

УДК 577.342

Н. В. КОЗЕЛ, В. П. ДОМАНСКИЙ, Е. Е. МАНАНКИНА, К. О. АДАМЧИК,  
И. А. ДРЕМУК, С. М. САВИНА

## ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА *SPIRULINA PLATENSIS*

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: ktmu@tut.by

(Поступила в редакцию 22.12.2014)

**Введение.** В настоящее время использование светодиодных источников света для выращивания фотосинтезирующих организмов в условиях искусственного освещения представляет большой интерес как с точки зрения высокой энергоэффективности таких осветителей, так и с точки зрения получения оптимального спектрального состава для создания наиболее благоприятных условий для роста и развития растений [1]. Если энергоэффективность светодиодных источников фотосинтетически активного света определяется, как правило, их конструктивными особенностями, то для получения наиболее оптимального спектрального состава при выращивании фотосинтезирующих организмов необходимо знать и учитывать особенности восприятия света каждым конкретным растительным объектом. Первостепенной задачей при решении этой проблемы является выявление особенностей функционирования фотосинтетического аппарата растений при освещении светодиодными источниками света и установление механизмов адаптации фотосинтетического аппарата к освещению от таких источников.

Оптимизация спектрального состава источников фотосинтетически активного света весьма актуальна при биотехнологическом производстве хозяйственно ценных видов водорослей, в частности *Spirulina*. Уже почти полвека *Spirulina* является объектом промышленной биотехнологии для получения биомассы, используемой при лечении и профилактике болезней, в качестве витаминно-кормовой добавки к рационам кормления сельскохозяйственных животных, для промышленного получения из нее различных ценных веществ –  $\beta$ -каротина, фикоцианина, полиненасыщенных жирных кислот [2]. Отличительной особенностью фотосинтетического аппарата *Spirulina* по сравнению с таковым у высших растений и некоторых других видов водорослей является отсутствие в его составе фотосинтетического пигмента хлорофилла *b*, а также наличие большого количества фикобилинового пигмента фикоцианина, характерного для сине-зеленых водорослей. Указанные особенности, видимо, оказывают существенное влияние на адаптацию *Spirulina* к изменению спектрального состава фотосинтетически активного света, что было показано нами ранее [3].

Цель работы – выявление особенностей адаптации фотосинтетического аппарата *Spirulina platensis* при освещении водоросли светодиодными источниками света разного спектрального состава с целью конструирования новых высокоэффективных источников фотосинтетически активного света.

**Объект и методы исследования.** В качестве объекта исследования использовали трихомную сине-зеленую водоросль *Spirulina (Arthrospira) platensis* (штамм ИВСЕ S-2 из коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси) [4]. Водоросль выращивали на среде Зарроука [5] в стеклянных бюксах объемом 200 мл (рабочий объем 100 мл) в режиме 14 ч света –

10 ч темноты при температуре  $23 \pm 2$  °С в течение 7 сут. Для выращивания *Spirulina* использовали светодиодный осветитель, сконструированный в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [3], с различными комбинациями синего ( $\lambda = 450\text{--}465$  нм), голубого ( $\lambda = 465\text{--}485$  нм), желтого ( $\lambda = 590\text{--}595$  нм) и красного ( $\lambda = 630\text{--}650$  нм) светодиодов (потребляемая мощность одного светодиода около 1 Вт), а также энергосберегающую люминесцентную лампу Philips PL-S 11W/827/2P с потребляемой мощностью 11 Вт, цветовой температурой 2700 К и светоотдачей 64 Лм/Вт в качестве контроля. Интенсивности световых потоков лампы и светодиодного осветителя изначально были выравнены по энергии и составляли 5 мВт/см<sup>2</sup>. В работе были использованы сверхъяркие светодиоды Luxeon Rebel (Philips, Голландия) и XLamp (Cree, Китай).

Продуктивность *Spirulina* определяли по изменению биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензии в зеленой области спектра при  $\lambda = 560$  нм на спектрофотометре Metertech SP-830 Plus (Тайвань). Поглощение при 560 нм соответствует минимуму поглощения пигментов *Spirulina*, поэтому ослабление светового потока в этой области спектра обусловлено, как правило, лишь самой массой клеток. Известно, что оптическая плотность культуры *Spirulina* при  $\lambda = 560$  нм, равная единице, эквивалентна содержанию 699 мг сухой биомассы в 1 л [6].

Определение количества фикоцианина в биомассе *Spirulina* проводили согласно методике, описанной в работе [6]. Осажденную путем центрифугирования и промытую дистиллированной водой биомассу *Spirulina* растирали в ступке (без песка) в K-Na-фосфатном буфере (50 мМ, pH 7,0). Полученную суспензию центрифугировали 5 мин при 13 000 об/мин. Оптическую плотность супернатанта регистрировали на спектрофотометре Uvikon 931 фирмы Kontron (Германия) при 615 и 652 нм и рассчитывали содержание фикоцианина по формуле  $C = (ОП_{615} - 0,474(ОП_{652}))/5,34$  [6], где ОП – оптическая плотность экстракта при длинах волн 615 и 652 нм соответственно.

Качественную и количественную оценку содержания хлорофилла и каротиноидов в образцах проводили с помощью хроматографа высокого давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия). В основу метода выделения, разделения и идентификации пигментов были положены методики, описанные в работах [7–9]. Экстракцию фотосинтетических пигментов из клеток *Spirulina* осуществляли с помощью щелочного ацетона (100 % ацетон + 0,4 % водный NH<sub>3</sub> в соотношении 9:1). Разделение экстрагированных пигментов в колонке проводили с использованием растворов А и В по программе, приведенной в табл. 1, с потоком 0,5 мл/мин. Пигменты регистрировали спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей Shimadzu SPD-M20A (Япония) в диапазоне длин волн 200–800 нм.

**Т а б л и ц а 1. Программа изменения концентрации растворителей для разделения растительных пигментов на хроматографической колонке Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см)**

| Время, мин | Скорость потока, мл/мин | Раствор А, % | Раствор В, % | Режим                |
|------------|-------------------------|--------------|--------------|----------------------|
| 0,01       | 0,5                     | 100          | 0            | Линейный градиент    |
| 15,00      | 0,5                     | 0            | 100          | Изократический режим |
| 18,00      | 0,5                     | 0            | 100          | Линейный градиент    |
| 19,00      | 0,5                     | 100          | 0            | Изократический режим |
| 25,00      | 0,5                     | 100          | 0            | Остановка            |

Определение содержания структурных белков фотосистемы (ФС) 1 и ФС2 проводили с помощью иммуноблоттинга согласно методике, описанной в [10]. Белки экстрагировали из свежей растительной ткани в буфере, который содержал 56 мМ дитиотреитола, 56 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2 мМ ЭДТА, 12 % сахарозы и 2 % SDS-Na. Разделение белков осуществляли методом денатурирующего гель-электрофореза на установке Amersham (США), используя 12 %-ный разделяющий и 4 %-ный концентрирующий полиакриламидные гели. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C pure (диаметр пор 0,45 мкм) проводили, используя аппарат для переноса фирмы Amersham (США). При проведении иммуноблоттинга использовали поликлональные ан-

титела фирмы Agrisera (Швеция) на белок реакционного центра ФС1 PsaA и белок реакционного центра ФС2 D1 (PsbA). Для визуализации результатов иммуноблоттинга нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в темноте в буфере для щелочной фосфатазы, содержащем NBT (p-nitro blue tetrazolium chloride) и BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolil phosphate), до появления четко окрашенных белковых полос, после чего мембрану промывали дистиллированной водой. Количество белков рассчитывали (в отн. ед.) с помощью программы TotalLab 2.01, учитывая площадь и интенсивность полос после их визуализации.

Все данные представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения, полученные в трех независимых опытах. Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot 11.2.

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что структурная организация светособирающих пигмент-белковых комплексов определяет их функционирование в фотосинтетической мембране. Эти комплексы являются основными компонентами, обеспечивающими перенос энергии к реакционным центрам фотосинтеза и ее перераспределение между ФС [11, 12]. В данной работе нами исследовано изменение качественного и количественного состава важных структурных элементов фотосинтетических мембран клеток водоросли *Spirulina* – пигментов и структурных белков реакционных центров ФС1 и ФС2 – при изменении спектрального состава осветителя.

Для выращивания *Spirulina platensis* были использованы светодиоды с полосами испускания в красной и синей областях спектра. Использование именно таких светодиодов для культивирования водорослей не случайно, так как в фотосинтезирующих организмах в качестве основных пигментов-светосборщиков выступают хлорофилл и каротиноиды, которые наиболее эффективно поглощают свет в синей и красной областях спектра. Именно этими критериями руководствуется большинство исследователей, применяя в разных комбинациях только синие и красные светодиоды для выращивания растений [1, 13].

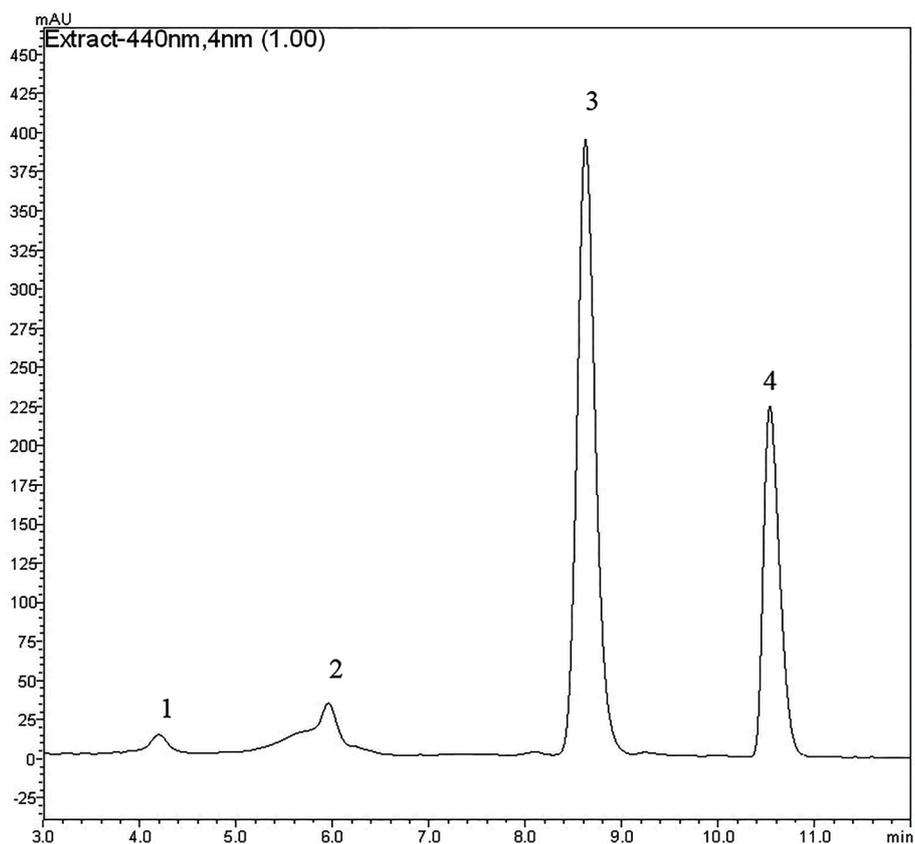


Рис. 1. Хроматограмма экстракта пигментов суспензии *Spirulina platensis*. Пики: № 1 – виолаксантин (время удержания 4,20 мин), № 2 – лютеин (время удержания 5,95 мин), № 3 – хлорофилл *a* (время удержания 8,62 мин), № 4 –  $\beta$ -каротин (время удержания 10,53 мин)

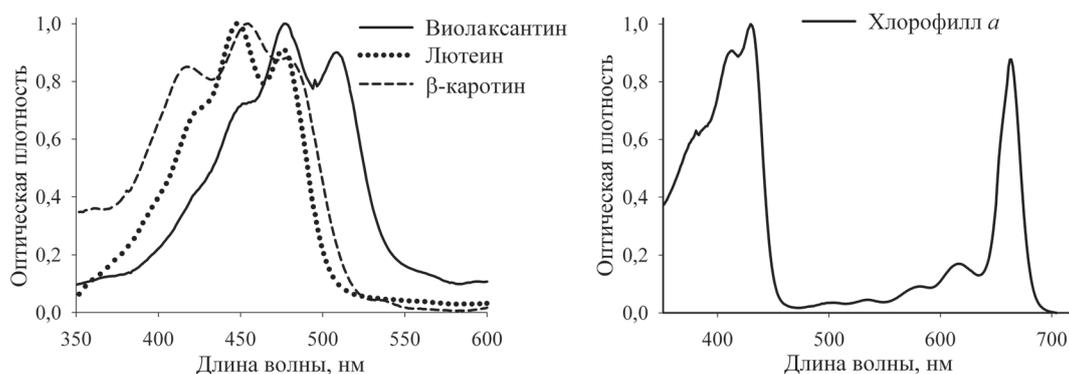


Рис. 2. Спектры пигментов, выделенных из клеток *Spirulina platensis*. Спектры нормированы на единицу

Анализ пигментных экстрактов суспензии *Spirulina* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии позволил выявить в исследуемых препаратах вне зависимости от спектрального состава осветителя наличие каротиноидов (виолаксантина, лютеина и  $\beta$ -каротина) и хлорофилла *a*. На рис. 1 представлена типичная для исследованных препаратов хроматограмма ацетонового экстракта из суспензии *Spirulina* с ярко выраженными пиками виолаксантина (пик № 1, время удержания 4,20 мин), лютеина (пик № 2, время удержания 5,95 мин), хлорофилла *a* (пик № 3, время удержания 8,62 мин) и  $\beta$ -каротина (пик № 4, время удержания 10,53 мин). На рис. 2 представлены спектры выделенных пигментов, зарегистрированные спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей, нормированные на единицу.

Несмотря на отсутствие качественного различия в составе фотосинтетических пигментов между экспериментальными вариантами *Spirulina*, выращенными под источниками света с разным спектральным составом, выявлены существенные количественные отличия в исследованных образцах. В ходе экспериментов установлена высокая чувствительность *Spirulina* к изменению спектрального состава светодиодного осветителя. Рост этой водоросли, а также количество фотосинтетических пигментов в расчете на 1 мл суспензии существенно снижались при отсутствии красной составляющей в спектре излучения осветителя. Так, при использовании только синего света наблюдалось более чем двукратное снижение продуктивности *Spirulina* (табл. 2). Отметим, что синий свет эффективно поглощается как хлорофиллом *a*, так и каротиноидами. Соответственно, такое существенное замедление роста водоросли связано не со снижением фотосинтетической активности *Spirulina* в результате уменьшения количества поглощенных квантов света, а с более сложными регуляторными механизмами, направленными на изменение синтеза структурных компонентов фотосистем и требующими для нормального протекания внутриклеточных процессов у *Spirulina* наличия в спектре излучения осветителя красного света.

Изложенную выше гипотезу подтверждают данные, полученные при выращивании *Spirulina* в условиях избытка красного света либо только при освещении водоросли красным светом (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Изменение продуктивности и содержания пигментов у *Spirulina platensis* при выращивании под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль)

| Свет   | Продуктивность, мг/л | Фикоцианин, мг/г сух. массы (в скобках – мг/л) | Хлорофилл <i>a</i> , мг/г сух. массы | Виолаксантин, мкг/г сух. массы | Лютеин, мкг/г сух. массы | $\beta$ -каротин, мг/г сух. массы |
|--|----------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Белый (люм. лампа Philips)                   | 595,8 ± 34,3         | 57,4 ± 8,6 (34,2 ± 5,1)                        | 17,6 ± 0,8                           | 225,3 ± 19,2                   | 840,0 ± 81,9             | 4,3 ± 0,32                        |
| Красный                                      | 782,2 ± 40,0         | 55,7 ± 7,2 (43,6 ± 5,6)                        | 18,8 ± 0,5                           | 213,3 ± 8,8                    | 970,0 ± 35,1             | 4,7 ± 0,17                        |
| Синий  | 322,8 ± 12,5         | 69,7 ± 11,4 (22,5 ± 3,7)                       | 17,6 ± 0,2                           | 300,0 ± 17,3                   | 876,7 ± 28,5             | 4,1 ± 0,01                        |
| Красный + синий (3:1)                        | 715,1 ± 19,7         | 56,5 ± 7,3 (40,4 ± 5,2)                        | 19,0 ± 1,0                           | 256,7 ± 23,3                   | 996,7 ± 91,2             | 4,8 ± 0,29                        |
| Красный + желтый + голубой + синий (3:3:1:1) | 696,4 ± 21,6         | 65,9 ± 3,1 (45,9 ± 2,1)                        | 16,1 ± 0,9                           | 204,2 ± 21,0                   | 748,7 ± 27,5             | 3,9 ± 0,26                        |

В таких условиях продуктивность *Spirulina* была выше контрольного варианта (белый свет): на 31 % при использовании только красного света, на 20 % при использовании совместно красного и синего (в соотношении 3:1 по энергии излучения), на 17 % при использовании одновременно красного, желтого, голубого и синего светодиодов (в соотношении 3:3:1:1 по энергии излучения). Таким образом, все использованные в работе варианты светодиодного освещения, за исключением синего, позволили добиться более высокой (на 17–31 %) продуктивности водоросли по сравнению с контрольным вариантом, выращенным под люминесцентной лампой.

Однако при выращивании *Spirulina* только под красным светом, а также под красным и синим светом одновременно зафиксировано снижение содержания в клетках водоросли фикоцианина в расчете на 1 г сухой массы при увеличении количества хлорофилла и каротиноидов относительно контроля. Добавление в спектр излучения осветителя желтого и голубого света, наоборот, позволило повысить на 15 % продукцию клетками водоросли фикоцианина на фоне снижения количества хлорофилла и каротиноидов. Отметим, что в расчете на 1 мл суспензии количество фикоцианина в варианте с использованием красного, желтого, голубого и синего светодиодов увеличилось более чем на 30 % по отношению к контролю (табл. 2). Поскольку фикоцианин является одним из важнейших молекулярных компонентов, определяющих антиоксидантную ценность *Spirulina*, вариант осветителя с использованием дополнительно к красным и синим светодиодам желтого и голубого с точки зрения промышленной биотехнологии является более привлекательным. Также ранее нами было показано [3], что при увеличении интенсивности освещения использование совместно красного, желтого, голубого и синего света не приводит к ингибированию роста водоросли в результате развития фотоокислительного стресса в отличие от варианта с красным или одновременно красным и синим светом.

Для выяснения механизмов, лежащих в основе перераспределения синтеза фотосинтетических пигментов у *Spirulina* при использовании светодиодного освещения разного спектрального состава, проведен анализ содержания в клетках водоросли основных структурных белков ФС – белка реакционного центра ФС1 PsaA и белка реакционного центра ФС2 D1 (PsbA). Иммуноблоттинг с использованием антител на белки PsaA и D1 показал (рис. 3), что в вариантах с применением красного и одновременно красного и синего света регистрируется большее количество белка D1 в расчете на 1 г сухой массы по сравнению с белым светом, а также по сравнению со светодиодным источником с красным, желтым, голубым и синим светодиодами. При этом количество белка реакционного центра ФС1 PsaA в вариантах с использованием красного и одновременно красного и синего света было ниже, чем в контроле и в варианте с применением одновременно красного, желтого, голубого и синего света. Полученные данные указывают на то, что при избытке красного света в спектре излучения осветителя происходит перераспределение синтеза структурных компонентов комплексов ФС в пользу ФС2. Подобный механизм выявлен нами у высших растений [14], что, видимо, связано с адаптационными и защитными процессами, направленными на увеличение количества светособирающих комплексов ФС2 для более эффективного поглощения наиболее фотосинтетически активного красного света и более эффективной утилизации энергии поглощенных квантов при фотосинтезе. Такие регуляторные механизмы, заключающиеся в перераспределении синтеза основных структурных белков ФС, описаны в литературе, причем есть предположение, что регуляция синтеза белков ФС1 и ФС2 при адаптации

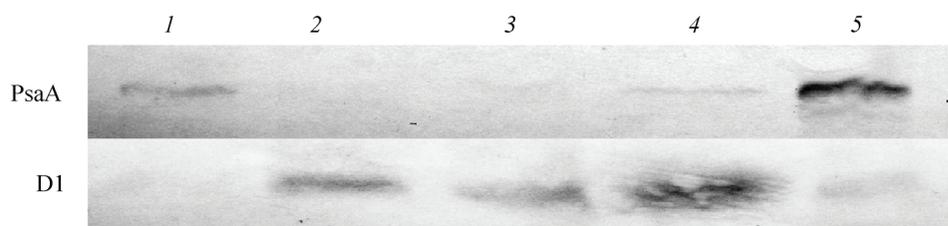


Рис. 3. Полосы белков PsaA и D1 после иммуноблоттинга и визуализации. Свет: 1 – красный + желтый + голубой + синий (в соотношении 3:3:1:1 по энергии излучения), 2 – красный, 3 – красный + синий (в соотношении 3:1 по энергии излучения), 4 – синий, 5 – белый

фотосинтетического аппарата растений связана со степенью окисленности пластохинонового пула [15, 16].

В то же время при использовании в осветительной установке дополнительно к красному и синему свету желтого и голубого адаптационная реакция у *Spirulina* существенно отличалась от таковой у высших растений. В частности, в клетках водоросли отмечалось не перераспределение синтеза компонентов светособирающих комплексов в пользу ФС2, а увеличение синтеза фикоцианина, который активно участвует в процессах светосбора и переноса энергии поглощенных квантов света в фотосинтетической мембране [17, 18]. Поскольку максимум поглощения фикоцианина находится в желтой области спектра, нами сделано предположение, что определяющую роль в увеличении синтеза фикоцианина в клетках *Spirulina* имеет добавление в спектральный состав освещения именно желтого света.

**Заключение.** Установлены существенные изменения количественного состава структурных компонентов фотосинтетических мембран *Spirulina* – пигментов и белков реакционных центров ФС – в зависимости от спектрального состава светодиодного освещения. Показано, что избыток красного света приводит к перераспределению синтеза компонентов комплексов ФС в пользу ФС2, в то время как добавление в спектр освещения желтого света вызывает повышение синтеза в клетках *Spirulina* фикобилинового пигмента фикоцианина. Таким образом, выявленные адаптационные механизмы по сравнению с таковыми у высших растений имеют отличительные особенности, что связано с наличием в составе фотосинтетических мембран *Spirulina* наряду с хлорофиллом и каротиноидами фикоцианина, регуляция синтеза которого определяется в том числе и спектральным составом фотосинтетически активного света.

## Литература

1. Мартиросян Ю. Ц., Кособрюхов А. А., Креславский В. Д. и др. // С.-х. биология. 2008. № 3. С. 102–105.
2. Мельников С. С., Самович Т. В., Мананкина Е. Е. и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2011. № 3. С. 41–45.
3. Доманский В. П., Козел Н. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 3. С. 56–59.
4. Мельников С. С., Мананкина Е. Е., Будакова Е. А. и др. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей. Минск, 2011.
5. Suparon C., Kalyanee P., Peerada P. et al. // Stand. Genomic Sci. 2012. Vol. 6, N 1. P. 43–53.
6. Sasaki K., Marquez F., Nishio N. et al. // J. of Fermentation and Bioengineering. 1995. Vol. 79, N 5. P. 453–457.
7. Milenković S. V., Zvezdanović J. B., Andelković T. D. et al. // Advanced technologies. 2012. Vol. 1. P. 16–24.
8. Forni E., Ghezzi M., Polesello A. // Chromatography. 2012. Vol. 1. P. 120–124.
9. Olajire A. A., Ameen A. B., Abdul-Hammed M. et al. // J. Fuel. Chem. Technol. 2007. Vol. 35. P. 641–647.
10. Jansson S., Stefánsson H., Nyström U. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. Vol. 1320, N 3. P. 297–309.
11. Рубин А. Б. Биофизика. М., 2004. Т. 2.
12. Ладыгин В. Г. // Физиол. раст. 1998. Т. 45. С. 741–762.
13. Аверчева О. В., Бассарская Е. М., Жигалова Т. В. и др. // Физиол. раст. 2010. Т. 57. С. 404–414.
14. Вязов Е. В., Козел Н. В., Доманский В. П. и др. // Журн. прикл. спектроскопии. 2014. Т. 81, № 6. С. 929–934.
15. Pfannschmidt T., Nilson A., Allen J. F. // Nature. 1999. Vol. 397. P. 625–628.
16. Dietzel L., Brütigam K., Pfannschmidt T. // FEBS J. 2008. Vol. 275. P. 1080–1088.
17. Каранетян Н. В. // Биохимия. 2007. Т. 72. С. 1385–1395.
18. Biggins J., Bruce D. // Photosynthesis Res. 1989. Vol. 20, N 1. P. 1–34.

N. V. KOZEL, V. P. DOMANSKII, E. E. MANANKINA, K. O. ADAMCHYK, I. A. DREMUK, S. M. SAVINA

## THE INFLUENCE OF THE SPECTRAL COMPOSITION OF THE LED LIGHTING ON THE STRUCTURE OF THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF *SPIRULINA PLATENSIS*

### Summary

Hypersensitivity of *Spirulina platensis* to change of the spectral composition of LED lighting has been revealed. It is shown that the regulation of the synthesis of phycocyanin is determined by the spectral composition of photosynthetically active light.