

ДЕКОМПОЗИЦИЯ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ АЦЕТОНОВОГО ЭКСТРАКТА МИКРОВОДОРОСЛИ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS* NORTH. GEITL.**Чернышев Д.Н.¹, Ключкова В.С.¹, Лелеков А.С.², Серяк Е.С.¹**¹ Севастопольский государственный университет

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

² ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

Поступила в редакцию 15.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbps.2023.0599

Аннотация. В работе проведено описание спектров поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *Arthrospira (Spirulina) platensis* математическими моделями каротиноидов и хлорофиллов в области от 400 до 700 нм. Полученные значения концентрации пигментов хорошо согласуются со стандартными методами. Модель спектра поглощения ацетонового экстракта *A. platensis* может быть использована для определения концентрации хлорофилла *a* и каротиноидов без применения методов хроматографии. Показано отсутствие вклада хлорофилла *b* в суммарный спектр поглощения. Реализован метод математического разделения спектра поглощения ацетонового экстракта в программе Microsoft Excel. Вычисления, выполняющие приближения концентраций пигментов путем минимизации суммы квадратов отклонений между истинным спектром поглощения и его математической моделью, выполнены при помощи табличного процессора с использованием инструмента поиска решения.

Ключевые слова: кривые Гаусса, спирулина, каротиноиды, хлорофилл *a*, аппроксимация, ацетоновый экстракт, спектры поглощения.

ВВЕДЕНИЕ

Методы измерения концентрации пигментов микроводорослей и разделения их смеси представляют собой методически трудную задачу в практическом и теоретическом плане. При работе с интенсивными культурами микроводорослей необходимо использовать такие методы, которые позволяют определять концентрацию пигментов за достаточно короткое время. В большинстве исследований оценка концентрации выделенных пигментов определяется спектрофотометрическим методом. Стандартная биохимическая методика [1] предполагает экстракцию фотосинтетических пигментов микроводорослей каким-либо полярным растворителем, центрифугирование и спектрофотометрирование образцов с последующим расчётом содержания пигментов по известным экстинкциям. Однако такой подход позволяет оценить только те пигменты микроводорослей, максимумы поглощения которых не перекрываются, что делает невозможным разделение каротиноидов. Для решения этой проблемы используют методы тонкослойной, жидкостной хроматографии, которые требуют специализированного оборудования и длительной пробоподготовки.

Один из простых способов разделения и идентификации пигментов микроводорослей — это декомпозиция спектра ацетонового экстракта математическими моделями. Спектры растворов пигментов имеют несколько максимумов, каждый из которых определяется наличием субъединиц (хромофорных групп). Такие группы имеют симметричную форму распределения, относительно максимума. Это позволило количественно описать зависимость поглощения хлорофиллов и каротиноидов от длины волны в виде суммы гауссиан или лоренциан [2,3]. В предыдущей работе [4], предложено использовать кривые Гаусса для описания поглощения каждого пигмента. Каждый отдельный пик был описан выражением:

$$D(\lambda) = D_{\max} e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - \lambda_{\max}}{\sigma} \right)^2}, \quad (1)$$

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.

В настоящей работе было выполнено разделение и анализ накладываются полос пигментов в спектре поглощения экстракта методом аппроксимации с использованием табличного процессора MS Excel при реализации надстройки «Поиск решения». При этом оптимизировалась целевая функция, а именно сумма квадратов отклонений стремились к нулю, поиск решения проводился методом общего понижающего градиента (ОПГ).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась на базе кафедры «Физика» СевГУ (г. Севастополь). Объектом исследования являлась спирулина *Arthrospira (Spirulina) platensis* North. Geitl., полученная из коллекции Научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ «Коллекция гидробионтов Мирового океана». Выращивание проводилось в фотобиореакторе объёмом 1 л на среде Заррук [5] (для приготовления среды использовалась дистиллированная вода) методом накопительной культуры. В качестве источника освещения применялась

световая решётка из люминесцентных ламп Philips Daylight 54-765. Средняя освещённость рабочей поверхности составляла 5 клк. Барботаж: 0,5 л воздуха на литр культуры в минуту.

Пигменты экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном (100%) [1,6]. Спектры поглощения ацетоновых экстрактов и фиксировались на спектрофотометре Unicо 4802, в диапазоне от 400 до 800 нм, в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основными каротиноидами *A. platensis* являются бета-каротин, зеаксантин и миксоксантофилл, представленные в процентах от общих каротиноидов в отношении 35 %, 31 %, 24 % [7]. В модели Куппера [2] бета-каротин и зеаксантин имеют сходные спектры поглощения, разделить их математически невозможно, поэтому целесообразно использовать только одну модель, которая описывает сумму бета-каротина и зеаксантина. Кроме того, в ацетоновом экстракте спирулины в небольшом количестве содержится эхиноенон, криптоксантин [7] и феофитин. На начальном этапе моделирования в общую модель, описывающую спектр поглощения ацетонового экстракта, были включены следующие модели пигментов – хлорофилл *a*, феофитин, бета-каротин (=зеаксантин), миксоксантофилл, эхиноенон и криптоксантин. Оказалось, что рассчитанные концентрации феофитина, эхиноенона и криптоксантина – незначительные и стремятся к нулю. Поэтому в окончательную модель спектра вошли только хлорофилл *a*, бета-каротин (=зеаксантин) и миксоксантофилл. Отметим, что единицами измерения концентрации методом GPS [2] является мкмоль/л.

Реализован метод математического разделения спектра поглощения ацетонового экстракта в программе Microsoft Excel. Вычисления, выполняющие приближения концентраций пигментов путем минимизации суммы квадратов отклонений между спектром поглощения и его математической моделью, выполнены при помощи табличного процессора с использованием инструмента поиска решения. Спектр поглощения экстракта приближали с помощью математической модели, в которой неизвестными параметрами являются концентрации хлорофилла *a*, зеаксантина, миксоксантофилла. Было проведено описание спектров поглощения ацетонового экстракта микроводоросли *A. platensis* алгебраической суммой гауссиан в области от 400 до 750 нм. Полученные значения концентрации пигментов хорошо согласуются со стандартными методами [1,6] (расчет по точкам D_{480} и D_{662}).

На рисунке 1 представлен пример декомпозиции спектра поглощения ацетонового экстракта спирулины. Всего было обработано 24 спектра, коэффициент детерминации R^2 составлял от 0,996 до 0,999, что говорит о высокой точности предлагаемой модели. Среди каротиноидов во всех экстрактах преобладала смесь бета-каротина и зеаксантина.

Получены парные значения ($n = 25$) концентраций хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов, вычисленные разными методами (рис. 2). Коэффициент корреляции составил 0,9968 для хлорофилла *a*, 0,9976 для суммы каротиноидов, что свидетельствует о высокой связи между значениями концентраций, рассчитанных разными методами.

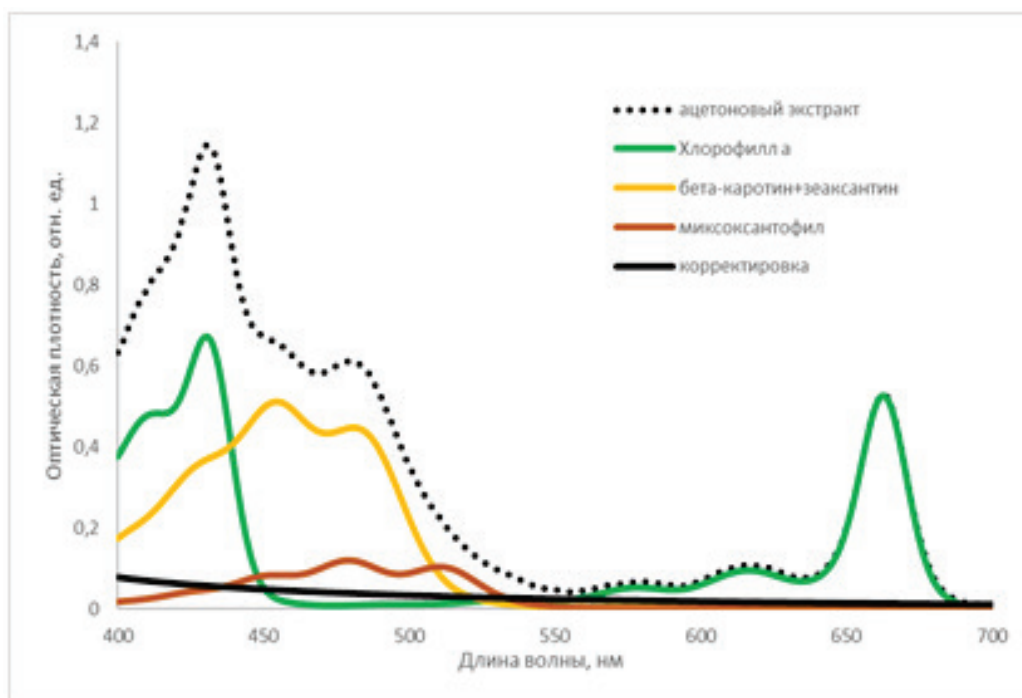


Рисунок 1. Пример разделения спектра поглощения ацетонового экстракта *A. platensis* методом GPS

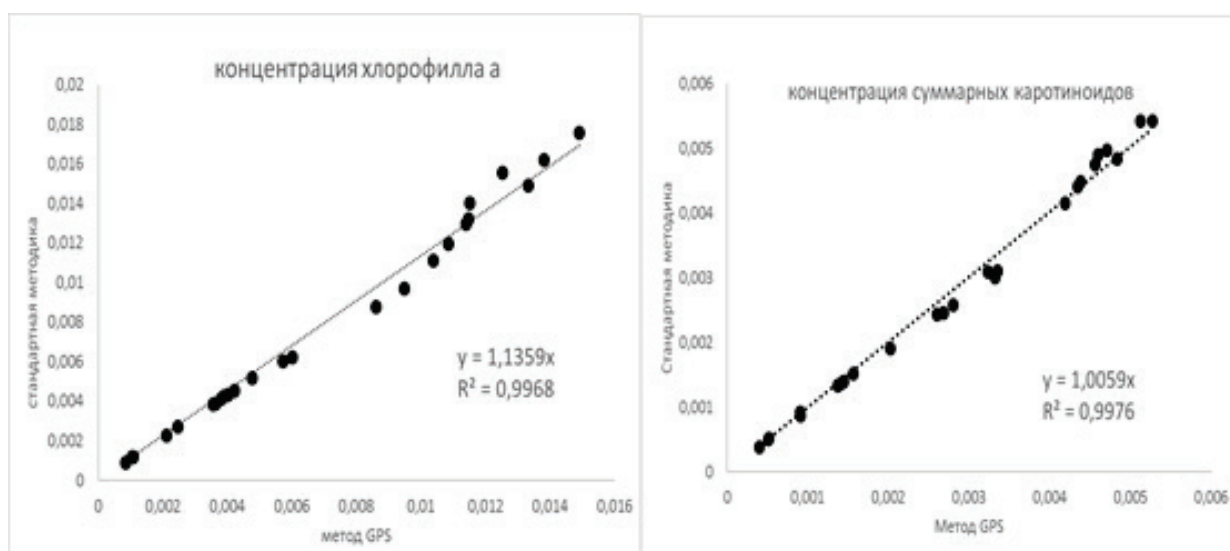


Рисунок 2. Зависимость между результатами (г/л), полученными стандартным методом и методом кривых Гаусса (GPS)

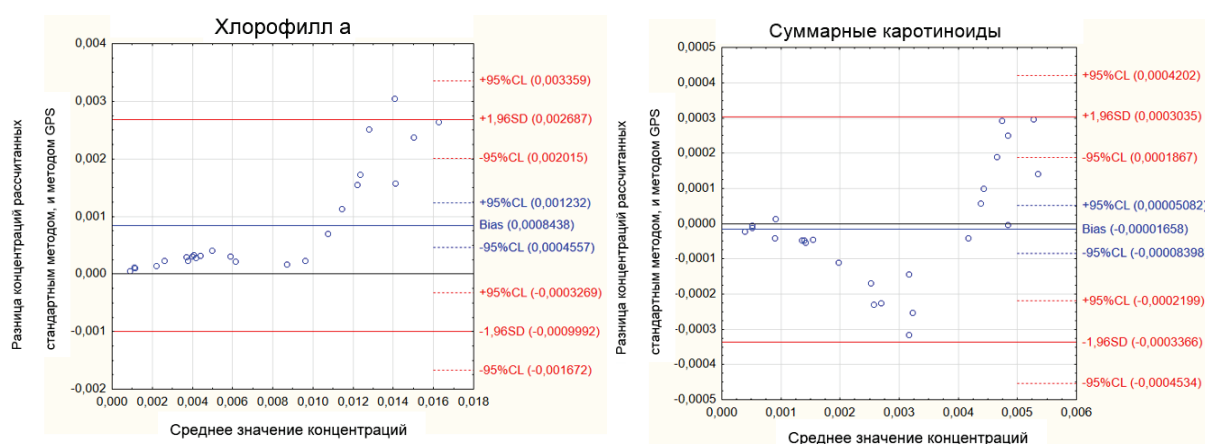


Рисунок 3. Диаграммы Блэнда-Алтмана, сравнения значений концентраций (г/л), рассчитанных по стандартной методике и методом GPS

При сравнении значений концентрации, полученных различными методами, был применен метод Блэнда-Алтмана [8] (рис. 3). Было установлено, что все концентрации хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов находятся в пределах двух стандартных отклонений разности концентраций, что говорит о согласованности измерений, полученных разными способами. Средняя разность методов с 95 % доверительным интервалом для хлорофилла *a* составила 0,0008438 [0,0004557; 0,001232], суммарных каротиноидов 0,00001658 [-0,00008398; 0,00005082]. В предложенном способе расчета в табличном процессоре все характеристики модели могут быть изменены (коэффициенты экстинкции, характеристики отдельных пиков).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что многими исследователями отмечается наличие хлорофилла *b* в клетках спирулины [9], результаты моделирования свидетельствуют об отсутствии вклада данного пигмента в суммарный спектр поглощения. При добавлении в общую модель спектра хлорофилла *b* его расчётная концентрация стремится к нулю. Предложенный способ математической обработки спектра статистически не отличается от стандартной методики и может быть использован как дополнительный метод определения концентрации пигментов в экстракте. Так же реализация данного метода позволяет наглядно оценить вклад отдельных пигментов в общий спектр. Используя данный метод можно увидеть, что в точке спектра 662 вклад вносит только хлорофилл *a*, а в точке 480 только каротиноиды.

Авторы готовы выслать файл для автоматизации расчета в программе Microsoft Excel на электронную почту всем заинтересованным лицам.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ, № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO, 1997, 661 p.
2. 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.
3. Barsanti L. et al. Absorption microspectroscopy, theory and applications in the case of the photosynthetic compartment. *Micron.*, 2007, vol. 38, no. 3, pp. 197-213.
4. Чернышев Д.Н., Клочкова В.С. Разделение нативного спектра поглощения культуры *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 2, с. 217-221 [Chernyshev D.N., Klochkova V.S. Separation of the native absorption spectrum of *Arthrospira (Spirulina) platensis* culture. *Actual Questions of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 2, pp. 217-221 (In Russ.)].
5. Zarrouk C. *Contribution à l'étude d'une cyanophycée*. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler: Ph. D these, 1966, 114 p.
6. 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 the dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis North*. Geitl.: training manual. RAS, Institute of Marine Biological Research. A.O. Kovalevsky, Sevastopol, 2017, 12 с. (In Russ.)].
7. Aakermann T. et al. A comparison of the carotenoids of strains of *Oscillatoria* and *Spirulina* (Cyanobacteria). *Biochemical systematics and ecology*, 1992, vol. 20, no. 8, pp. 761-769.
8. Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *International journal of nursing studies*, 2010, vol. 47, no. 8, pp. 931-936.
9. Piovan A., Battaglia J., Filippini R. et al. Pre- and early post-treatment with *Arthrospira platensis (Spirulina)* extract impedes lipopolysaccharide-triggered neuroinflammation in microglia. *Front. Pharmacol*, 2021, vol. 12, doi: 10.3389/fphar.2021.724993.

**DECOMPOSITION OF THE ABSORPTION SPECTRUM ACETONE EXTRACT OF MICROALGAE
ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS NORTH. GEITL.**

Chernyshev D.N.¹, Klochkova V.S.¹, Lelekov A.S.², Seryak E.S.¹

¹ Sevastopol State University

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

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nakhimov Ave. Nakhimova, 2, Sevastopol, 299011, Russia

Received 15.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbc.2023.0599

Abstract. We have described the absorption spectra of acetone extract of the microalga *Arthrospira (Spirulina) platensis* by mathematical models of carotenoids and chlorophylls in the range from 400 to 700 nm. The obtained values of pigment concentrations agree well with standard methods. A model of the absorption spectrum of acetone extract of *A. platensis* can be used to determine the concentration of chlorophyll a and carotenoids. The absence of chlorophyll b contribution to the total absorption spectrum was shown. The method of mathematical separation of acetone extract absorption spectrum in Microsoft Excel program was implemented. Calculations performing approximations of pigment concentrations by minimizing the sum of squares of deviations between the true absorption spectrum and its mathematical model have been performed using the spreadsheet processor with the help of the solution search tool.

Key words: *gaussian curves, spirulina, carotenoids, chlorophyll a, approximation, acetone extract, absorption spectra.*