

**Mirzaeva Sh.U.¹, Khalilov I.M.², Mukhamadiev B.T.³, Khalilova F.M.¹,
Jalolov E.B.¹**

¹Bukhara State University, Bukhara c., Uzbekistan

²Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Republic of
Uzbekistan, Bukhara c., Uzbekistan

³Bukhara State Technical University, Bukhara c., Uzbekistan

EXTRACELLULAR PEPTIDES OF MUTANTS – CHLORELLA FEEDERS

Abstract. This article presents data from the analysis of biomass and culture medium concerning the content of sulfur-containing amino acids in mutants designated as “feeders” of Chlorella, utilizing the method of radioactive indicators. The objective of this study is to address the question of the nature of the substances responsible for the “feeding” effect attributed to the extracellular products of the mutant “feeders.” To achieve this, a radiochemical method was employed to determine the relative quantities of the sulfur-containing amino acids methionine and cysteine in the biomass and culture medium of various Chlorella mutants, using radioactive sulfur S³⁵. The method for determining the relative amounts of sulfur-containing amino acids in the biomass and culture medium of Chlorella “feeder” mutants is described. It is demonstrated that mutants 94, U-6, U-7, and 722-2-S accumulate cysteine in their proteins at levels 2-3 times higher than those found in the original strain B, while in the peptide fraction (in the medium), the accumulation is nearly six times greater. Low molecular weight peptides find extensive applications in the food, pharmaceutical, and medical industries. They also serve as foundational models for biochemical, genetic, and molecular-biological research. Specifically, these peptides influence the DNA of aged cells, prompting their activation and thereby rejuvenating them. The application sphere of chlorella and other algae encompasses agriculture, where they serve as fertilizers and growth stimulants; medicine, cosmetology, and sports for detoxification and immune system enhancement; aquaculture for oxygen enrichment of water and improving fish health; as well as in the production of biofuels, bioplastics, and as feed additives.

Keywords: chlorella, mutant, feeder, methionine, cysteine, chromatography, radioactive indicator.

Introduction. The industrial utilization of *Chlorella* and other algae necessitates the development of principles and methods for the selection of these organisms. A number of studies [1-4] have demonstrated that the selection of beneficial forms and the assessment of their efficacy can be conducted using microbiological qualitative methods. This method is based on the so-called “feeding effect,” which is identified by the ring of auxotrophic mutants that develop around *Chlorella* colonies. However, it is important to note that the “feeding effect,” as determined by this method, does not yet provide answers to the following questions: 1) What is the underlying mechanism of this effect? Is it due to the active secretion of specific metabolites by *Chlorella*, or is it a result of autolysis and the release of the same substances into the surrounding environment? 2) If the “feeding effect” [8] is attributed to extracellular products from the mutants – termed “feeders” – what is the nature of these substances that elicit this effect? Furthermore, it remains challenging to ascertain the nature of extracellular products [5-10]. The previous work [3] has provided an answer to the first question, specifically that the “feeder” effect is attributed to the extracellular products of mutants.

The aim of the study. The aim of the study is to investigate the substances that cause the nature of “feeding”. To achieve this, a radiochemical method was employed to determine the relative quantities of sulfur-containing amino acids-methionine and cysteine-in the biomass and culture medium of several *Chlorella* mutants using radioactive sulfur S^{35} [11-12].

Materials and Methods of Research. The following strains of *Chlorella* were used as material for the study: Strain B - *Chlorella vulgaris*-served as the starting format for obtaining mutants K-94, U-6, U-7, 283-4, 322, 7179, 7199, 7255, 7232, and 7-22-2-S, which were utilized as controls. The *Chlorella* culture was grown in a sulfur-depleted inorganic medium with the following composition:

KNO_3 5 g/L
 $Mg(NO_3)_2$ 2.5 g/L
 KH_2PO_4 1.25 g/L
 $MgSO_4$ 0.083 g/L
 Glucose 10 g/L

To this solution, $Na_2S_{35}O_4$ with an activity of 2 μC was added in the amount of the indicator. A two-day algal culture was cultivated in flasks containing 15.0 mL of medium under illumination. The light intensity was 5000 lux. The initial cell density was 2×10^6 cells per mL. The duration of the experiment was 10 days. During this period, a sufficient amount of biomass (approximately 100 mg) was obtained for further analyses. The cells were separated from the culture medium by centrifugation. The cells were then extracted three times with 80% ethanol to remove lipids, carbohydrates, and other low-molecular-weight substances [13]. The extract was isolated through extraction but exhibited negligible activity, leading to its disposal. Further processing of the cells involved hydrolysis using equal volumes of concentrated HCl and CH_3COOH . The algae were transferred into an ampoule from which air was displaced with CO_2 . The presence of O_2 dur-

ing hydrolysis reduces the yield of amino acids. The ampoule was then sealed. Hydrolysis was conducted in a thermostat at 105°C for a duration of 28 min. The hydrolysate was subjected to chromatography (Amstell chromatograph, UK) in a solvent system comprising n-butanol, acetic acid, and water in a ratio of 4:1:5. Prior to chromatography, it was essential to separate mechanical impurities and remove HCl [11]. To achieve this, the hydrolysate was applied using a pipette onto a Büchner funnel lined with a double layer of filter paper. The liquid was filtered under vacuum. For enhanced desorption of amino acids, both the ampoule and the filter were rinsed three times with small portions of water. The hydrolysate was then concentrated under vacuum. To ensure the complete removal of HCl during the evaporation process, it was necessary to add 2 ml of water several times [14-20].

Chromatographic analysis of the nutrient medium was performed similarly. Equal amounts (by weight) of the hydrolysates were chromatographed to facilitate comparison of the activities between the mutant strains and the original strains. The fractions obtained from the chromatograms were dried, and the activity measurements were conducted [14].

Results and Discussion. The experiment consisted of four repetitions, the results of which are summarized and presented in Tables 1 and 2. Table 1 provides data regarding the accumulation of radioactive sulfur by the biomass of the strains. The values of specific activities (activity per 10^6 cells and activity per mg of dry biomass) corresponding to the control strains (strain B and 283-4) are set at 100% [21-30]. As shown in this table, the specific activity values of the investigated strains are 1.5 to 2.0 times greater compared to the control strains. To further characterize the strains, we conducted an analysis of the biomass for sulfur-containing amino acids. The absence of significant amounts of activity in the alcoholic extract indicates that sulfur-containing amino acids are predominantly located in the protein portion of the cells [31].

As indicated in Table 2, which presents data obtained from the chromatographic analysis of the alcohol-insoluble fraction following its hydrolysis, the activity corresponding to cysteine in the chromatograms of strains 94, U-6, U-7, and 722-2-S is 2 to 3 times greater compared to the control strain B. In contrast, the activity of methionine remains nearly identical across all these strains. Furthermore, in the strains 722, 7179, 7199, 7232, and 7255, the activity of methionine is 1.5 to 3.0 times higher compared to the control strain 283-4, while the activity of cysteine is elevated up to 1.5 times [32-35]. The examined strains exhibited an increase in activity not only in the alcohol-insoluble fraction but also in the culture medium (Table 3). Table 3 presents the data from the chromatographic analysis of the medium following its hydrolysis. As shown in this table, strains 94, U-6, U-7, and 722-2-S accumulate cysteine in the medium to a concentration that exceeds the control by up to six times, whereas strains 722, 7179, and 7199 accumulate methionine at levels up to five times higher compared to the control strain 283-4.

Table 4 presents the values of R_f obtained from the chromatographic analysis of the nutrient medium before and after hydrolysis. The values of R_f changed as a result of hydrolysis, suggesting that methionine and cysteine accumulate in the

medium not in their free form. It is possible that the alteration in the R_f values is due to the chemical transformations of these amino acids during hydrolysis [36-38].

The results we obtained are consistent with the data available in the literature. Specifically, Kanazawa [10], in studying the ontogenetic variability of the amino acid composition of *Chl. ellip.*, found that methionine and cysteine do not occur in free form but rather as peptides and within proteins. This finding is corroborated by the lack of activity in the alcohol-soluble fraction, where free amino acids and peptides, along with other substances from the strains we studied, should have been extracted, assuming that sulfur-containing amino acids existing in peptide form are nearly completely released into the culture medium [35-37]. Kanazawa's findings [10] suggest that there may be two extreme types of mutants, accumulating methionine and cysteine in either an increased quantity within proteins or within peptides. However, if we assume that the content of amino acids in the first is directly or indirectly related to their content in the second [10], it is possible that there will be mutants with an increased concentration of cysteine and methionine in both proteins and peptides, a hypothesis that is supported by our data (Tables 2 and 3).

Prospects for the application of low-molecular-weight peptides in gerontology include:

1. Heterogeneity of age and algal peptides;
2. Control and management of the synthesis and remodeling of algal peptides;
3. Peptide bioregulators in geriatrics;
4. Characterization of anxiety levels and quality of life;
5. Peptideology of emotions;
6. Algal peptides and intermolecular mechanisms of human body protection;
7. Algal peptides as microbiota correctors.

Table 1 - Specific Activities of Strains (as a percentage of control)

Strain	Activity	
	per 10 ⁶ cells	per mg of biomass
B, control	100	100
94	185	181
U-6	285	219
U-7	175	134
722-2-S	145	159
283-4, control	100	100
722	201	127
7179	106	144
7199	168	148
7232	162	145
7255	196	186

Table 2 - Activity of Cysteine – A_1 and Methionine – A_2 on Chromatograms of Hydromezon Medium (imp/min) and Their Ratios to the Activity of Control Strains (A_1/A_0 и A_2/A_0)

Strain	A_1	A_1/A_0	Strain	A_1	A_1/A_0
B, control	380	1	283-4 control	590	1
94	2170	5,71	7-22	1050	1,78
U-6	1420	3,74	7-179	1700	2,89
U-7	1770	4,70	7-199	1860	3,15
722-2-S	2030	5,34	7232	1940	3,28
			7255	2810	4,77

Table 3 - Activity of Cysteine (A_1) and Methionine (A_2) on Chromatograms of Hydrolysates of Alcohol-Insoluble Fractions of Strains and Their Ratios to the Activity of Corresponding Amino Acids (A_1/A_{01} и A_2/A_{02}) of Control Strains (B, 283-4)

Strain	A_1	A_2	A_1/A_{01}	A_2/A_{02}
B, control	810	1120	1,0	1,0
94	1550	1190	1,91	1,06
U – 6	2520	1190	3,11	1,06
U – 7	2010	1110	2,48	0,99
722-2-S	1700	1620	2,10	1,46
283-4, control	810	780	1,0	1,0
7-22	1070	2280	1,32	2,92
7-179	980	1060	1,21	1,36
7-199	1130	1090	1,40	1,40
7232	1050	1320	1,30	1,69
7255	970	1570	1,20	2,01

Table 4 - R_f Values (S^{35} -containing chromatographic analysis of medium components before (R_{f1}) and after (R_{f2}) Hydrolysis

Strain	R_{f1}	R_{f2}	Strain	R_{f1}	R_{f2}
B, control	0,10	0,08	283-4, control	0,10	0,20
94	0,10	0,08	722	0,10	0,20
U – 6	0,12	0,08	7179	0,12	0,20
U – 7	0,12	0,08	7199	0,10	0,20
722-2-S	0,12	0,10	7232	0,12	0,20
			7255	0,16	0,20

Conclusion: A method for determining the relative quantities of sulfur-containing amino acids in biomass and in the culture medium of *Chlorella* mutants, referred to as “feeders,” has been described. It has been demonstrated that mutants 94, U – 6, U – 7, and 722-2-S accumulate cysteine in their proteins at levels 2 to

3 times higher than those of the original strain B, while in the peptide fraction (in the medium), the accumulation is nearly 6 times greater. Mutants 722, 7179, 7199, 7232, and 7255 not only accumulate more methionine in proteins and peptides (in the medium) compared to the original strain 288-4, but they also exhibit higher levels of cysteine in their proteins.

References /Список литературы

- 1 Квитко К.В., Мухамадиев Б.Т. "Перспективы использования мутантов одноклеточных водорослей при контролируемых условиях культивирования" В сб. "Управляемый биосинтез", "Наука", Москва, С.-252-262, 2006. [Kvitko K.V., Mukhamadiev B.T. "Prospects for the use of mutants of unicellular algae under controlled cultivation conditions" In the collection "Controlled biosynthesis", "Science", Moscow, pp. 252-262, 2006]
- 2 Квитко К.В., и др. "Некоторые принципы генетико-селекционной работы с микроорганизмами в применении к хлорелле", Генетика 2, С. -148, 2008 [Kvitko K.V., et al. "Some principles of genetic selection work with microorganisms as applied to chlorella", Genetics 2, p. -148, 2008]
- 3 Квитко К.В., Мухамадиев Б.Т. "Опыт селекции хлореллы на измененный биохимический состав с использованием спонтанных и индуцированных мутантов" В сб. "Экспериментальный мутагенез у животных, растений и микроорганизмов", Москва, С. 11,44, 2013. [Kvitko K.V., Mukhamadiev B.T. "Experience of Chlorella Selection for Altered Biochemical Composition Using Spontaneous and Induced Mutants" In the collection "Experimental Mutagenesis in Animals, Plants, and Microorganisms", Moscow, pp. 11.44, 2013.]
- 4 Mirzaeva Sh. U., Muxamadiev B. T., Perspective Theoretical Foundations of the Extraction Process, Sulfur Dioxide Chemistry and Environmental Impact, 2024, IntechOpen.
- 5 Гафуров К.Х., Мухаммадиев Б.Т., Мирзаева Ш.У., Сверхкритическая [СК] CO₂ экстракция глицирризиновой кислоты из лакричных корней, Бултеровские сообщения №1, том 49. 2017, Татарстан, С. 108-114. [Gafurov K.Kh., Mukhammadiev B.T., Mirzaeva Sh.U., Supercritical [SC] CO₂ extraction of glycyrrhizic acid from licorice roots, Butlerov Communications No. 1, Vol. 49. 2017, Tatarstan, pp. 108-114]
- 6 Mirzaeva Sh.U., Gafurov K.Kh., Zhumaev Zh., Certificate of official registration of the program for electronic computers. Computer program Optimization of the process of obtaining CO₂ extract from licorice root. DGU 09833 (2021)
- 7 Gafurov K.X., Muxammadiyev B.T, Kuldosheva F.S., Obtaining extracts from plant raw materials using carbon dioxide, Food Science and Technology, Scientific and Production Journal Odessa, Vol. 14 No. 1 (2023), Web of science journal.
- 8 Ilkhom Khalilov, Firuza Abdullayeva, Niyozgul Xodjiyeva, Shoxista Mirzaeva, Optimization of the process CO₂ - extraction of plant raw material, BIO Web of Conferences 141, 01030 (2024) AGRICULTURAL SCIENCE 2024.
- 9 Громов Б.В., Авиллов И.А. "Фенетическая классификация водорослей рода Chlorellif" Вестник ДГУ, С. 9, 2,118, 1985. [Gromov B.V., Avilov I.A. "Phenetic classification of algae of the genus Chlorellif" Vestnik DSU, pp. 9, 2,118, 1985.]
- 10 Kanazawa T., Changes of aminoacid composition of Chlorella cells during her life's of cycle . Plant and Cell Physiology, С.15,13, 2014.
- 11 Мухамадиев Б.Т. "Эффект фидерства и хлореллы, связанный с выделением в среде аргининсодержащих пептидов" Вестник ЛГУ, 1970. [Mukhamadiev B.T. "The effect of

n-chloroulli feeder activity associated with the release of arginine-containing peptides into the medium" Vestnik LSU, 1970.]

12 Материалы международного пептидного симпозиума, 13-14 VI, 2024 г., Москва, Россия. [Proceedings of the International Peptide Symposium, VI 13-14, 2024, Moscow, Russia.]

13 *Mirzaeva Shoxista, Laziz Yuldoshov, Niyozgul Xodjiyeva*, CO₂ - extraction of glycyrrhizic acid from licorice root: optimization of extraction conditions using RSM, BIO Web Conferences 113, 01004 <https://doi.org/10.1051/bioconf/202411301004>.

14 *Джурраев Х.Ф., Мухаммадиев Б.Т., Мирзаева Ш.У.*, Исследование Международная сверхкритических CO₂ научно-практическая Ф.С. Кудлошева, экстрактов заочная листьев солодки, конференция 330 «Биотехнологические, экологические и экономические аспекты создания безопасных продуктов питания специализированного назначения», Краснодар, 2020, С. 21-27. [Dzhuraev Kh.F., Muhammadiev B.T., Mirzaeva Sh.U., Research of the International supercritical CO₂ scientific and practical F.S. Kuldosheva, absentee licorice leaf extracts, conference 330 "Biotechnological, environmental and economic aspects of creating safe food products for special purposes", Krasnodar, 2020, pp. 21-27.]

15 Старость в России, Если быть точным [Электронный ресурс] <https://tochno.st/problems/ageing> [Old Age in Russia, To Be Precise [Electronic Resource]: <https://tochno.st/problems/ageing>]

16 *Ikramova M L, Buriev SB, Yuldoshov LT, Karimova M F*. Use of chlorella on arid and saline soils of the Bukhara region. Scientific and information magazine of Bukhara State University No. (1), 2024. 94-98 pp. [In Uzbek.].

17 *Uzhanova A.S.* Systematic characteristics of chlorella. Its production and application. - Scientific Bulletin No. 1 (1), 2014. - P. 113. [(In Russ.).]

18 *Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.Y., & Vaca-Garcia, C.* (2014). "Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review". Renewable and Sustainable Energy Reviews. 35: 265-278.

19 *Karpushin G. N.* Possibilities of using chlorella in the medical and agricultural industry. *Jorun. Agrarian History*, № 18, 2024. 22-29 pp. Creative Commons Attribution 4.0 International License. Journal website: https://agrarianhistory.com/O_zhurnale.

20 *Muzaffarov, A M, Taubaev T T*. Chlorella. Tashkent: Fan. 1974. - P. 131 // *Muzaffarov, A.M. Taubaev. T. T. Chlorella. Tashkent: The science. 1974. - P. 131. [In Uzbek.].*

21 *Jumanieзов, I. et al.* Complex use of chlorella in agriculture. Tashkent: Mehnat, 2000. - P. 55// *Jumanieзов, I. and so on.* Complex use of chlorella in agriculture. Tashkent: From, 2000. - P. 55. [In Uzbek.].

22 *Muminova R, Rozmatov R Z*. The role of algae in water purification. Scientific Bulletin of Namangan State University. 2020: 2(9), pp.96-100. // *Muminova R.N., Rozmatov R Z*. The role of algae in water purification. Scientific Bulletin of Namangan State University. 2020: 2(9), pp.96-100. [In Uzbek.].

23 *Muminova, R.* Application of chlorella in cultivation of cultivated plants. *Farg'ona Davlat Universiteti*, 2023. 29(1), 205. Retrieved from <https://journal.fdu.uz/index.php/sjfsu/article/view/1209> [In Uzbek.].

24 *Chmulev I.S.* research on the influence of chlorella vulgaris bin microalgae suspension on potato varieties and samples, carried out for the first time in the magadan region. International Research Journal , No. 1 2023 (127) January plant breeding, seed production and biotechnology DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.127.31> [(In Russ.).]

25 *Buriev S B , Kabilov A M* Cultivation of chlorella vulgaris and its use for fish feeding. Journal of biology and ecology Tashkent: 2019 No. 2: 45-49b[(In Russ.).]

- 26 Buriev S.B., Rashidov N.E., Kalandarova D.S., Kenzhaeva J. Microscopic and higher aquatic plants of fish ponds, their use in fish farming // Scientific and practical achievements and modern problems in the field of botany. Res. conf. Samarkand 2014. P. 14-15. [In Uzbek.].
- 27 Ikramova M L, Rakhmatov B N, Yunusov R Yu. ³ Application of under- film drip irrigation for high yield yields in saline soils and global warming. «E3S Web of Conferences».2023, <https://www.universitetam.ru/ojs/index.php/e3swebofconferences/authorDashboard/submission/4731>
- 28 Ikramova M L¹, Rakhmatov B N Gaffarov I Ch³, Jalliev B A⁴. Methods for converting unsuitable saline lands into suitable soils using the “Coal Acid Utility Model” «E3S Web of Conferences».2023, апрель <https://www.universitetam.ru/ojs/index.php/e3swebofconferences/authorDashboard/submission/4731>
- 29 Liu L., Pohnert G., & Wei D. (2016). Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. *Marine drugs*, 14(10), P.-191.
- 30 Amin M. A., Chondra U., & Alam M. M. (2024). In Silico Assessment of Photosystem I P700 Chlorophyll a Apoprotein A2 (PsaB) from *Chlorella vulgaris* (green microalga) as a Source of Bioactive Peptides. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, 9(3), 153-168.
- 31 Guarnieri M. T., Nag A., Yang S., & Pienkos P. T. (2013). Proteomic analysis of *Chlorella vulgaris*: potential targets for enhanced lipid accumulation. *Journal of proteomics*, 93, 245-253.
- 32 Costa M. M., Spínola M. P., Alves, V. D., & Prates J. A. M. (2024). Improving protein extraction and peptide production from *Chlorella vulgaris* using combined mechanical/ physical and enzymatic pre-treatments. *Heliyon*, 10(12).
- 33 Liu L., Pohnert G., & Wei D. (2016). Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. *Marine drugs*, 14(10), 191.
- 34 Wu Q., Ma Y., Zhang L., Han J., Lei Y., Le Y., ... & Fu, C. (2023). Extraction, functionality, and applications of *Chlorella pyrenoidosa* protein/peptide. *Current Research in Food Science*, 7, 100621.
- 35 Liu H., Xian M., Cao Y., Guo J., Kan L., & Xu X. (2023). Omics integration for in-depth understanding of the low-carbon co-culture platform system of *Chlorella vulgaris*-*Escherichia coli*. *Algal Research*, 75, 103252.
- 36 Amin M. A., Chondra U., & Alam M. M. (2024). In Silico Assessment of Photosystem I P700 Chlorophyll a Apoprotein A2 (PsaB) from *Chlorella vulgaris* (green microalga) as a Source of Bioactive Peptides. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, 9(3), 153-168.
- 37 Liu J., & Chen F. (2014). Biology and industrial applications of *Chlorella*: advances and prospects. *Microalgae biotechnology*, 1-35.
- 38 Anand S., & Padmanabhan P. (2024). Omics approach for enhanced microalgae biomass production with the improved concentration of desired biomolecules. In *Recent Trends and Developments in Algal Biofuels and Biorefinery* (pp. 367-381). Cham: Springer Nature Switzerland

Мирзаева Ш.У.¹, Халилов И.М.², Мухамадиев Б.Т.³, Халилова Ф.М.¹, Жалолов Э.Б.¹

¹Бухара мемлекеттік университеті, Бухара қ., Өзбекстан

²Өзбекстан Республикасы Ғылым академиясының Микробиология институты, Бухара қ., Өзбекстан

³Бухара мемлекеттік техникалық университеті, Бухара қ., Өзбекстан

ХЛОРЕЛЛА ФИДЕР МУТАНТТАРЫНЫҢ ЖАСУШАДАН ТЫС ПЕПТИДТЕРІ

Түйіндеме. Мақалада радиоактивті индикаторлар әдісін қолдана отырып, хлорелланың «фидерлері» мутанттарындағы күкірті бар аминқышқылдарының болуына байланысты биомасса мен культуралық ортаны талдау деректері келтірілген. Жұмыстың мақсаты – «фидерлер» мутанттарының жасушадан тыс өнімдеріне байланысты «фидерлік» әсерін тудыратын заттардың табиғаты қандай деген сұраққа жауап. Ол үшін радиоактивті күкірт S^{35} көмегімен бірқатар хлорелла мутанттарының биомассасы мен өсінділер ортасындағы күкірті бар аминқышқылдарының – метионин мен цистеиннің салыстырмалы мөлшерін анықтаудың радиохимиялық әдісі қолданылды. Биомассадағы және хлорелла «фидер» мутанттарының өсінділер ортасындағы күкірті бар аминқышқылдарының салыстырмалы мөлшерін анықтау әдісі сипатталған. 94, U-6, U-7, 722-2-s мутанттары ақуыздарда циттеинді бастапқы В штаммынан 2-3 есе, ал пептидтік фракцияда (ортада) шамамен 6 есе көп жинайтыны көрсетілген. 722, 7179, 7199, 7232, 7255 мутанттары бастапқы 288-4 штаммымен салыстырғанда белоктар мен пептидтердегі метионинді ғана емес, сонымен қатар белоктардағы цистеинді де жинақтайды. Төмен молекулалық пептидтер тамақ, фармацевтика және медицина салаларында кеңінен қолданылады. Олар сонымен қатар биохимиялық, генетикалық және молекулалық биологиялық зерттеулердің бастапқы үлгілері болып табылады. Атап айтқанда, олар ескі жасушалардың ДНҚ-сына әсер етеді және олардың белсендірілуіне әкеледі және осылайша бұл жасушаларды жасартады. Хлорелла мен басқа балдырлардың қолданылу аясы – тыңайтқыш және өсу стимуляторы ретінде өсімдік шаруашылығында; детоксикация және иммунитетті нығайту үшін медицинада, косметологияда және спортта; суды оттегімен байытып, балықтың жағдайын жақсарту үшін аквашаруашылықта; сонымен қатар биоотын, биопластика өндірісінде және жемшөп қоспасы ретінде.

Түйінді сөздер: хлорелла, мутант, фидер, метионин, цистеин, хроматография, радиоактивті индикатор.

Мирзаева Ш.У.¹, Халилов И.М.², Мухамадиев Б.Т.³, Халилова Ф.М.¹, Жалолов Э.Б.¹

¹Бухарский государственный университет, г. Бухара, Узбекистан

²Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, г. Бухара, Узбекистан

³Бухарский государственный технический университет, г. Бухара, Узбекистан

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПЕПТИДЫ МУТАНТОВ – ФИДЕРОВ ХЛОРЕЛЛЫ

Аннотация. В статье приводятся данные анализа биомассы и культуральной среды на содержание серосодержащих аминокислот у мутантов – “фидеров” хлореллы, используя метод радиоактивных индикаторов. Цель работы – ответ на вопрос какова природа

веществ, вызывающий эффект «фидерства» обусловленный внеклеточными продуктами мутантов – «фидеров». Для этого использовался радиохимический метод определения относительных количеств серосодержащих аминокислот – метионина и цистеина в биомассе и культуральной среде ряда мутантов хлореллы с помощью радиоактивной серы S^{35} . Описан метод определения относительных количеств серосодержащих аминокислот в биомассе и в культуральной среде мутантов – «фидеров» хлореллы. Показано, что мутанты 94, U-6, U-7, 722-2-S накапливают в белках цистеин в 2-3 раза больше, чем исходный штамм В, а в пептидной фракции (в среде) больше почти в 6 раз. Мутанты 722, 7179, 7199, 7232, 7255 накапливают, по сравнению с исходным штаммом 288-4, больше не только метионина в белках и пептидах, а также цистеина в белках. Низкомолекулярные пептиды находят широкое применение в пищевой, фармацевтической и медицинской отрасли. Они также являются исходными моделями для биохимических, генетических и молекулярно-биологических исследований. В частности, они влияют на ДНК старых клеток и вызывают их активацию и тем самым омолаживают эти клетки. Сфера применения хлореллы и других водорослей – растениеводство, как удобрение и стимулятор роста; медицина, косметология и спорт для детоксикации и укрепления иммунитета; в аквакультуре для обогащения воды кислородом и улучшения состояния рыб; а также в производстве биотоплива, биопластиков и как кормовая добавка.

Ключевые слова: хлорелла, мутант, фидер, метионин, цистеин, хроматография, радиоактивный индикатор.

Авторлар туралы мәліметтер

Халилов Илхом Маматкулович – биология ғылымдарының докторы, профессор, Өзбекстан Республикасы Ғылым академиясының Микробиология институты, Бұхара қ, Өзбекстан, ilkhom2002@yahoo.com

Мухамадиев Баходир Тимурович – биология ғылымдарының кандидаты, доцент, Бұхара мемлекеттік техникалық университетінің өнеркәсіптік экология кафедрасы, Бұхара қ, Өзбекстан, shohista.m@rambler.ru

Мирзаева Шохиста Усмоновна – техника ғылымдарының докторы (PhD), доцент, Бұхара мемлекеттік университетінің биотехнология және азық-түлік қауіпсіздігі кафедрасы, Бұхара қ, Өзбекстан, shohista.m@rambler.ru

Халилова Феруза Маматкуловна – Бұхара мемлекеттік университетінің «Биология» кафедрасының оқытушысы, Бұхара қ, Өзбекстан, ilkhom2002@yahoo.com

Жалолов Элбек Бахшиллоевич – Бұхара мемлекеттік университетінің оқытушысы, Бұхара қ, Өзбекстан, b.jalolov@buxdu.uz

Сведения об авторах

Халилов Илхом Маматкулович – доктор биологических наук, профессор, Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, г. Бухара, Узбекистан, ilkhom2002@yahoo.com

Мухамадиев Баходир Тимурович – кандидат биологических наук, доцент кафедра Промышленная экология, Бухарский государственный технический университет, г. Бухара, Узбекистан, shohista.m@rambler.ru

Мирзаева Шохиста Усмоновна – доктор технических наук (PhD), доцент кафедра

Биотехнология и пищевая безопасность, Бухарский государственный университет, г. Бухара, Узбекистан, shohista.m@rambler.ru

Халилова Феруза Маматкуловна – преподаватель, Бухарский государственный университет кафедра «Биология», г. Бухара, Узбекистан, ilkhom2002@yahoo.com

Жалолов Элбек Бахшиллоевич – преподаватель, Бухарский государственный университет, г. Бухара, Узбекистан, e.b.jalolov@buxdu.uz

Information about the authors

Khalilov Ilkhom Mamatkulovich – Doctor of Biological Sciences, Professor, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Bukhara c., Uzbekistan, ilkhom2002@yahoo.com

Mukhamadiev Bakhodir Timurovich – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of Industrial Ecology, Bukhara State Technical University, Bukhara c., Uzbekistan, shohista.m@rambler.ru

Mirzaeva Shokhista Usmonovna – Doctor of Technical Sciences (PhD), Associate Professor, Department of Biotechnology and Food Safety, Bukhara State University, Bukhara c., Uzbekistan, shohista.m@rambler.ru

Khalilova Feruza Mamatkulovna – Lecturer, Department of Biology, Bukhara State University, Bukhara c., Uzbekistan, ilkhom2002@yahoo.com

Jalolov Elbek Bakhshilloevich – lecturer, Bukhara State University, Bukhara c., Uzbekistan, e.b.jalolov@buxdu.uz

ПЕРЕВОД СТАТЬИ / МАҚАЛАНЫҢ АУДАРМАСЫ

Мирзаева Ш.У.¹, Халилов И.М.², Мухамадиев Б.Т.³, Халилова Ф.М.¹, Жалолов Э.Б.¹

¹Бухарский государственный университет, г. Бухара, Узбекистан

²Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, г. Бухара, Узбекистан

³Бухарский государственный технический университет, г. Бухара, Узбекистан

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПЕПТИДЫ МУТАНТОВ – ФИДЕРОВ ХЛОРЕЛЛЫ

Аннотация. В статье приводятся данные анализа биомассы и культуральной среды на содержание серосодержащих аминокислот у мутантов – «фидеров» хлореллы, используя метод радиоактивных индикаторов. Цель работы – ответ на вопрос какова природа веществ, вызывающий эффект «фидерства» обусловленный внеклеточными продуктами мутантов – «фидеров». Для этого использовался радиохимический метод определения относительных количеств серосодержащих аминокислот – метионина и цистеина в биомассе и культуральной среде ряда мутантов хлореллы с помощью радиоактивной серы S^{35} . Описан метод определения относительных количеств серосодержащих аминокислот в биомассе и в культуральной среде мутантов – «фидеров» хлореллы. Показано, что мутанты 94, U-6, U-7, 722-2-S накапливают в белках цистеин в 2-3 раза больше, чем исходный штамм В, а в пептидной фракции (в среде) больше почти в 6 раз. Мутанты 722, 7179, 7199, 7232, 7255 накапливают, по сравнению с исходным штаммом 288-4, больше не только метионина в белках и пептидах, а также цистеина в белках. Низкомолекулярные пептиды находят широкое применение в пищевой, фармацевтической и медицинской отрасли. Они также являются исходными моделями для биохимических, генетических и молекулярно-биологических исследований. В частности, они влияют на ДНК старых клеток и вызывают их активацию и тем самым омолаживают эти клетки. Сфера применения хлореллы и других водорослей – растениеводство, как удобрение и стимулятор роста; медицина, косметология и спорт для детоксикации и укрепления иммунитета; в аквакультуре для обогащения воды кислородом и улучшения состояния рыб; а также в производстве биотоплива, биопластиков и как кормовая добавка.

Ключевые слова: хлорелла, мутант, фидер, метионин, цистеин, хроматография, радиоактивный индикатор.

Введение. Производственное использование хлореллы и других водорослей делает необходимым разработку принципов и методов селекции этих организмов. В ряде работ [1-4] показано, что селекцию полезных форм и методы оценки можно провести микробиологическим качественным методом. Этот метод основан на так называемом эффекте «фидерства» - подкормки, определяемый по кольцу обрастания аукоотрофных мутантов вокруг колоний хлореллы.

Однако, следует отметить, что эффект «фидерства», определяемый таким способом, ещё не дает ответа на вопросы: 1) за счет чего происходит этот эффект? За счет прижизненного выделения хлореллой в сферу определенных метаболитов, или за счет автолиза и выделения в окружающую среду тех же веществ? 2) Если эффект «фидерства» [8] обусловлен внекле-

точными продуктами мутантов – «фидеров», то какова природа веществ, вызывающих этот эффект. К тому же трудно судить о природе внеклеточных продуктов [5-10].

Предыдущая работа [3] в какой-то мере дала ответ на 1-й вопрос, а именно, эффект «фидерства» обусловлен внеклеточными продуктами мутантов.

Цель исследования – изучение веществ, вызывающих природу «фидерства». Для этого использовался радиохимический метод определения относительных количеств серосодержащих аминокислот – метионина и цистеина в биомассе и культуральной среде ряда мутантов хлореллы с помощью радиоактивной серы S^{35} [11-12].

Материал и методы исследования. Материалом послужили следующие штаммы хлореллы:

В – штамм *Clorella vulgaris*, послуживший исходной формат для получения мутантов

K-94, U-6, U-7, 283-4, 322, 7179, 7199, 7255, 7232, 7-22-2-S. Служит контролем.

Культура хлореллы выращивалась в обедненной неорганической серой среде следующего состава:

KNO_3 5 г/л

$Mg(NO_3)_2$ 2,5 г/л

KH_2PO_4 1,25 г/л

$MgSO_4$ 0,083 г/л

Глюкоза 10 г/л

К этому раствору добавлялся $Na_2S_{35}O_4$ с активностью 2 μ к в количестве индикатора. Двухдневная культура водорослей выращивалась в колбах с 15,0 мл средой на подсветке. Освещенность 5000 лк. Исходная густота клеток $2 \cdot 10^6$ в мл. Продолжительность опыта 10 дней. За это время мы получаем достаточное количество биомассы (~100 мг) для проведения дальнейших анализов. Клетки отделялись от культуральной среды центрифугированием. Затем клетки экстрагировались 3 раза 80 % этанолом для удаления липидов, углеводов и других низкомолекулярных веществ [13]. Экстракт отделялся экстрагированием, он имел незначительную активность из-за чего отбрасывался. Дальнейшая обработка клеток заключалась в гидролизе их равными объемами концентрированных HCl и CH_3COOH . Водоросли переводились в ампулу, из которой воздух вытеснялся CO_2 . Присутствие O_2 во время гидролиза понижает выход аминокислот. Ампула запаивалась. Гидролиз проводится в термостате при $105^\circ C$ в течении 28 мин. Гидролизат хроматографировался (хроматограф марки Amstell, Великобритания) в системе растворителей n -бутанол-уксусная кислота – вода (4:1:5). Перед хроматографированием необходимо отделить механические примеси и удалить HCl [11]. С этой целью гидролизат с помощью пипетки наносился на воронку Бюхнера с двойным слоем фильтровальной бумаги. Жидкость отфильтровывалась под вакуумом. Для лучшей десорбции аминокислот ампула и фильтр

промывались трижды небольшими порциями воды. Гидролизат упаривался под вакуумом. Для полного удаления HCl в процессе упаривания необходимо несколько раз добавлять 2 мл воды [14-20].

Хроматографический анализ питательной среды проводился аналогичным образом. Хроматографировались одинаковые количества (по весу) гидролизатов, чтобы получить возможность сравнения активностей мутантов и исходных штаммов. Фракции хроматограмм высушивались и проводилось измерение активностей [14].

Результаты и их обсуждение. Опыт состоял из 4-х повторностей, результаты которого суммированы и представлены в таблицах 1,2. В таблице 1 представлены данные, касающиеся накопления радиоактивной серы биомассами штаммов. Значения удельных активностей (активность на 10^6 клеток и активность на мг сухого веса биомассы), соответствующие контрольным штаммам (штамм В и 283-4) взяты за 100 % [21-30]. Как видно из этой таблицы, значения удельных активностей исследованных штаммов больше в 1,5-2,0 раза, по сравнению с контрольными штаммами. Для более четкой характеристики штаммов был проведен анализ биомассы на серу, содержащую аминокислоты. Отсутствие значительных количеств активностей в спиртовом экстракте свидетельствует, что серосодержащие аминокислоты находятся преимущественно в белковой части клеток [31].

Как видно из таблицы 2, где представлены данные, полученные в результате хромато графического анализа спирт нерастворимой фракции после её гидролиза, активность соответствующая цистеину, на хромато граммах штаммов 94, U-6, U-7, 722-2-S в 2-3 раза больше, по сравнению с контрольным штаммом В, в то время как активность метионина почти одинакова у всех этих штаммов, а у штаммов 722, 7179, 7199, 7232, 7255 активность метионина в 1,5-3,0 раза больше, по сравнению с контрольным штаммом 283-4 и активность цистеина до 1,5 раза [32-35]. У изученных штаммов наблюдалось превышение активности не только в спиртонерастворимой фракции, а также в культуральной среде (таблица 3). В таблице 3 представлены данные хроматографического анализа среды после её гидролиза. Как видно из этой таблицы, штаммы 94, U-6, U-7, 722-2-S накапливают в среде цистеина до концентрации в 6 раз превышающий контроль и штаммы 722, 7179, 7199 накапливают метионин больше, по сравнению с контрольным штаммом 283-4 до 5 раз.

В таблице 4 приведены значения R_f , полученные в результате хроматографического анализа питательной среды до и после гидролиза. Значения R_f изменялись в результате гидролиза, что заставляет предполагать, что метионин и цистеин накапливаются в среде не в свободном виде. Возможно, что изменение значения R_f вызвано химическими превращениями этих аминокислот во время гидролиза [36-38].

Полученные результаты согласуются с данными, имеющимися в литературе. Так, Каназава [10], изучая онтогенетическую изменчивость аминокислотного состава *Chl. ellip.*, обнаружил, что у них метионин и цистеин встречаются не в свободном виде, а в виде пептидов и в белках, что подтверждается отсутствием активности в спирторастворимой фракции, где должны были экстрагироваться свободные аминокислоты и пептид наряду с другими веществами, изученных нами штаммов, если допустить, что серосодержа-

щие аминокислоты, находящиеся в пептидной форме выделяются ими почти полностью в культуральную среду [35-37]. Данные Каназавы [10] позволяют полагать, что могут быть два крайних типа мутантов, накапливающих метионин и цистеин с повышенным количеством его или в белках, или в пептидах. Однако, если допустить, что содержание аминокислот во-первых прямо или косвенно связано с содержанием их, во-вторых [10] возможно, что будут мутанты с повышенным содержанием цистеина и метионина как в белках, так и в пептидах, что подтверждается данными таблиц 2 и 3.

Перспективы применения низкомолекулярных пептидов в геронтологии:

1. Гетерогенность возраста и пептиды водорослей;
2. Контроль и менеджмент синтеза и ремоделирования пептидов водорослей;
3. Пептидные биорегуляторы в гериатрии;
4. Характеристика уровней тревожности и качества жизни;
5. Пептидология эмоций;
6. Пептиды водорослей и межмолекулярные механизмы защиты организма человека;
7. Пептиды водорослей- корректоры микробиоты.

Таблица 1 - Удельные активности штаммов (в % к контролю)

Штамм	Активность	
	на 10^6 клеток	на мг биомассы
В, контроль	100	100
94	185	181
U-6	285	219
U-7	175	134
722-2-S	145	159
283-4, контроль	100	100
722	201	127
7179	106	144
7199	168	148
7232	162	145
7255	196	186

Таблица 2 - Активность цистеина – A_1 , и метионина – A_2 на хроматограммах гидрометризованной среды (имп/мин) и их отношения к активности контрольных штаммов (A_1/A_0 и A_2/A_0)

Штамм	A_1	A_1/A_0	Штамм	A_1	A_1/A_0
В, контроль	380	1	283-4 контроль	590	1
94	2170	5,71	7-22	1050	1,78
U-6	1420	3,74	7-179	1700	2,89
U-7	1770	4,70	7-199	1860	3,15
722-2-S	2030	5,34	7232	1940	3,28
			7255	2810	4,77

Таблица 3 - Активность цистеина (A_1), и метионина (A_2) на хроматограммах гидролизатов спиртонерастворимых фракций штаммов и их отношения к активности соответствующих аминокислот (A_1/A_{01} и A_2/A_{02}) и контрольных штаммов (В, 283-4)

Strain	A_1	A_2	A_1/A_{01}	A_2/A_{02}
В, контроль	810	1120	1,0	1,0
94	1550	1190	1,91	1,06
U-6	2520	1190	3,11	1,06
U-7	2010	1110	2,48	0,99
722-2-S	1700	1620	2,10	1,46
283-4, контроль	810	780	1,0	1,0
7-22	1070	2280	1,32	2,92
7-179	980	1060	1,21	1,36
7-199	1130	1090	1,40	1,40
7232	1050	1320	1,30	1,69
7255	970	1570	1,20	2,01

Таблица 4 - Значения R_f (S^{35} – содержащих компонентов хроматографического анализа среды до (R_{f1}) и после (R_{f2}) гидролиза

Strain	R_{f1}	R_{f2}	Strain	R_{f1}	R_{f2}
В, контроль	0,10	0,08	283-4, контроль	0,10	0,20
94	0,10	0,08	722	0,10	0,20
U-6	0,12	0,08	7179	0,12	0,20
U-7	0,12	0,08	7199	0,10	0,20
722-2-S	0,12	0,10	7232	0,12	0,20
			7255	0,16	0,20

Вывод I.

Описан метод определения относительных количеств серусодержащих аминокислот в биомассе и в культуральной среде мутантов – “фидеров” хлореллы. Показано, что мутанты 94, U-6, U-7, 722-2-S накапливают в белках цистеин в 2-3 раза больше, чем исходный штамм В, а в пептидной фракции (в среде) больше почти в 6 раз. Мутанты 722, 7179, 7199, 7232, 7255 накапливают, по сравнению с исходным штаммом 283-4, больше не только метионина в белках и пептидах (в среде), а также цистеина в белках.

References /Список литературы (см. страница 71)