

ОЦЕНКА ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА МИКРОВОДОРОСЛИ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* ПО ИСТИННОМУ СПЕКТРУ ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТАБЛИЧНОГО ПРОЦЕССОРА

Чернышев Д.Н., Клочкова В.С., Серяк Е.С.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: chernishev@gmail.com

Поступила в редакцию 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0504

Аннотация. В работе описан метод математического разделения спектра поглощения культуры красной морской водоросли *Porphyridium purpureum* с применением табличного процессора – программой Microsoft Excel. Данный метод представляет анализ и разделение перекрывающихся полос пигментов в нативном спектре поглощения культуры. Спектры культуры были записаны на спектрофотометре вблизи и на расстоянии от входного окна интегрирующей сферы. Рассчитан истинный спектр поглощения, скомпенсированный на рассеяние в области от 400 до 750 нм. Истинный спектр поглощения культуры аппроксимировали математической моделью, в которой неизвестными параметрами являются концентрации хлорофилла *a*, В-фикоэритрина, R-фикоцианина, аллофикоцианина и суммарных каротиноидов. Модели пигментов представлены суммой кривых нормального распределения. Реализация вычислений, выполняющих подбор концентраций пигментов путем минимизации суммы квадратов отклонений между истинным спектром поглощения и его математической моделью, выполнена при помощи табличного процессора с использованием инструмента «Поиск решения». Предлагаемый способ математической обработки спектра может быть использован как экспресс метод определения концентрации пигментов в культуре, без выделения пигментов в чистом виде. Применение данного метода позволяет оценить вклад пигментов в общий спектр поглощения культуры.

Ключевые слова: порфиридиум, каротиноиды, хлорофилл *a*, фикобилины, истинный спектр поглощения, гауссианы, табличный процессор.

ВВЕДЕНИЕ

Определение концентрации пигментов в культурах микроводорослей продолжает оставаться одной из сложнейших задач в теоретическом и практическом плане. Как правило необходимо взять пробу из культуры, разрушить клетку с последующим извлечением пигмента из раствора [1-5]. Однако, данный метод является затратным по времени и реактивам. Возникает вопрос о нахождении быстрого и точного метода по определению количественного и качественного пигментного состава культуры микроводоросли.

Известно, что спектр поглощения культуры микроводорослей несёт в себе информацию о пигментном составе. Чтобы получить данные из спектра, применяются математические модели, которые заключаются в том, что нужно описать спектр пигмента одной или несколькими кривыми Гаусса [6,7]. На сегодняшний день остаётся актуальна разработка экспресс-методов определения содержания пигментов в клетках микроводорослей. Развитие информационных систем позволило существенно сократить сроки проведения экспресс-анализов [8].

В настоящей работе выполнен анализ и разделение перекрывающихся полос пигментов в нативном спектре поглощения культуры красной морской водоросли *Porphyridium purpureum* с использованием табличного процессора Microsoft Excel.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для разделения истинного спектра поглощения на модели отдельных пигментов использовались спектры культуры красной морской водоросли *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew & Ross (1965). Культивирование проводилось аналогично, как представлено в работе [9]. Освещённость составляла 5 клк.

Спектры поглощения регистрировались в диапазоне от 400 до 750 нм с шагом 0,5 нм на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible (производитель: Perkin Elmer, Индия), который оснащён интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм (внешнее покрытие – BaSO₄). Кварцевые кюветы располагали в стандартном положении и на расстоянии от входного окна ИС.

Для определения истинного спектра поглощения использовали подход, предложенный в [10,11]:

$$\tilde{A}(\lambda) = D(\lambda; r) - L_{\text{осл-е}}(r; 0) \cdot [D(\lambda; r) - D(\lambda; 0)], \quad (1)$$

где $D(\lambda; r)$ – оптическая плотность образца, расположенного на некотором расстоянии r от ИС; $D(\lambda; 0)$ – оптическая плотность образца при стандартном положении кюветы; $L_{\text{осл-е}}(r; 0)$ – поправочный коэффициент ослабления света.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ранее опубликованных работах [12-15] показано, что спектр поглощения культуры микроводоросли описывается суммой кривых Гаусса (2):

$$D_{Pigment} = C_{Pigment} \times \varepsilon_{Pigment} \sum_{i=1}^N a_N \exp \left(-0.5 \left(\frac{\lambda - \lambda_{p_N}}{\sigma_N} \right)^2 \right), \quad (2)$$

где:

- $D(\lambda)$ – оптическая плотность, отн. ед;
- D_{max} – амплитуда пика N, отн. ед;
- λ – длина волны, нм;
- $\lambda_{max} = \lambda_{p_N}$ – положение максимума пика N, нм;
- σ – полуширина пика N, нм.
- $D_{Pigment}$ – оптическая плотность отдельного пигмента, отн. ед;
- $C_{Pigment}$ – концентрация отдельного пигмента (г/л);
- $\varepsilon_{Pigment}$ – экстинкция пигмента ($\text{л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$);
- N – количество кривых Гаусса, примененных при описании пигмента;
- a_N – амплитуда пика, отн. ед.

В предыдущем исследовании [16] составлена модель спектра поглощения культуры *P. purpureum* для красной области (550–750 нм). Модель всего спектра ($D(\lambda)$) красной водоросли представляет собой сумму оптических плотностей хлорофилла *a* (D_{Chla}), суммарных каротиноидов ($D_{sum.car}$) и фикобилиновых пигментов, представленные В-фикоэритрином (D_{B-PE}), R-фикоцианином (D_{R-PC}) и аллофикоцианином (D_{APC}):

$$D(\lambda) = D_{B-PE} + D_{R-PC} + D_{APC} + D_{Chla} + D_{sum.car}. \quad (3)$$

Для расчёта концентрации пигментов *P. purpureum* использованы следующие коэффициенты экстинкции водных растворов фикобилиновых пигментов [17]: В-фикоэритрина – (545 нм) $10,0 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; R-фикоцианин (615 нм) $7,0 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; аллофикоцианин (650 нм) $5,8 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Коэффициент экстинкции хлорофилла *a* в нативной форме [18] – $76 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Коэффициент экстинкции общих каротиноидов по литературным данным составляет $250 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [1].

Результаты математического разделения спектра культуры *P. purpureum* на отдельные кривые представлен на рисунке 1. Значения параметров моделей нативных пигментов (для удобства расчетов приведены к 1), обозначены в таблице 1.

Решение оптимизационной задачи нахождения концентрации в культуре микроводорослей проводилось с использованием табличного процессора MS Excel при помощи надстройки «Поиск решения». При этом параметры поиска решения задавались следующим образом:

- оптимизировалась целевая функция, а именно сумма квадратов отклонений, стремилась к минимуму;
- поиск решения проводился методом общего понижающего градиента (ОПГ) с точностью сходимости 0,0000001;
- случайное начальное значение было принято равным 1;
- ограничения искомым значений концентрации были заданы в интервале от (0; ∞).

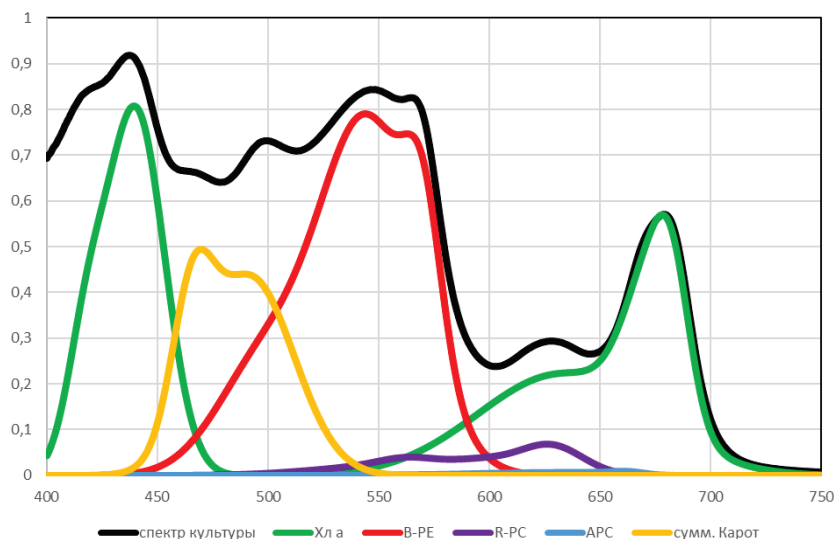


Рисунок 1. Пример разделения спектра поглощения культуры *P. purpureum*

Таблица 1. Параметры моделей пигментов

пигмент	параметр	№ пика				
		1	2	3	4	5
хлорофилл <i>a</i>	D_{max} амплитуда пика, отн. ед	0,4584	1,3936	0,3917	0,5428	0,3618
	σ полуширина пика, нм	9,03	12,99	38,54	12,05	7,94
	λ_{max} положение максимума пика, нм	417,8	440,2	633,4	673,3	683
В-фикоэритрин	D_{max} амплитуда пика, отн. ед	0,2902	0,9791	0,3565	-	-
	σ полуширина пика, нм	20,94	22,43	8,31	-	-
	λ_{max} положение максимума пика, нм	497,1	544,8	570,3	-	-
R-фикоцианин	D_{max} амплитуда пика, отн. ед	0,3157	0,2605	0,33	0,9421	-
	σ полуширина пика, нм	32,8	12,9	14,3	14,4	-
	λ_{max} положение максимума пика, нм	555,8	563,5	596,7	627,8	-
аллофикоцианин	D_{max} амплитуда пика, отн. ед	0,2418	0,4053	0,4389	0,6459	-
	σ полуширина пика, нм	37,7	20,6	14,1	7,3	-
	λ_{max} положение максимума пика, нм	595,5	618,6	647,3	662,6	-
суммарные каротиноиды	D_{max} амплитуда пика, отн. ед	0,5902	0,8812	-	-	-
	σ полуширина пика, нм	9,16	19,8	-	-	-
	λ_{max} положение максимума пика, нм	465,5	491,8	-	-	-

В предлагаемом нами методе расчета в табличном процессоре все коэффициенты экстинкции, а также характеристики отдельных пиков могут быть изменены. Авторы готовы выслать файл для автоматизации расчета на электронную почту заинтересованным лицам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан автоматический расчёт с помощью табличного процессора MS Excel, позволяющий быстро и точно определить концентрации фотосинтетических пигментов красной морской водоросли *P. purpureum* в области 400 – 750 нм. Для использования данного метода необходимо только наличие программного обеспечения Microsoft Excel и истинного спектра поглощения культуры, компенсированного на рассеяние.

Список литературы / References:

1. 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. [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, A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research, Sevastopol, 2017, 12 p. (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. [Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V. *Quantitative determination of the mass fraction of C-phycoerythrin and allophycocyanin in the dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl. Cold extraction: a teaching aid.* Russian Academy of Sciences, Institute of Marine Biological Research, A.O. Kovalevsky, Sevastopol, 2017, 21 p. (In Russ.)]
3. Cunningham F.X., Dennenberg R.J., Mustardy L., Jursinic P.A., Gantt E. Stoichiometry of photosystem I, photosystem II, and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum* as a function of growth irradiance. *Plant Physiol.*, 1989, vol. 91, no. 3, pp. 1179-1187, doi: 10.1104/pp.91.3.1179.
4. 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, pp. 35-40. (In Russ.)]
5. Zdenko G., Bumba L., Schrofel A., Herbstova M., Nebesarova J., Vacha F. Organisation of Photosystem I and Photosystem II in red alga *Cyanidium caldarium*: Encounter of cyanobacterial and higher plant concepts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, vol. 1767, no. 6, pp. 725-731, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.01.021.
6. Коваленко А.В., Вовк С.М., Плахтий Е.Г. Метод декомпозиции суммы гауссовых функций, составляющих экспериментальный спектр фотолуминесценции. *Журнал прикладной спектроскопии*, 2021, т. 88, № 2, с. 297-302. [Kovalenko A.V., Vovk S.M., Plakhtii Y.G. The Sum Decomposition Method for the Gaussian Functions Comprising the Experimental Photoluminescence Spectrum. *Zhurnal Prikladnoii Spektroskopii*, 2021, vol. 88, no. 2, pp. 297-302. (In Russ.)]
7. 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. *Analyt. Chem.*, 2007, vol. 79, no. 20, pp. 7611-7627.

8. Гаврилов П.Е., Лелеков А.С., Малахов А.С., Умеров Э.Э. Экспресс-метод определения спектра поглощения культуры микроводорослей. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2018, т. 3, № 4, с. 758-762. [Gavrilov P.E., Lelekov A.S., Malakhov A.S., Umerov E.E. Express method for determining the absorption spectrum of microalgae culture. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 758-762. (In Russ.)]
9. Гудвилевич И.Н., Лелеков А.С., Мальцев Е.И., Куликовский М.С., Боровков А.Б. Рост культуры *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) и продукция В-фикоэритрина при различной освещённости. *Физиология растений*, 2021, т. 68, № 1, с. 103-112. [Gudvilovich I.N., Lelekov A.S., Maltsev E.I., Kulikovskiy M.S., Borovkov A.B. The growth of *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) culture and the production of B-phycocerythrin in different light conditions. *Fiziologiya rastenij*, 2021, vol. 68, no. 1, pp. 103-112, doi: 10.31857/S0015330320060056. (In Russ.)]
10. Merzlyak M.N., Naqvi, K.R. On recording the true absorption and scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 2000, vol. 58, pp. 123-129. doi: 10.1016/S1011-1344(00)00114-7.
11. Ключкова В.С., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Ширяев А.В., Бучельников А.С., Шупова Е.В. Изменение спектра оптической плотности накопительной культуры *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 4, с. 543-547. [Klochkova V.S., Lelekov A.S., Gevorgiz R.G., Shiryaev A.V., Buchelnikov A.S., Shupova E.V. Changes in the optical density spectrum of the enrichment culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 4, pp. 543-547. (In Russ.)]
12. 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. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 4, pp. 467-471. (In Russ.)]
13. Чернышев Д.Н., Боровков А.Б. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта *Dunaliella salina*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, т. 1, № 1, с. 51-56. [Chernyshev D.N., Borovkov A.B. Separation of absorption spectrum of acetone extract *Dunaliella salina*. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2016, vol. 1, no. 1, pp. 51-56. (In Russ.)]
14. Гулин А.С., Тренкеншу Р.П., Чернышев Д.Н. Декомпозиция красной области спектра поглощения – начальный метод оценки пигментного состава микроводорослей. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 2, с. 239-245. [Gulin A.S., Trenkenshu R.P., Chernyshev D.N. Decomposition of the red region of the absorption spectrum is the initial method for assessing the pigment composition of microalgae. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 2, pp. 239-245. (In Russ.)]
15. Чернышев Д.Н., Горбунова С.Ю., Тренкеншу Р.П. Разделение спектров поглощения культуры и ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* на спектры отдельных пигментов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2020, т. 5, № 2, с. 55-56. [Chernyshev D.N., Gorbunova S.Yu., Trenkenshu R.P. Separation of the absorption spectra of the culture and acetone extract of the microalgae *Tetraselmis viridis* into the spectra of individual pigments. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2020, vol. 5, no. 2, pp. 55-56. (In Russ.)]
16. Чернышев Д.Н., Ключкова В.С., Лелеков А.С. Разделение спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. в красной области. *Материалы IX Сабининских чтений*, 2022. [Chernyshev D.N., Klochkova V.S., Lelekov A.S. Separation of the absorption spectrum of *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. in the red area. *Materialy IX Sabininskih chtenij*, 2022. (In Russ.)]
17. Стадничук И.Н. *Фикобилипротеины*. М.: ВИНТИ, 1990, 193 с. [Stadnichuk I.N. Phycobiliproteins. М.: VINITI, 1990, 193 p. (In Russ.)]
18. Myers J., Graham J.R., Wang R.T. On spectral control of pigmentation in *Anacystis nidulans* (Cyanophyceae). *J. Phycol.*, 1978, vol. 14, no. 4, pp. 513-518, doi: 10.1111/j.1529-8817.1978.tb02478.x.

EVALUATION OF THE PIGMENT COMPOSITION OF MICROALGAE PORPHYRIDIUM PURPUREUM ACCORDING TO THE TRUE ABSORPTION SPECTRUM OF THE CULTURE USING A SPREADSHEET PROCESSOR**Chernyshev D.N., Klochkova V.S., Seryak E.S.**

Sevastopol State University

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

Received 20.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0504

Abstract. The paper describes a method for mathematical separation of the absorption spectrum of the culture of the red seaweed *Porphyridium purpureum* using a spreadsheet processor - the Microsoft Excel program. This method represents the analysis and separation of overlapping pigment bands in the native absorption spectrum of a culture. The culture spectra were recorded on a spectrophotometer near and at a distance from the entrance window of the integrating sphere. The true absorption spectrum is calculated, compensated for scattering in the region from 400 to 750 nm. The true absorption spectrum of the culture was approximated by a mathematical model in which the unknown parameters are the concentrations of chlorophyll a, B-phycoerythrin, R-phyococyanin, allophycocyanin, and total carotenoids. Pigment models are represented by the sum of normal distribution curves. The implementation of calculations that perform the selection of pigment concentrations by minimizing the sum of squared deviations between the true absorption spectrum and its mathematical model was performed using a spreadsheet using the "Search for a solution" tool. The proposed method of mathematical processing of the spectrum can be used as an express method for determining the concentration of pigments in culture, without isolating pure pigments. The application of this method makes it possible to evaluate the contribution of pigments to the total absorption spectrum of the culture.

Key words: *porphyridium, carotenoids, chlorophyll a, phycobilins, true absorption spectrum, gaussians, tabular processor.*