

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

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

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 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. — (Препринт / РАН, ИМБИ).

В настоящем учебно-методическом пособии представлена подробная инструкция по количественному определению массовой доли С-фикоцианина и аллофикоцианина в сухой биомассе спирулины с использованием метода холодной экстракции. Уделено внимание возможным ошибкам при хранении проб, при пробоподготовке и измерениях. Приведены рекомендации по высушиванию сырой массы спирулины, а также по измерению концентрации фикобилипротеинов в биомассе спирулины, культивируемой в промышленных масштабах. Указаны оптимальные условия для измерений.

Пособие адресовано студентам и аспирантам всех специальностей.

Утверждено к публикации Ученым 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 массовые доли С-фикоцианина и аллофикоцианина в сухой (воздушно-сухой) биомассе спирулины. Определение доли С-фикоцианина и аллофикоцианина требуется для исследований многих процессов фотосинтеза, поскольку фикобилипротеины являются вспомогательными пигментами фотосистем I и II у цианобактерий, а также источником азота при неблагоприятных условиях [1]. По величине массовой доли фикобилипротеинов в биомассе судят о физиологическом состоянии клеток и об обеспеченности клеток биогенными элементами. Также концентрация фикобилипротеинов является критерием качества биомассы при промышленном производстве синезеленых водорослей, поскольку фикобилипротеины — ценный продукт для медицины и пищевой промышленности [3]. Методика применима как для биомассы микроводорослей, выращенных в лабораторных условиях, так и для биомассы, полученной в условиях производства, а также для анализа коммерческих продуктов на основе фикобилипротеинов из цианобактерий. Описание методики сделано на примере *Spirulina (Arthrospira) platensis*, но она вполне применима и для других представителей синезелёных водорослей (цианобактерий).

Термины и определения

Фикобилипротеины — это пигмент-белковые комплексы фотосинтетического аппарата цианобактерий, красных и криптофитовых водорослей. У фикобилипротеинов хромофорные простетические группы представлены линейными тетрапирролами, которые близки по химическому строению к билинам желчи (биливердину, билирубину) [2, 6]. С-фикоцианин и аллофикоцианин — основные фикобилипротеины *S. (A.) platensis*.

Удельный коэффициент экстинкции (поглощения) ε — оптическая плотность раствора вещества с концентрацией 1 г/л при толщине поглощающего слоя 1 см. Единицы измерения¹ [мл · мг⁻¹ · см⁻¹].

Сухая масса водорослей — масса навески микроводорослей после высушивания до постоянного веса при температуре 105 °С в течение 24 часов².

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

²В публикациях по микроводорослям иногда вместо термина «сухая масса» используются термины «абсолютно сухая масса водорослей» или «абсолютно сухой вес», которые по сути являются синонимами.

Воздушно-сухая масса водорослей — масса навески микроводорослей после высушивания до постоянного веса при температуре 35–60 °С в течение 6–8 часов. Обычно высушивают биомассу на полиэтиленовой плёнке до остаточной влажности 1–15 %.

Принцип метода

Оптическая плотность водного раствора С-фикоцианина в области максимума поглощения (620 нм) пропорциональна удельному коэффициенту экстинкции $\varepsilon_{\text{фц}} = 7,3 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Оптическая плотность водного раствора аллофикоцианина в области максимума поглощения (655 нм) пропорциональна удельному коэффициенту экстинкции $\varepsilon_{\text{афц}} = 5,8 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Замечание 1. Вышеприведённые коэффициенты экстинкции экспериментально определены для фикобилипротеинов, которые были извлечены из *Spirulina (Arthrospira) platensis* [4]. В некоторых публикациях приводятся спектральные характеристики фикобилипротеинов [1], извлечённых из других видов сине-зелёных водорослей, при этом максимумы поглощения отличаются на 5–8 нм от вышеприведённых. Например, максимум поглощения аллофикоцианина, извлечённого из *Spirulina (Arthrospira) platensis*, приходится³ на 655 нм, а извлечённого из *Fremyella diplosiphon* — на 650 нм [5].

Замечание 2. Положение максимумов поглощения фикобилипротеинов зависит от величины рН водного раствора, поэтому при определении удельного коэффициента экстинкции для фикобилипротеинов используют буферные растворы с заданной величиной рН. Вышеприведённые удельные коэффициенты определены при рН=7,0 [4].

Сущность методики

После механического измельчения к воздушно-сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* приливают охлаждённый до 3–5 °С фосфатный буфер (рН=7,0) и удерживают на холоде при температуре 3–5 °С в течение 6–10 часов. В результате происходит экстракция фикобилипротеинов. Затем, водный экстракт помещают в измерительную кювету спектрофотометра и измеряют величину ослабления (пропускания) на длине волны 620 и 655 нм относительно кюветы с дистиллированной водой. Спектры водных экстрактов С-фикоцианина и аллофикоцианина представлены на рисунке 1.

³ На практике это легко проверить: достаточно из спектра водного экстракта спиролины (см. рисунок 2) вычесть спектр С-фикоцианина (см. рисунок 1).

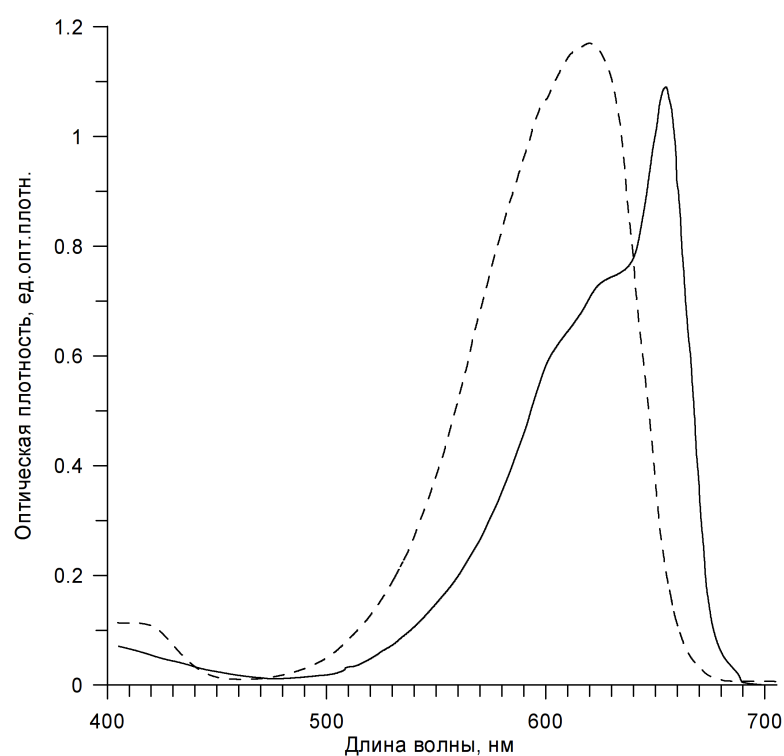


Рис. 1. Спектр поглощения С-фикоцианина (пунктирная линия) и аллофикоцианина (сплошная линия); пигменты извлечены из клеток *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. фосфатным буфером pH=7,0 [4].

Измеряемые величины

- D_{620} , D_{655} , D_{700} , D_{470} — оптическая плотность в области максимума С-фикоцианина (на длине волны 620 нм), оптическая плотность в области максимума аллофикоцианина (655 нм) и неспецифическое поглощение на длине волны 700 и 470 нм соответственно;
- V — объём водного 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 с кюветами в 1 см. Спектральный диапазон — 400–800 нм.
2. Центрифуга лабораторная. Фактор разделения — 6000 g и выше.
3. Весы аналитические с погрешностью измерений до 0,0002 г.
4. Иономер лабораторный для измерения pH с абсолютной погрешностью не более 0,02 единицы.
5. Сушильный шкаф, диапазон температур 20–150 °C.
6. Аналитические стеклянные пипетки объёмом 1–5 мл с резиновой грушей или пипетатором (фингером) поршневым либо дозатор.

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

Посуда

1. Мерный цилиндр объёмом 10 мл с абсолютной погрешностью $\pm 0,2$ мл.
2. Мерный цилиндр объёмом 100 мл с абсолютной погрешностью ± 2 мл.
3. Колбы плоскодонные объёмом 250 мл, 3 шт.
4. Центрифужные стеклянные или полимерные пробирки объёмом не менее 5 мл, 12 шт.
5. Пробирки объёмом 20 мл, 12 шт.
6. Стеклянная палочка.
7. Фарфоровая или агатовая ступка с пестиком.

Реактивы

1. Натрий фосфорнокислый 1-замещённый 2-водный или другой кристаллогидрат, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, х.ч.
2. Натрий фосфорнокислый 2-замещённый 12-водный или другой кристаллогидрат, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, х.ч.
3. Вода дистиллированная.
4. Пищевая сода для мытья посуды.

Приготовление 0,2М фосфатного буфера

Для приготовления фосфатного буфера с заданной величиной pH необходимо приготовить 0,2М маточный раствор двузамещённого фосфорнокислого натрия и 0,2М раствор однозамещённого фосфорнокислого натрия с учётом использования кристаллогидратов. Например, если имеются две соли $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (молярная масса 156,01) и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (молярная масса 358,14), то для приготовления маточных растворов необходимо:

Маточный раствор А.

3,12 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ растворить в 100 мл дистиллированной воды⁴.

Маточный раствор Б.

7,163 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ растворить в 100 мл дистиллированной воды⁵.

Затем смешать раствор А и Б в соответствии с нижеследующей таблицей⁶:

pH	Раствор А, мл	Раствор В, мл
6,8	51,0	49,0
7,0	39,0	61,0
7,2	28,0	72,0
7,4	19,0	81,0

Замечание. Поскольку фикобилипротеины из биомассы спироулины экстрагируют фосфатным буфером 0,1М (pH=7,0), перед употреблением ранее приготовленный 0,2М буферный раствор разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:1 (при этом молярность раствора понижается до 0,1М). Хранят 0,2М буферный раствор в склянке тёмного стекла в холодильнике.

⁴Поскольку молярная масса $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ равна 156,01, то для приготовления 0,2М раствора необходимо $\frac{156,01}{10} \cdot 2 = 31,2$ г соли растворить в 1 литре воды.

⁵Или 2,839 г Na_2HPO_4 , или 3,56 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.

⁶Добавление раствора А снижает pH, добавление раствора Б увеличивает pH.

Ход анализа проб

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 раза⁷. 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, т. к. это приводит к разрушению пигментов.

Подготовка проб к анализу

1. Посуду моют ёршиком с пищевой содой⁸, ополаскивают водопроводной водой, затем дважды промывают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. В работе используют только сухую посуду.
2. Воздушно-сухую биомассу *S. (A.) platensis* измельчают в ступке до порошкообразного состояния. Чем меньше будут частички биомассы, тем лучше пройдет экстракция.

Определение содержания фикобилипротеинов

1. Навески измельчённой в ступке воздушно-сухой биомассы *S. (A.) platensis* массой 7–10 мг взвешивают на кальке⁹ с абсолютной погрешностью не более 0,0002 г и переносят в стеклянные или полимерные пробирки.
2. К каждой навеске приливают 3 мл охлаждённого до 2–5 °С фосфатного буфера рН=7,0, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и выдерживают на холоде (2–5 °С) в течение 6–8 часов.
3. По истечении указанного времени пробы центрифугируют 4–5 мин при 6000–7000 g (8 000 об/мин).

⁷ 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 CO_3^{2-} . Для этого в сточную воду добавляют 2 % раствор CaCl_2 . Если смесь становится мутной, тогда биомасса промыта недостаточно.

⁸ Хромовой смесью мыть посуду не рекомендуется, т. к. это может приводить к занижению результатов измерений.

⁹ Поскольку на кальке остаются следы биомассы, кальку следует взвешивать после перенесения навески в пробирку.

4. Супернатанты каждой пробы сливают в пробирки объёмом 20 мл, к осадку снова приливают 3 мл охлаждённого фосфатного буфера, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и выдерживают на холоде (3–5 °С) в течение 6–8 часов. Процедуру по извлечению пигментов повторяют до тех пор, пока супернатант не будет бесцветным (обычно достаточно трёх экстракций).
5. После экстрагирования фикобилипротеинов измеряют общий объём экстракта для каждой пробы и оптическую плотность раствора¹⁰ в области максимума спектра (620 нм), на длине волны 655 нм и в области неспецифического поглощения — на длинах волн 470 и 700 нм.
6. 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 воды в воздушно-сухой биомассе (k) рассчитывают по формуле:

$$k = \frac{m_{\text{навеска}} - m_{\text{асв}}}{m_{\text{навеска}}},$$

где $m_{\text{навеска}}$ — навеска воздушно-сухой биомассы, мг; $m_{\text{асв}}$ — навеска после высушивания до постоянного веса при 105 °С.

Массовую долю С-фикоцианина ($C_{\text{фц}}$) и аллофикоцианина ($C_{\text{афц}}$) в пробе, в пересчёте на сухую массу водорослей, вычисляют по нижеследующим формулам (вывод формул см. в [Приложении А](#)):

$$C_{\text{фц}} = \frac{0,154 \cdot D_{620}^* - 0,1 \cdot D_{655}^*}{m \cdot (1 - k) \cdot l} \cdot V \cdot 100\%;$$

$$C_{\text{афц}} = \frac{0,194 \cdot D_{655}^* - 0,034 \cdot D_{620}^*}{m \cdot (1 - k) \cdot l} \cdot V \cdot 100\%,$$

где D_{620}^* , D_{655}^* — оптическая плотность водного экстракта С-фикоцианина и аллофикоцианина с учётом неспецифического поглощения (истинные значения, см. рисунок 2), ед. опт. пл.; V — объём объединённого экстракта, мл; m —

¹⁰Следует заметить, что в области 0,4–0,5 ед. опт. пл. измерения оптической плотности характеризуются минимальной ошибкой, поэтому при необходимости концентрированный объединённый экстракт разбавляют 0,1М фосфатным буфером.

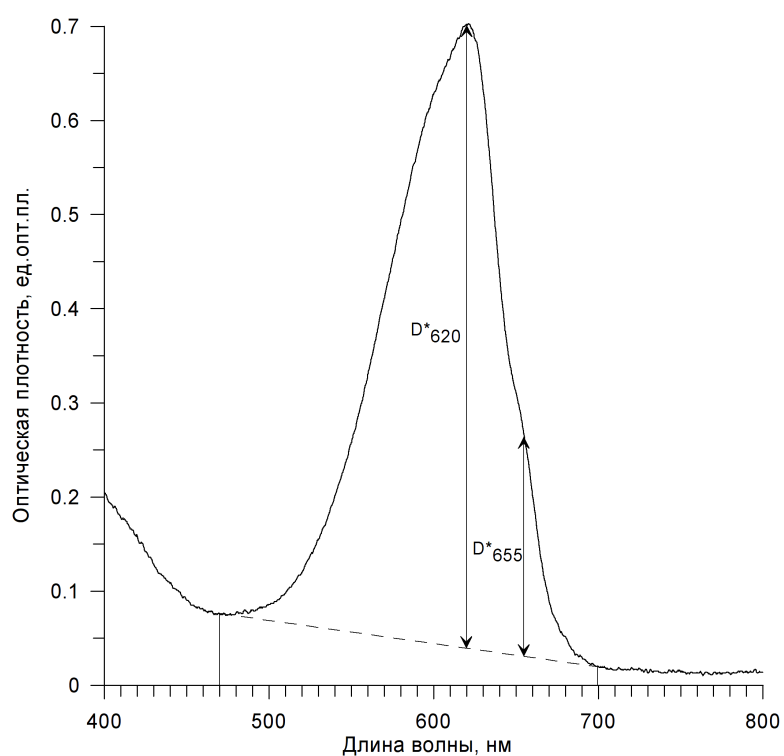


Рис. 2. Спектр поглощения водного экстракта фикобилипротеинов из биомассы *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Неспецифическое поглощение отмечено пунктирной линией. D_{620}^* и D_{655}^* — оптическая плотность С-фикоцианина и аллофикоцианина с учётом неспецифического поглощения (истинная оптическая плотность указана стрелками). Пигменты экстрагировали фосфатным буфером pH=7,0.

масса навески, мг; k — массовая доля воды в пробе; l — длина оптического пути, см.

Либо:

$$C_{\text{фц}} = \frac{0,154 \cdot D_{620} - 0,1 \cdot D_{655} - 0,034 \cdot D_{470} - 0,02 \cdot D_{700}}{m \cdot (1 - k) \cdot l} \cdot V \cdot 100\%,$$

$$C_{\text{афц}} = \frac{0,194 \cdot D_{655} - 0,034 \cdot D_{620} - 0,026 \cdot D_{470} - 0,134 \cdot D_{700}}{m \cdot (1 - k) \cdot l} \cdot V \cdot 100\%.$$

В нижеследующей таблице приведены результаты пятикратного измерения массовой доли С-фикоцианина и аллофикоцианина в воздушно-сухой биомассе *S. (A.) platensis* (доля воды в биомассе 11 %).

№	m , г	V , мл	D_{620}	D_{655}	D_{700}	D_{470}	$C_{\text{фц}}$, %	$C_{\text{афц}}$, %
1	0,01710	13,3	0,700	0,26	0,01	0,055	7,020	2,101
2	0,01320	11,6	0,593	0,22	0,01	0,051	6,656	1,960
3	0,01480	11,6	0,702	0,27	0,02	0,076	6,880	2,100
4	0,01095	11,5	0,455	0,17	0,01	0,052	6,083	1,763
5	0,01547	11,5	0,656	0,25	0,01	0,059	6,236	1,932

Среднее значение: $\bar{C}_{\text{фц}} = 6,575$; $\bar{C}_{\text{афц}} = 1,971$.

Минимальное значение: $C_{\text{фц}} = 6,083$; $C_{\text{афц}} = 1,763$.

Максимальное значение: $C_{\text{фц}} = 7,02$; $C_{\text{афц}} = 2,101$.

Несмещённая средняя квадратичная ошибка:

$$S_{\text{фс}} = \sqrt{\frac{\sum_1^5 (\bar{C} - C_i)^2}{5 - 1}} = 0,405; \quad S_{\text{афс}} = 0,140.$$

Коэффициент вариации:

$$V_{\text{фс}} = \frac{S_5}{\bar{C}} \cdot 100\% = \frac{0,405}{6,575} \cdot 100\% = 6,150; \quad V_{\text{афс}} = \frac{0,140}{1,971} \cdot 100\% = 7,11\%.$$

Доверительный интервал для среднего:

$$P \left(\bar{C}_{\text{фс}} - 2,78 \frac{0,405}{\sqrt{5}} < C_{\text{фс}} < \bar{C}_{\text{фс}} + 2,78 \frac{0,405}{\sqrt{5}} \right) = 0,95;$$

$$P (6,575 - 0,50 < C_{\text{фс}} < 6,575 + 0,50) = 0,95;$$

$$\bar{C}_{\text{фс}} = 6,935 \pm 0,50.$$

$$P (1,971 - 0,17 < C_{\text{афс}} < 1,971 + 0,17) = 0,95;$$

$$\bar{C}_{\text{афс}} = 1,229 \pm 0,17.$$

Рекомендации по избежанию ошибок

1. При приготовлении фосфатного буфера необходимо следить за величиной pH, поскольку даже при чётком соблюдении инструкции по приготовлению буферной смеси (см. страницу 7) величина pH может оказаться ниже 7,0. Это связано с тем, что соль Na_2HPO_4 гигроскопична.
2. При работе с экстрактами фикобилипротеинов следует избегать попадания прямых солнечных лучей, поскольку интенсивный свет приводит к фотодеструкции пигментов. Экстракты хранят в темноте при низкой температуре. Также, чтобы избежать занижения результатов, не следует проводить измельчение биомассы на ярком свету.
3. Существенным недостатком холодной экстракции фикобилипротеинов является продолжительность процесса. По сути для определения доли фикобилипротеинов в спирулине необходимо минимум 2–3 дня. Даже при хранении экстрактов в темноте на холоде фикобилипротеины частично разрушаются. Кроме того, фикобилипротеины имеют белковую природу, поэтому их водные растворы крайне неустойчивы и подвержены бактериальному загрязнению, что, в свою очередь, приводит к занижению результатов измерений.
4. Занижение результатов измерений может быть обусловлено смачиванием воздушно-сухой биомассы, например, при использовании мокрой посуды. При этом полного извлечения фикобилипротеинов из биомассы добиться не удастся.
5. Использование в работе центрифуги с фактором разделения ниже 6000 g (8000 об/мин) приводит к получению неверных результатов из-за неполного осаждения пигментированных частиц разрушенной биомассы. Ошибка измерений может достигать 30–40 %. Характерным признаком неполного осаждения является зеленоватый оттенок у водных экстрактов фикобилипротеинов (см. рисунок 3).

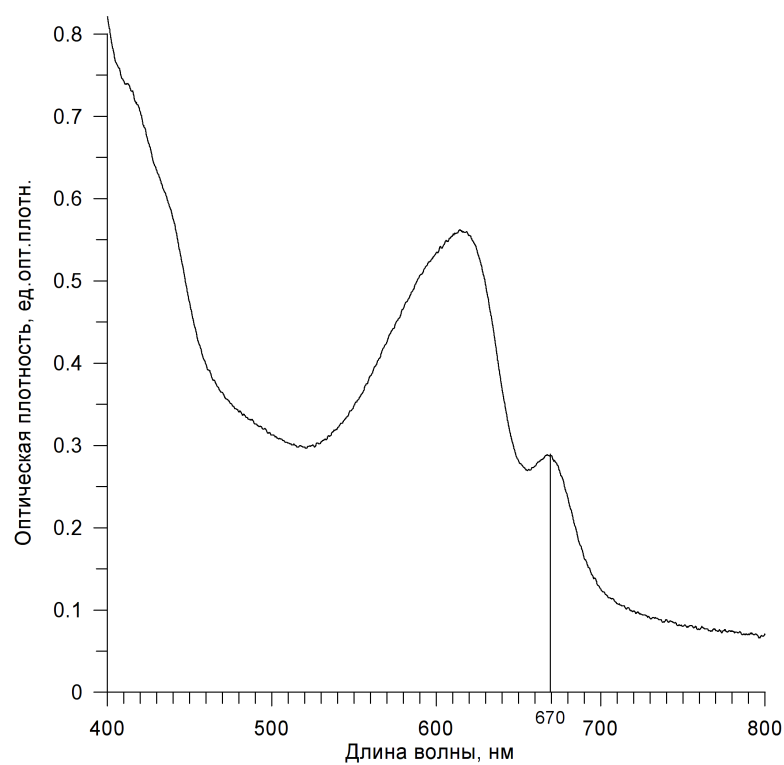


Рис. 3. Спектр поглощения водного экстракта фикобилипротеинов из биомассы *Spirulina (Arthrospira) platensis* при неполном осаждении пигментированных частиц разрушенной биомассы (линией отмечен пик хлорофилла).

Приложение А

В соответствии с законом Бера, для разбавленных растворов оптическая плотность равна произведению удельного коэффициента экстинкции на концентрацию растворённого вещества. Для С-фикоцианина и аллофикоцианина удельные коэффициенты экстинкции известны, следовательно, можно записать:

$$D_{620} = \varepsilon_{\text{фс}} \cdot c_{\text{фц}} \cdot l = 7,3 \cdot c_{\text{фц}} \cdot l; \quad D_{655} = \varepsilon_{\text{афс}} \cdot c_{\text{афц}} \cdot l = 5,8 \cdot c_{\text{афц}} \cdot l,$$

где D_{620} и D_{655} — оптические плотности С-фикоцианина и аллофикоцианина при 620 и 655 нм соответственно (см. рисунок 1), ед. опт. пл.; 7,3 и 5,8 — удельные коэффициенты экстинкции С-фикоцианина и аллофикоцианина [4], мл/(мг·см); $c_{\text{фц}}$ и $c_{\text{афц}}$ — концентрация С-фикоцианина и аллофикоцианина в растворе соответственно, мг/мл; l — длина оптического пути, см.

Учитывая тот факт, что спектры С-фикоцианина и аллофикоцианина перекрывают друг друга, т. е. С-фикоцианин поглощает на длине волны 655 нм, а аллофикоцианин — на длине волны 620 нм, для смеси пигментов можно записать равенства:

$$\begin{cases} D_{620}^* = D_{620} + D_{620}^{\text{афц}} = 7,3 \cdot c_{\text{фц}} \cdot l + \varepsilon_{620}^{\text{афц}} \cdot c_{\text{афц}} \cdot l; \\ D_{655}^* = D_{655}^{\text{фц}} + D_{655} = \varepsilon_{655}^{\text{фц}} \cdot c_{\text{фц}} \cdot l + 5,8 \cdot c_{\text{афц}} \cdot l, \end{cases} \quad (1)$$

где D_{620}^* , D_{655}^* — оптические плотности смеси С-фикоцианина и аллофикоцианина, ед. опт. пл.; $D_{620}^{\text{афц}}$ — величина оптической плотности раствора аллофикоцианина на длине волны 620 нм, ед. опт. пл.; $D_{655}^{\text{фц}}$ — величина оптической плотности раствора С-фикоцианина на длине волны 655 нм, ед. опт. пл.; $\varepsilon_{620}^{\text{афц}}$ — удельный коэффициент экстинкции аллофикоцианина для длины волны 620 нм, мл/(мг·см); $\varepsilon_{655}^{\text{фц}}$ — удельный коэффициент экстинкции С-фикоцианина для длины волны 655 нм, мл/(мг·см).

Таким образом, чтобы найти величины концентраций С-фикоцианина и аллофикоцианина в смеси, необходимо знать значение оптических плотностей D_{620}^* , D_{655}^* и удельных коэффициентов экстинкции $\varepsilon_{620}^{\text{афц}}$ и $\varepsilon_{655}^{\text{фц}}$.

Расчёт величин D_{620}^* и D_{655}^*

При экстрагировании фикобилипротеинов из биомассы спироулины в водном растворе всегда присутствует мелкодисперсная взвесь — частицы разрушенной биомассы. Избавиться от этой взвеси практически не удаётся даже при осаждении центрифугированием при 10 000–15 000 g. Сравнивая спектры фикобилипротеинов, представленных на рисунке 1, и спектр водного экстракта

из спироулины, представленного на рисунке 2, можно заметить, что в области 470 и 700 нм оптическая плотность как С-фикоцианина, так и аллофикоцианина практически равна нулю, чего нельзя сказать об оптической плотности для спектра водного экстракта из спироулины. Эти отличия обусловлены именно присутствием в экстракте мелкодисперсной взвеси.

Аппроксимируя линейной функцией спектр поглощения мелкодисперсной взвеси в экстракте, легко рассчитать величины D_{620}^* и D_{655}^* . Для этого обратимся к рисунку 4.

Оптические плотности водного экстракта из спироулины на длине волны 470, 620, 655 и 700 нм — измеряемые величины, поэтому легко найти отрезки GK, AC и DF:

$$GK = D_{470} - D_{700}, \quad AC = D_{620} - D_{700}, \quad DF = D_{655} - D_{700}.$$

Из подобия треугольников HGK и HBC находим отрезок BC:

$$\frac{GK}{KH} = \frac{BC}{CH}, \quad \text{откуда} \quad BC = \frac{CH}{KH} GK,$$

или, что то же самое:

$$\frac{GK}{700 - 470} = \frac{BC}{700 - 620}, \quad \text{откуда} \quad BC = \frac{8}{23} GK.$$

Далее находим D_{620}^* :

$$D_{620}^* = AC - BC = (D_{620} - D_{700}) - \frac{8}{23}(D_{470} - D_{700}). \quad (2)$$

Аналогично из подобия треугольников HGK и HEF находим отрезок EF и далее — величину D_{655}^* :

$$D_{655}^* = DF - EF = (D_{655} - D_{700}) - \frac{9}{46}(D_{470} - D_{700}). \quad (3)$$

Расчёт величин $\varepsilon_{620}^{\text{афц}}$ и $\varepsilon_{655}^{\text{фц}}$

Для расчёта удельных коэффициентов экстинкции $\varepsilon_{620}^{\text{афц}}$ и $\varepsilon_{655}^{\text{фц}}$ спектры поглощения С-фикоцианина и аллофикоцианина (см. рисунок 1) представим в нормированном виде таким образом, чтобы их максимальные значения соответствовали удельным коэффициентам экстинкции 7,3 для С-фикоцианина и 5,8 для аллофикоцианина (см. рисунок 5):

$$\varepsilon^{\text{фц}}(\lambda) = \frac{D^{\text{фц}}(\lambda)}{D^{\text{фц}}(620)} \cdot 7,3; \quad \varepsilon^{\text{афц}}(\lambda) = \frac{D^{\text{афц}}(\lambda)}{D^{\text{афц}}(655)} \cdot 5,8, \quad \text{где} \quad \lambda \in [400, 700].$$

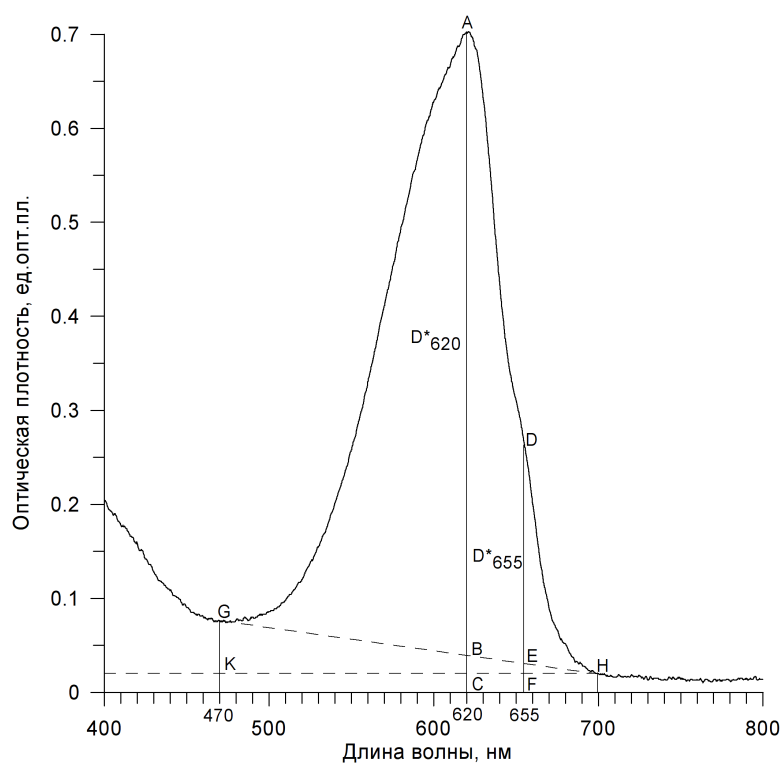


Рис. 4. Спектр поглощения водного экстракта фикобилипротеинов из биомассы *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Пунктиром отмечено неспецифическое поглощение мелкодисперсной взвесью (см. рисунок 2).

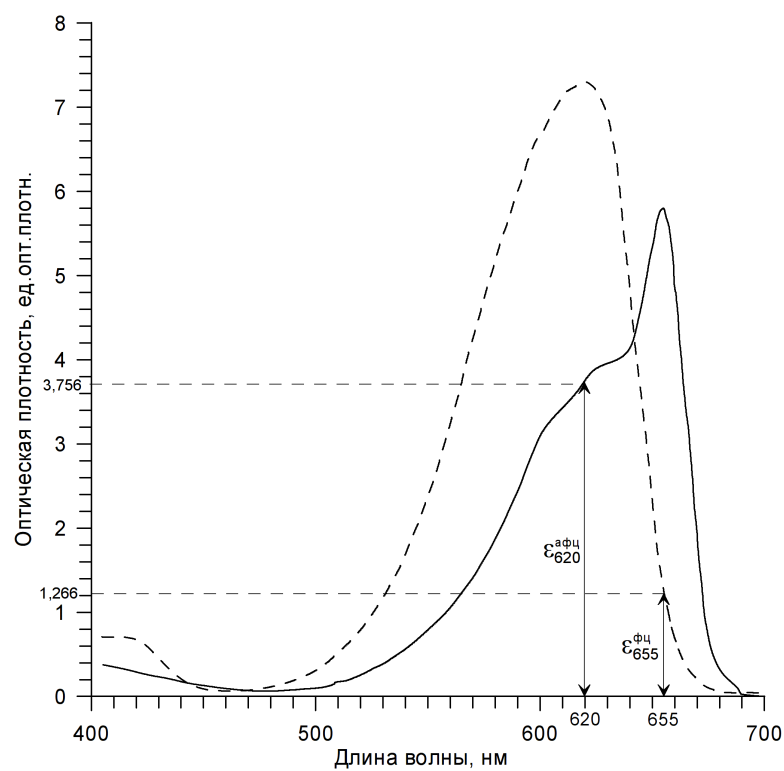


Рис. 5. Спектры поглощения С-фикоцианина (пунктирная линия) и аллофикоцианина (сплошная линия) в нормированном виде (см. также рисунок 1). Стрелками отмечены величины удельных коэффициентов экстинкции С-фикоцианина $\epsilon_{655}^{фц} = 1,266$ для 655 нм и аллофикоцианина $\epsilon_{620}^{aфц} = \epsilon_{620}^{aфц} = 3,756$ для 620 нм.

Далее по спектрам $\varepsilon_{\text{фц}}(\lambda)$, $\varepsilon_{\text{афц}}(\lambda)$ находим значения удельных коэффициентов экстинкции $\varepsilon_{\text{афц}}(620) = \varepsilon_{620}^{\text{афц}} = 3,756$ и $\varepsilon_{\text{фц}}(655) = \varepsilon_{655}^{\text{фц}} = 1,266$.

Расчёт массовых долей С-фикоцианина и аллофикоцианина в биомассе спиролины

Из выражения (1) следует:

$$c_{\text{фц}} = \frac{D_{620}^* - \varepsilon_{620}^{\text{афц}} \cdot c_{\text{афц}} \cdot l}{7,3 \cdot l}; \quad c_{\text{афц}} = \frac{D_{655}^* - \varepsilon_{655}^{\text{фц}} \cdot c_{\text{фц}} \cdot l}{5,8 \cdot l};$$

$$c_{\text{фц}} = \frac{D_{620}^*}{7,3 \cdot l} - \frac{\varepsilon_{620}^{\text{афц}}}{7,3} \left(\frac{D_{655}^*}{5,8 \cdot l} - \frac{\varepsilon_{655}^{\text{фц}} \cdot c_{\text{фц}}}{5,8} \right) =$$

$$= \frac{D_{620}^*}{7,3 \cdot l} - \frac{\varepsilon_{620}^{\text{афц}}}{7,3} \cdot \frac{D_{655}^*}{5,8 \cdot l} + \frac{\varepsilon_{620}^{\text{афц}}}{7,3} \cdot \frac{\varepsilon_{655}^{\text{фц}}}{5,8} \cdot c_{\text{фц}}.$$

Подставляя численные значения коэффициентов $\varepsilon_{620}^{\text{афц}} = 3,756$ и $\varepsilon_{655}^{\text{фц}} = 1,266$, имеем:

$$c_{\text{фц}} = \frac{\frac{D_{620}^*}{7,3 \cdot l} - \frac{\varepsilon_{620}^{\text{афц}}}{7,3} \cdot \frac{D_{655}^*}{5,8 \cdot l}}{1 - \frac{\varepsilon_{620}^{\text{афц}}}{7,3} \cdot \frac{\varepsilon_{655}^{\text{фц}}}{5,8}} = \frac{D_{620}^* \cdot 5,8 - \varepsilon_{620}^{\text{афц}} \cdot D_{655}^*}{(7,3 \cdot 5,8 - \varepsilon_{620}^{\text{афц}} \cdot \varepsilon_{655}^{\text{фц}}) \cdot l} =$$

$$= \frac{D_{620}^* \cdot 5,8 - 3,756 \cdot D_{655}^*}{(7,3 \cdot 5,8 - 3,756 \cdot 1,266) \cdot l} = \frac{0,154 \cdot D_{620}^* - 0,1 \cdot D_{655}^*}{l}.$$

Таким образом, концентрация С-фикоцианина ($c_{\text{фц}}$, мг/мл) в водном экстракте равна:

$$c_{\text{фц}} = \frac{0,154 \cdot D_{620}^* - 0,1 \cdot D_{655}^*}{l}.$$

Следовательно, формула для вычисления массовой доли С-фикоцианина ($C_{\text{фц}}$) в биомассе имеет вид:

$$C_{\text{фц}} = \frac{0,154 \cdot D_{620}^* - 0,1 \cdot D_{655}^*}{m \cdot (1 - k) \cdot l} \cdot V \cdot 100\%,$$

где V — объём объединённого экстракта, мл; m — масса навески, мг; k — массовая доля воды в пробе; l — длина оптического пути, см.

Аналогичные рассуждения для аллофикоцианина ($C_{\text{афц}}$) приводят к формуле:

$$C_{\text{афц}} = \frac{0,194 \cdot D_{655}^* - 0,034 \cdot D_{620}^*}{m \cdot (1 - k) \cdot l} \cdot V \cdot 100\%.$$

Подставляя величины D_{620}^* и D_{655}^* из выражений 2 и 3, после преобразования получим формулы для расчёта массовой доли С-фикоцианина и аллофикоцианина по экспериментальным данным:

$$C_{\text{фц}} = \frac{0,154 \cdot D_{620} - 0,1 \cdot D_{655} - 0,034 \cdot D_{470} - 0,02 \cdot D_{700}}{m \cdot (1 - k) \cdot l} \cdot V \cdot 100\%,$$

$$C_{\text{афц}} = \frac{0,194 \cdot D_{655} - 0,034 \cdot D_{620} - 0,026 \cdot D_{470} - 0,134 \cdot D_{700}}{m \cdot (1 - k) \cdot l} \cdot V \cdot 100\%.$$

Приложение Б

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-8. Частота обращения ротора — 1000–8000 об/мин. Допускаемое приведённое отклонение заданной частоты вращения — не более ± 10 %. Фактор разделения для скорости в 8000 об/мин $\Phi_{8000} = 6600 g$.
3. Весы аналитические ВЛР-200, 0–200 г, 2 класс. Набор разновесок Г 2–210, 0–200 г, класс 2.
4. Иономер лабораторный И-160М с ионоселективным стеклянным электродом ЭСК-43-07 для измерения рН, группа В4 ГОСТ 12997-84, с абсолютной погрешностью 0,020.
5. Сушильный шкаф стерилизационный сухожаровый СНОЛ ШС-58/350.

6. 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 ± 1 % и 100–1000 мкл, погрешностью не более ± 1 %.

Список литературы

1. Стаднийчук И. Н. Фикобилипротеины. Биологическая химия. (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР). — М., 1990. — Т. 40. — 196 с.
2. Стадничук И. Н., Красильников П. М., Зленко Д. В. Фикобилисомы и фикобилипротеины цианобактерий // Микробиология. — 2015. — Т. 84, № 2. — С. 131–143.
3. Belay A. The Potential Application of Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management // JANA. — 2002. — V. 5, no. 2. — P. 27–49.
4. Boussiba S., Richmond E. Isolation and Characterization of Phycocyanins from the Blue-Green Alga *Spirulina platensis* // Arch. Microbiol. 1979. — V. 120. — pp. 155–159.
5. Bennett A., Bogorad L. Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins // Biochemistry. — 1971. — V. 10, no 19. — pp. 3625–3634.
6. Vonshak A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology. — Taylor Fransis, 1996. — 196 p.

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 C-phycocyanin and allophycocyanin in dry biomass of *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. Cold extraction : educational and methodological manual / RAS, Kovalevsky Institute of Marine Biological Research. — Sevastopol, 2017. — 21 p. — (Working paper / RAS, IMBR).

This training aid provides detailed instructions on the quantitative determination of the mass fraction of C-phycocyanin and allophycocyanin in the dry biomass of spirulina using the cold extraction method. 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 phycobiliproteins 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.