

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
Институт морских биологических исследований  
им. А. О. Ковалевского

Геворгиз Р. Г., Нехорошев М. В.

**Количественное определение  
массовой доли суммарных каротиноидов в сухой  
биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl.**

Учебно-методическое пособие

Севастополь, 2017

УДК 582.232:58.082

ББК 28.591.2

Г–27

Р е ц е н з е н т : заведующий отделом экологической физиологии водорослей ФГБУН ИМБИ, доктор биологических наук, профессор  
З.З. Финенко

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).

В настоящем учебно-методическом пособии изложена подробная инструкция по определению массовой доли суммарных каротиноидов в сухой биомассе спирулины. Уделено внимание возможным ошибкам при хранении проб, при пробоподготовке и измерениях. Приведены рекомендации по высушиванию сырой массы спирулины, а также по измерению концентрации каротиноидов в биомассе спирулины, культивируемой в промышленных масштабах. Указаны оптимальные условия для экстракции и измерений каротиноидов.

Пособие адресовано аспирантам и студентам всех специальностей.

Утверждено к публикации Учёным советом  
ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского»  
(протокол №12 от 18.12.2017 г.)

© Р. Г. Геворгиз, М. В. Нехорошев, 2017

© ФГБУН ИМБИ, 2017

### Область применения

Процедура описывает методику, которая позволяет оценить массовую долю суммарных каротиноидов в сухой (воздушно-сухой) биомассе спирулины. Определение доли каротиноидов требуется для исследований многих процессов фотосинтеза, поскольку каротиноиды, с одной стороны, являются вспомогательными пигментами фотосистем I и II, с другой — выполняют защитную функцию в клетках при высокой облучённости и лимитировании роста биогенными элементами. Методика применима как для биомассы микроводорослей, выращенных в лабораторных условиях, так и для биомассы, полученной в условиях производства. Описание методики сделано на примере *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl., но она вполне применима и для других представителей синезелёных водорослей (цианобактерий).

### Термины и определения

*Каротиноиды* — вспомогательные пигменты фотосинтетического аппарата высших растений, а также одноклеточных водорослей, в том числе прокариотических (Cyanophyta и Prochlorophyta). С химической точки зрения каротиноиды являются углеводородами терпенового ряда.

*Массовая концентрация* — отношение массы растворённого вещества (г) к объёму раствора (л). Выражается в г/л.

*Процентная концентрация (массовая доля растворённого вещества)* — отношение массы растворённого вещества (г) к общей массе раствора (г). Выражается в *весовых* процентах.

*Процентная концентрация (массообъёмные проценты)* — отношение массы одной весовой части растворённого вещества (г) к 100 объёмным частям раствора (мл). Выражается в *массообъёмных* процентах. Например, в работе с каротиноидами для экспериментального определения *удельного коэффициента экстинкции* вещества всегда готовят 1%-ный раствор, т. е. 100 мл раствора содержат 1 г каротиноида.

*Удельный коэффициент экстинкции ( $E_{1\text{ см}}^{1\%}$ )* — оптическая плотность 1%-го раствора<sup>1</sup> вещества при толщине поглощающего слоя 1 см. Удельный коэффициент экстинкции характеризует способность растворённого вещества поглощать свет, он специфичен для каждого типа каротиноида и растворителя.

<sup>1</sup>Для  $E_{1\text{ см}}^{1\%}$  концентрация раствора всегда выражается в массообъёмных процентах.

Зависит от длины световой волны. Единицы измерения<sup>2</sup> [мл · мг<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup>].

*Сухая масса водорослей* — масса навески микроводорослей после высушивания до постоянного веса при температуре 105 °С в течение 24 часов<sup>3</sup>.

*Воздушно-сухая масса водорослей* — масса навески микроводорослей после высушивания до постоянного веса при температуре 35–60 °С в течение 6–12 часов. Обычно высушивают биомассу на полиэтиленовой плёнке до остаточной влажности 1–15 %.

### Принцип метода

Оптическая плотность ацетонового экстракта *суммарных* каротиноидов спирулины на длине волны 480 нм пропорциональна удельному коэффициенту экстинкции  $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 2500 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

*Замечание.* Не все каротиноиды, входящие в состав фотосинтетического аппарата *S. (A.) platensis*, достаточно изучены, т. е. удельный коэффициент экстинкции для некоторых типов каротиноидов остаётся неизвестным. Поэтому принято считать, что оптическая плотность 1%-го раствора суммарных каротиноидов для кюветы в 1 см в области 480 нм пропорциональна некоторой усреднённой величине  $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 2500 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [1].

### Сущность методики

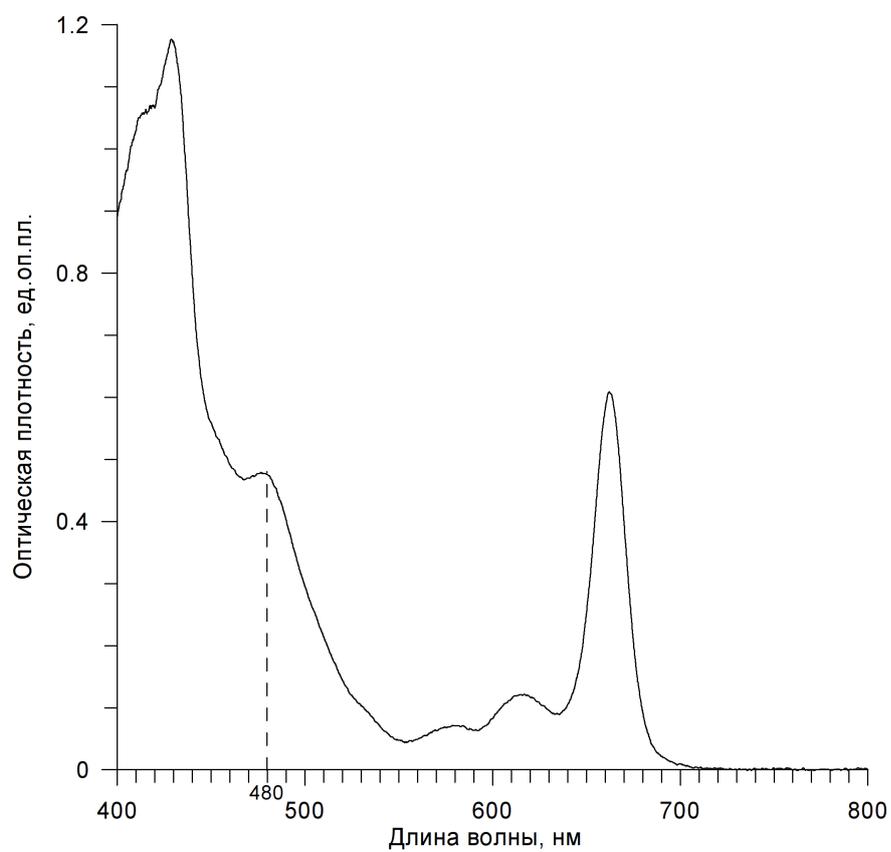
После механического измельчения к воздушно-сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* приливают 100%-ный ацетон, что приводит к экстракции всех жирорастворимых пигментов (хлорофилла *a* и каротиноидов). Затем ацетоновый экстракт помещают в измерительную кювету спектрофотометра и измеряют величину ослабления (пропускания) на длине волны 480 нм относительно кюветы со 100%-ным ацетоном. Спектр ацетонового экстракта из сухой биомассы спирулины представлен на рисунке 1.

### Измеряемые величины

- $D_{480}, D_{730}$  — оптическая плотность в области максимума поглощения каротиноидов спирулины (на длине волны 480 нм) и неспецифического

<sup>2</sup>Формально единицы измерений удельного коэффициента экстинкции записываются в виде [ед. опт. плотн. · мл · мг<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup>], но на практике оптическую плотность, как безразмерную величину, опускают.

<sup>3</sup>В публикациях по микроводорослям иногда вместо термина «сухая масса» используются термины «абсолютно сухая масса водорослей» или «абсолютно сухой вес», которые по сути являются синонимами.



**Рис. 1.** Спектр поглощения ацетонового экстракта из биомассы *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. Оптическая плотность на длине волны 480 нм (отмечена пунктиром) пропорциональна концентрации суммарных каротиноидов.

поглощения на длине волны 730 нм;

- $V$  — объём ацетонового экстракта, мл;
- $m$  — масса навески воздушно-сухой биомассы *S. (A.) platensis*, мг;
- $k$  — доля воды в воздушно-сухой биомассе *S. (A.) platensis*, %.

### Оборудование

1. Автоматически регистрирующий спектрофотометр. Спектральный диапазон 400–800 нм, с кюветами в 1 см.
2. Центрифуга лабораторная. Фактор разделения 1500–5000 g.
3. Весы аналитические с погрешностью измерений до 0,0002 г.
4. Сушильный шкаф, диапазон температур 20–150 °С.
5. Аналитические стеклянные пипетки объёмом 1–5 мл с резиновой грушей или пипетатором (фингером) поршневым либо дозаторы.

**Замечание.** Рекомендуемые модели приборов приведены в [Приложении](#).

### Посуда

1. Мерный цилиндр объёмом 10 мл с абсолютной погрешностью  $\pm 0,2$  мл.
2. Центрифужные полимерные<sup>4</sup> пробирки с закручивающимися пробками, 8 шт.
3. Стеклянная палочка.
4. Фарфоровая или агатовая ступка с пестиком.

### Реактивы

1. Ацетон х.ч. (перегнанный).
2. Пищевая сода для мытья посуды.

<sup>4</sup>Следует обратить внимание на то, чтобы полимер был инертным, не мутнел и не растворялся при контакте с ацетоном.

## Ход работы

### Отбор проб

Суспензию спирулины фильтруют через газ с ячейёй 40–100 мкм. Полученную таким образом сырую биомассу (пасту) промывают дистиллированной водой (1 объём пасты к 1 объёму воды). Промывают биомассу водой 3–4 раза<sup>5</sup>. Затем пасту наносят тонким слоем (2–5 мм) на полиэтилен и высушивают в течение 6–10 часов при температуре 35–60 °С до воздушно-сухого состояния (обычно до остаточной влажности 5–15 %). Не рекомендуется высушивать водоросли при ярком освещении, чтобы не допустить разрушения пигментов.

### Подготовка проб к анализу

1. Посуду моют ёршиком с пищевой содой, затем тщательно промывают дистиллированной водой<sup>6</sup> и высушивают в сушильном шкафу<sup>7</sup>. В работе используют только сухую посуду.
2. Воздушно-сухую биомассу *S. (A.) platensis* измельчают в ступке до грубого помола и отбирают «среднюю» пробу<sup>8</sup> для измерений.

### Определение содержания каротиноидов

1. Навеску 7–10 мг измельчённой до грубого помола воздушно-сухой биомассы спирулины взвешивают на кальке<sup>9</sup> с абсолютной погрешностью не более 0,0002 г и переносят в чистую сухую ступку.
2. К навеске дозатором приливают небольшое количество (0,5–1 мл) ацетона так, чтобы биомасса была увлажнена ацетоном, и тщательно растирают её пестиком в ступке. По мере испарения ацетона приливают ещё порцию 1–2 мл, продолжая процесс механического разрушения клеток. В результате из клеток экстрагируются пигменты.

<sup>5</sup>Объём воды подбирают таким образом, чтобы в сточной воде отсутствовали соли культуральной среды. Наличие солей в сточной воде можно определить посредством качественной реакции на ион карбоната  $\text{CO}_3^{2-}$ . Для этого в сточную воду добавляют 2 %-ный раствор  $\text{CaCl}_2$ . Если смесь становится мутной, тогда биомасса промыта недостаточно.

<sup>6</sup>Хромовой смесью мыть посуду не рекомендуется, т. к. это может приводит к занижению результатов измерений.

<sup>7</sup>Рекомендуется посуду перед сушкой промыть небольшим количеством спирта.

<sup>8</sup>Для получения статистически достоверного результата в работе используют 6–10 параллельных измерений.

<sup>9</sup>Поскольку на кальке остаются следы биомассы, кальку следует взвешивать после перенесения навески в ступку.

3. Надосадочную жидкость количественно переносят в центрифужную пробирку<sup>10</sup>, при этом следят за тем, чтобы частицы биомассы оставались в ступке. Затем приливают следующую порцию ацетона (1–2 мл) и продолжают растирать биомассу в ступке. Таким образом поступают до полного извлечения пигментов из биомассы, т. е. до тех пор, пока экстракт не будет оставаться бесцветным. Обычно для полной экстракции пигментов из навески 7–10 мг достаточно 5–6 мл ацетона.
4. После экстрагирования пигментов раствор центрифугируют 10–15 минут при 1500–5000 g (3000–5000 об/мин) для осаждения нерастворившихся частиц.
5. Измеряют объём экстракта.
6. Измеряют оптическую плотность экстракта на длине волны 480 нм<sup>11</sup> и неспецифическое поглощение на длине волны 730 нм.  
*Замечание.* Обычно из-за большой концентрации пигментов в пробе оптическая плотность экстракта находится за пределами допустимого для измерений оптической плотности диапазона (т. е. превышает 0,8 ед. опт. пл.). Поэтому аликвоту экстракта разбавляют ацетоном<sup>12</sup> таким образом, чтобы значения оптической плотности попадали в диапазон наименьшей погрешности измерений 0,4–0,5 ед. опт. пл.
7. Для учёта доли воды в воздушно-сухой массе водорослей навеску 1–2 г воздушно-сухой биомассы помещают в бюкс и высушивают при 105 °С в течение 24 ч. Учитывая массу бюкса, по разнице весов до и после высушивания рассчитывают долю воды в биомассе.

### Обработка результатов

Массовую долю общих каротиноидов рассчитывают, используя следующее выражение:

$$C_{\text{кр}} = \frac{10}{E_{1\text{ см}}^{1\%}} \cdot \frac{\Delta D_{480} \cdot V_{\text{экстракт}}}{l \cdot m_{\text{навеска}} \cdot (1 - k)} \cdot 100\%; \quad k = \frac{m_{\text{навеска}} - m_{\text{асв}}}{m_{\text{навеска}}};$$

<sup>10</sup>Для этой цели используют стеклянную пипетку или дозатор с тонким наконечником.

<sup>11</sup>Следует отметить, что в зависимости от чистоты растворителя и массовой доли воды в воздушно-сухой биомассе спирулины плечо на длине волны 480 нм может смещаться на 0,2–5 нм и более в длинноволновую область.

<sup>12</sup>Если в биомассе содержится порядка 0,5 % суммарных каротиноидов, то разбавление делают 1:3 непосредственно в измерительной кювете.

$$[C_{\text{кр}}] = \left[ \frac{\text{см} \cdot \text{мг}}{\text{мл}} \cdot \frac{\text{мл}}{\text{см} \cdot \text{мг}} \cdot \% \right] = [\%],$$

где  $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 2500$  — удельный коэффициент экстинкции для суммарных каротиноидов,  $\text{мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ;  $\Delta D$  — оптическая плотность экстракта с учётом неспецифического поглощения,  $\Delta D = D_{480} - D_{730}$ , ед. опт. плотн.;  $V_{\text{экстракт}}$  — объём ацетонового экстракта, мл;  $l$  — длина светового пути (измерительной кюветы), см;  $m_{\text{навеска}}$  — масса воздушно-сухой навески водорослей, мг;  $m_{\text{асв}}$  — навеска после высушивания до постоянного веса при 105 °С;  $k$  — массовая доля воды в пробе.

*Замечание.* Традиционно при работе с каротиноидами для выражения концентрации растворов используют *массообъёмные проценты* (г/100 мл). Но на практике часто концентрацию растворов каротиноидов, как и других пигментов [2, 3], выражают в единицах *массовой концентрации* (мг/мл). Поэтому для перехода от одних единиц к другим удельный коэффициент экстинкции умножают или делят на 10 в соответствии с формулой:

$$\varepsilon = \frac{E_{1\text{ см}}^{1\%}}{10},$$

где  $\varepsilon$  — удельный коэффициент экстинкции для раствора с концентрацией 1 г/л;  $E_{1\text{ см}}^{1\%}$  — удельный коэффициент экстинкции для раствора с концентрацией 1 г/100 мл.

**Пример расчёта.** В нижеследующей таблице приведены результаты восьмикратного измерения массовой доли общих каротиноидов в воздушно-сухой биомассе спирулины (массовая доля воды в биомассе  $k = 12\%$ ).

№	Навеска, г	Объём экстракта, мл	$\Delta D_{480}$	АСВ, г	$C$ , %
1	0,00870	20,8	0,59	0,00766	0,641
2	0,00975	21,6	0,665	0,00858	0,670
3	0,01060	23,2	0,682	0,00933	0,679
4	0,00985	27,6	0,52	0,00867	0,662
5	0,01235	29,6	0,584	0,01087	0,636
6	0,00950	22,8	0,634	0,00836	0,692
7	0,01045	32,8	0,482	0,00919	0,688
8	0,01100	23,2	0,704	0,00968	0,675

Среднее значение:

$$\bar{C} = \frac{\sum_{i=1}^8 C_i}{8} = 0,668.$$

Минимальное значение: 0,636.

Максимальное значение: 0,692.

Несмещённая средняя квадратичная ошибка:

$$S_8 = \sqrt{\frac{\sum_1^8 (\bar{C} - C_i)^2}{8 - 1}} = 0,020.$$

Коэффициент вариации:

$$V = \frac{S_8}{\bar{C}} \cdot 100\% = \frac{0,020}{0,668} \cdot 100\% = 3,03\%.$$

Доверительный интервал для среднего:

$$P \left( \bar{C} - 2,36 \frac{0,02}{\sqrt{8}} < C < \bar{C} + 2,36 \frac{0,02}{\sqrt{8}} \right) = 0,95,$$

$$P(0,668 - 0,017 < C < 0,668 + 0,017) = 0,95.$$

$$C = 0,668 \pm 0,017.$$

### Рекомендации по избежанию ошибок

1. Чтобы избежать занижения результатов, следует учесть, что ацетоновые экстракты не подлежат хранению. Поэтому время между получением экстрактов и измерением оптической плотности и объёма должно быть минимальным.
2. Не следует проводить измерения каротиноидов в условиях повышенной освещённости и при высокой температуре в лаборатории, поскольку в таких условиях пигменты разрушаются. Кроме того, при высокой температуре значительно увеличивается разброс данных и расход ацетона.
3. Особое внимание следует уделять чистоте ацетона. Любые примеси изменяют значение удельного коэффициента экстинкции.

## Приложение

### Рекомендуемое оборудование

1. Автоматически регистрирующий СФ-2000 (ЛОМО, Россия). Спектральный диапазон — 200–1100 нм. Диапазон измерений спектральных коэффициентов направленного пропускания — 1–100% с абсолютной

погрешностью не более 1%. Предел допускаемого значения среднего квадратического отклонения случайной составляющей погрешности спектрофотометра при измерении спектральных коэффициентов направленного пропускания — 0,2 %. Набор кварцевых кювет, входящий в комплект поставки прибора.

2. Центрифуга лабораторная ОПН-3 с радиусом ротора  $r = 0,09$  м и центрифужными пробирками  $l = 0,07$  м. Частота обращения ротора — 1000, 1500, 3000 об/мин. Допускаемое приведённое отклонение заданной частоты вращения не более  $\pm 10$  %. Центростремительное ускорение равно  $a = \omega^2 \cdot R$ , где  $\omega$  — угловая скорость, об/с;  $\omega = 2\pi n$ , где  $n$  — частота обращения ротора, об/с,  $R = r + l$  — радиус ротора плюс длина центрифужной пробирки. Фактор разделения для скорости в 3000 об/мин,  $\Phi_{3000} = (2 \times \pi \times 3000/60)^2 \times 0,16/9,8 = 1611 g$ .
3. Весы аналитические ВЛР-200, 0–200 г, 2-й класс. Набор разновесок Г 2–210, 0–200 г, класс 2.
4. Сушильный шкаф стерилизационный сухожаровый СНОЛ ШС-58/350;
5. Аналитические стеклянные пипетки объёмом 1–5 мл с резиновой грушей или пипетатором (фингером) поршневым либо дозатор Biohit, 1000–5000 мкл с погрешностью измерения не более  $\pm 1$  % и 100–1000 мкл с погрешностью не более  $\pm 1$  %.

## Список литературы

1. Aakermann T., Skulberg O.M., Liaaen-Jensen S. A Comparison of the Carotenoids of Strains of *Oscillatoria* and *Spirulina* (Cyanobacteria) // *Biochemical Systematics and Ecology*. — 1992. — Vol. 20, no. 8. — P. 761–769.
2. Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls  $a$ ,  $b$ ,  $c_1$ , and  $c_2$  in higher plants, algae and natural populations // *Biochem. Physiol. Pflanzen*. — 1975. — Vol. 167. — P. 191–194.
3. Boussiba S., Richmond E. Isolation and Characterization of Phycocyanins from the Blue-Green Alga *Spirulina platensis* // *Arch. Microbiol.* — 1979. — V. 120. — P. 155–159.

Геворгиз Руслан Георгиевич  
e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Нехорошев Михаил Валентинович  
e-mail: mnekhoroshev@gmail.com

R. G. Gevorgiz, M. V. Nekhoroshev

Quantitative determination of the mass fraction of total carotenoids in dry biomass of *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. : educational and methodological manual / RAS, Kovalevsky Institute of Marine Biological Research. — Sevastopol, 2017. — 12 p. — (Working paper / RAS, IMBR).

This training aid provides detailed instructions on the quantitative determination of the mass fraction of total carotenoids in the dry biomass of spirulina. Possible errors in the storage of samples, in sample preparation and in measurements are highlighted. The aid contains recommendations for drying the wet weight of spirulina, as well as for measuring the concentration of carotenoids in spirulina biomass cultivated on an industrial scale. Optimum conditions for measurements are specified.

The training aid is addressed to students and postgraduates of all specialties.