за підвищеного вуглецевого живлення.

**ВЛИЯНИЕ МЕТАНОЛА
НА СОДЕРЖАНИЕ NAD(P)H,
СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ
И ПРОТЕИНА В КЛЕТКАХ
*Chlamydomonas reinhardtii***

С. С. Степанов, Е. К. Золотарева

Институт ботаники им. М. Г. Холодного
НАН Украины, Киев;
e-mail: serhiy1986@ukr.net

Известно, что добавление метанола в среду культивирования стимулирует фотосинтетическую продуктивность некоторых видов микроводорослей, но влияние его на биохимический состав их биомассы не исследовано. Целью работы было определение влияния метанола (50 мМ) на содержание протеина, свободных аминокислот, а также восстановленных никотинамидных коэнзимов NAD(P)H в культуре одноклеточной зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Показано, что в условиях освещения *C. reinhardtii* под воздействием метанола внутриклеточное содержание NAD(P)H повышается в четыре раза эффективнее, чем в темноте. Также увеличивается общее количественное содержание аминокислот, меняется их соотношение. Возрастает содержание глутаминовой кислоты, глутамина, аланина, серина и тирозина. Содержание валина и метионина снижается. Рост культуры с метанолом сопровождается увеличением содержания внутриклеточного протеина на 30% после 20 часов культивирования. Полученные данные свидетельствуют, что метанол стимулирует рост *C. reinhardtii* не только в результате дополнительной утилизации углерода, но и в связи с улучшением ассимиляции азота и влиянием на энергетический обмен клеток.

Ключевые слова: метанол, *Chlamydomonas reinhardtii*, свободные аминокислоты, общий протеин.

**INFLUENCE OF METHANOL ON THE
CONTENT OF NAD(P)H, FREE AMINO
ACIDS AND PROTEIN IN THE CELLS
OF *Chlamydomonas reinhardtii***

S. S. Stepanov, E. K. Zolotareva

Kholodny Institute of Botany National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: serhiy1986@ukr.net

It is known that the addition of methanol to the culture medium stimulates the photosynthetic productivity of some species of microalgae, but its influence on the biochemical composition of the biomass has not been investigated. The aim of the present work is to determine the effect of methanol (50 mM) on the content of free amino acids, soluble proteins and reduced nicotinamide coenzyme NAD(P)H in *C. reinhardtii* cells.

It is shown that in case of illumination of *C. reinhardtii* methanol raises intracellular content of NAD(P)H four times more efficiently than in the darkness. Total content of free amino acids is increased and their ratio is changed. The concentration of glutamic acid, glutamine, alanine, serine and tyrosine also increases. The concentration of valine and methionine is reduced. Growth of culture with methanol is followed by an increase in the content of intracellular protein by 30% after 20 hours of cultivation. The obtained data indicate that methanol stimulates growth of *C. reinhardtii*, not only as a result of additional carbon utilization, but also due to improved nitrogen assimilation and the impact on the energy metabolism of cells.

Key words: methanol, *Chlamydomonas reinhardtii*, free amino acids, total protein.

1. Woon-Yong Choi, Sung-Ho Oh, Yong-Chang Seo et al. // Biotechn. Bioprocess Eng. – 2011. – 16, N 5. – P. 946–955.
2. Nonomura A., Benson A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – 89(20). – P. 9794–9798.

3. Kotzabasis K., Hatzathanasiou A., Bengoa-Ruigomez M. V. et al. // J. Biotechnol. – 1999. – **70**, N 1–3. – P. 357–362.
4. Theodoridou A., Dörnemann D., Kotzabasis K. // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – **1573**, N 2. – P. 189–198.
5. Fall R., Benson A. // Trends Plant Sci. – 1996. – **1**, N 9. – P. 296–301.
6. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sundaram S. P., Tongmin S. // Environ. Exp. Bot. – 2006. – **57**. – P. 168–176.
7. Степанов С. С., Золотарьова О. К. // Укр. біохім. журн. – 2011. – **84**, № 4. – С. 5–15.
8. Bishop N. I., Senger H. / Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus* / Methods in Enzymology. – New York: Acad. Press, 1971. – **23**, pt. A. – P. 53–66.
9. Cournac L., Latouche G., Cerovic Z. et al. // Plant Physiology. – 2002. – **129**, N 4. – P. 1921–1928.
10. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randell R. J. // Biol. Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
11. Bölling C., Fiehn O. // Plant Physiol. – 2005. – **139**, N 4. – P. 1995–2005.
12. Whitehouse D. G. // J. Exp. Bot. – 1971. – **22**, N 4. – P. 772–791.
13. Kisaki T., Tolbert N. E. // Plant Physiol. – 1969. – **44**, N 2. – P. 242–250.
14. Shen C. H., Yeh K. W. // J. Plant Physiol. – 2010. – **167**, N 5. – P. 400–407.
15. Степанов С. С., Золотарева Е. К. // Альгология. – 2011. – **21**, № 2. – С. 178–189.
16. Downie A., Miyazaki S., Bohnert H. et al. // Phytochemistry. – 2004. – **65**(16). – P. 2305–2316.
17. Степанов С. С., Білявська Н. О., Золотарьова О. К. // Доповіді НАН України. – 2012. – **4**. – С. 162–167.
18. Florencio F. J., Vega J. M. // Z. Naturforsch. – 1983. – **38**(c). – P. 531–538.
19. Renberg L., Johansson A. I., Shutova T. et al. // Plant Physiol. – 2010. – **154**. – P. 187–196.
20. Hanson A. D., Roje S. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – **52**(1). – P. 119–137.
21. Ho C. L., Saito K. // Amino Acids – 2001. – **20**. – P. 243–259.
22. Gout E., Aubert S., Bligny R. et al. // Plant Physiol. – 2000. – **123**. – P. 287–296.
23. Harris E. H. / The Chlamydomonas Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes. – Academic press Inc, Canada. – 2009. – P. 271–275.
24. Kovács Z., Simon-Sarkadi L., Vashegyi I., Kocsy G. // Sci. World J. – 2012. doi:10.1100.
25. Mirakhori M., Paknejad F., Moradi F. et al. // Am. J. Biochem. Biotechnol. – 2009. – **5**, N 4. – P. 162–169.
26. Cossins R. // Can. J. Biochem. – 1964. – **44**. – P. 1739–1802.
27. Singh B. K., Shaner D. L. // Plant Cell. – 1995. – **7**. – P. 935–944.
28. Waffenschmidt S., Woessner J. P., Beer K., Goodenough U. W. // Plant Cell. – 1993. – **5**, N 7. – P. 809–820.

Отримано 13.03.2013