

МОДЕЛЬ РЕКОНСТРУКЦИИ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ КРАСНОЙ ОБЛАСТИ *SPIRULINA PLATENSIS IN VIVO* ПО ХАРАКТЕРИСТИКАМ РАСТВОРОВ ХЛОРОФИЛЛА *a* И ФИКОБИЛИНОВ

Чернышев Д.Н.¹, Тренкеншу Р.П.²

¹ Севастопольский государственный университет

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

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

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

Поступила в редакцию: 03.08.2019

Аннотация. В работе количественно описан спектр поглощения ацетонового экстракта хлорофилла *a* микроводоросли *Spirulina platensis* тремя кривыми Гаусса в области от 550 до 700 нм. Полученная модель, с поправкой сдвига максимума поглощения, учитывающая упаковку пигмента в клетках, взята за основу для описания спектра поглощения нативной формы хлорофилла *a* в области 600-700 нм. Спектр водного экстракта фикобилинов также описывается гауссианой, но без поправок на упаковку. Используя суммарную модель можно описать красную область спектра поглощения культуры *S. platensis* и определить концентрации хлорофилла и фикобилинов по спектрам поглощения нативных культур.

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

ВВЕДЕНИЕ

Измерения концентрации пигментов в культурах микроводорослей представляет собой относительно сложную задачу как в теоретическом так в практическом плане. Как правило, в современных исследованиях используются методы, связанные с выделением пигментов из клеток путем их разрушения с дальнейшим экстрагированием. [1]. В подавляющем большинстве случаев оценка концентрации выделенных пигментов определяется спектрофотометрически.

В тоже время описаны способы определения пигментов в нативной культуре микроводорослей. Например, с хорошей точностью концентрация хлорофилла *a* коррелирует с красным максимумом поглощения в области длины волны 680 нм, измеренной, относительно 730-750 нм, ($\Delta D_{680} = D_{680} - D_{730}$) для хлореллы [2]. Такой же коэффициент, (сечение поглощения хлорофилла *a* был получен для морской микроводоросли *Platimonas viridis* [3]. Необходимо заметить, что измерения производились на двухлучевом спектрофотометре с интегрирующей сферой, которая обеспечила высокую точность измерения оптических характеристик и исключает фактор рассеяния света.

Вместе с тем, хорошо изучены оптические свойства пигментов, выделенных из клетки с помощью различных растворителей [4].

Оказалось, что спектры растворов пигментов имеют несколько максимумов, каждый из которых определяется наличием субъединиц (хромофорных групп). Эти группы имеют симметричную форму распределения, относительно максимума. Это позволило количественно описать зависимость поглощения от длины волны в виде суммы гауссиан или лоренциан. [5] По крайней мере для растворов хлорофиллов и каротиноидов [6]. При переходе к нативным формам пигментов максимумы сдвигаются. [7]

В предлагаемой работе сделана попытка количественно описать спектр поглощения культур микроводорослей и определить коэффициенты, позволяющие вычислить концентрации пигментов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объект исследования – спектры поглощения культуры и ацетоновых экстрактов микроводоросли *Spirulina platensis*.

Культуру *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl, из коллекции культур ИМБИ РАН, выращивали в культиваторах плоско-параллельного типа на среде «Zagrouk», в накопительном режиме, освещенность поверхности культиватора – 80 Вт/м², температура – 26-28°C. Культура постоянно снабжалась газо-воздушной смесью с 3% содержанием углекислого газа.

Пигменты экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном (100%) [1]. Спектры поглощения ацетоновых экстрактов и фиксировались на спектрофотометре Unicо 4802, в диапазоне от 400 до 800 нм, в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Спектры нативных культур регистрировались на спектрофотометре Lambda 35 с интегрирующей сферой.

Для анализа спектров поглощения культуры и экстрактов *S. platensis* использовался метод разделения длинноволновой области спектра (от 600 до 700) на отдельные кривые Гаусса. Длинноволновая область спектра была разделена на 3 кривые Гаусса. Начальные параметры аппроксимации и количество кривых было задано исходя из анализа литературных данных [5, 8]

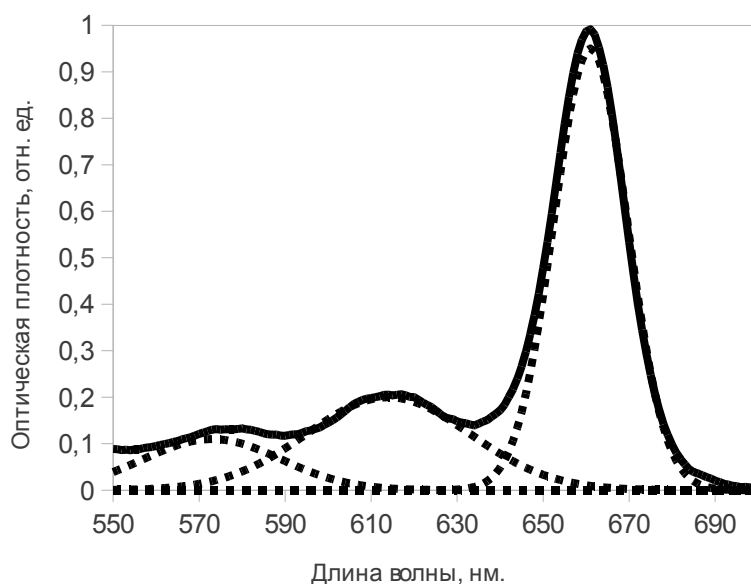


Рисунок 1. Разделение нормированного спектра поглощения ацетонового экстракта хлорофилла *a* в области 550-700 нм

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Область спектра от 550 до 700 нм была выбрана для моделирования по нескольким причинам, а именно: спектральные характеристики хлорофилла *a* особенно велики, и в данной области каротиноиды не вносят значимый вклад в спектр поглощения [9].

Спектр ацетонового экстракта хлорофилла *a* *S. platensis*, нормированный в точке максимума 662 нм, был описан в области 550-700 нм тремя кривыми Гаусса (рис. 1).

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

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

λ_i – длина волны, нм;

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

D_{\max} – амплитуда пика, отн. ед.;

σ – полуширина пика, нм.

Аппроксимация проводилась методом доверительных областей с заданными ограничениями и начальными параметрами. Коэффициент детерминации R^2 составил 0,998. Результаты аппроксимации приведены в таблице 1.

Основной проблемой при переходе от спектров растворов пигментов к измерению оптических характеристик нативных культур микроводорослей является то, что в клетке пигменты имеют гетерогенную структуру. Пигменты упакованы определенным образом, что приводит к изменению максимумов поглощения и, возможно, к изменению полуширины отдельных пиков, например, пики нативного хлорофилла *a* в области 550-730 нм сдвигаются на +12 нм [7]. Данные поправки были внесены в модель хлорофилла *a* в культуре. Известно, что смещение полосы поглощения хлорофилла не сопровождается изменением интенсивности и коэффициента экстинкции [10]. Поскольку в красной области спектра (550-750 нм) у синезеленых водорослей поглощение света происходит за счет фикобилиновых пигментов и хлорофилла *a*, необходимо учитывать

Таблица 1. Коэффициенты модели ацетонового экстракта хлорофилла *a*

Номер пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	568	16,0	0,11
2	617	20,6	0,20
3	661	8,6	0,95

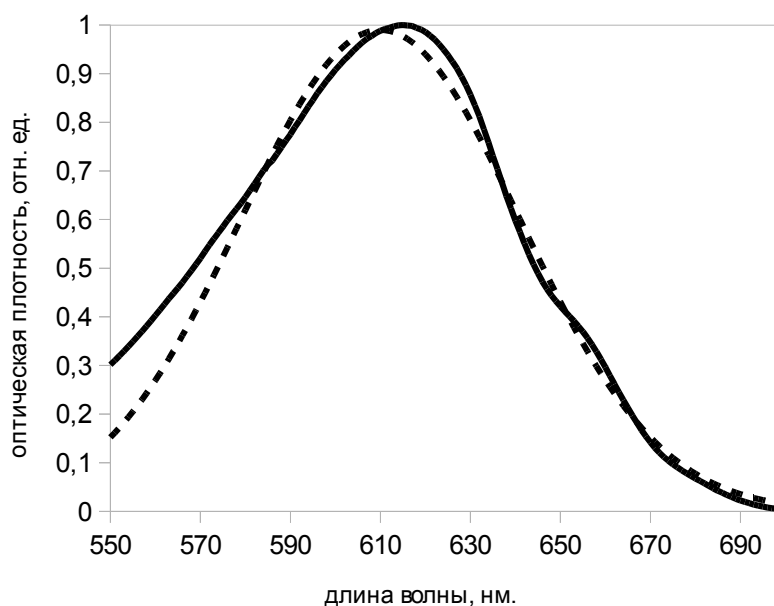


Рисунок 2. Спектр поглощения экстракта фикобилиновых пигментов и его модель

суммарные фикобилины. Экстракция фикобилиновых пигментов проведена по стандартной методике [11]. Была составлена простая модель для спектра данных пигментов, (нормировка 615), из одной кривой Гаусса (рис. 2).

Параметры модели приведены в таблице 2.

Принято считать, что в нативной форме максимум фикобилиновых пигментов не сдвигается. Полученную модель применена к нативному спектру (рис. 3).

Значения полученной модели нативного хлорофилла *a* приведены в таблице 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В приведенной работе предложена модель спектра поглощения нативных форм хлорофилла *a* и фикобилинов в культуре *S. platensis*. В модели достаточно использовать спектральные характеристики в интервале от 600 до 700 нм. Данная модель может использоваться для определения концентраций хлорофилла *a* и фикобилинов, используя непосредственно спектр поглощения культуры *in vivo*.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН» по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Таблица 2. Параметры модели спектра поглощения фикобилиновых пигментов

Номер пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	610	31	0,99

Таблица 3. Коэффициентов модели нативного хлорофилла *a*

Номер пика	Положение максимума, нм	Полуширина, нм	Амплитуда, отн. ед.
1	586	23,6	0,11
2	635	30,4	0,20
3	679	12,7	0,95

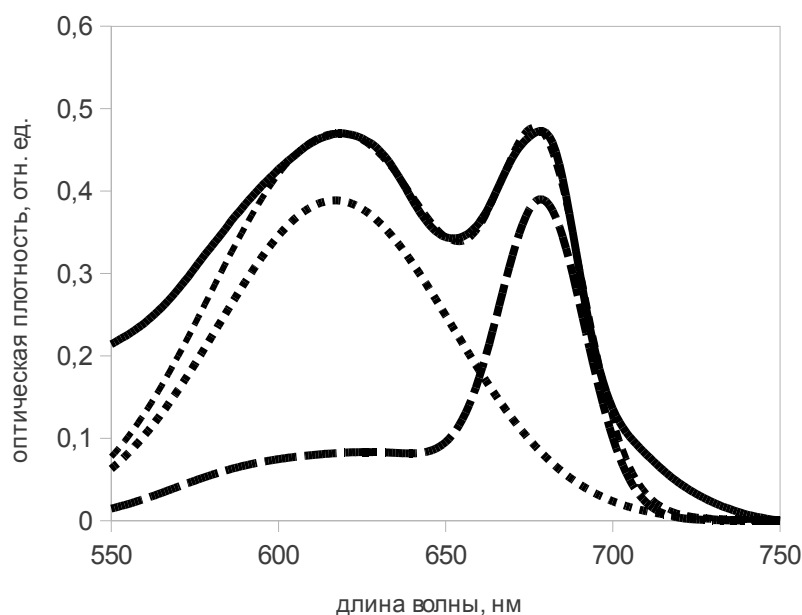


Рисунок 3. Спектр поглощения культуры *S. platensis* и его разделение на хлорофилл *a* (—) и суммарный спектр фикобилиновых пигментов (---)

Список литературы / References:

1. Копытов Ю.П. и др. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей. *Альгология*, 2015. [Kopytov Yu. P. et al. Method of complex determination of biochemical composition of microalgae. *Algology*, 2015. (In Russ.)]
2. Сидько Ф.Я., Белянин В.Н. Рост и эффективность фотосинтеза хлореллы при прерывистом облучении. *Доклады Академии наук СССР*, Изд-во Академии наук СССР, 1976, т. 230, №. 4-6, 998 с. [Sidko F. Ya., Belyanin V. N. Growth and efficiency of *Chlorella* photosynthesis under intermittent irradiation. *Reports of the USSR Academy of Sciences*, Publishing house of the USSR Academy of Sciences, 1976, vol. 230, no. 4-6, 998 p. (In Russ.)]
3. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch., 1979. [Trenkenshu R.P., Belyanin V.N. Influence of elements of mineral nutrition on productivity of algae *Platymonas viridis* Rouch., 1979. (In Russ.)]
4. Jeffrey S.W. Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. *Phytoplankton pigments in oceanography*, 1997, pp. 449-559.
5. Küpper 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.
6. Чернышев Д.Н., Боровков А.Б. Разделение спектра поглощения ацетонового экстракта *Dunaliella salina*. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2016, № 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 (1), pp. 51-56. (In Russ.)]
7. 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. 290-303.
8. Парамонов Л.Е. Спектр показателей поглощения и внутриклеточная концентрация пигментов цианобактерий на примере *Spirulina platensis*. *Оптика атмосферы и океана*, 2018, т. 31, № 02, с. 103-108. [Paramonov L.E. Spectrum of indicators of absorption and intracellular concentration of cyanobacteria pigments on the example of *Spirulina platensis*. *Optika Atmosfery i Okeana*, 2018, vol. 31, no. 02, pp. 103-108. (In Russ.)]
9. Küpper H., Spiller M., Küpper F. C. Photometric method for the quantification of chlorophylls and their derivatives in complex mixtures: fitting with Gauss-Peak spectra. *Analytical Biochemistry*, 2000, vol. 286, no. 2, pp. 247-256.
10. Рабинович Е., Ильина А.А., Бояркина А.Н. *Фотосинтез*: Пер. с англ. – Иностранной литературы, 1953. [Rabinovich E., Ilyina A. A., boyarkina A. N. *Photosynthesis*: Per. s angl. – Inostrannoy literatuty, 1953. (In Russ.)]
11. 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 allophycoerythrin in the dry biomass of Spirulina (Arthrospira) platensis North. Geitl. Cold extraction: educational and methodical manual*. Russian Academy of Sciences, Institute of marine biological studies. A.O. Kovalevsky, Sevastopol, 2017, 21 p. (In Russ.)]

MODEL OF RECONSTRUCTION OF THE ABSORPTION SPECTRUM OF THE RED REGION *SPIRULINA PLATENSIS* IN VIVO BY CHARACTERISTICS OF CHLOROPHYLL *a* AND PHYCOBILIN SOLUTIONS**Chernyshev D.N.¹, Trenkenshu R.P.²**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 RAS*Nakhimov str., 2, Sevastopol, 299011, Russia*

Abstract. The article describes quantitatively the absorption spectrum of the acetone extract of chlorophyll and micro-algae *Spirulina platensis* by three Gauss curves in the range from 550 to 700 nm. The obtained model, with the correction of the absorption maximum shift, taking into account the pigment packing in the cells, is taken as a basis for the description of the absorption spectrum of the native form of chlorophyll *a* in the range of 600-700 nm. Spectrum of aqueous extract of phycobilins is also described as Gaussian, but with no adjustments for packing. Using the total model it is possible to describe the red region of the absorption spectrum of *S. platensis* culture and determine the concentration of chlorophyll and phycobilins by the absorption spectrum of native cultures.

Key words: *spirulina, chlorophyll a, phycobilins, absorption spectra, Gaussians.*