

РАЗДЕЛЕНИЕ НАТИВНОГО СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Чернышев Д.Н., Ключкова В.С.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: chernishev@gsu.sevastopol.ru

Поступила в редакцию: 13.07.2021

Аннотация. В работе проведено математическое разделение спектра поглощения культуры микроводоросли *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Спектры культуры регистрировались на спектрофотометре с интегрирующей сферой. При анализе спектра вычислена производная второго порядка и определены основные максимумы поглощения. Полученные данные послужили основой при моделировании. Спектр поглощения культуры микроводоросли *A. platensis* в области от 400 до 800 нм был описан шестью кривыми Гаусса. Составлена общая модель спектра поглощения культуры из отдельных пигментов. Применяя полученную модель, возможно определить концентрации хлорофилла *a*, суммарных каротиноидов и фикобилинов непосредственно по спектру поглощения нативной культуры.

Ключевые слова: спирулина, каротиноиды, хлорофилл *a*, фикобилины, спектры поглощения, гауссианы.

ВВЕДЕНИЕ

Определение концентрации пигментов в клетках микроводорослей достаточно сложная задача, как на практике, так и в теории. [1] В большинстве современных исследований применяются методы, предполагающие разрушение клеток с последующей экстракцией пигментов. [2, 3] Очень часто определение концентрации выделенных пигментов проводится спектрофотометрически. Спектры поглощения культур микроводорослей содержат сведения о поглощении света отдельными пигментами, и характеристики светорассеяния. Поглощение света культурой микроводорослей осложняется рассеянием, возникающими из-за того, что размеры клеток в суспензиях значительно больше, чем длина волны видимого света и неоднородным распределением пигментов в клетке. Значительно устранить рассеяние удастся, используя интегрирующую сферу.

Одним из решений проблемы идентификации и разделения пигментов является декомпозиция нативного спектра математическими методами. Оптическая плотность аддитивная величина, поэтому общий спектр поглощения представляет собой сумму спектров отдельных пигментов. Спектры пигментов состоят из нескольких максимумов, форма и положение которых определяется хромофорными группами. Поглощение хромофорной группы, относительно максимума, распределено симметрично. Это свойство позволяет описать спектр пигмента одной или несколькими кривыми Гаусса. [4] В настоящей работе выполнен анализ и разделение перекрывающихся полос в нативном спектре поглощения культуры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования была выбрана *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Gomont, полученная из коллекции ФИЦ Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь.

A. platensis культивировали в накопительном режиме в унифицированной лабораторной установке [5] на питательной среде Zarrouk [6], в фотобиореакторе плоскопараллельного типа толщиной 2 см, площадью рабочей поверхности 0,05 м². Источником освещения служили холодные люминесцентные лампы Philips Daylight TL-D 54-765 6G мощностью 18 Вт. Освещённость рабочей поверхности фотобиореактора составляла 5 клк (~17 Вт/м²). Температура поддерживалась на уровне 27±1°C.

Спектры поглощения регистрировались в диапазоне от 400 до 800 нм на спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible, оснащённом интегрирующей сферой (диаметр 60 мм), в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

При анализе спектра поглощения культуры *A. platensis* использовался метод математического дифференцирования в программе QtiPlot, а также разделение спектра на отдельные кривые Гаусса в программе MagicPlot.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе нормированного в точке максимума (678 нм) спектра поглощения культуры *A. platensis*, для достоверного выявления пиков была вычислена производная второго порядка. Контур второй производной похож на спектр поглощения, но его полосы имеют более тонкую организацию. [7] В производном спектре второго порядка была отмечена сложная структура, в которой прослеживались явные пики и плечи (рис. 1).

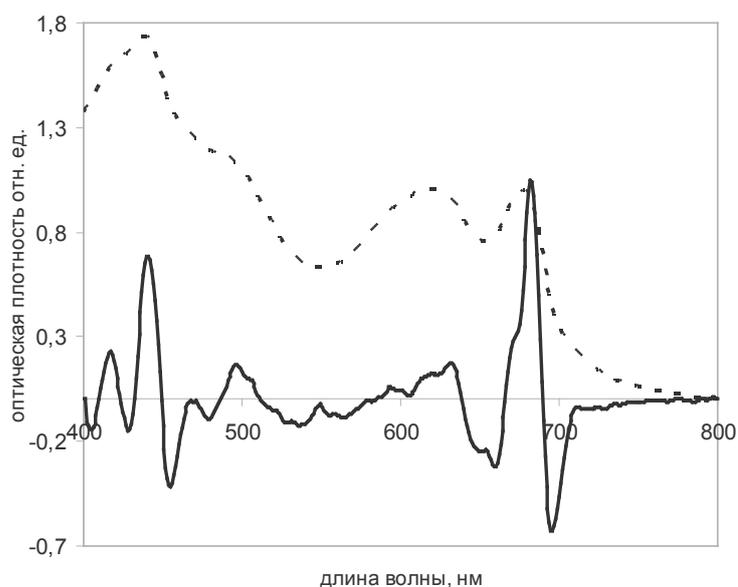


Рисунок 1. Спектр поглощения культуры микроводоросли *A. platensis* нормированный по значению D_{678} (пунктирная линия). Вторая производная спектра* $\cdot 200$ (сплошная линия)

Можно предположить, что выявленные явные максимумы связаны с определенными полосами поглощения основных пигментов сине-зеленых водорослей. А именно: хлорофилл *a*: 420, 440, 630, 680 нм, общие каротиноиды: 500 нм, и общей группой фикобилиновых пигментов: 600 нм.

Полученные данные послужили начальными точками максимумов пиков при аппроксимации спектра кривыми Гаусса. Каждый отдельный пик был описан формулой (1):

$$D(\lambda) = D_{\max} e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - \lambda_{\max}}{\sigma} \right)^2}, \quad (1)$$

где $D(\lambda)$ – оптическая плотность, отн. ед;

D_{\max} – амплитуда пика, отн. ед;

λ_i – длина волны, нм;

λ_{\max} – положение максимума пика, нм;

σ – полуширина пика, нм.

Результат математического разделения спектра на отдельные кривые представлен в таблице 1 и на рисунке

2.

Сравнивая полученные данные с литературными источниками [8, 9], возможно, соотнести рассчитанные пики с определенными пигментами. Спектр хлорофилла *a* соответствует пикам с максимумами 402, 434, 620, и 678 нм. Суммарные каротиноиды представлены одним пиком 482 нм. Общий спектр фикобилиновых пигментов описан пиком с максимумом 609 нм. Полученные данные хорошо согласуются с предыдущими исследованиями [10].

Вычисленные данные (положения максимумов, отношение амплитуд, и полуширины пиков) можно использовать как математические модели отдельных пигментов.

Ниже представлена модель спектра поглощения культуры. Общий спектр культуры представляет сумму спектров хлорофилла *a*, фикобилиновых, и суммарных каротиноидов. В данной модели 3 неизвестных величины – концентрации хлорофилла *a*, фикобилиновых пигментов, и концентрация общих каротиноидов.

Таблица 1. Результаты вычислений пиков в спектре культуры *A. platensis*

№ пика	1	2	3	4	5	6
λ_{\max} положение максимума пика, нм	403	434	482	609	620	678
D_{\max} амплитуда пика, отн. ед.	1,051	1,240	1,068	0,785	0,231	0,567
σ полуширина пика, нм	17,0	20,9	38,6	73,7	29,5	13,0

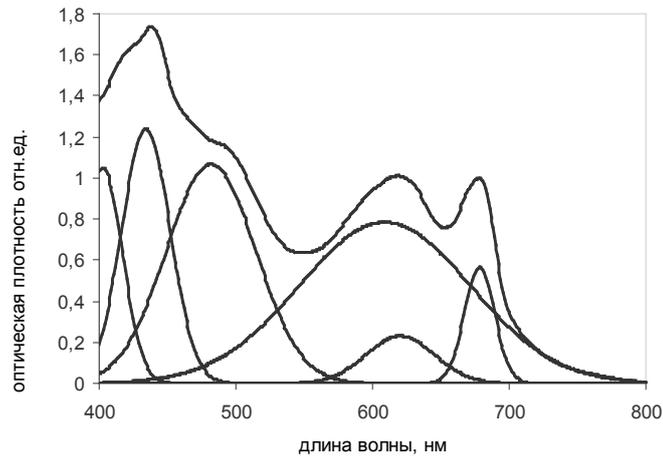


Рисунок 2. Разделение спектра поглощения культуры микроводоросли *A. platensis* на отдельные кривые Гаусса

$$D(\lambda) = D_{\text{Хла}}(\lambda) + D_{\text{Фико}}(\lambda) + D_{\text{Кар}}(\lambda)$$

$$D_{\text{Хла}}(\lambda) = C_{\text{Хла}} \varepsilon_{\text{Хла}} \left(1.80 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 403}{17.0} \right)^2} + 2.13 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 434}{20.9} \right)^2} + 0.40 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 620}{29.5} \right)^2} + 0.97 e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 678}{13.0} \right)^2} \right)$$

$$D_{\text{Фико}}(\lambda) = C_{\text{Фико}} \varepsilon_{\text{Фико}} e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 609}{73.7} \right)^2}$$

$$D_{\text{Кар}}(\lambda) = C_{\text{Кар}} \varepsilon_{\text{Кар}} e^{-\ln 2 \left(\frac{\lambda_i - 482}{38.6} \right)^2}$$

(2)

где $D(\lambda)$ – общая оптическая плотность, отн. ед;

$D_{\text{Хла}}(\lambda)$ – оптическая плотность хлорофилла *a*;

$D_{\text{Фико}}(\lambda)$ – оптическая плотность фикобилинов;

$D_{\text{Кар}}(\lambda)$ – оптическая плотность суммарных каротиноидов;

$C_{\text{Хла}}$ – концентрация хлорофилла *a* (г/л);

$C_{\text{Фико}}$ – концентрация фикобилинов (г/л);

$C_{\text{сум.кар.}}$ – концентрация суммарных каротиноидов (г/л);

$\varepsilon_{\text{Хла}}$ – экстинкция хлорофилла *a* 88,15 (л г⁻¹ см⁻¹) [12];

$\varepsilon_{\text{Фико}}$ – экстинкция фикобилинов (фикоцианин) 7,3 (л г⁻¹ см⁻¹) [2];

$\varepsilon_{\text{Кар}}$ – экстинкция суммарных каротиноидов 250 (л г⁻¹ см⁻¹) [13];

Амплитуды моделей пигментов приведены к 1 в точке максимума экстинкции. Известно, что у хлорофилла, коэффициент экстинкции примерно одинаков в ацетоновом растворе и водном экстракте в красной области [11]. Для упрощения использованы стандартные значения экстинкции в максимумах поглощения пигментов [12]. Пример декомпозиции спектра представлен на рисунке .3.

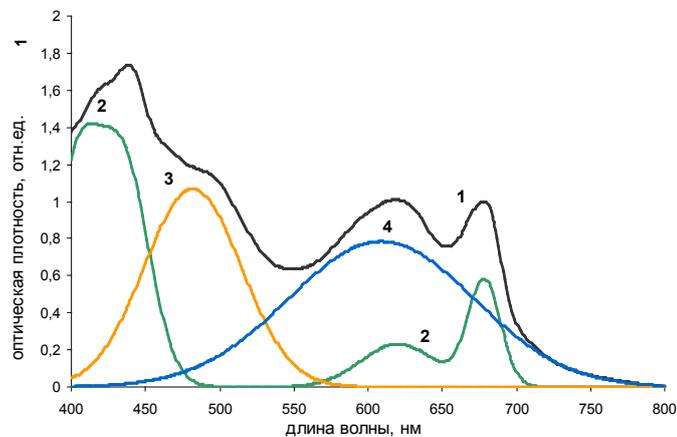


Рисунок 3. Декомпозиция спектра поглощения культуры микроводоросли *A. platensis* на отдельные спектры пигментов. Общий спектр (1), хлорофилл *a* (2), суммарные каротиноиды (3), фикобилины (4)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемый способ декомпозиции спектра может быть использован как экспресс метод определения концентрации пигментов в культуре, без выделения пигментов в чистом виде.

Список литературы / References:

1. Копытов Ю.П. и др. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей. *Альгология*, 2015, т. 25, № 1, с. 35-40. [Kopytov Yu.P. et al. The method of complex determination of the biochemical composition of microalgae. *Algologiya*, 2015, vol. 25, no. 1, с. 35-40. (In Russ.)]
2. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. *Количественное определение массовой доли С-фикоцианина и аллофикоцианина в сухой биомассе Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl. Холодная экстракция: учебно-методическое пособие.* РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского. Севастополь, 2017, 21 с. (Препринт РАН, ИМБИ). [Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V. *Quantitative determination of the mass fraction of C-phycoerythrin and allophycoerythrin in the dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl. Cold extraction: an educational and methodological manual.* RAS, Institute of Marine Biological Research named after A.O. Kovalevsky. Sevastopol, 2017, 21 p. (Preprint RAS, IMBI). (In Russ.)]
3. Wellburn R.W. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 1994, vol. 144, no. 3, pp. 307-313.
4. Kupper H., Seibert S., Parameswaran A. Fast, sensitive, and inexpensive alternative to analytical pigment HPLC: quantification of chlorophylls and carotenoids in crude extracts by fitting with Gauss peak spectra. *Analytical chemistry*. 2007, vol. 79, no. 20, pp. 7611-7627.
5. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1 (13). [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. Unified installation for laboratory research of microalgae. *Questions of modern algology*, 2017, no. 1 (13). (In Russ.)]
6. Zarrouk C. *Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de Spirulina maxima* (Setch et Gardner). Geitler: Ph. D these, Paris, 1966, 114 p.
7. Гуляев Б.А., Литвин Ф.Ф. Первая и вторая производная спектра поглощения хлорофилла и сопровождающих пигментов в клетках высших растений и водорослей при 20°C. *Биофизика*, 1970, т. 15, № 4, с. 670-680. [Gulyaev B.A., Litvin F.F. The first and second derivatives of the absorption spectrum of chlorophyll and accompanying pigments in cells of higher plants and algae at 20°C. *Biophysics*, 1970, vol. 15, no. 4, pp. 670-680. (In Russ.)]
8. Bidigare R.R. et al. In vivo absorption properties of algal pigments. *Ocean Optics X. International Society for Optics and Photonics*, 1990, vol. 1302, pp. 290-302.
9. Hoepffner N., Sathyendranath S. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1991, vol. 73, no. 1, pp. 11-23.
10. Чернышев Д.Н., Тренкеншу Р.П. Модель реконструкции спектра поглощения красной области spirulina platensis in vivo по характеристикам растворов хлорофилла а и фикобилинов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 4, с. 467-471. [Chernyshev D.N., Trenkenshu R.P. Model of reconstruction of the absorption spectrum of the red region of spirulina platensis in vivo according to the characteristics of solutions of chlorophyll a and phycobilins. *Actual issues of biological physics and chemistry*, 2019, vol. 4, no. 4, pp. 467-471. (In Russ.)]
11. Smith E.L. The action of sodium dodecyl sulfate on the chlorophyll-protein compound of the spinach leaf. *The Journal of General Physiology*, 1941, vol. 24, no. 5, p. 583.
12. Mantoura R.F.C., Wright S.W. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. *Oceanographic Literature Review*, 1997, vol. 10, no. 44, p. 1110.
13. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. *Количественное определение массовой доли суммарных каротиноидов в сухой биомассе Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl. : учебно-методическое пособие.* РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского. Севастополь, 2017, 12 с. (Препринт РАН, ИМБИ). [Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V. *Quantitative determination of the mass fraction of total carotenoids in dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl. : educational and methodological manual.* RAS, Institute of Marine Biological Research named after A. O. Kovalevsky. Sevastopol, 2017, 12 p. (Preprint RAS, IMBI). (In Russ.)]

DECOMPOSITION NATIVE ABSORPTION SPECTRUM OF THE CULTURE MICRO ALGA
ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS

Chernyshev D.N., Klochkova V.S.

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: chernishev@gmail.com

Abstract. The work carried out a mathematical separation of the absorption spectrum of the culture of the microalga *Spirulina platensis*. Culture spectra were recorded on an integrating sphere spectrophotometer. When analyzing the spectrum, the second-order derivative was calculated and the main absorption maxima were determined. The obtained data served as the basis for modeling. The absorption spectrum of the culture of the microalga *Spirulina platensis* in the region from 400 to 800 nm was described by six Gaussian curves. A general model of the absorption spectrum of a culture from individual pigments was compiled. Using the resulting model, it is possible to determine the concentration of chlorophyll a, total carotenoids and phycobilins directly from the absorption spectrum of the native culture.

Key words: *Spirulina, carotenoids, chlorophyll a, phycobilins, absorption spectra, Gaussian curves.*