

Российская академия наук
Сибирское отделение
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Заместитель директора
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН
Доцент, к.х.н. Коваль В.В.




28 февраля 2018 г.

НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ

«Определение количественного содержания фикоцианина в живой спирулине»

договор № 08 ИХБФМ/2018 от «19» февраля 2018 г.

Руководитель НИР,
к.х.н, руководитель ЦКП ЦМСА

 А. А. Черноносков

Новосибирск – 2018

РЕФЕРАТ

Проведена научно-исследовательская работа с целью определения количественного содержания фикоцианина в живой спирулине. Проведено разрушение клеток живой спирулины, экстракция и определение фикоцианина согласно оптимизированным SOP с использованием спектрометрии.

Приведены спектры навесок образца, результаты измерения оптического поглощения и итогового расчета количества фикоцианина в живой спирулине.

Работа выполнена в соответствии с техническим заданием.

ОТЧЕТ О РАБОТЕ

Согласно заключенному между ИХБФМ СО РАН и ООО «СИБАФ» договору № 08 ИХБФМ/2018 от «19» февраля 2018 г. была проведена научно-исследовательская работа с целью определения количественного содержания фикоцианина в живой спирулине.

От заказчика «19» февраля 2018 г. был получен образец живой спирулины весом 50 грамм с датой изготовления «19» февраля 2018 г. и следующим составом: живая спирулина, экстракт из красных и бурых водорослей, допускается наличие вкусовой добавки.

До проведения анализа, образец живой спирулины хранился в сухом, темном месте при температуре 4 °С.

Планом исследования было запланировано разрушение клеток живой спирулины, экстракция и определение фикоцианина согласно оптимизированным SOP с использованием спектрометрии.

В основу метода определения количественного содержания фикоцианина в живой спирулине был взят SOP (standart operation procedure) [1] по экстракции и определению фикоцианина в цианобактериях. Данный протокол был разработан для водных образцов цианобактерий, тогда как полученный образец живой спирулины находился в 0,2% агаре. В связи с этим протокол был оптимизирован в части экстракции фикоцианина согласно данным [2], а именно повторному замораживанию-размораживанию образца и использованию стеклянных шариков в процессе разрушения ультразвуком. В итоге протокол экстракции и определения фикоцианина выглядел следующим образом:

Экспериментальная часть

Реагенты

- Хлорид натрия (NaCl)
- Хлорид калия (KCl)
- Безводный двухосновный фосфат натрия (Na_2HPO_4)
- Калий фосфат безводный одноосновный (KH_2PO_4)
- Динатриевая соль EDTA

Приборы

- Градуированные 15-мл полипропиленовые пробирки
- Центрифуга Eppendorf 5810R (4000 об/мин = 3220×g)
- Ультразвуковой гомогенизатор SONOPULS UW 3100 (Bandelin electronic)
- Спектрофотометр Shimadzu UV 2100 (Япония) для регистрации спектров и оптической плотности на 620, 650 и 750 нм.
- Весы Sartorius SP323P с точностью измерения 1 мг
- Стеклокюветы

Подготовка буферного раствора

а. К конечному объему 1 л воды качества MilliQ последовательно добавляют и растворяют:

- 8,77 г NaCl (конечная концентрация 0,15 М),
- 2,01 г KCl (конечная концентрация 27 мМ),
- 11,36 г Na_2HPO_4 (конечная концентрация 80 мМ),
- 2,72 г KH_2PO_4 (конечная концентрация 20 мМ) и
- 3,72 г Na_2EDTA (конечная концентрация 10 мМ).

Повышение pH до 7,45-7,50 способствует растворению компонентов солевого буфера.

б. Доводят pH до 7,45-7,50 с использованием 3-4 мл 5 мМ NaOH.

с. Раствор хранится до 6 месяцев при 4 °С.

Подготовка проб

Следующие шаги необходимо выполнять в условиях недостаточного света, чтобы избежать фотохимической деградации фикоцианина.

- а. Отобрать навески образца (0,5-1 г) и поместить в градуированные 15-мл полипропиленовые пробирки. Добавить 1 мл солевого буферного раствора. Закрыть пробирки алюминиевой фольгой, чтобы избежать фотохимического разложения.
- б. Провести 2 цикла замораживание-оттаивание образца для индукции клеточного лизиса при -70 °С.
- с. Добавить стеклянные шарики и разрушать ультразвуком в течение 20 минут в ультразвуковом гомогенизаторе с водой и льдом.
- д. Добавить 10 мл солевого буферного раствора и перемешать.
- е. Инкубировать при 4 °С в течение 16 часов.
- е. Разрушить ультразвуком в течение 10 минут в ультразвуковом гомогенизаторе с водой и льдом (этот шаг уменьшает мутность экстрактов).
- г. Центрифугировать образцы, 20 мин, при 4 °С, 4000 об/мин (3220×g).

Спектрофотометрические показания

- а. Записать базовую линию солевого буферного раствора. Записать спектр образца.
- б. Измерить значения оптического поглощения на 620, 650 и 750 нм. Значения абсорбции на 620 и 650 нм нужно скорректировать путем вычитания значения, полученного на 750 нм. Поглощение образцов на 750 нм указывает на остаточную неспецифическую мутность образца и во всех случаях должно быть ниже 0,010 а.е. Показания должны быть в пределах от 0,03 до 1,5 для правильного измерения значений оптического поглощения.

Расчет концентрации фикоцианина провести по следующему уравнению, предложенному в [3]:

$$\text{Фикоцианин (мг/л)} = \frac{(\text{Abs } 620 - 0,7 \times \text{Abs } 650) \times V_e}{7,38 \times V_s \times l}$$

V_e = объем буферного экстракта (мл),

V_s = объем образца (литр),

l = длина пути кюветы (см),

Abs 620 = оптическое поглощение на длине волны 620 нм

Abs 650 = оптическое поглощение на длине волны 650 нм

Результаты

Для повышения достоверности измерения, было отобрано 4 навески (1-4) предоставленного образца.

Данные измерений оптического поглощения на длинах волн 620, 650 и 750 нм представлены в таблице 1

Таблица 1.

Навеска	Масса, г	Оптическое поглощение на длине волны				
		620 нм	650 нм	750 нм	(620 -750) нм	(650-750) нм
1	0,469	0,1438	0,0592	0,0060	0,1378	0,0532
2	0,507	0,1525	0,0652	0,0078	0,1447	0,0574
3	0,569	0,1584	0,0688	0,0083	0,1501	0,0605
4	0,445	0,1275	0,0528	0,0053	0,1222	0,0475

Спектры растворов фикоцианина, полученные из навесок 1-4 представлены на рисунках 1-4.

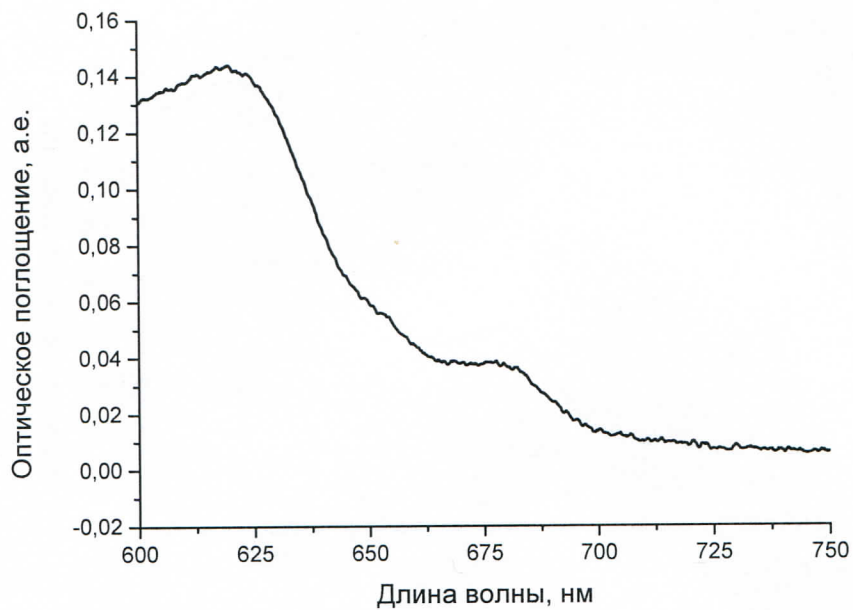


Рисунок 1. Спектр раствора фикоцианина, полученного из навески 1.

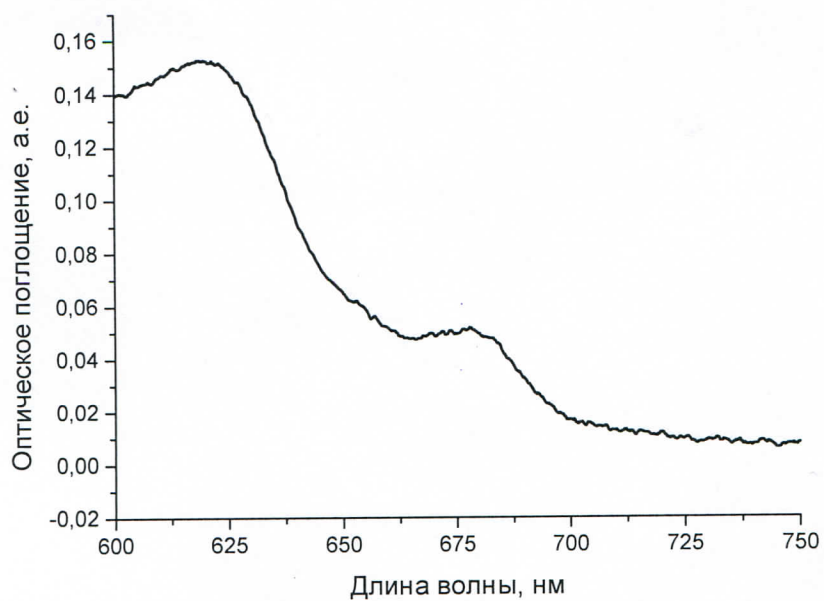


Рисунок 2. Спектр раствора фикоцианина, полученного из навески 2.

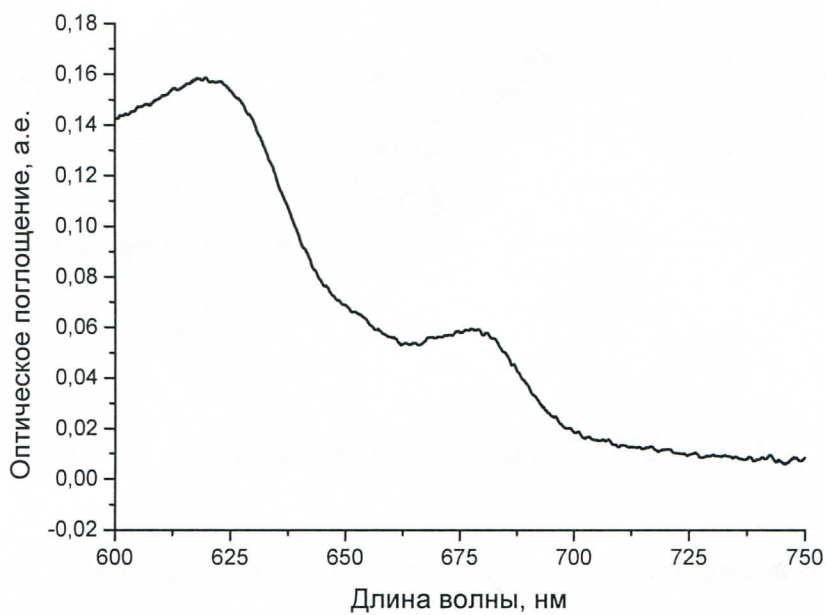


Рисунок 3. Спектр раствора фикоцианина, полученного из навески 3.

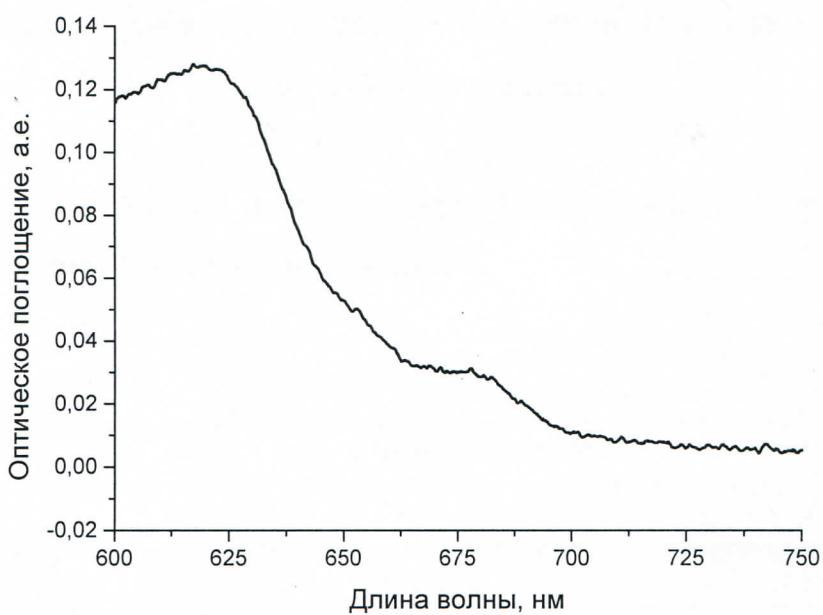


Рисунок 4. Спектр раствора фикоцианина, полученного из навески 4.

Результат расчета концентрации фикоцианина согласно указанной выше формуле представлен в таблице 2.

Значение плотности образца было предоставлено Заказчиком и составляло 1 г/мл.

Таблица 2.

Навеска	Фикоцианин мг/л
1	319,6
2	307,3
3	282,3
4	297,9

Концентрация фикоцианина составила $301,8 \pm 15,7$ мг/л.

Кроме этого была проведена оценка содержания фикоцианина в расчете на сухую массу спирулины.

Для этого взяли навеску 940 мг образца и высушили досуха в течение 72 часов при температуре 40 °С. В результате вес сухого остатка составил 12 мг. Из них 0,2% составлял агар: $940 \text{ мг} \times 0,2\% / 100\% = 1,88 \text{ мг}$. Итого вес сухой спирулины составил $12 \text{ мг} - 1,88 \text{ мг} = 10,12 \text{ мг}$ из 940 мг образца.

Результат оценки концентрации фикоцианина в перерасчете на сухой вес спирулины представлен в таблице 3.

Таблица 3.

Навеска	Фикоцианин мг/г	Фикоцианин, %
1	29,7	2,97
2	28,5	2,85
3	26,2	2,62
4	27,7	2,77

Оценка содержания фикоцианина в расчете на сухую массу спирулины составила $28,0 \pm 1,5$ мг/г или $2,8 \pm 0,15$ %.

Заклучение

Концентрация фикоцианина в живой спирулине составила $301,8 \pm 15,7$ мг/л., по оценке содержания фикоцианина в расчете на сухую массу спирулины концентрация составила $28,0 \pm 1,5$ мг/г или $2,8 \pm 0,15$ %.

Ссылки

- [1] C. Yéprémian, A. Catherine, C. Bernard et al., "Phycocyanin Extraction and Determination," in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, pp. 335–338, John Wiley & Sons, Ltd, 2016.
- [2] C. C. Moraes, L. Sala, G. P. Cerveira et al., "C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass," *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 28, no. 1, pp. 45–49, 2011.
- [3] N.T. de Marsac and J. Houmard, "[34] Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra," in *Cyanobacteria*, L. Packer and A. N. Glazer, Eds., vol. 167, pp. 318–328, Elsevier, 1988.