

УДК 582.26/.27: 579.8:577.1:37.087

**Ю.П. КОПЫТОВ, А.С. ЛЕЛЕКОВ, Р.Г. ГЕВОРГИЗ,
М.В. НЕХОРОШЕВ, Т.М. НОВИКОВА**

Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского,
пр. Нахимова, 2, Севастополь 99011, Крым

e-mail: kopytov_49@mail.ru, a.lelekov@yandex.ru,

r-gevorgiz@yandex.ru, mnekhorochev@gmail.com, nowtanj@yandex.ru

МЕТОДИКА КОМПЛЕКСНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Предложена методика комплексного определения биохимического состава клеток культуры микроводорослей, которая позволяет в течение 2–4 ч методом окисляемости определять абсолютно сухую биомассу микроводорослей, содержание хлорофилла, каротиноидов, общего белка, углеводов, липидов. Это существенно экономит время и реактивы, что особенно актуально при исследовании интенсивной квазинепрерывной культуры микроводорослей.

К л ю ч е в ы е с л о в а : квазинепрерывная культура микроводорослей, окисляемость биомассы, хлорофиллы, каротиноиды, общий белок, липиды, углеводы.

Введение

Определение биохимического состава биомассы является важным этапом при исследовании роста культур микроводорослей в управляемых условиях. В гидробиологической практике используется целый ряд методик для определения химического состава водорослей (Методы ..., 1975, 1979, Руководство ..., 2004). Но, как правило, они позволяют определять лишь один химический компонент биомассы микроводорослей и не предполагают объединение двух, трех и более методик с целью экономии времени для анализа. Это обстоятельство значительно затрудняет исследование динамики биохимических показателей биомассы при интенсивном культивировании микроводорослей, когда время анализа проб не должно превышать 2–4 ч.

Цель данного исследования – разработка методики комплексного определения основных биохимических компонентов биомассы микроводорослей (органический углерод, общий белок, липиды, углеводы, пигменты) с минимальными затратами времени и реактивов.

Материалы и методы

Все этапы предлагаемой методики комплексного определения биохимических компонентов биомассы основаны на фотоколориметрическом анализе (380–750 нм). Для экономии реактивов предпочтительно применение фотоколориметра с щелевой диафрагмой, например, КФК-3.

© Ю.П. Копытов, А.С. Лелеков, Р.Г. Геворгиз, М.В. Нехорошев,
Т.М. Новикова, 2015

Наличие такой диафрагмы позволяет использовать микрокюветы объемом 1,2 мл. При модификации кюветодержателя таким образом, чтобы луч проходил у основания кюветы, объем раствора следует уменьшить до 0,8 мл.

Для работы необходим набор реактивов с квалификацией не ниже «хч». Подготовка органических растворителей проводится в соответствии с методами очистки, предложенными Коростелёвым (1964).

Реактивы для определения окисляемости биомассы. 0,4 н. сульфохромовый реактив: 19,6 г $K_2Cr_2O_7$ растворяли в 1 л концентрированной H_2SO_4 .

Реактивы для экстракции фотосинтетических пигментов. Ацетон (90 или 100 %) (Jeffrey, Humphrey, 1975), смесь Фолча (хлороформ : метанол, 2:1 v/v) (Lindsay, 1985; Strickland, Parsons, 1968).

Реактивы для экстракции и определения липидов. Смесь Фолча, фосфованилиновый реактив (Руководство ..., 2004).

Реактивы для экстракции и определения общего белка по Лоури. Растворы А, В, С и реактив Фолина (Филиппович и др., 1975; Lowry et al., 1951).

Реактив для экстракции и определения общих углеводов. Триптофановый реактив (Руководство ..., 2004).

Предложенная методика апробирована на нескольких культурах микроводорослей различных систематических групп: *Synechococcus* sp., *Arthrospira platensis* Gomont, *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross, *Tetraselmis viridis* Rouch, *Dunaliella salina* Teodor., *Chlorella vulgaris* Beyer.

Данная методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей включает в себя стандартные методы (Методы ..., 1975, 1979; Филиппович и др., 1975; Руководство ..., 2004) с некоторыми модификациями. Приведенные ниже модификации обусловлены минимизацией расхода реактивов и затрат времени при определении биохимического состава микроводорослей.

При исследовании биохимического состава необходимо вначале оценить плотность культуры микроводорослей, которая может быть осуществлена различными методами. Наиболее распространённым экспресс-методом является оценка плотности культуры оптическим методом (Геворгиз и др., 2005; Соловченко и др., 2011). Однако в зависимости от видоспецифических свойств исследуемого объекта оптический метод может быть неприемлем из-за больших погрешностей. Например, клетки *P. purpureum* в плотной культуре обычно агглютинируют, поэтому при измерении оптической плотности возникает эффект «проскока», что значительно занижает результаты измерений. В стационарной фазе роста у *A. platensis* большая доля органической взвеси (продукты лизиса клеток, продуцируемые водорослями экзометаболиты и прочие оптически активные органические соединения) рассеивает свет, что приводит к завышению показаний измерений оптической плотности. Этих недостатков экспресс-оценки плотности культуры лишён метод определения

абсолютно сухой биомассы, основанный на окисляемости органического вещества (Методы ..., 1979). В отличие от оригинального метода, который основан на титриметрическом анализе, предлагаемая нами модификация основана на спектрофотометрическом измерении.

Окисляемость биомассы. Из фотобиореактора после тщательного перемешивания отбирали аликвота объёмом 1 мл. Далее клетки микроводорослей отделяли от супернатанта центрифугированием (10 мин при 1600 g и более) или другим методом. Затем надосадочную жидкость удаляли и вносили 1 мл 0,4 н. сульфохромового реактива, 10 мин выдерживали на песчаной бане при медленном кипении либо в сушильном шкафу при 165–170 °С. Перед измерением добавляли 5 мл дистиллированной воды, центрифугировали и в растворе определяли оптическую плотность при длине волны 590 нм.

Калибровочную кривую строили по показателям воздушно-сухой или сырой биомассы микроводорослей, параллельно пересчитывали на абсолютно сухую биомассу. Полученное нами калибровочное уравнение для культур зелёных водорослей *Dunaliella salina* и *Chlorella vulgaris* (для 1 см кюветы) имеет вид:

$$ACB = 15,4 \cdot \Delta D_{590} - 0,13 \text{ (мг/мл)},$$

где ΔD_{590} – разница оптических плотностей опытной и контрольной пробы.

Определение содержания жирорастворимых пигментов. В центрифужную пробирку вносили 5 мл суспензии микроводорослей, центрифугировали, удаляли супернатант и добавляли смесь Фолча. В последней метанол можно заменить этанолом, однако в этом случае экстрагирующая способность уменьшается, что требует проведения дополнительных исследований для определения коэффициента экстинкции. Нами установлено, что при экстракции хлороформ-этанолом хл. *a* из биомассы *A. platensis* коэффициент экстинкции снижается примерно на 20 %.

Необходимым условием полного извлечения пигментов является дезинтеграция клеточных стенок. Для разрушения клеточных стенок хлореллы при небольшом количестве биомассы достаточно растереть навески в ступке с кварцевым стеклом (Беренштейн, Костлан, 1977).

Концентрацию пигментов определяли по коэффициентам экстинкции (Strickland, 1968; Jeffrey, Humphrey, 1975; Lindsay, 1985).

Определение содержания липидов. Концентрацию липидов (С) определяли согласно литературным данным (Руководство ..., 2004). Калибровочную кривую, с помощью которой можно определить концентрацию липидов в пробе, строили, используя нерафинированное оливковое масло. Полученное нами калибровочное уравнение (для 1 см кюветы) имеет вид:

$$C = 79 \cdot \Delta D_{530} \text{ (мкг/мл)}.$$

Калибровочный коэффициент будет возрастать, если фосфованилиновый реактив будет храниться более месяца. Его следует содержать в таре из тёмного стекла в тёмном месте при комнатной температуре.

Определение содержания общего белка по Лоури. Концентрацию белка определяли согласно литературным данным (Филиппович и др., 1975; Lowry et al., 1951). Калибровочную кривую строили по сывороточному альбумину человека. Полученное нами калибровочное уравнение (для 1 см кюветы) имеет вид: $C = 368 \cdot \Delta D_{750}$ (мкг/мл).

В отличие от стандартной методики, мы рекомендуем измерять оптическую плотность при длине волны 750 нм, т.к. она соответствует максимуму спектра поглощения при любых концентрациях белка в пробе.

Определение содержания углеводов. Для определения содержания щелочерастворимых углеводов к аликвоте щелочного гидролизата объёмом 0,1 мл добавляли 0,9 мл дистиллированной воды, а к 0,5 мл полученной пробы – 0,75 мл триптофанового реактива, выдерживали 10 мин на водяной бане при 100 °С, охлаждали и спектрофотометрировали при длине волны 540 нм.

Кислоторастворимые углеводы определяли в осадке, оставшемся после центрифугирования щелочного гидролизата. Для этого к нему добавляли 3 мл разбавленной 1:1 серной кислоты и выдерживали при 100 °С 10 мин на водяной бане. После охлаждения и центрифугирования из полученного раствора отбирали аликвоту объёмом 0,1 мл и проводили анализ аналогично определению щелочерастворимых углеводов. При необходимости можно определить содержание суммарных углеводов. Для этого необходимо смешать 0,05 мл аликвот щелочного и кислотного гидролизата.

Калибровочную кривую строили по D-изомеру глюкозы. Полученное нами калибровочное уравнение (для 1 см кюветы) имеет вид: $C = 37,3 \cdot \Delta D_{540}$ (мг/л).

Заключение

Разработана комплексная методика, позволяющая отслеживать динамику основных биохимических компонентов квазинепрерывной культуры микроводорослей с интервалом между разбавлениями 3–5 ч. В зависимости от видоспецифичности исследуемого вида микроводорослей продолжительность проведения анализов может варьировать в широком диапазоне. Обычно самым длительным этапом является дезинтеграция клеточных стенок при извлечении пигментов из сырой биомассы.

Абсолютные значения содержания биохимических составляющих биомассы микроводорослей при комплексном подходе каждого последующего измерения могут зависеть от измерений на предыдущем этапе. Например, при определении содержания белка в микро-

водорослях предварительная экстракция пигментов завышает результаты измерений белка (Berges et al., 1993). Для введения поправок необходимо сравнить полученные значения со значениями, полученными посредством стандартных методик.

Предложенная методика апробирована на культурах микроводорослей различных систематических групп: *Synechococcus* sp., *Artospira platensis*, *Porophyridium purpureum*, *Tetraselmis viridis*, *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*. Относительная ошибка при определении окисляемости биомассы не превышала 5 %, концентрации пигментов – 4 %, липидов – 5 %, общего белка – 5 %, углеводов – 6 %. Методика представляет собой лишь некоторую схему анализа, которая может быть расширена путем определения дополнительных биохимических компонентов, например аминокислот, свободных нуклеотидов, нуклеиновых кислот и т. д.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беренштейн А.Ф., Костлан Н.В. Методы разрушения оболочки клеток хлореллы: Мат. респ. совещ. (Ташкент, 5–7 окт., 1977 г.). – Ташкент: Фан, 1977. – С. 49–50.
- Геворгуз Р.Г., Алисиевич А.В., Шматок М.Г. Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культуры // Экол. моря. – 2005. – 70. – С. 96–106.
- Коростелев П.П. Приготовление растворов для химико-аналитических работ. – Изд-во АН СССР, 1964. – 398 с.
- Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наук. думка, 1975. – 247 с.
- Методы химического анализа в гидробиологических исследованиях. – Владивосток, 1979. – 128 с.
- Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры. – М.: Изд-во ВНИРО, 2004. – 123 с.
- Соловченко А.Е., Чивкунова О.Б., Маслова И.П. Пигментный состав, оптические свойства и устойчивость к фотодеструкции микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, культивируемой при высокой освещенности // Физиол. раст. – 2011. – 58(1). – С. 12–20.
- Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии. – М.: Просвещение, 1975. – 318 с.
- Berges J.A., Fisher A.F., Harrison P.J. A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* // Mar. Biol. – 1993. – 115. – P. 187 – 193.
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1*, and *c2* in higher plants, algae and natural populations // Biochem. Physiol. Pflanz. – 1975. – 167. – P. 191–194.
- Lindsay W.W. Chloroform-methanol extraction of chlorophyll *a* // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1985. – 42. – P. 38–42.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**(1). – P. 265–275.

Strickland J.D.H., Parsons T.R. A practical handbook of seawater analysis. – *Bull. Fish. Res. (Canada)*, 1968. – 311 p.

Поступила 23 сентября 2013 г.
Подписала в печать Е.И. Шнюкова

ISSN 0868-8540. Algologia. 2015, 25(1): 35–40 <http://dx.doi.org/10.15407/alg25.01.021>

Yu.P. Kopytov, A.S. Lelekov, R.G. Gevorgiz, M.V. Nekhoroshev, T.M. Novikova

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas,

2, Nakhimov Prosp., Sevastopol 99011, Crimea

e-mail: kopytov_49@mail.ru, a.lelekov@yandex.ru,

r-gevorgiz@yandex.ru, mnekhroshev@gmail.com, nowtanj@yandex.ru

METHOD OF COMPLEX ANALYSIS OF BIOCHEMICAL COMPOSITION OF MICROALGAE

The method of complex analysis of biochemical composition of microalgae culture is proposed. The method allows to define dry weight on oxidability of biomass, content of chlorophylls, carotenoids, total proteins, carbohydrates, lipids. Use of the given method allows essentially to save time and reactants at the analysis since it is carried out by a micromethod.

Key words: microalgae culture, oxidability of biomass, chlorophylls, carotenoids, total proteins, lipids, carbohydrates.