

УДК 581.133.1.088

## ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОК ХЛОРЕЛЛЫ В ДЕЗИНТЕГРАТОРЕ СО СТЕКЛЯННЫМИ БУСАМИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ НАТИВНЫХ БЕЛКОВ

*В. Е. СЕМЕНЕНКО, Т. И. КАСАТКИНА*

*Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева  
Академии наук СССР, Москва*

Изучали процесс разрушения аналитических количеств клеток *Chlorella* в дезинтеграторе со стеклянными бусами и количественную связь между степенью разрушения клеток и выходом (извлекаемостью) растворимых и структурных белков.

Получены кривые зависимости разрушения клеток от скорости оборотов дезинтегратора, длительности разрушения, размера микробус, соотношения их количеств и объема суспензии, от плотности биомассы, соотношения размеров и формы ротационного устройства и стакана. Найдены оптимальные соотношения параметров, обеспечивающие полное (до 98%) механическое разрушение всех клеток суспензии (пасты) в достаточно мягких, сохраняющих нативность белка условиях.

Изучена динамика выхода растворимых и структурных (после обработки нерастворимого остатка детергентом) белков в зависимости от степени механического разрушения клеток.

Показаны различия в динамике выхода структурных и растворимых белков и определены условия полного их извлечения из всех клеток. Показана хорошая разделяемость извлекаемого комплекса растворимых белков на индивидуальные компоненты с помощью вертикального электрофореза в полиакриламидном геле как в аналитическом, так и в препаративном его вариантах.

К настоящему времени хорошо разработаны методы высокоинтенсивного непрерывного культивирования одноклеточных водорослей в полностью контролируемых условиях, исключающих действие случайных факторов [1]. Детально изучены различные стороны жизнедеятельности как индивидуальных клеток (в разбавленных, в том числе синхронно развивающихся суспензиях) [2], так и специфическая физиология оптически плотных популяций, как целостных фотосинтезирующих систем [3], вплоть до математического их описания и моделирования [4, 5]. Исследована пластичность метаболизма этих организмов и показана способность, в частности рода *Chlorella*, к широким физиолого-биохимическим адаптивно-приспособительным перестройкам при изменении условий среды и воздействии различных экстремальных факторов [6—9]. На примере изучения большого числа штаммов показана генотипическая специфичность различных форм как в отношении ростовых характеристик и активности фотосинтетического аппарата [10, 11], так и в отношении потенциальной их способности к направленному биосинтезу различных классов веществ [7, 8, 12—15], а также способности переходить на фотогетеротрофный и миксотрофный типы питания и усваивать различные экзогенные углеродсодержащие соединения [16, 17]. В самое последнее время в результате прямых анализов установлено наличие у *Chlorella* физиологически активных гормональных веществ, в частности соединений индольной природы, и чувствительность ростовой реакции культуры к этим веществам [18].

С другой стороны, установлено, что при изменении внешних условий наблюдаются существенные перестройки в составе индивидуальных белков [19], в изоферментных спектрах [20], в активности ферментов [21]. При внесении в среду органических источников углерода и переходе к миксотрофным условиям роста показано [22] уменьшение активности ключевых ферментов фотосинтетического пентозофосфатного цикла восстановления углерода (карбоксидисмутаза, НАДФ-глицеринальдегид-3-фосфатдегидрогеназа, альдолаза) и повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, гексокиназы, транскетолазы, фосфоглюкомутаза. Другими исследователями в аналогичных условиях показана репрессия синтеза хлорофилла [23], уменьшение количества таких веществ, как пластохиноны А, С и Д, и витамина К [24], являющихся составными элементами цепи транспорта электрона.

В ряде случаев показана индукция синтеза ферментов *de novo* в ответ на вносимые в среду субстраты: глутаматдегидрогеназы — при изменении формы азота в питательной среде [25], инвертазы — при внесении в среду сахарозы [26], пируват-киназы и изоцитратлиазы — при замене  $\text{CO}_2$  как источника углерода на соответственно глюкозу [27] или ацетат [28].

Таким образом, экспериментально вызываемые физиолого-биохимические перестройки клеток *Chlorella* затрагивают все уровни метаболизма, начиная от механизмов регуляции активности генов, синтеза энзиматических белков и кончая регуляторными взаимодействиями между субклеточными структурами и биосинтезом различных соединений. Это делает одноклеточные водоросли чрезвычайно удобной моделью для изучения механизмов эндогенной регуляции фотосинтеза и сопряженных с ним процессов и для разработки на этой основе путей и принципов управления интенсивностью и качественной направленностью фотобиосинтеза растений посредством целенаправленного воздействия на системы внутриклеточной регуляции и отдельные элементы этих систем.

Вместе с тем необычайно большая прочность клеточной стенки водорослей существенно ограничивает доступность исследований в указанных направлениях вследствие значительных трудностей извлечения из клеток различных соединений и в особенности количественного извлечения высокомолекулярных биополимеров в нативном их состоянии. Вопрос осложняется еще тем обстоятельством, что экспериментальное изучение основного обмена и проблемы регуляции клеточных функций сопряжено с необходимостью получения кинетических данных об изменениях в отдельных клетках индивидуальных белков, нуклеопротеидных комплексов различных форм нуклеиновых кислот и других нестойких соединений, а также с необходимостью применения специфических (и часто дефицитных) субстратов, ингибиторов и разобщителей. Это влечет за собой необходимость количественного разрушения в достаточно мягких условиях аналитических количеств биомассы.

Разработке методов разрушения одноклеточных водорослей посвящено значительное число исследований [29—36]. Применяются различные способы разрушения: механические (различного рода дезинтеграторы, гомогенизаторы, шаровые и шнековые мельницы, прессы, разрушающие замороженную биомассу и без ее замораживания), физические (ультразвуковые дезинтеграторы), химические (с помощью щелочей, перекисей), биохимические (с помощью ферментов). Однако многие из применяющихся методов разработаны для разрушения бактериальных и дрожжевых клеток, обладающих гораздо менее прочной клеточной стенкой, и не обеспечивают достаточно полного разрушения водорослей. Так, разработанный Френчем и Миллером [29] в принципе очень удобный метод стригущего давления, который удовлетворительно разрушает бактериальные клетки, не обеспечивал, как пишет сам автор, разрушение всех клеток хлореллы при однократном пропускании пасты через аппарат.

Применение ультразвуковых дезинтеграторов не всегда обеспечивает целостность белковых молекул, а иногда приводит к изменению активности ферментов [36]. Сложным оказалось применение химических и биохимических методов [34].

Наиболее широкое распространение в различных биохимических лабораториях получил метод разрушения одноклеточных водорослей с помощью разных типов дезинтеграторов со стеклянными микробусами (Ballotini) [19, 22, 25, 32—35], принцип которого заключается в том, что в стакан гомогенизатора с суспензией вносят определенное количество бус и при вращении перемешивающего устройства разрушение клеток осуществляется собственно в результате раскалывания и перетирания их бусами. Однако во многих случаях исследователи, преследуя цель обнаружения каких-либо соединений или определения, например, состава индивидуальных белков, используют водоросли по существу как источник этих веществ и не нуждались в полном количественном их извлечении из клеток [19, 22, 25].

Вместе с тем Новотный [32], описавший одну из конструкций работающего на указанном принципе ротационного дезинтегратора, в результате изучения процесса разрушения клеток различных бактерий (*Micrococcus*, *Escherichia*, *Bacillus megaterium* и *Corinebacterium pyogenes*) нашел, что одинаковая степень разрушения этих микроорганизмов достигается при разных режимах разрушения. Различным был также процент разрушения клеток *Corinebacterium pyogenes* в зависимости от физиологического состояния культуры.

В самое последнее время процесс разрушения клеток водорослей также стал предметом специальных работ ряда исследователей, которые изучили, в частности, особенности разрушения *Scenedesmus* [33—35]. Эти работы вскрыли сложную зависимость степени разрушения клеток от сочетания различных факторов. Показано, что процент разрушенных клеток *Scenedesmus* определяется не только техническими параметрами (число оборотов гомогенизатора, время разрушения, размер бус и др.), но существенно зависит также от размеров разрушаемых клеток, физиологического состояния культуры, специфики штамма [35]. Это, естественно, не позволяет переносить режимы, найденные (как оптимальные) для разрушения клеток одних форм и штаммов водорослей на другие.

Мы изучали процесс разрушения клеток *Chlorella* с целью: 1) установить динамические кривые зависимости разрушения клеток от различных значимых параметров, 2) оптимизировать процесс с доведением коэффициента разрушения до 95% и более; 3) определить количественную связь между степенью механического разрушения клеток и выходом из них нативных (растворимых и структурных) белков, пригодных для исследования их методами электрофореза, гель-хроматографии, иммунохимического анализа и др.

## МЕТОДИКА

Объектом исследования был штамм *Chlorella* sp. K, широко используемый в нашей и ряде других лабораторий для различных физиолого-биохимических исследований. Культуру выращивали в накопительном и проточном режиме в автотрофных условиях на среде Тамия с нитратным азотом при температуре 36—38°, непрерывном барботировании воздуха с 1,7% CO<sub>2</sub> и круглосуточном освещении. Распределение клеток по размерам в такой популяции, как видно из рис. 1, несколько изменяется в отдельные периоды накопительного роста, но в принципе описывается типичной кривой распределения, охватывающей область от 1,5 до 6 мк с максимальным содержанием (до 25%) клеток с размером 3—4 мк.

Клетки хлореллы разрушали в дезинтеграторе со стеклянными микробусами. Принципиальная схема разработанного дезинтегратора (рис. 2) представляет некоторую модификацию варианта конструкции, описанной Новотным [32] для разрушения бактериальных клеток. Прибор изготовлен на основе гомогенизатора (тип 302, Польша) для измельчения тканей, в котором ходовая часть и измельчитель тканей были заменены на сменную приставку для дезинтеграции клеток. Разрушение клеток осуществляется в обычных стеклянных центрифужных пробирках со сферическим дном. Про-

бирка с разрушаемой суспензией клеток и бусами надевается на вал ротационного устройства, устанавливается на опорно-прижимной подвижный столик откидной скобы и с помощью подающего винта столика прижимается верхним срезом к резиновой прокладке. Во время разрушения весь узел погружается в воду со льдом. Откидная скоба с опорно-прижимным столиком обеспечивают легкую смену пробирок, дают возможность использовать пробирки разного диаметра в зависимости от количества суспензии, которое необходимо разрушать) и, что наиболее существенно, не нарушают условий теплообмена с хладагентом независимо от диаметра установленной пробирки.

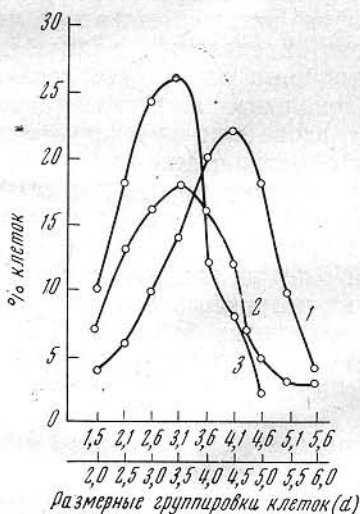


Рис. 1. Распределение клеток по размерам в культуре *Chlorella* sp. K в различные периоды выращивания

1, 2, 3 — распределение клеток по размерам соответственно на 1-, 2-, 3-и сутки накопительного роста

турные белки. Для этого нерастворимый остаток обрабатывали 2 часа детергентом тритон X-100 (1%) в 0,067 М фосфатном буфере с pH 7,4. Осажденные нерастворенными структуры, количество которых существенно различалось в зависимости от степени дезинтеграции клеток. В надосадочной жидкости определяли содержание белка и регистрировали на спектрофотометре СФ-10 оптическую плотность в пределах от 400 до 700 нм с целью определения динамики выхода хлорофилл-белкового комплекса. Выход структурных белков определяли по поглощению при 280 нм на проградированном предварительно спектрофотометре. При этом оптическую плотность (E) определяли по отношению к экстракционной смеси в качестве контроля.

Комплекс растворимых белков делили на две функции путем высаливания сульфатом аммония (30 и 80% от насыщения) по схеме, используемой Пиневичем, Берс и Пасскель [19]. Электрофоретическую подвижность и разделяемость белков, входящих в состав полученных фракций, оценивали посредством анализа их методом вертикального микроэлектрофореза в полиакриламидном геле по Девису в описании Сафонова и Сафоновой [38]. Кроме аналитического варианта изучали также разделяемость белков в препаративном варианте электрофореза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Динамическая характеристика процесса дезинтеграции клеток хлореллы

Наиболее существенными факторами, влияющими на процесс разрушения клеток в ротационном дезинтеграторе со стеклянными бусами, являются: скорость оборотов ротационного устройства, продолжительность разрушения, форма стакана, в котором осуществляется разрушение, и соотношение его размеров с размерами ротационного устройства, размеры бус, соотношение объемов суспензии клеток и микробус, плотность суспензии.

Определение эффективности разрушения клеток проводили двумя способами: 1) по механическому разрушению клеток, которое оценивали прямым подсчетом числа клеток под микроскопом в камере Горяева до и после разрушения и выражали в процентах разрушенных клеток от исходного их числа в суспензии; 2) учетом динамики выхода растворимых белков при разрушении клеток в фосфатном буфере с pH 7,4 и структурных белков после обработки нерастворимого остатка бесклеточного гомогената детергентом.

Для выделения растворимых белков и определения их количества клетки водорослей отделяли от культуральной среды в центрифуге с охлаждением (К-23) при 2° и 3 тыс. g, промывали буфером и ресуспендировали в охлажденном 0,067 М фосфатном буфере с pH 7,4. После разрушения клеток гомогенат количественно отделяли от бус. Далее проводили ступенчатое центрифугирование последовательно при 3, 5, 14 и 18 тыс. g соответственно 5, 10, 20 и 60 мин. при 2° на рефрижераторной центрифуге К-24. Содержание белков надосадочной жидкости определяли по методу Лоури, а также спектрофотометрически по поглощению света при 280 нм на спектрофотометре СФ-4, предварительно проградированном для белков данного штамма *Chlorella*, определявшихся по Кьельдалю и Лоури после их высаливания сульфатом аммония и обессоливания посредством гель-фильтрации через сефадекс Г-25 (грубый) на колонках или в центрифуге [37].

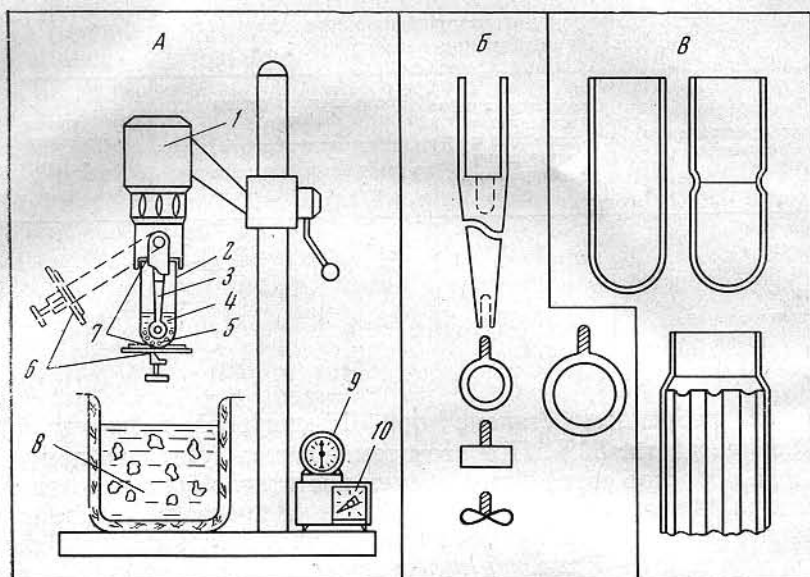


Рис. 2. Дезинтегратор

А — принципиальная схема: 1 — мотор, 2 — стакан, 3 — ротационное устройство, 4 — суспензия (паста) клеток, 5 — микробусы, 6 — откидная скоба с опорно-прижимным столиком, 7 — резиновые прокладки, 8 — термостатированная ванна со льдом, 9 — регулятор скорости оборотов дезинтегратора, 10 — реле времени; Б — различные варианты мешалок; В — различные варианты стаканов

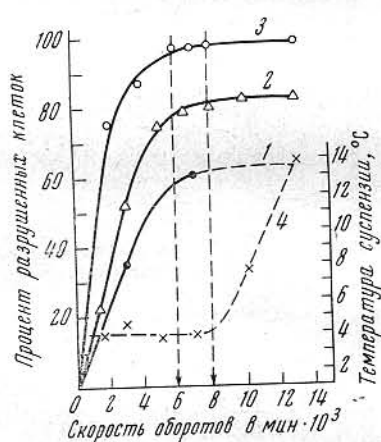


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость разрушения клеток *Chlorella* от скорости оборотов дезинтегратора и формы стакана

1 — цилиндрическая пробирка ( $d=40$  мм), 2 — ребренный стакан ( $d=40$  мм), 3 — цилиндрический стакан ( $d=28$  мм), 4 — изменение температуры суспензии во время разрушения ( $d$  петли=12 мм, время разрушения 15 мин.)

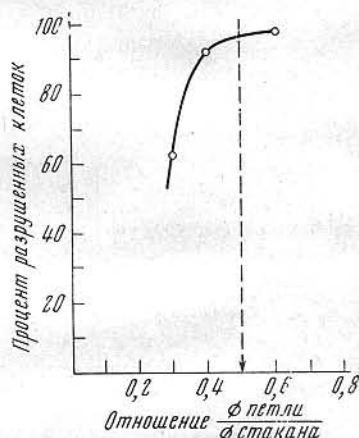


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость степени разрушения клеток *Chlorella* от соотношения диаметров петли и стакана

Для разрушения клеток и тканей в ротационных дезинтеграторах часто применяют ребренные стаканы. Поэтому при изучении зависимости степени разрушения клеток хлореллы от скорости оборотов ротационного устройства были получены кривые процесса разрушения как для ребренного стакана, так и для обычных центрифужных пробирок со сферическим дном. Как видно из рис. 3, ребренность стакана повышает эффективность разрушения клеток по сравнению с обычной пробиркой такого же диаметра примерно на 30%. Однако максимальный коэффициент раз-

**Зависимость коэффициента разрушения клеток хлореллы от формы ротационного устройства**

Форма ротационного устройства	Отношение размера ротационного устройства к внутреннему диаметру стакана	Число клеток в суспензии, млн/мл		Коэффициент разрушения $\left(\frac{a-b}{a} \cdot 100\right)$
		до разрушения (а)	после разрушения (б)	
Кольцо	0,48	427,5	20,0	95,4
Винтообразная пластинка	0,48	427,5	17,5	95,9
Прямоугольная пластинка	0,48	427,5	50,0	88,4

рушения в ребренном стакане при 15-минутной дезинтеграции и 14 тыс. об/мин достиг 82%. При этом температура суспензии при увеличении числа оборотов сверх 8 тыс. об/мин достаточно быстро возрастала, достигая при 14 тыс. об/мин 13,5°, несмотря на предварительное охлаждение суспензии до 1°. Во то же время в обычной пробирке меньшего диаметра уже при 6—7 тыс. об/мин разрушение составляло 98% и температура суспензии не возрастала выше 4°. Это привело к мысли, что для процесса разрушения клеток в ротационном дезинтеграторе со стеклян-

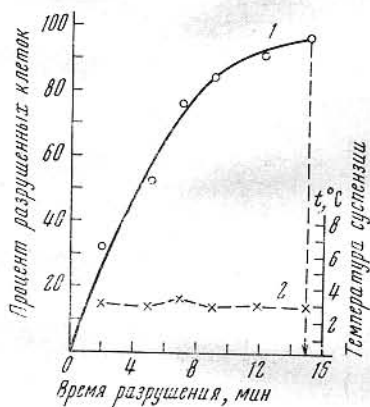


Рис. 5. Зависимость разрушения клеток *Chlorella* (1) и температуры суспензии (2) от продолжительности дезинтеграции

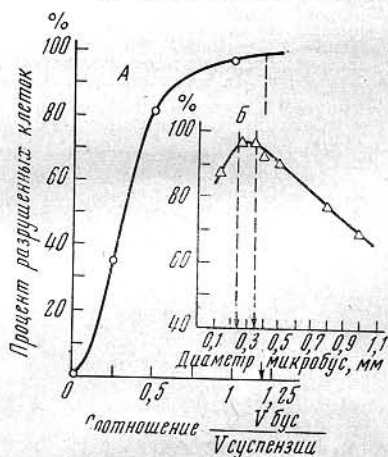


Рис. 6. Зависимость разрушения клеток *Chlorella* от соотношения объемов бус и разрушаемой суспензии (А) и от размеров бус (Б)

ными бусами определяющее значение имеет не столько форма стакана (в частности наличие в нем ребер), сколько соотношение размеров ротационного устройства и внутреннего диаметра стакана. Действительно, как следует из рис. 4, указанное соотношение существенно влияет на процесс дезинтеграции клеток. При отношении ротационного устройства к внутреннему диаметру стакана, равном 0,5 и более, коэффициент разрушения составил более 97%, в то время как уменьшение этого отношения до 0,3 снижает коэффициент разрушения клеток до 60%. При этом оказалось (таблица), что форма ротационного устройства, если отношение его размеров к внутреннему диаметру стакана равно 0,5, не имеет существенного значения. При получении всех представленных ниже характеристик использовали мешалку в форме кольца диаметром 18 мм. Разрушение проводили при 6,5—7 тыс. об/мин в центрифужных пробирках с соотношением диаметра кольца к диаметру пробирки, равным 0,5.

На рис. 5 представлен ход зависимости процесса разрушения клеток *Chlorella* sp. K от продолжительности дезинтеграции: в начальный период (в течение первых 5 мин.) процент разрушенных клеток возрастает пропорционально времени дезинтеграции с коэффициентом примерно 12% в 1 мин. Далее кривая асимптотически приближается к насыщению, достигая после 15-минутной дезинтеграции 97%. При этом температура гомогената несколько повышается, но к концу 15-минутного периода разрушения не превышает 4—5°.

Существенным параметром для оптимизации процесса разрушения клеток оказывается также размер микробус и соотношение их количе-

ства и объема разрушаемой суспензии клеток. Как видно из рис. 6, А, максимальная степень разрушения клеток хлореллы при 6,5 тыс. об/мин и 15-минутной дезинтеграции достигается при соотношении объемов бус и суспензии, равном 1,2. Оптимальный размер бус, соответствующий максимальной (98%) степени разрушения клеток водорослей с представленными выше характеристиками, лежит в области 0,25—0,35 мм (55—40 меш, см. рис. 6, Б). Уменьшение диаметра бус, так же как увеличение его, ведет к уменьшению эффективности дезинтеграции клеток.

Найденные условия разрушения клеток хлореллы оказались достаточно эффективными для их разрушения в суспензиях, существенно различающихся по плотности. Как видно из рис. 7, коэффициент разрушения составил 98—99% в широком диапазоне плотностей: от 100 до 6000 млн клеток/мл, или соответственно от 0,7—0,8 до 45—50 мг сухого вещества биомассы/мл.

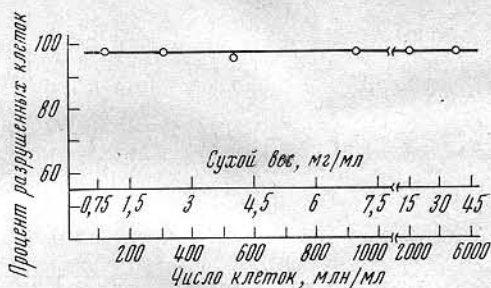


Рис. 7. Зависимость степени разрушения клеток *Chlorella* от плотности суспензии

## 2. Количественная взаимосвязь между степенью дезинтеграции клеток хлореллы и выходом структурных и растворимых белков

Представленные выше зависимости получены путем прямого подсчета под микроскопом числа клеток в суспензии до и после дезинтеграции и отражают по существу число клеток, которые полностью (механически) разрушались. При таком способе учета к числу целых клеток, естественно, были отнесены клетки с лопнувшими и частично поврежденными оболочками и, возможно, хлоропласты, т. е. какая-то часть клеток и их частей в таком состоянии, когда из них могут элюироваться легко растворимые вещества, но остаются препятствия для извлечения труднорастворимых фракций, входящих в структурные элементы клетки. Последнее видно из нарастания спектральных кривых в области 400—700 нм (рис. 8, А), которые отражают выход в раствор хлорофилл-белкового комплекса после обработки детергентом Тритон X-100 проб суспензии водорослей, подвергавшихся дезинтеграции различное время. Отчетливо видна зависимость от степени дезинтеграции клеток доступности их для действия детергента Тритон X-100, который, разрушая мембранные системы, приводит к выходу в буферный раствор структурных белков, в том числе хлорофилл-белкового комплекса. Неразрушенные клетки недоступны для детергента (после двухчасовой обработки), и нарастание экстинкции в максимуме поглощения хлорофилла (см. рис. 8, Б) находится практически в прямой связи со степенью механического разрушения клеток суспензии.

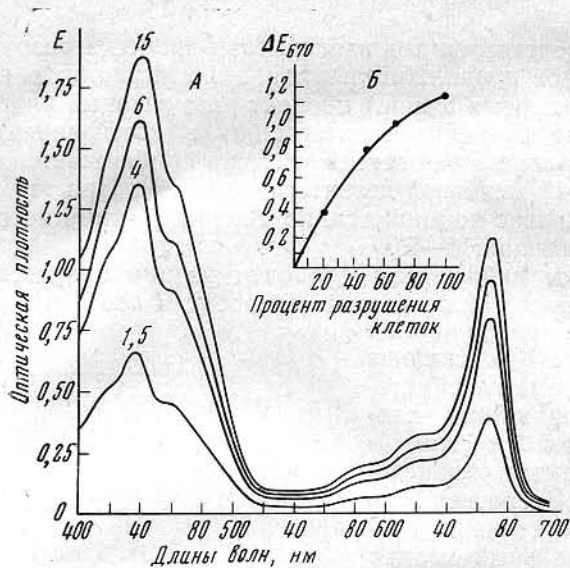


Рис. 8. Изменение спектра поглощения супернатанта после двухчасовой обработки нерастворимого осадка детергентом (А) и оптической плотности при  $\lambda=670$  нм в зависимости от дезинтеграции клеток (Б)

Цифры над кривыми — продолжительность дезинтеграции клеток (минуты)

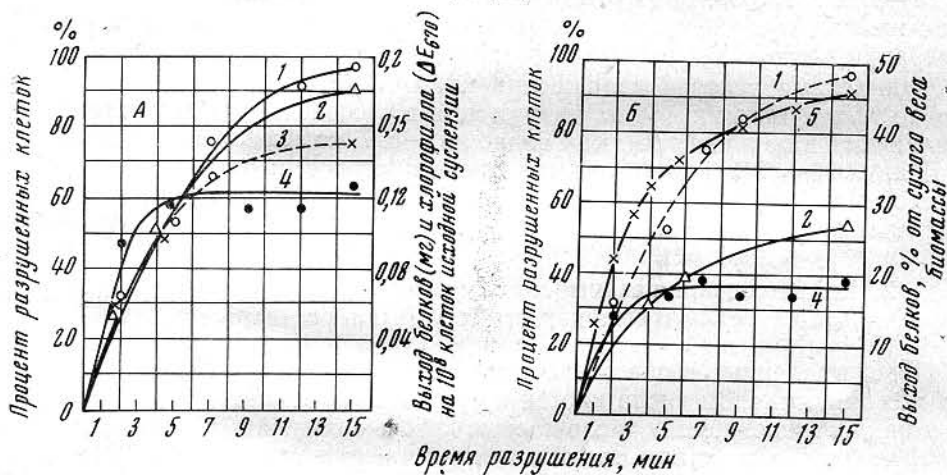


Рис. 9. Характеристика количественной связи между степенью разрушения клеток *Chlorella* и выходом структурного и растворимого белка

1 — процент разрушенных клеток, 2 — выход структурного белка, 3 — выход хлорофилла, 4 — выход растворимого белка, 5 — сумма структурного и растворимого белков; А — в расчете на клетку, Б — в процентах от сухого веса биомассы

В связи с этим в особенности для работ, преследующих цель выявления перестроек в соотношении структурных и растворимых элементов (например белков) клеток, представляло интерес оценить количественную связь между степенью механического разрушения клеток и динамикой выхода растворимых и структурных белков. Кроме того, сопоставление количеств растворимых и структурных белков, извлекаемых после различной степени дезинтеграции клеток, с общим (определяемым по Кьельдалю) количеством содержащегося в клетке белка дало бы возможность оценить динамику и полноту извлечения белков из клеток хлореллы.

Как видно из рис. 9, выход растворимых белков в зависимости от степени дезинтеграции клеток значительно отличается от динамики выхода структурных белков. Растворимые белки (кривая 4 на рис. 9, А) практически полностью извлекаются из всех клеток уже после 7-минутной дезинтеграции, когда процент их механического разрушения (учитываемого путем подсчета клеток под микроскопом) составляет 75 (кривая 1 на рис. 9, А), что, очевидно, свидетельствует о том, что оставшиеся 25% клеток имеют в достаточной степени поврежденные оболочки, которые не препятствуют вымыванию растворимых веществ. Структурные же белки (после обработки нерастворимого остатка детергентом) извлекаются (кривая 2 на рис. 9, А) в это время лишь на 60% и выход их прямо пропорционален степени разрушения. Сопоставление количеств (в процентах от сухого веса биомассы) растворимого и структурного белка с общим (определяемым по Кьельдалю) его количеством (см. рис. 9, Б) показывает, что при рассмотренных условиях разрушения клеток и извлечения белковой фракции имеет место достаточно полное извлечение всех белков. Это явно следует из того, что сумма «растворимый + структурный белок», как видно из рис. 9, Б (кривая 5), составляет 46% от сухого веса биомассы, а содержание общего белка у *Chlorella*, как известно, составляет обычно 50%. При этом оказывается, что фракция растворимых белков составляет ~18% от сухого веса биомассы, а структурных ~27%.

Как видно из рис. 10, выделяемые описанным способом белки *Chlorella* sp. К обладают достаточно хорошей подвижностью и разделяемостью на индивидуальные белки при электрофорезе в полиакриламидном геле.

Таким образом, проведенная работа дала возможность установить параметры, значимые для разрушения клеток *Chlorella* в дезинтеграторе со стеклянными бусами, и определить оптимальное их сочетание, обеспечивающее полное выделение нативных белков из всех клеток. Это открывает возможность для исследований содержания и количественных перестроек в составе индивидуальных белков в отдельных клетках.

Для выделения легкоокисляющихся веществ, в частности некоторых компонент липидной фракции, проводимого в нашей лаборатории, дезинтегратор был оснащен простым приспособлением, позволившим вести процесс разрушения в токе азота. Для этой цели стакан дезинтегратора закрывали тефлоновой крышкой с центральным отверстием для оси мешалки. Через второе отверстие диаметром 3 мм в стакан вводили полиэтиленовый капилляр, через который непрерывно продували азот.

В заключение пользуемся случаем и приносим благодарность лаборатории экспериментальной альгологии Института микробиологии Чехо-

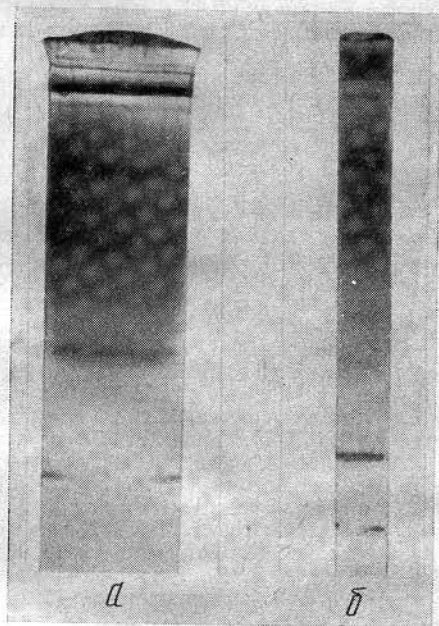


Рис. 10. Фракционирование комплекса растворимых белков методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле  
а — препаративный вариант, б — аналитический вариант

словацкой Академии наук, В. В. Пиневицу и Ю. Г. Молотковскому за предоставление микробус с различными характеристиками, что позволило провести данную работу, а также Н. В. Потапчуку за помощь при разработке дезинтегратора.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Семененко В. Е., Владимирова М. Г., Цоглин Л. Н., Таутс М. И., Филипповский Ю. Н., Клячко-Гурвич Г. Л., Кузнецов Е. Д., Кованова Е. С., Райков Н. И. В сб. Управляемый биосинтез, 75. «Наука», 1966.
2. Tamiya H. Synchrony in cell Division and growth, 247. Ed. by Leutheu E., 1964.
3. Владимирова М. Г., Таутс М. И., Феоктистова О. И., Семененко В. Е. В сб. Биология автотрофных микроорганизмов, 152. Изд-во МГУ, 1966.
4. Филипповский Ю. Н., Семененко В. Е., Ничипорович А. А., Лебедев В. М., Цоглин Л. Н. В сб. Биоэнергетика и биологическая спектроскопия, 231. «Наука», 1967.
5. Цоглин Л. Н., Семененко В. Е., Поляков А. К. Биофизика, 12, 704, 1967.
6. Sproehr H., Milner H. Plant Physiol., 24, 120, 1949.
7. Клячко-Гурвич Г. Л., Семененко В. Е. В сб. Биология автотрофных микроорганизмов, 159. Изд-во МГУ, 1966.
8. Клячко-Гурвич Г. Л. Некоторые физиолого-биохимические особенности направленного синтеза углеводов и липидов у хлореллы. Автореф. канд. дис. Ин-т физиол. раст. АН СССР, М., 1967.
9. Семененко В. Е., Владимирова М. Г., Орлеанская О. Б., Кованова Е. С., Райков Н. И. Физиол. растений, 16, 210, 1969.
10. Владимирова М. Г., Семененко В. Е., Жукова Т. С., Кованова Е. С. В сб. Управляемый биосинтез, 93. «Наука», 1966.
11. Владимирова М. Г., Семененко В. Е., Ничипорович А. А., В сб. Проблемы космической биологии, 2, 315. Изд-во АН СССР, 1962.
12. Patterson G. W., Krauss R. W. Plant cell Physiol., 6, 211, 1965.
13. Владимирова М. Г., Клячко-Гурвич Г. Л., Курносова Т. А., Жукова Т. С. Физиол. растений, 15, 993, 1968.
14. Жукова Т. С., Клячко-Гурвич Г. Л., Владимирова М. Г., Курносова Т. А. Физиол. растений, 16, 96, 1969.
15. Клячко-Гурвич Г. Л., Жукова Т. С., Владимирова М. Г., Курносова Т. А. Физисл. растений, 16, 205, 1969.
16. Авиллов И. А. Вестн. Ленингр. ун-та, 15, 3, 1963.
17. Rodrigues-Lopez M. J. Gen. Microbiol., 43, 139, 1966.
18. Таутс М. И. Физиол. растений, 18, 69, 1971.
19. Пиневиц В. В., Берс Э. П., Пасскель Г. Г. Вестн. Ленингр. ун-та, 21, 140, 1968.
20. Пиневиц В. В., Берс Э. П., Пасскель Г. Г. Тр. Биол. ин-та, ЛГУ, вып. 31, 270, 1970.
21. Berger C., Pirson A. Flora, A., 158, 164, 1967.
22. Huth W. Flora, A., 158, 58, 1967.
23. Aoki S., Hase E. Plant cell Physiol., 5, 485, 1964.
24. Graue F. S., Henninger M. D., Wood P. M., Barr R. Biochem. Chloroplasts, 2, 133, 1965.
25. Томова Н. Г., Евстигнеев З. Г., Кретович В. А., Биохимия, 34, 249, 1969.
26. Авиллов И. А., Брежнева И. В., Вестн. Ленингр. ун-та, 2, 128, 1969.
27. Ohmann E. Arch. Mikrobiol., 67, 273, 1969.
28. Goulding R. H., Merrett M. T. J. Biol. Educ., 4, 43, 1968.
29. French C. S., Miller H. W. In: Methods in Enzymology, 1, 64, 1955.
30. Бойко Н. Н., Ключкина Н. С., Кондратьев Ю. И. Вопросы питания, 5, 3, 1964.
31. Guansalus I. C. In: Methods in Enzymology, 1, 51, 1955.
32. Novotny P. Nature, 202, 364, 1964.
33. Vendlova I. Ann. report of laboratory of experimental algology and departament of applied algology. C SAV, Trebou, 147, 1968.
34. Hedenskog G., Enebo L., Vendlova J., Prokes V. Biotechnology a. bioengineering, 11, 37, 1969.
35. Tetik A. Ann. report of the laboratory of algology, C SAV, Trebou, 66, 1969.
36. Гуляев Л. С., Левинсон М. С. Изв. СО АН СССР. Сер. биол.-мед. наук, 15, 63, 1968.
37. Детерман Г. Гель-хроматография. «Мир», 1970.
38. Сафонов В. И., Сафонова М. П. Физиол. растений, 16, 350, 1969.

Поступила в редакцию  
15.IV.1971

# A STUDY ON THE DISINTEGRATION OF CHLORELLA CELLS IN A GLASS BEAD DISINTEGRATOR FOR THE QUANTITATIVE EXTRACTION OF NATIVE PROTEINS FROM THE CELLS

V. E. SEMENENKO, T. I. KASATKINA

K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology, USSR Academy of Sciences, Moscow

The disintegration of analytical amounts of Chlorella cells was studied in a glass bead disintegrator, and the quantitative correlation was established between the degree of cell decomposition and the extraction of soluble and structural proteins.

The decomposition of the cells was found to depend on the rotation rate of the disintegrator, the duration of the decomposition, the size of glass beads, the ratio between the bead amounts and the suspension volume, the biomass density, the ratio between the size and the shape of the rotation system and those of the beaker. Optimal ratio of the parameters resulted in the complete (98%) mechanical disintegration of all cells in the suspension (paste) under relatively mild conditions which did not bring about the denaturation of proteins.

The effect of the degree of mechanical disintegration of the cells on the dynamics of extraction of soluble and structural (after treating of the insoluble residue with a detergent) proteins was studied. The dynamics of extraction of soluble and structural proteins was shown to be different, and the conditions for their complete extraction from all cells were determined. The complex of soluble proteins can be divided into individual components by vertical electrophoresis in polyacrylamide gel (analytical and preparative variants).