

УДК 581.19:577.15

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ КАРБОАНГИДРАЗЫ В КЛЕТКАХ CHLORELLA И SCENEDESMUS

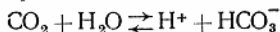
В. Е. СЕМЕНЕНКО, С. АВРАМОВА*, Д. ГЕОРГИЕВ*, Н. А. ПРОНИНА

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

Показано, что клетки всех изученных видов *Chlorella* обладают более высокой активностью карбоангидразы по сравнению с видами *Scenedesmus*. Существенные различия обнаружены во внутриклеточном распределении карбоангидразы, которая в клетках *Scenedesmus* локализована во фракции растворимых в фосфатном буфере белков, а у *Chlorella* в мембранно-связанных нерастворимых компонентах клетки.

Растительная карбоангидраза локализована преимущественно в листьях и других фотосинтезирующих тканях, найдена в клетках зеленых и сине-зеленых водорослей, как морских, так и пресноводных. Изучению этого фермента посвящено значительное число экспериментальных работ и ряд обзоров [1, 2]. По мере совершенствования методов выделения нативных хлоропластов различными исследователями отмечено возрастание доли карбоангидразной активности, локализованной в хлоропластах по сравнению с цитоплазматическими фрагментами [3—5], вплоть до 100% в случае выделения хлоропластов в безводные среды [6], что указывает на участие этого фермента в осуществлении процесса фотосинтеза.

Карбоангидраза (карбонатгидролиза, КФ 4, 2.1.1) является цинк-содержащим ферментом, который катализирует обратимую реакцию гидратации двуокиси углерода



и может участвовать в подготовительных стадиях фотосинтеза, катализируя начальные этапы физико-химического взаимодействия исходных продуктов фотосинтеза (углекислоты и воды), переводя их в форму, наиболее пригодную для внутриклеточной транслокации и для взаимодействия со специализированными ферментами CO_2 -, O_2 -метаболизма и протонной помпы.

Вместе с тем конкретные механизмы участия карбоангидразы в фотосинтезе и тем более в регуляции этого процесса остаются неясными.

Наиболее распространенной является гипотеза, которая предполагает участие карбоангидразы в облегчении транспорта и снижении диффузионного сопротивления для внутриклеточного переноса CO_2 и повышения ее концентрации в зонах карбоксилирования [1, 6—9]. На вероятность такой функции карбоангидразы указывает то, что активность фермента у ряда водорослей зависит от концентрации углекислоты, повышаясь при низких и уменьшаясь при высоких концентрациях CO_2 [8, 10]. При этом наблюдается корреляция между фотосинтезом и активностью карбоангидразы при низких концентрациях CO_2 , что свидетельствует о существенной роли этого фермента в утилизации низких концентраций угле-

кислоты [8], т. е. при высоких диффузионных сопротивлениях. Об указанной выше роли карбоангидразы может свидетельствовать необходимость этого фермента при ассимиляции иона бикарбоната [1, 11], а также локализация в хлоропластах и высокая активность фермента у C_3 -растений в отличие от C_4 -растений, у которых карбоангидраза локализована в цитоплазме и имеет низкую активность [6], хотя другие исследователи не находят такого четкого различия в локализации фермента этих типов растений [12].

Обсуждается также гипотеза об участии карбоангидразы в создании светондущиванного градиента pH в хлоропласте, когда H^+ -ионы образуются в результате гидратации CO_2 [8]. Такая функция карбоангидразы должна предполагать, очевидно, тесную связь фермента с мембранами хлоропласта или существование мембранно-связанной карбоангидразы.

Поскольку участие карбоангидразы в выполнении той или иной функции существенным образом зависит от ее локализации в клетке, особое значение приобретает вопрос, является ли внутриклеточное распределение карбоангидразы универсальным, а имеющиеся в литературе противоречия обусловлены лишь несовершенством методов выделения клеточных органелл, или существуют различные типы внутриклеточного распределения этого фермента, свойственного разным организмам.

В данной работе проведено сравнительное изучение активности и внутриклеточного распределения карбоангидразы у разных видов *Chlorella* и *Scenedesmus*.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили четыре вида *Chlorella* и три вида *Scenedesmus*. *Chlorella* sp. K (*Chlorella vulgaris* Beijer. var. *vulgaris* штамм C-1), *Chlorella pyrenoidosa* 82, *Chick*, штамм C-2, *Chlorella ellipsoidea*, *Gerneck*, штамм C-31, *Scenedesmus obliquus*, (*Turp*) *Kruger*, штамм S-5 — из коллекции ИФР АН СССР; *Chlorella vulgaris* *Beijerinck*, штамм 1971/4 Илков, *Scenedesmus acutus* *Meyer*, штамм 8 *Tomaselli*, *Scenedesmus acuminatus* (*Lagerh.*) *Chod*, штамм 1975/7 Ильков — из коллекции Болгарской Академии наук.

Водоросли культивировали в стерильных условиях в стеклянных сосудах с плоскопараллельными стенками [13] в условиях интенсивной накопительной культуры [14] при круглосуточном освещении люминесцентными лампами ($60 \text{ тыс. эрг} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), при оптимальной для каждого вида температуре и непрерывном барботировании культур газовой смеси с 1,7% CO_2 . В качестве питательной среды использовали среду Тамия с нитратным азотом [14]. Для анализа использовали водоросли на линейной стадии роста культур.

Клетки водорослей (около 100 мг сухой биомассы) промывали фосфатным буфером, содержащим 0,06 М Na_2HPO_4 , 5 мМ цистеина и 1 мМ ЭДТА (pH 8,3), ресуспендировали в 10 мл этого буфера и разрушали.

Дезинтеграцию клеток проводили на холоду в ротационном дезинтеграторе со стеклянными бусами по описанной ранее [15] методике, которая обеспечивает практически 100%-ное разрушение клеток и полный выход растворимых белков. После разрушения объем гомогената довели фосфатным буфером до 20 мл. Часть гомогената использовали для определения в нем активности карбоангидразы, другую — фракционировали на фракцию растворимых белков и нерастворимых в фосфатном буфере клеточных компонентов.

Фракционирование бесклеточного гомогената осуществляли методом ступенчатого центрифугирования последовательно при 3, 5, 14 и 18 тыс. g соответственно 5, 10, 20 и 60 мин при 2°. Активность карбоангидразы определяли в супернатанте (фракция растворимых белков) и в осадке (фракция нерастворимых клеточных компонентов) после ресуспендиро-

вания его в фосфатном буфере в объеме, равном объему взятого для фракционирования гомогената.

Активность карбоангидразы определяли электрометрическим методом по изменению начального значения pH от 7,8 до 7,3 в процессе реакции гидратации CO₂. Сдвиг pH от 7,8 до 7,3, как функцию от времени на линейном участке, регистрировали при помощи pH-метра (pH-340) и самописца (EZ-10). Реакцию гидратации, а также насыщение воды CO₂ проводили в термостатированных условиях при 2°. Реакцию начинали быстрым введением из шприца 2 мл насыщенного раствора углекислого газа в равный объем реакционной смеси, содержащей бесклеточный гомогенат, фракцию растворимых белков или фракцию нерастворимых клеточных компонентов в фосфатном буфере.

Скорость неэнзиматической реакции определяли при добавлении насыщенного раствора CO₂ к 2 мл фосфатного буфера pH 8,3.

Скорость энзиматической и неэнзиматической реакций гидратации CO₂ определяли в трехкратной повторности.

Активность фермента определяли по формуле [16]:

$$U = 10(T_0/T - 1),$$

где T_0 — время (в с) изменения pH неэнзиматической (контрольной) реакции, T — время изменения pH энзиматической реакции, и рассчитывали на мг сухой биомассы, на мг растворимого белка и на общий объем исследуемой фракции.

Количество белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм на спектрофотометре VSU-2P, предварительно проградуированном для растворимых белков, выделенных из *Chlorella*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показывают, что все изученные виды *Chlorella* и *Scenedesmus* обладают карбоангидразной активностью. При этом уровни активности фермента у разных видов рода *Chlorella* близки между собой, так же как у разных видов рода *Scenedesmus* (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика активности карбоангидразы * в гомогенате и во фракциях растворимых белков и нерастворимых клеточных компонентов разных видов *Chlorella* и *Scenedesmus*

Вид	Гомогенат, U	Растворимый белок		Нерастворимые клеточные компоненты	
		U	% от активности гомогената	U	% от активности гомогената
<i>Chl. pyrenoidosa</i> 82	1,41	0,00	0,00	1,26	89,4
<i>Chl. vulgaris</i>	2,67	0,23	8,6	2,62	98,1
<i>Chl. ellipsoidea</i>	0,69	0,05	7,3	0,62	89,9
<i>Chl. sp. K</i>	4,99	0,09	1,8	4,92	98,6
<i>Sc. acutus</i>	0,34	0,37	108,8	0,06	17,6
<i>Sc. acuminatus</i>	0,39	0,43	110,3	0,03	7,7
<i>Sc. obliquus</i>	0,30	0,35	116,7	0,04	13,3
<i>Chl. sp. K</i> , нагревание до 100°, 5 мин	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00

* U — единицы ферментной активности на мг сухого вещества.

Вместе с тем уровень активности карбоангидразы всех изученных видов *Chlorella* существенно превышает активность этого фермента у *Scenedesmus*, что видно из сравнения карбоангидразной активности в гомогенате, отнесенной на единицу биомассы. Следует отметить, что

Таблица 2

Активность карбоангидразы в гомогенате и во фракции растворимых белков разных видов *Scenedesmus*

Вид	Гомогенат, У/мг белка	Растворимый белок	
		У/мг белка	% от активности гомогената
<i>Sc. acutus</i>	1,35	1,46	108,1
<i>Sc. acuminatus</i>	1,14	1,23	107,9
<i>Sc. obliquus</i>	1,10	1,29	117,3

Таблица 3

Распределение карбоангидразной активности во фракциях растворимых белков и нерастворимых клеточных компонентов в клетках разных видов *Chlorella* и *Scenedesmus*

Вид	Общая активность карбоангидразы, отн. ед. ферментативной активности		
	гомогенат	растворимый белок	нерастворимые клеточные компоненты
<i>Chl. pyrenoidosa</i> 82	15,8	0,4	13,7
<i>Chl. ellipsoidea</i>	8,3	0,6	7,7
<i>Chlorella</i> sp. К	49,6	9,3	42,4
<i>Sc. acutus</i>	4,1	5,8	0,5
<i>Sc. obliquus</i>	4,7	5,3	0,6

аналогичные результаты были получены при сравнении карбоангидразной активности у большого ряда морских водорослей [17]. В то же время необходимо иметь в виду, что приведенные результаты получены для условий культивирования водорослей при достаточно высокой (насыщающей) концентрации CO_2 , когда как отмечалось выше, активность карбоангидразы бывает низкой. Возможно, в условиях низких концентраций углекислоты могут проявиться иные закономерности распределения активности карбоангидразы у разных видов водорослей, обусловленные потенциальной их способностью к индуцированному синтезу фермента.

Особенно интересные закономерности обнаружены при изучении локализации карбоангидразы в различных клеточных фракциях исследованных водорослей. Оказалось, что практически вся карбоангидразная активность у всех видов рода *Scenedesmus* локализована во фракции растворимых в фосфатном буфере белков и почти не содержится в нерастворимых клеточных компонентах. В то же время у всех изученных видов рода *Chlorella* вся карбоангидразная активность сосредоточена в мембранно-связанных нерастворимых в буфере клеточных компонентах (табл. 1). При этом 5-минутное прогревание при 100° гомогената растворимых белков и фракции нерастворимых клеточных компонентов приводило к полной потере карбоангидразной активности.

О локализации карбоангидразы у *Scenedesmus* именно во фракции растворимых белков свидетельствует также то, что активность фермента, рассчитанная на мг растворимых белков, дает близкие величины как для гомогената, так и для фракции растворимых белков (табл. 2).

Более корректные выводы относительно внутриклеточного распределения карбоангидразы могут быть сделаны при расчете общей активности фермента в клеточных фракциях [18]. Как видно из табл. 3, карбоангидраза в клетках всех изученных видов *Chlorella* действительно локализована во фракциях нерастворимых клеточных компонентов.

а в клетках *Scenedesmus* — во фракциях растворимых белков. Причем уровень активности карбоангидразы у *Scenedesmus* оказался несколько большим во фракции растворимых белков по сравнению с ее активностью в гомогенате, что, вероятно, обусловлено подавлением активности фермента в гомогенате физиологически активными соединениями индольной или фенольной природы.

Следует отметить, что Рид и Грэхем [10] определяли активность карбоангидразы у *Chlorella rugenoidosa* в супернатанте. Однако это не противоречит полученным данным и обусловлено, вероятно, тем, что для удаления неразрушенных клеток и клеточных стенок из гомогената и получения супернатанта указанные авторы применяли центрифугирование при 400 г в течение 5 мин, когда не могут седиментировать многие структурные образования и фрагменты дезинтегрированных клеток.

Остается неясным, в каких нерастворимых клеточных компонентах локализована карбоангидраза в клетках *Chlorella*. Она может находиться в мембранно-связанном состоянии во фракции клеточных стенок или других структур, что требует специального изучения. Вместе с тем обнаружение этого феномена представляет особый интерес в связи с гипотезой об участии карбоангидразы в регуляции трансмембранного переноса углекислоты и разделения ионов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Raven J. A. Biol. Rev., 45, 167, 1970.
2. Косинин А. В. Успехи соврем. биол., 83, 86, 1977.
3. Rossi C., Cortivo M. Boll. Soc. ital. biol. sperim., 44, 20 bis, 1335, 1968.
4. Wood J. G., Sibly P. M. Austral. J. Scient. Res., B5, 244, 1952.
5. Poincelot R. P. Biochim. et biophys. acta, 258, 637, 1972.
6. Everson R. G., Slack C. R. Phytochemistry, 7, 581, 1968.
7. Reyss A., Prioul J. L. Plant Sci. Letters, 5, 189, 1975.
8. Graham D., Atkins C. A., Reed M. L., Patterson B. D., Smillie R. M. In: Photosynthesis and photorespiration, 267, Ed. Hatch. Publ. by John Wiley and Sons, Inc., 1971.
9. Bamberger E. S., Avron M. Plant Physiol., 56, 481, 1975.
10. Reed M. L., Graham D. Austral. J. Plant Physiol., 4, 87, 1977.
11. Чернядьев И. И., Терехова И. В., Комарова Ю. М., Доман Н. Г., Горонкова О. И., Альбицкая О. Н. Докл. АН СССР, 223, 501, 1975.
12. Poincelot R. P. Plant Physiol., 50, 336, 1972.
13. Дилов Хр., Семеновко В. Е., Георгиев Д., Шаренкова Х., Стаев С. Докл. Акад. с.-х. наук Болгарии, 2, 201, 1969.
14. Владимирова М. Г., Семеновко В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. Изд-во АН СССР, 1962.
15. Семеновко В. Е., Касаткина Т. И. Физиол. растений, 19, 169, 1972.
16. Rickli E. F., Ghazanfar S. A. S., Gibbons B. H., Edsall L. T. J. Biol. Chem., 239, 1965, 1964.
17. Graham D., Smillie R. M. Austral. J. Plant Physiol, 3, 113, 1976.
18. Керридж Д., Типтон К. Биохимическая логика. «Мир», 1974.

Поступила в редакцию
20.IV.1977

A COMPARATIVE STUDY ON THE ACTIVITY AND LOCALIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE IN THE CELLS OF CHLORELLA AND SCENEDESMUS

V. E. SEMENENKO, S. AVRAMOVA, D. GEORGIEV, N. A. PRONINA

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

A comparative study is carried out on the activity and localization of carbonic anhydrase in several species of *Chlorella* and *Scenedesmus*. It is found that in all *Chlorella* species investigated the activity of the enzyme is higher than in the *Scenedesmus* species. Significant differences are observed in the intracellular distribution of the anhydrase in the two algae. In *Scenedesmus* the enzyme is localized in the protein fraction soluble in phosphate buffer and in *Chlorella*, in membrane-bound insoluble cellular components.