



Научная статья

DOI: 10.18287/2541-7525-2024-30-1-122-131

УДК 579.017:57.033

Дата: поступления статьи: 15.01.2024
после рецензирования: 20.02.2024
принятия статьи: 28.02.2024

Д.Н. Чернышёв

Севастопольский государственный университет,
г. Севастополь, Российская Федерация

E-mail: chernishev@gmail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8120-7382>

В.С. Клочкова

Севастопольский государственный университет,
г. Севастополь, Российская Федерация

E-mail: viki-iki@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2120-9589>

А.С. Лелеков

ФГБУН ФИЦ "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН",
г. Севастополь, Российская Федерация

E-mail: a.lelekov@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1213-7963>

МОДЕЛЬ ДЕКОМПОЗИЦИИ НАТИВНОГО СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ КУЛЬТУРЫ *PORPHYRIDIUM PURPUREUM*

АННОТАЦИЯ

В статье разработана модель нативного спектра поглощения культуры красной морской водоросли *Porphyridium purpureum*. Математическая модель каждого пигмента представляет сумму кривых Гаусса. Для нивелирования светорассеяния спектры культуры фиксировались на спектрофотометре с интегрирующей сферой. Для верификации модели проводилась серия параллельных измерений концентрации фотосинтетических пигментов стандартными биохимическими методиками и методом кривых Гаусса. Показано, что предлагаемая модель с достаточной точностью позволяет определить концентрацию основных фотосинтетических пигментов культуры *Porphyridium purpureum*, не вмешиваясь в процессы ее роста.

Ключевые слова: математическая модель; В-фикоэритрин; хлорофилл *a*; суммарные каротиноиды; кривые Гаусса; истинный спектр поглощения.

Цитирование. Чернышёв Д.Н., Клочкова В.С., Лелеков А.С. Модель декомпозиции нативного спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum* // Вестник Самарского университета. Естественная серия / Vestnik of Samara University. Natural Science Series. 2024. Т. 30, № 1. С. 122–131. DOI: <http://doi.org/10.18287/2541-7525-2024-30-1-122-131>.

Информация о конфликте интересов: авторы и рецензенты заявляют об отсутствии конфликта интересов.

© Чернышёв Д.Н., Клочкова В.С., Лелеков А.С., 2024

Дмитрий Николаевич Чернышёв — заведующий лабораторией кафедры физики, Севастопольский государственный университет, 299053, Российская Федерация, г. Севастополь, ул. Университетская, 33.
Виктория Сергеевна Клочкова — инженер кафедры физики, Севастопольский государственный университет, 299053, Российская Федерация, г. Севастополь, ул. Университетская, 33.

Александр Сергеевич Лелеков — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, отдел биотехнологий и фиторесурсов, ФИЦ "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН", 299011, Российская Федерация, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2.

Введение

Водоросли рода *Porphyridium* известны тем, что продуцируют фикобилипротеины, полиненасыщенные жирные кислоты и экзополисахариды [1]. Фикобилипротеины – это группа окрашенных, водорастворимых белков, составляющих основной комплекс светособирающих пигментов цианобактерий, красных водорослей, глаукоцистофитов и криптофитов. Фикоэритрин является основным пигментом красных морских водорослей, составляющим 60–80 % от общего количества растворимых белков [2]. Также пигменты представлены хлорофиллом *a* и каротиноидами (преимущественно бета-каротин и зеоксантин). Хлорофилл *a* – основной фотосинтетический пигмент микроводорослей, а такие каротиноиды, как бета-каротин и зеоксантин, являются фотопротекторными пигментами и передают энергию на хлорофилл при фотосинтезе [3].

Количественное содержание пигментов в культуре микроводорослей представляет ценную информацию о физиологическом состоянии, однако их определение достаточно сложная и трудоемкая задача [4]. Среди множества доступных современных методов наиболее используемыми являются микроволновая экстракция, ультразвуковая экстракция, гомогенизация под высоким давлением, экстракция сверхкритическими жидкостями и ускоренная экстракция растворителем (также называемая экстракцией жидкостью / растворителем под давлением или субкритической экстракцией растворителем) [5; 6]. При работе с интенсивными культурами микроводорослей достаточно часто возникает необходимость определения пигментов, не прибегая к экстракции и не вмешиваясь в процессы роста культуры. Определение пигментов *in vivo* – это быстрый метод без разрушения клеток. Одним из способов вычисления концентрации пигментов в нативном состоянии является анализ спектров поглощения культуры микроводорослей с помощью математического моделирования [7].

Таким образом, целью данной статьи является разработка математической модели спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum*, которая позволяла бы определять концентрации основных фотосинтетических пигментов: хлорофилла *a*, В-фикоэритрина и суммарных каротиноидов.

1. Материалы и методы исследования

Экспериментальные работы выполняли на базе кафедры "Физика" СевГУ. В работе использовалась красная морская водоросль *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross (Rhodophyta). Культуру *P. purpureum* выращивали в накопительном режиме, используя среду для красных морских водорослей [8], в плоскопараллельном фотобиореакторе объемом 1,2 л, рабочая толщина культуры – 2 см [9]. Нижняя грань фотобиореактора расположена под углом с целью улучшения перемешивания суспензий микроводорослей и цианобактерий. Сверху культиватор закрывался пластиковой крышкой, в которой было выполнено отверстие для подачи воздуха, а также был оснащен системой охлаждения ("водяной рубашкой"), обеспечивающей поддержание температуры.

В качестве источника освещения использовали горизонтальную световую решетку из светодиодных ламп LCD Feron LB-213 мощностью 10 Вт. В эксперименте освещенность составляла 5 клк или 17 Вт·м⁻². Температуру стабилизировали на уровне 25 ± 1 °С. Барботаж культуры осуществляли аквариумным компрессором Hailea АСО-308 воздухом через аквариумный распылитель, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм, у которой диаметр пор не превышает 0,1 мм. Скорость подачи воздуха составляла 1 л·л⁻¹ культуры в минуту. Дополнительного введения углекислого газа не производилось.

Отбор проб для определения оптической плотности проводили из разных точек внутри фотобиореактора: отбирали по 5 мл суспензии клеток водорослей, получая таким образом "среднюю пробу" объемом 30 мл. В средней пробе после перемешивания определяли коэффициент пропускания. Оптическую плотность рассчитывали по формуле: $D = -\lg(T)$, где T – величина пропускания, определяемая на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм, погрешность измерения величины пропускания не превышала 1 %. Кюветы располагали максимально близко к фотоприемнику, что позволяло снизить ошибку измерения оптической плотности культуры, связанную со светорассеянием. Пробы с оптической плотностью выше единицы предварительно разбавляли свежей питательной средой, подбирая коэффициент разбавления таким образом, чтобы показания КФК-2 попадали в диапазон наименьшей погрешности (0,2 – 0,6 единиц).

Для определения сухого веса 5–10 мл суспензии центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об·мин⁻¹, сливали надосадочную жидкость, осадок промывали дистиллированной водой, повторно центрифугировали и сушили в течение суток при 55 °С. В результате получена линейная зависимость сухого веса от оптической плотности D_{750} , а коэффициент пропорциональности составил $k = 0,7$ г СВ·л⁻¹·ед. опт. пл⁻¹.

Пробы для определения содержания пигментов отбирали ежедневно на различных фазах роста накопительной культуры после тщательного перемешивания. Концентрации хлорофилла *a*, В-фикоэритрина и суммарных каротиноидов (далее — хл *a*, В-ФЭ, кр) определяли согласно стандартным методикам [10–12]. После отбора проб из фотобиореактора проводили центрифугирование при 3000 об·мин⁻¹, надосадочную жидкость сливали. Далее проводили несколько циклов "замораживание-оттаивание" в морозильной камере при -18 °С. Затем В-ФЭ экстрагировали водным буферным раствором с рН 7–7,5. После изменения цвета осадка (из красного на зеленый), с помощью ацетона выделяли хл *a*. Спектры экстрактов пигментов записывали на спектрофотометре Unicо в кварцевых 1 см кюветах в диапазоне длин волн 400 — 800 нм с шагом 0,5 нм. Регистрировали оптическую плотность полученных экстрактов в области характеристических максимумов поглощения В-ФЭ (545 нм), R-фикоцианина (615 нм), аллофикоцианина (650 нм), хл *a* (663 нм) и кр (480 нм). Концентрацию В-ФЭ определяли по [10], хл *a* [11], кр [12] с учетом объемов экстрактов и массы навесок:

$$C_{BPE} = \frac{D_{650}}{\varepsilon_{APC}} + \frac{D_{615}}{\varepsilon_{RPC}} + \frac{D_{545}}{\varepsilon_{BPE}}, \quad (1)$$

$$C_{chla} = \frac{D_{663}}{\varepsilon_{chla}}, \quad (2)$$

$$C_{car} = \frac{D_{480}}{\varepsilon_{car}}, \quad (3)$$

где D_{650} , D_{615} , D_{545} , D_{680} , D_{480} — значения оптических плотностей в соответствующей длине волны; ε_{BPE} — экстинкция В-фикоэритрина 10 (л·г⁻¹·см⁻¹); ε_{RPC} — экстинкция R-фикоцианина 7 (л·г⁻¹·см⁻¹); ε_{APC} — экстинкция аллофикоцианина 5,8 (л·г⁻¹·см⁻¹); ε_{chla} — экстинкция хлорофилла *a* 88,15 (л·г⁻¹·см⁻¹); ε_{car} — экстинкция суммарных каротиноидов 2500 (л·г⁻¹·см⁻¹).

Спектры поглощения культуры регистрировались в диапазоне от 400 до 800 нм с шагом 0,5 нм на двухлучевом спектрофотометре Lambda 365 Double Beam UV-Visible (производитель: Perkin Elmer, Индия), который оснащен интегрирующей сферой (ИС) диаметром 60 мм (внешнее покрытие — BaSO₄). Для определения концентрации пигментов методом кривых Гаусса необходим истинный спектр поглощения, компенсированный на рассеяние, который определяли по формуле [13]:

$$\tilde{A} = D(\lambda; r) - L(r; 0) \cdot [D(\lambda; r) - D(\lambda; 0)], \quad (4)$$

где $D(\lambda; r)$ — оптическая плотность образца, расположенного на некотором расстоянии r от ИС; $L(r; 0)$ — поправочный коэффициент ослабления света; $D(\lambda; 0)$ — оптическая плотность образца при стандартном положении кюветы.

2. Результаты и их обсуждение

Экспериментальные результаты

На рис. 1, *A* представлена накопительная кривая роста культуры *P. purpureum*, которая характеризуется наличием ярко выраженных экспоненциальной и линейной фаз роста.

Биомасса культуры за две недели эксперимента увеличилась почти в 50 раз и достигла 1,7 г СВ·л⁻¹, что с учетом толщины фотобиореактора (1 см) составляет 17 г СВ·м⁻². Экспоненциальная и линейная фазы роста культуры описывались выражениями:

$$B = B_0 \cdot e^{\mu_m \cdot t}, \quad B = B_l + P_m \cdot (t - t_l), \quad (5)$$

где B_0 — начальная плотность культуры, г СВ·л⁻¹; μ_m — максимальная удельная скорость роста, которая составила 0,7 сут⁻¹; B_l — плотность культуры на момент начала линейного роста t_l ; P_m — максимальная продуктивность, значение которой составило 0,21 г СВ·л⁻¹·сут⁻¹.

Проведенные расчеты позволяют предположить, что рост порфиридиума начиная с третьих суток эксперимента был ограничен потоком углекислого газа. В работе [14] показано, что максимальная продуктивность культуры *P. purpureum* достигала 0,42 г СВ·л⁻¹·сут⁻¹ при такой же освещенности и рабочем слое культуры.

На рис. 1, *B* представлена динамика истинных спектров поглощения, компенсированных на рассеяние, определенные по формуле (4). Получим математическую модель, позволяющую описать такие данные и определить концентрации основных фотосинтетических пигментов.

Модель спектра поглощения

При анализе нормированного в точке максимума (678 нм) спектра поглощения культуры *P. purpureum*, для достоверного выявления пиков была вычислена производная второго порядка.

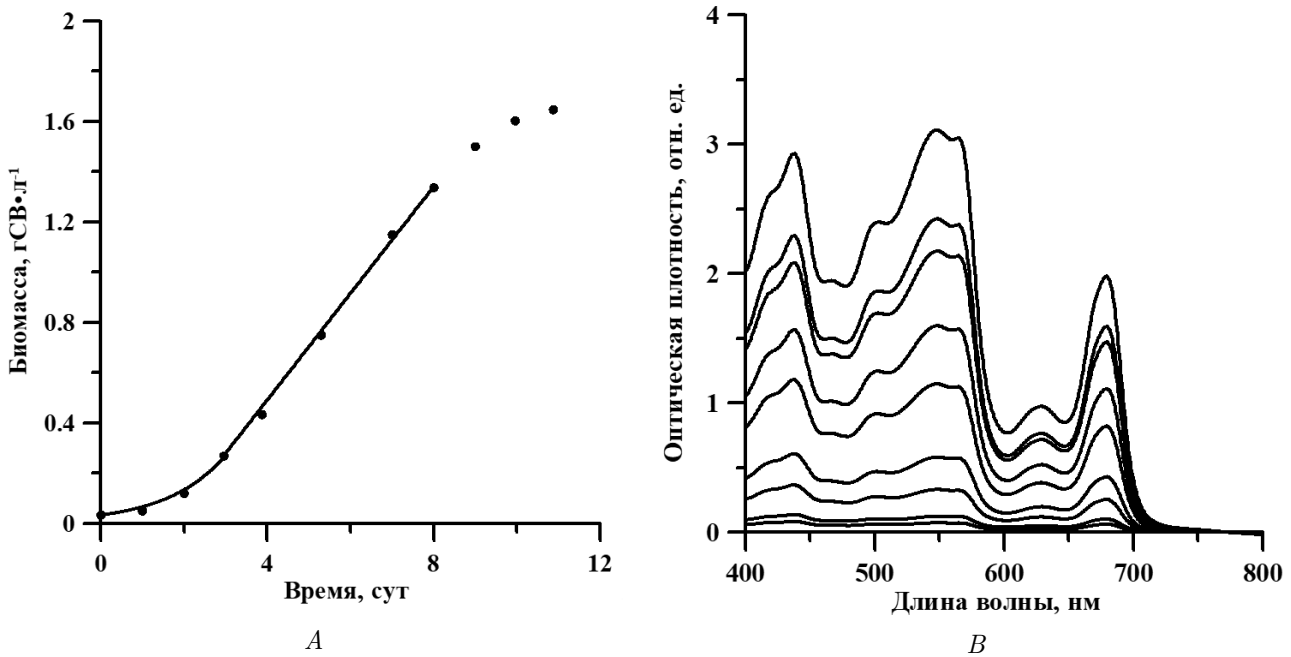


Рис. 1. Накопительная кривая роста культуры *P. purpureum* (A). Сплошные линии — аппроксимации экспоненциальной (0 — 3 суток) и линейной (3 — 8 суток) фаз. Истинные спектры поглощения культуры *P. purpureum*, скомпенсированные на рассеяние (B)

Fig. 1. Batch growth curves of *P. purpureum* culture (A). Solid lines are approximations of exponential (0 — 3 days) and linear (3 — 8 days) phases. True absorption spectra of *P. purpureum* culture compensated for scattering (B)

Контур второй производной похож на спектр поглощения, но его полосы имеют более тонкую организацию [15]. Производная второго порядка (отрицательные области) позволяет точно выявить скрытые дополнительные максимумы в общем спектре поглощения (рис. 2, A). Можно предположить, что выявленные явные максимумы связаны с определенными полосами поглощения основных пигментов красной микроводоросли *P. purpureum*. Полученные данные послужили начальными точками максимумов пиков при аппроксимации спектра кривыми Гаусса. Каждый отдельный пик был описан формулой (6):

$$D(\lambda) = D_{max} \cdot e^{-0,5 \cdot \left(\frac{\lambda_i - \lambda_{max}}{\sigma}\right)^2} \quad (6)$$

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.

Для описания спектра поглощения нативной формы хлорофилла *a* в работах [7; 16] приводится 4 кривых Гаусса с максимумами 415, 435, 623, 675 нм. Пик хл *a* в области 680 нм необходимо разделить на 2 кривых (673 и 683 нм). Такое разделение основано на дифференциальном спектре — появление двух максимумов в области 680 нм. Аппроксимация спектра поглощения культуры *P. purpureum* подтвердила, что в области 680 нм пик хл *a* необходимо разделять на две составляющие, при этом коэффициент детерминации приближается к 1 (рис. 2, B). Нативные каротиноиды у [16] описываются двумя кривыми Гаусса с максимумами 489, 532 нм. В нашем случае (рис. 2, C) в процессе приближения функции к нативному спектру поглощения получены 2 кривые Гаусса с максимумами 465 и 490 нм. У фикобилиновых пигментов форма и положение максимумов практически не изменяются при переходе от экстрактов к нативным формам [10; 17]. На основе полученных данных о спектрах поглощения пигментов на рис. 2, (B – F) приведены модели отдельных пигментов.

Таким образом, модель спектра поглощения культуры *P. purpureum* представляет собой сумму спектров хл *a* и В-ФЭ, R-фикоцианина, аллофикоцианина и кр:

$$D(\lambda) = D_{BPE}(\lambda) + D_{RPC}(\lambda) + D_{APC}(\lambda) + D_{chla}(\lambda) + D_{car}(\lambda), \quad (7)$$

$$D_{BPE}(\lambda) = C_{BPE} \cdot \varepsilon_{BPE} \left(0,25 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 493,3}{19,0}\right)^2} + 0,99 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 543,2}{23,2}\right)^2} + 0,4 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 570,1}{8,3}\right)^2} \right),$$

$$D_{RPC}(\lambda) = C_{RPC} \cdot \varepsilon_{RPC} \left(0,31 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 545,3}{32,8}\right)^2} + 0,26 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 552,7}{12,9}\right)^2} + 0,33 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 585,9}{14,3}\right)^2} + 0,94 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 617}{14,4}\right)^2} \right),$$

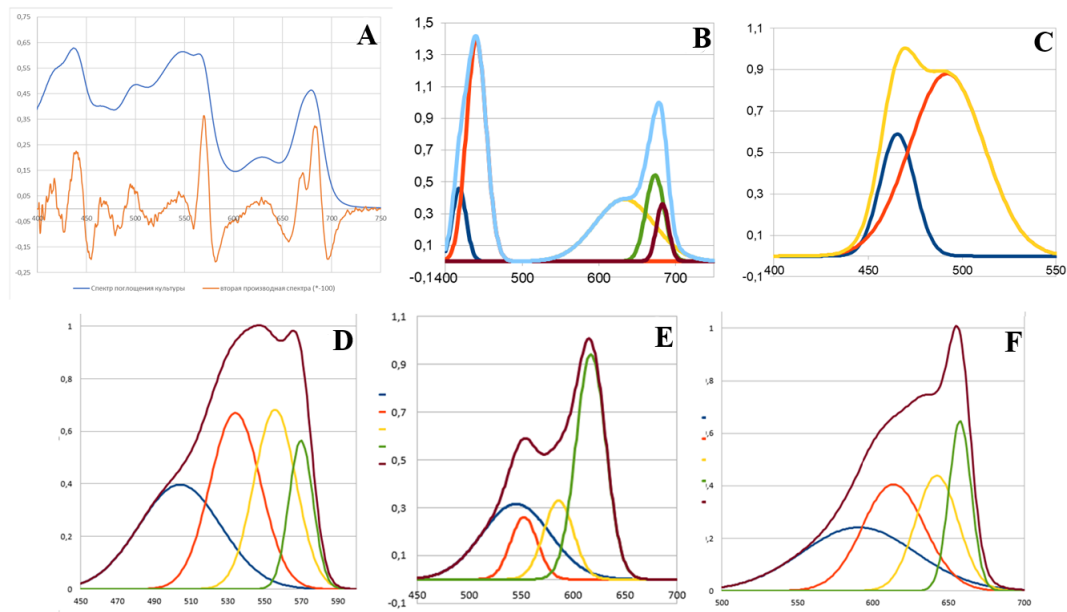


Рис. 2. Спектр поглощения культуры микроводоросли *P. purpureum*, нормированный по значению D_{678} и вторая производная спектра (умноженная на (-100)) (A). Математическая модель спектра хл *a* (B), кр (C), В-ФЭ (D), R-фиикоцианина (E) и аллофиикоцианина (F)

Fig. 2. Absorption spectrum of microalgae *P. purpureum* normalized by D_{678} value and the second derivative of the spectrum (multiplied by (-100))(multiplied by (-100)) (A). Mathematical model of the spectrum of chl *a* (B), car (C), B-PE (D), R-ficocyanin (E), and allophycocyanin (F)

$$D_{APC}(\lambda) = C_{APC} \cdot \varepsilon_{APC} \left(0,24 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 590,5}{37,7} \right)^2} + 0,40 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 613,6}{20,6} \right)^2} + 0,43 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 642,3}{14,1} \right)^2} + 0,64 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 657,6}{7,3} \right)^2} \right),$$

$$D_{chla}(\lambda) = C_{chla} \cdot \varepsilon_{chla} \left(0,38 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 633,6}{40,8} \right)^2} + 0,53 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 673,6}{12,3} \right)^2} + 0,35 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 683,3}{8,1} \right)^2} + 1,39 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 440,2}{12,99} \right)^2} + 0,45 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 417,8}{9,03} \right)^2} \right),$$

$$D_{car}(\lambda) = C_{car} \cdot \varepsilon_{car} \left(0,59 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 465,5}{9,1} \right)^2} + 0,88 \cdot e^{-0,5 \left(\frac{\lambda_i - 491,8}{19,8} \right)^2} \right),$$

где $D(\lambda)$ — общая оптическая плотность; $D_{BPE}(\lambda)$ — оптическая плотность В-фикоэритрина; $D_{RPC}(\lambda)$ — оптическая плотность R-фиикоцианина; $D_{APC}(\lambda)$ — оптическая плотность аллофиикоцианина; $D_{chla}(\lambda)$ — оптическая плотность хлорофилла *a*; $D_{car}(\lambda)$ — оптическая плотность суммарных каротиноидов; C_{BPE} — концентрация В-фикоэритрина ($\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$); C_{RPC} — концентрация R-фиикоцианина ($\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$); C_{APC} — концентрация аллофиикоцианина ($\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$); C_{chla} — концентрация хлорофилла *a* ($\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$); C_{car} — концентрация суммарных каротиноидов ($\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$); ε_{BPE} — экстинкция В-фикоэритрина $10 \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; ε_{RPC} — экстинкция R-фиикоцианина $7 \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; ε_{APC} — экстинкция аллофиикоцианина $5,8 \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; ε_{chla} — экстинкция хлорофилла *a* $88,15 \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; ε_{car} — экстинкция суммарных каротиноидов $2500 \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

На рис. 3 представлен пример разделения спектра поглощения культуры микроводоросли *P. purpureum* на отдельные кривые Гаусса методом аппроксимации моделью (7). Предлагаемый способ декомпозиции спектра может быть использован как экспресс-метод определения концентрации пигментов без их выделения в чистом виде, что важно при работе с накопительными культурами без вмешательства в процессы их роста.

Верификация модели

Для верификации полученных результатов была проведена серия параллельных измерений концентрации хл *a*, кр и В-ФЭ по стандартным методикам и предлагаемой модели (7). Сравнение результатов представлено на рис. 4.

Согласно рис. 4, значения концентраций В-ФЭ, хл *a* и кр, полученные с помощью стандартного метода, а также концентрации, определенные методом разложения истинных спектров поглощения на кривые Гаусса, коррелируют между собой с высокой точностью ($R^2 > 0,95$). Для определения концентрации хл *a* в обоих методах использовался коэффициент экстинкции в ацетоновом экстракте $88,15 \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [18].

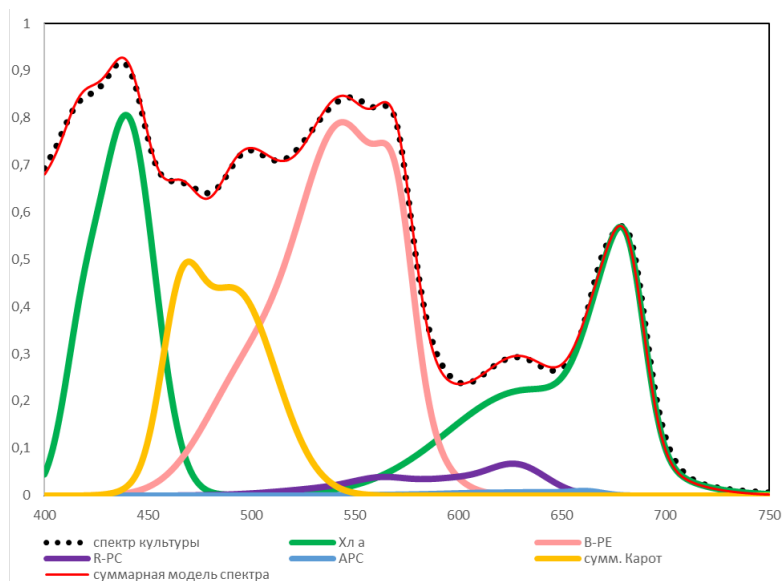


Рис. 3. Пример разделения спектра поглощения культуры микроводоросли *P. purpureum* на отдельные кривые Гаусса методом аппроксимации. Черными точками показан спектр поглощения культуры; зеленая линия — спектр хлорофилла *a*, розовая — В-фикоэритрина; фиолетовая — R-фикоцианина; синяя — аллофикоцианина; желтая — суммарных каротиноидов; красная — суммарная модель спектра
 Fig. 3. Example of separation of the absorption spectrum of the microalgae *P. purpureum* into separate Gaussian curves by approximation. Black dots show the absorption spectrum of the culture; green line — chlorophyll *a* spectrum, pink — B-phycoerythrin; purple — R-phycoerythrin; blue — allophycocyanin; yellow — total carotenoids; red — total spectrum model

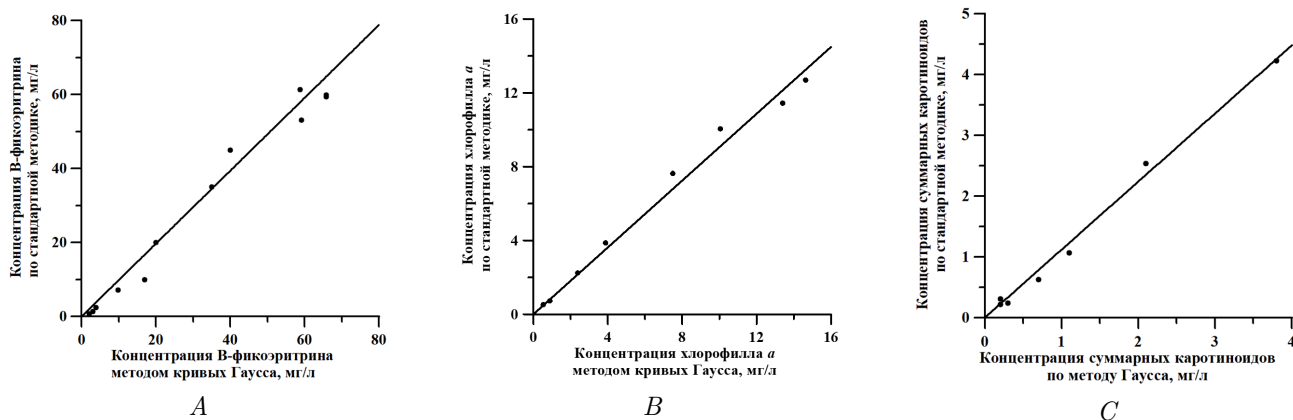


Рис. 4. Концентрация В-фикоэритрина (А), хлорофилла *a* (В) и суммарных каротиноидов (С), определенных по стандартной методике (1–3) и при помощи модели (6). Значения углов наклона прямой во всех вариантах близки к 1 ($R^2 > 0,95$)

Fig. 4. Concentrations of B-phycoerythrin (A), chlorophyll *a* (B) and total carotenoids (C) determined using the standard technique (1–3) and model (5). The values of the angles of slope of the straight line in all variants are close to 1 ($R^2 > 0,95$)

Известно, что нативный коэффициент экстинкции не совпадает с эталонным значением для ацетонового экстракта. В работе [19] коэффициент экстинкции хлорофилла *a* в нативной форме равен $76 \text{ л}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, а по данным [20] нативный коэффициент экстинкции хлорофилла *a* составляет $67,5 \text{ л}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ в максимуме поглощения 678 нм. Одним из объяснений различия между нативным коэффициентом экстинкции и коэффициентом экстинкции в ацетоновом растворе является эффект "упаковки" пигментов в клетках. Результаты расчетов показывают, что при экстинкции хл *a* $88,15 \text{ л}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ коэффициент корреляции (тангенс угла наклона) равен 0,9 (рис. 4 Б). Если при расчете концентрации хл *a* с помощью модели (7) использовать экстинкции $100 \text{ л}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, то коэффициент корреляции будет равен 1. Коэффициенты экстинкции В-ФЭ и кр не изменяются при переходе от экстрактов к нативным формам, поэтому в модели их значения составили $10 \text{ л}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ и $2500 \text{ л}\cdot\text{г}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ соответственно. Следует отметить, что для

определения концентрации фикобилипротеинов и суммарных каротиноидов необходимо аппроксимировать спектр поглощения культуры моделью (7). Для расчета концентрации хл *a* достаточно использовать значение оптической плотности при длине волны 680 нм, которое необходимо разделить на экстинкцию, так как поглощение других пигментов не влияет на оптическую плотность в этой области.

Заключение

В работе на основе анализа методов определения концентрации основных фотосинтетических пигментов: В-фикоэритрина, хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов разработана модель спектра поглощения культуры *P. purpureum*. Установлено, что метод кривых Гаусса с высокой точностью коррелирует со стандартными биохимическими методиками и может быть использован как экспресс-метод определения концентрации основных фотосинтетических пигментов *P. purpureum* без вмешательства в ход эксперимента. Однако предложенная модель не позволяет провести разделение каротиноидов (бета-каротина и зеоксантина). Отметим, что при работе с моделью (7) необходимо использовать только истинный спектр поглощения культуры, который, в свою очередь, должен быть записан на спектрофотометре, оснащенный интегрирующей сферой.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН", "Комплексное исследование механизмов функционирования биотехнологических комплексов с целью получения активных веществ из гидробионтов" (№ гос. регистрации 1023032700554-2-1.6.16)

Литература

- [1] Akimoto M., Shirai A., Ohtaguchi K., Koide K. Carbon dioxide fixation and polyunsaturated fatty acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. // Applied Biochemistry and Biotechnology. 1998. Vol. 73. Pp. 269–278. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02785661>.
- [2] Gantt E., Lipschultz C.A. Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. Pigment analysis. // Biochemistry. 1974. Vol. 13. Pp. 2960–2966. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00711a027>.
- [3] Bidigare R.R. et al. In-vivo absorption properties of algal pigments // Proceedings SPIE 1302, Ocean Optics X. 1990. Vol. 1302. P. 290–302. DOI: <https://doi.org/10.1117/12.21451>.
- [4] Копытов Ю.П., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В., Новикова Т.М. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей // Альгология. 2015. Т. 25, № 1. С. 35–40. DOI: <https://doi.org/10.15407/alg25.01.035>. EDN: <https://elibrary.ru/yndegr>.
- [5] Poojary M.M., Barba F.J., Aliakbarian B., Donsi F., Pataro G., Dias D.A., Juliano P. Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds // Marine Drugs. 2016. Vol. 14, Issue 11. P. 214. DOI: <http://doi.org/10.3390/md14110214>.
- [6] Kadam S.U., Tiwari B.K., O'Donnell C.P. Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013. Vol. 61, Issue 20. Pp. 4667–4675. DOI: <http://doi.org/10.1021/jf400819p>.
- [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 // Analytical Chemistry. 2007. Vol. 79, Issue 20. Pp. 7611–7627. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac070236m>.
- [8] Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. // Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук. 1981. Т. 5, № 1. С. 75–82. URL: https://www.researchgate.net/publication/333056415_Plotnye_kultury_morskih_mikrovodoroslej_Izvestia_Sibirskogo_otdelenia_Akademii_nauk_SSSR_Seria_biologiceskih_nauk_1981_T_5_No_1_S_75-82.
- [9] Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей // Вопросы современной альгологии. 2017. № 1 (13). С. 28. URL: <http://www.algology.ru/1097?ysclid=lswxthzikl382360690>; <https://elibrary.ru/item.asp?id=29800911>. EDN: <https://elibrary.ru/zcdlww>.
- [10] Стадничук И.Н. Фикобилипротеины. Москва: ВИНТИ, 1990. 193 с.
- [11] Геворгиз Р.Г. Количественное определение массовой доли хлорофилла *a* в сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl: учебно-методическое пособие. Севастополь, 2017. 11 с. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=46527794>. EDN: <https://elibrary.ru/cckhfn>.
- [12] 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). URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=44180447>. EDN: <https://elibrary.ru/zoqmpj>.

- [13] Merzlyak M.N., Naqvi K.R. On recording the true absorption and the scattering spectrum of a turbid sample: Application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2000. Vol. 58, Issues 2–3. Pp. 123–129. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00114-7).
- [14] Клочкова В.С., Лелеков А.С., Гудвилович И.Н. Динамика концентрации хлорофилла *a* и В-фикоэритрина в культуре *Porphyridium purpureum* в условиях светового и углеродного лимитирования // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2022. Т. 7, № 4. С. 534–540. DOI: <https://doi.org/10.29039/rusjbpс.2022.0556>. EDN: <https://elibrary.ru/tznenw>.
- [15] Гуляев Б.А., Литвин Ф.Ф. Первая и вторая производная спектра поглощения хлорофилла и сопровождающих пигментов в клетках высших растений и водорослей при 20 °С // Биофизика. 1970. Т. 15, № 4. С. 670–680. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4990547/>.
- [16] Hoerffner N., Sathyendranath S. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton // Marine Ecology Progress Series. 1991. Vol. 73, Issue 1. Pp. 11–23. URL: <https://fliphtml5.com/pqff/hlfk>.
- [17] Чернышев Д.Н., Клочкова В.С., Лелеков А.С. Разделение спектра поглощения культуры *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. в красной области // Вопросы современной альгологии. 2022. № 1 (28). С. 25–34. DOI: [https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1\(28\)-25-34](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1(28)-25-34). URL: <http://www.algology.ru/1777?ysclid=lsx2qj84fd245034257>; <https://elibrary.ru/item.asp?id=49416344>. EDN: <https://elibrary.ru/ioaumg>.
- [18] Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO, 1997. 661 p. URL: <https://typeset.io/papers/phytoplankton-pigments-in-oceanography-guidelines-to-modern-1nz2k808fz?ysclid=lsx319hon763087631>.
- [19] Myers J., Graham J.R., Wang R.T. On spectral control of pigmentation in *Anacystis nidulans* (Cyanophyceae). // Journal of Phycology. 1978. Vol. 14, Issue 4. Pp. 513–518. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1978.tb02478.x>.
- [20] Arnon D.I., McSwain B.D., Tsujimoto H.Y., Wada K. Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll *a* and removal of phycocyanin // Bioch. Biophys. Acta. 1974. Vol. 357, Issue 2. Pp. 231–245. DOI: [http://doi.org/10.1016/0005-2728\(74\)90063-2](http://doi.org/10.1016/0005-2728(74)90063-2).



Scientific article

DOI: 10.18287/2541-7525-2024-30-1-122-131

Submitted: 15.01.2024

Revised: 20.02.2024

Accepted: 28.02.2024

D.N. Chernyshev

Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: chernishev@gmail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8120-7382>

V.S. Klochkova

Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: wiki-iki@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2120-9589>

A.S. Lelekov

Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: a.lelekov@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1213-7963>

MODEL OF DECOMPOSITION OF THE NATIVE ABSORPTION SPECTRUM OF *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* CULTURE

ABSTRACT

A model of the native absorption spectrum of the red seaweed *Porphyrididium purpureum* culture was developed in this work. The mathematical model of each pigment is the sum of Gaussian curves. To level the light scattering, the spectra of the culture were recorded on a spectrophotometer with an integrating sphere. To verify the model, a series of parallel measurements of photosynthetic pigment concentrations using standard biochemical methods and the Gaussian curve method were performed. It was shown that the proposed model with sufficient accuracy makes it possible to determine the concentration of the main photosynthetic pigments of *Porphyrididium purpureum* culture without interfering with its growth processes.

Key words: mathematical model; B-phycoerythrin; chlorophyll *a*; carotenoids; Gauss curves; absorption spectrum.

Citation. Chernyshev D.N., Klochkova V.S., Lelekov A.S. Model of decomposition of the native absorption spectrum of *Porphyridium purpureum* culture. *Vestnik Samarskogo universiteta. Estestvennonauchnaya seriya / Vestnik of Samara University. Natural Science Series*, 2024, vol. 30, no. 1, pp. 122–131. DOI: <http://doi.org/10.18287/2541-7525-2024-30-1-122-131>. (In Russ.)

Information about the conflict of interests: authors and reviewers declare no conflict of interests.

© Chernyshev D.N., Klochkova V.S., Lelekov A.S., 2024

Dmitriy N. Chernyshev — head of laboratory, Department of Physics, Sevastopol State University, 33, Universitetskaya Street, Sevastopol, 299053, Russian Federation.

Victoria S. Klochkova — engineer, Department of Physics, Sevastopol State University, 33, Universitetskaya Street, Sevastopol, 299053, Russian Federation.

Alexander S. Lelekov — Candidate of Biological Sciences, senior researcher, Department of Biotechnology and Phytoresources, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, 2, Nakhimov Avenue, Sevastopol, 299011, Russian Federation.

References

- [1] Akimoto M., Shirai A., Ohtaguchi K., Koide K. Carbon dioxide fixation and polyunsaturated fatty acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, vol. 73, pp. 269–278. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02785661>.
- [2] Gantt E., Lipschultz C.A. Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. Pigment analysis. *Biochemistry*, 1974, vol. 13, pp. 2960–2966. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi00711a027>.
- [3] Bidigare R.R. [et al.] In-vivo absorption properties of algal pigments. *Proceedings SPIE 1302, Ocean Optics X*, 1990, vol. 1302, pp. 290–302. DOI: <https://doi.org/10.1117/12.21451>.
- [4] Kopytov Yu.P., Lelekov A.S., Gevorgiz R.G., Nekhoroshev M.V., Novikova T.M. Method of complex analysis of biochemical composition of microalgae. *Algologia*, 2015, vol. 25, no. 1, pp. 35–40. DOI: <https://doi.org/10.15407/alg25.01.035>. EDN: <https://elibrary.ru/yndcgr>. (In Russ.)
- [5] Poojary M.M., Barba F.J., Aliakbarian B., Donsi F., Pataro G., Dias D.A., Juliano P. Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine Drugs*, 2016, vol. 14, issue 11, p. 214. DOI: <http://doi.org/10.3390/md14110214>.
- [6] Kadam S.U., Tiwari B.K., O'Donnell C.P. Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, vol. 61, issue 20, pp. 4667–4675. DOI: <http://doi.org/10.1021/jf400819p>.
- [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. *Analytical Chemistry*, 2007, vol. 79, issue 20, pp. 7611–7627. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac070236m>.
- [8] Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine algae. *Izvestiya Sibirskogo otdeleniya Akademii nauk SSSR. Seriya biologicheskikh nauk*, 1981, vol. 5, no. 1, pp. 75–82. Available at: https://www.researchgate.net/publication/333056415_Plotnye_kultury_morskih_mikrovodoroslej_Izvestia_Sibirskogo_otdeleniya_Akademii_nauk_SSSR_Seria_biologicheskikh_nauk_1981_T_5_No_1_S_75-82.
- [9] Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. Unified installation for microalgae laboratory studies. *Issues of modern algology*, 2017, no. 1 (13), p. 28. Available at: <http://www.algology.ru/1097?ysclid=lswxthzikl382360690>; <https://elibrary.ru/item.asp?id=29800911>. EDN: <https://elibrary.ru/zcdlww>. (In Russ.)
- [10] Stadnichuk I.N. Phycobiliproteins. Moscow: VINITI, 1990. 193 p. (In Russ.)
- [11] Gevorgiz R.G. Quantitative determination of mass fraction of chlorophyll *a* in dry biomass of *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl: textbook. Sevastopol, 2017, 11 p. Available at: <https://elibrary.ru/item.asp?id=46527794>. EDN: <https://elibrary.ru/ckkhfn>. (In Russ.)
- [12] 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: educational and methodological manual. Sevastopol, 2017. 12 p. (Preprint / RAS, IMBI). Available at: <https://elibrary.ru/item.asp?id=44180447>. EDN: <https://elibrary.ru/zoqmpj>. (In Russ.)
- [13] 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*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2000, vol. 58, issues 2–3, pp. 123–129. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00114-7).

- [14] Klochkova V.S., Lelekov A.S., Gudvilovich I.N. Dynamics of the concentration of chlorophyll a and B-phycoerythrin concentration in culture *Porphyridium purpureum* in conditions of light and carbon limitation. *Modern Trends in Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 4, pp. 534–540. DOI: <https://doi.org/10.29039/rusjbpс.2022.0556>. EDN: <https://elibrary.ru/tznenw>. (In Russ.)
- [15] Guliaev B.A., Litvin F.F. 1st and 2nd derivatives of the absorption spectrum of chlorophyll and accompanying pigments in the cells of higher plants and algae at 20 °C. *Biofizika*, 1970, vol. 15, issue 4, pp. 670–680. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4990547/>. In Russ.
- [16] Hoepffner N., Sathyendranath S. Effect of pigment composition on absorption properties of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 1991, vol. 73, issue 1, pp. 11–23. Available at: <https://fliphtml5.com/pqff/hlfk>.
- [17] Chernyshev D.N., Klochkova V.S., Lelekov A.S. Separation of the absorption spectrum of *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. in the red area. *Issues of modern algology*, 2022, no. 1 (28), pp. 25–34. DOI: [https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1\(28\)-25-34](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1(28)-25-34). Available at: <http://www.algology.ru/1777?ysclid=lsx2qj84fd245034257>; <https://elibrary.ru/item.asp?id=49416344>. EDN: <https://elibrary.ru/iaaumg>. (In Russ.)
- [18] Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO, 1997, 661 p. Available at: <https://typeset.io/papers/phytoplankton-pigments-in-oceanography-guidelines-to-modern-1nz2k808fz?ysclid=lsx319hon763087631>.
- [19] Myers J., Graham J.R., Wang R.T. On spectral control of pigmentation in *Anacystis nidulans* (Cyanophyceae). *Journal of Phycology*, 1978, vol. 14, issue 4, pp. 513–518. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1978.tb02478.x>.
- [20] Arnon D.I., McSwain B.D., Tsujimoto H.Y., Wada K. Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Bioch. Biophys. Acta.*, 1974, vol. 357, issue 2, pp. 231–245. DOI: [http://doi.org/10.1016/0005-2728\(74\)90063-2](http://doi.org/10.1016/0005-2728(74)90063-2).