

## ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ И СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ КАРОТИНОИДОВ ВОДОРОСЛИ *Cladophora rivularis*

© 2016 г. В.В. Шутова, Е.В. Тютяев, А.А. Чурин\*, В.Ю. Пономарев\*,  
Г.А. Белякова\*, Г.В. Максимов\*

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва,  
430005, Республика Мордовия, Саранск, ул. Большевикская, 68;

\*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

E-mail: gmaksimov@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.16 г.

После доработки 21.03.16 г.

С помощью спектроскопии комбинационного рассеяния и инфракрасной спектроскопии установлено, что при нормальном функционировании водоросли (увеличении рН с 8,0 до 9,0) возрастает содержание каротиноидов и меняется конформация молекулы: снижается вклад связей  $\text{C}=\text{C}$  полиеновой цепочки молекулы каротиноида (спектроскопия комбинационного рассеяния), а также метильных групп ( $\sim 2940 \text{ см}^{-1}$ ) и ароматических  $\text{C}-\text{H}$ -плоскостных деформационных колебаний (полоса  $1050 \text{ см}^{-1}$ ) молекул каротиноидов (инфракрасная спектроскопия). По мнению авторов, изменение экстраклеточного рН в норме не влияет на содержание хлорофиллов *a* и *b*, но увеличивает содержание и меняет либо конформацию, либо состав молекул каротиноидов.

*Ключевые слова:* водоросль, каротиноид, спектроскопия комбинационного рассеяния, инфракрасная спектроскопия.

Одним из важнейших компонентов фотосинтезирующего комплекса (фотосистема I и фотосистема II) эукариотических клеток являются пигменты – хлорофиллы и каротиноиды [1,2]. В клетках зеленых водорослей каротиноиды локализованы либо в мембране [3,4], либо входят в состав фотосистем [3], либо в виде пластоглобул или свободной форме в виде эфиров ксантофиллов и жирных кислот [5,6]. Молекулы каротиноидов содержат систему сопряженных  $\pi$ -связей (рис. 1), для которой характерна делокализация  $\pi$ -электронов, в результате чего связи становятся нецелочисленными [7].

Известно, что с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) каротиноидов можно охарактеризовать колебания некоторых ядер атомов углерода в цепи сопряженных связей молекулы [7]. В спектрах КР каротиноидов полоса  $1520 \text{ см}^{-1}$  обусловлена валентными колебаниями двойных  $\text{C}=\text{C}$ -связей молекулы, а сдвиг данной полосы в область высоких частот наблюдается при изменении конформации молекулы из *all-trans* в *cis*-состояние [8]. Полоса

КР-спектра  $1156 \text{ см}^{-1}$  обусловлена валентными колебаниями  $\text{C}-\text{C}$ -связей в сочетании с валентными колебаниями  $\text{C}=\text{C}$ -связей: одновременный сдвиг полос  $1520$  и  $1156 \text{ см}^{-1}$  в область меньших частот свидетельствует об удлинении конъюгированной цепи в молекуле. Помимо конъюгированных двойных связей в состав молекулы каротиноидов входят метиловые группы, которые вносят вклад в положение полос спектра КР [9]: полоса  $1188 \text{ см}^{-1}$  характеризует изменения положения метила при  $\text{C}16$  в *all-trans*-конфигурации, а полоса  $1004 \text{ см}^{-1}$  характеризует валентные колебания боковой метильной группы  $\text{C}-\text{CH}_3$  [10]. Отметим, что полоса  $960 \text{ см}^{-1}$  спектра КР характеризует внеплоскостные колебания  $\text{C}-\text{H}$  при  $\text{C}=\text{C}$ -связи полиеновой цепи, причем увеличение интенсивности данной полосы наблюдается при изменении плоской конфигурации молекулы, а при ассоциации пигмента с белком вероятность таких изменений становится больше и амплитуда полосы  $960 \text{ см}^{-1}$  увеличивается [8,11].

Увеличение экстраклеточного рН (от 8,0 до 9,0) является характерным проявлением оптимального функционального состояния водоросли. Регуляция рН в цитоплазме водоросли, ве-

Сокращения: КР – комбинационное рассеяние, ИК – инфракрасный.

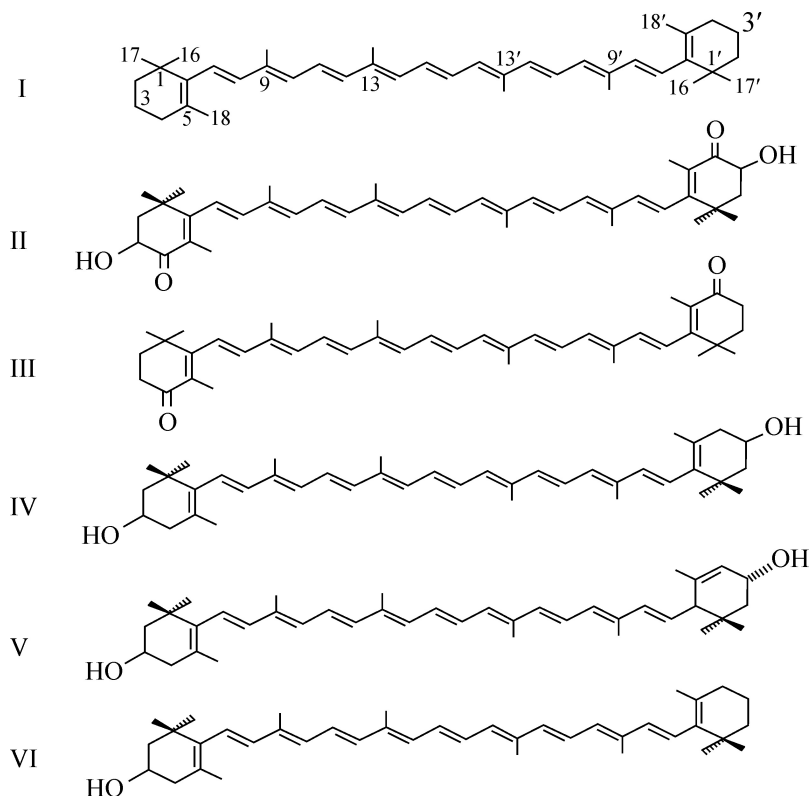


Рис. 1. Структурные формулы каротиноидов: I – бета-каротин, II – астаксантин, III – кантаксантин, IV – зеаксантин, V – лютеин, VI – бета-криптоксантин.

роятно, осуществляется как за счет связывания протонов, так и транспорта протонов из цитозоля в экстраклеточную среду или в вакуоль. Известно, что изменение экстраклеточного pH от 9,0 до 7,5 при культивировании клеток на свету вызывает изменения мембранного потенциала плазмалеммы и уменьшение pH в вакуолях. Вероятно, гомеостаз pH цитоплазмы может зависеть как от активации  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена, так и  $\text{H}^+$ -АТФазы плазмалеммы и хлоропласта [12–14].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании с помощью спектроскопии КР- и инфракрасной (ИК) спектроскопии изменения содержания и конформации каротиноидов хлоропластов при культивировании водоросли *Cladophora rivularis* при различных pH.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объектом исследования** служила десятидневная культура водоросли *Cladophora rivularis* (*Linnaeus*) *Hoek*, выращенная при температуре 25°C на среде Чу-10 следующего состава (г/л):  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  – 0,04;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,025;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,01;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 0,02;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  – 0,025;

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,0008 при pH среды 5,0, 7,0, 8,0 и 9,0.

**Флуоресценцию хлорофилла и КР каротиноидов** водорослей изучали с помощью конфокального Раман-дисперсионного спектрометра inVia фирмы Renishaw (Великобритания), на базе микроскопа Leica DM 2500M, оборудованного встроенной видеокамерой и ручным координатным столиком с минимальным шагом движения по осям X и Y – 100 нм. Использовали лазер с длиной волны 532 нм (максимальная мощность 100 мВт); система регистрации сигнала КРС и флуоресценции представляла собой CCD-детектор с Пельтье-охлаждением до –70°C, была использована дифракционная решетка 1800 штрихов/мм со спектральной шириной 1780  $\text{cm}^{-1}$  и разрешающей способностью 1,6  $\text{cm}^{-1}$ . Накопление сигнала производили в течение 10 с при мощности излучения лазера 5 мВт (для регистрации КР-спектров) и 1 с при мощности излучения лазера 0,25 мВт (для регистрации сигнала флуоресценции). Регистрацию и первичную обработку спектров КР и флуоресценции производили в программе WIRE, далее обработку полученных спектров вели с помощью пакета программ Origin 8.1.

**Регистрацию спектров флуоресценции хлорофилла** осуществляли с помощью спектрофлуориметра RF-5301PC (Shimadzu, Япония). В качестве источника излучения использовали ксеноновую лампу мощностью 150 Вт. Погрешность измерения по шкале длин волн составляла не более  $\pm 1,5$  нм. Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 410 нм (полоса Core). Концентрацию пигментов рассчитывали по спектрам поглощения хлорофиллов *a* и *b* (644 и 662 нм соответственно) и каротиноидов (440,5 нм) [15].

**Регистрацию ИК-спектров** объектов осуществляли с помощью ИК-спектрометра с Фурье-преобразователем фирмы IR-Prestige 21 (Shimadzu, Япония) в диапазоне от 400 до 4000  $\text{см}^{-1}$ . Образцы гомогенизировали и закатывали в таблетку с бромидом калия [16].

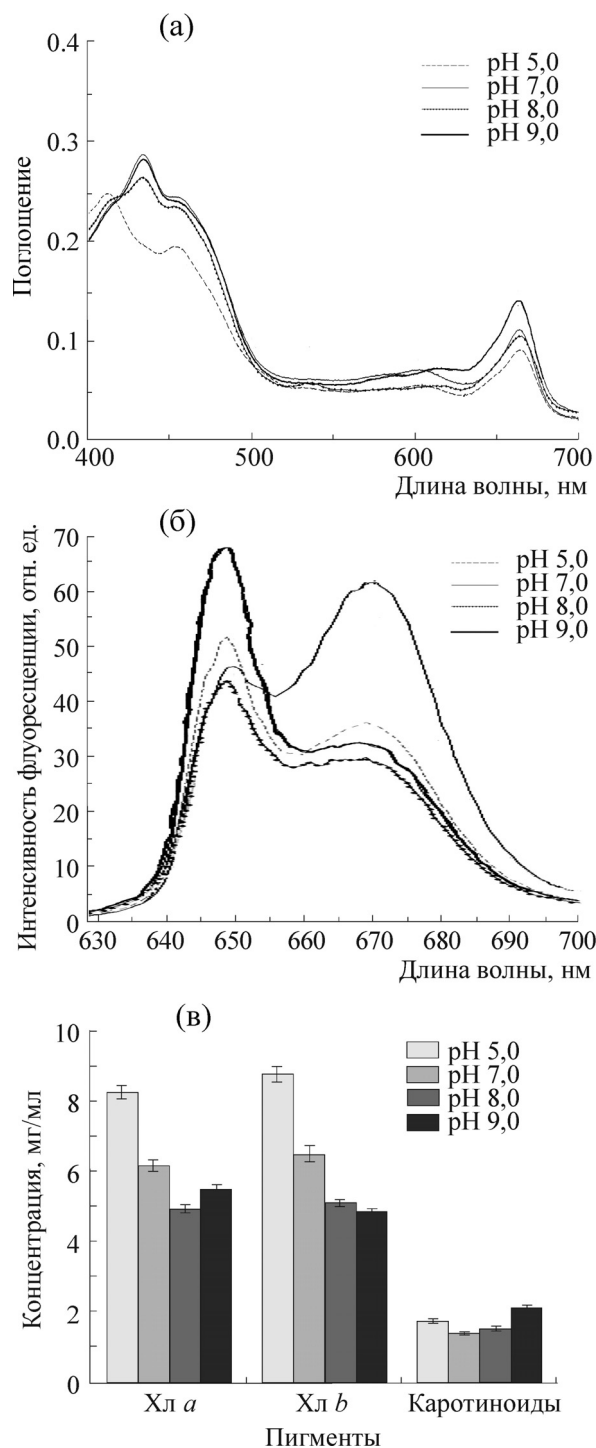
**Анализ данных** проводили с помощью программ Origin 8.0 (Origin Lab Corporation, США), и Microsoft Excel 2003.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения экспериментов было установлено, что величина поглощения света и флуоресценции хлорофилла водоросли *C. rivularis* зависит от величины pH среды культивирования (рис. 2). В спектрах поглощения наблюдаются характерные полосы каротиноидов (410–460 нм) и хлорофиллов *a* и *b* (640–660 нм). Установлено, что при культивировании в среде с pH 8,0 наблюдается максимальный рост водоросли, при этом pH среды еще больше смещается в щелочную сторону (8,5–8,7). Отметим, что при увеличении pH (от pH 5,0 до pH 8,0) в первую очередь снижается содержание хлорофилла *b*, затем хлорофилла *a* и в меньшей степени каротиноидов, содержание которых существенно возрастает при увеличении pH до 9,0 (рис. 2).

С помощью оптической микроскопии нами было зарегистрировано распределение флуоресценции хлорофилла в клетке кладофоры (рис. 3). Установлено, что распределение сигнала флуоресценции пигментов в клетке кладофоры гетерогенное, максимальная флуоресценция выявлена, как правило, по периметру клетки водоросли, что обусловлено пространственным распределением хлоропластов.

В следующей серии экспериментов с помощью КР- и ИК-спектроскопии исследовали изменения в содержании и конформации молекул каротиноидов водоросли *C. rivularis* при культивировании в средах с различным pH (рис. 4 и 5). В спектре КР водорослей *Cladophora* в области 900–1600  $\text{см}^{-1}$  обнаружены полосы, ха-



**Рис. 2.** Спектры поглощения (а), флуоресценции (б) и содержание пигментов (в) при различных значениях pH среды культивирования водоросли *C. rivularis*.

актерные для колебаний некоторых связей молекул каротиноидов (рис. 4). Для нормировки вклада отдельных связей молекулы каротиноида в спектр КР используют соотношения отдельных полос спектра, выбирая, как правило,

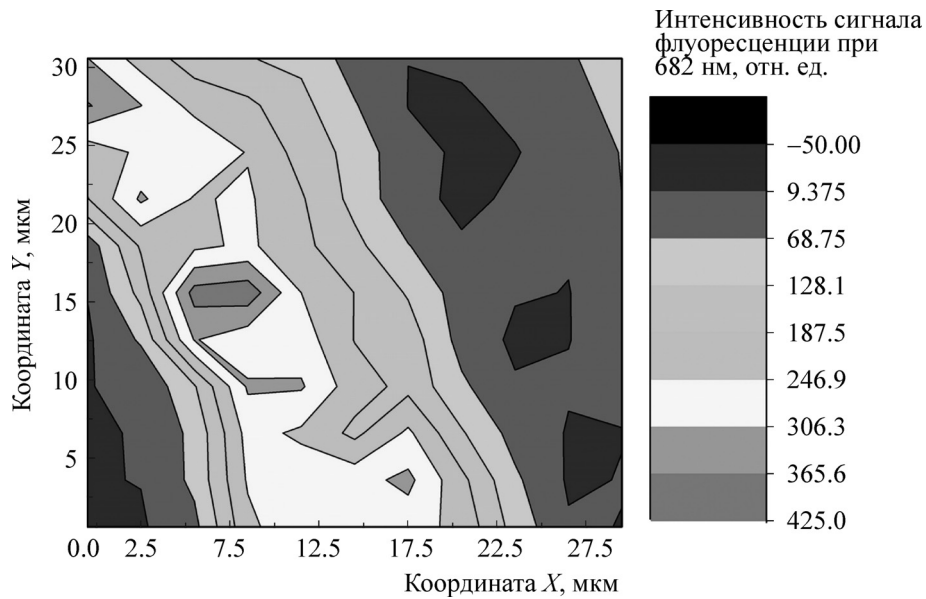


Рис. 3. Распределение величины интенсивности флуоресценции хлорофилла при 682 нм в клетке водоросли *C. rivularis*.

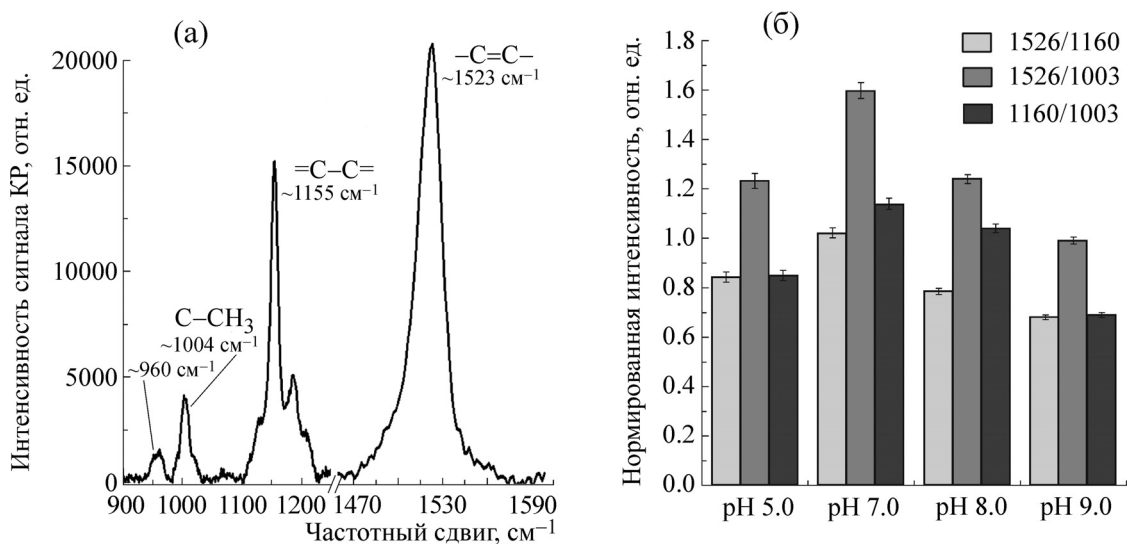


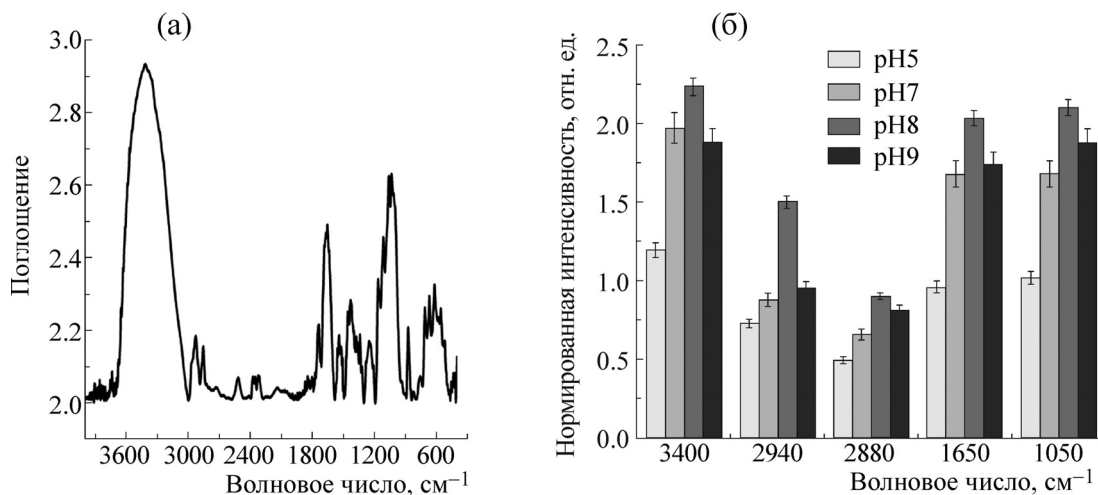
Рис. 4. Спектр комбинационного рассеяния (а) и изменения соотношений полос КР-спектра каротиноидов (б) при различных значениях pH среды культивирования водоросли *C. rivularis*.

постоянную по амплитуде полосу КР, изменения которой минимальны в данном процессе (внутримолекулярный маркер) [17].

Установлено, что в зависимости от pH среды культивирования водоросли меняется не только содержание, но и конформация каротиноидов (рис. 4): максимальный вклад полосы  $1526\text{ см}^{-1}$  наблюдается при pH 7,0 (исходя из соотношений амплитуды полос  $1526\text{ см}^{-1}/1160\text{ см}^{-1}$  и  $1526\text{ см}^{-1}/1003\text{ см}^{-1}$ ). Вероятно, при культивировании водоросли меняется либо состав каротиноидов, либо конформация моле-

кулы: возрастает вклад молекул каротиноидов, имеющих большее количество двойных  $\text{C}=\text{C}$ -связей [18], или микроокружение пигментов становится более плотным [17]. Максимальный вклад полосы  $1160\text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{C}$ -связей,  $1160\text{ см}^{-1}/1003\text{ см}^{-1}$ ) выявлен при нейтральных значениях pH и достоверно снижается при закислении или защелачивании среды.

Для сопоставления результатов двух методов исследовали изменения в ИК-спектрах (в диапазоне  $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$ ) образцов из водоросли в зависимости от pH. Установлено, что ИК-



**Рис. 5.** (а) – Характерный ИК-спектр (при pH 8,0); (б) – изменения амплитуды полос ИК-спектра при различных pH культивирования водоросли *C. rivularis*.

спектры водоросли характеризуются следующими максимумами: 3480; 2940; 1650; 1530, 1440, 1260, 1050, 660 см<sup>-1</sup> (рис. 5). Известно, что наличие полосы ИК-спектра в области 3480 см<sup>-1</sup> может свидетельствовать о наличии либо NH или OH, а также O–H-валентных колебаний (водородная связь –OH-группы). Обычно колебания в области частоты 2940 см<sup>-1</sup> рассматривают совместно с полосами поглощения в области 1650–1400 см<sup>-1</sup>, а также 1000–900 см<sup>-1</sup>, что свидетельствует о вкладе связи C=C в молекуле каротиноида. Вероятно, в данном случае нами обнаружены C–H-валентные колебания в метильных и метиленовых группах (обычно две четко выраженные полосы – ~2940 и ~2880 см<sup>-1</sup>; полосы 1651–1530 см<sup>-1</sup> характеризуют либо колебания связей полосы амид 1 и амид 2 (валентные колебания C=O в первичных, вторичных и третичных амидах – 1651 см<sup>-1</sup>, частоты деформационных колебаний NH и колебаний C–N во вторичных амидах – 1541 см<sup>-1</sup>)) для молекулы белков, пептидов и свободных аминокислот, либо O–H-групп кристаллической воды целлюлозы. Полоса 1050 см<sup>-1</sup> характеризует ароматические C–H-плоскостные деформационные колебания [19].

Полосы ИК-спектра водоросли могут соответствовать как колебаниям определенных связей в молекуле каротиноидов, так и изменениям состояния других молекул в клетке. Так, при увеличении pH среды культивирования водоросли с 7,0 до 9,0 амплитуда полосы ИК-спектра 3480 см<sup>-1</sup> увеличивается, что может свидетельствовать об увеличении вклада O–H-валентных колебаний каротиноида, либо об увеличении доли свободной воды в клетке. Действительно, при этом возрастает амплитуда полосы 1605–

1593 см<sup>-1</sup>, что, вероятно, свидетельствует об увеличении либо вклада колебания связей в амидных плоскостях полосы амидов, либо кристаллической воды в целлюлозной оболочке клетки.

Вероятно, при функционировании водоросли (увеличении pH с 8,0 до 9,0 при длительном культивировании) содержание каротиноидов увеличивается, а конформация меняется: снижается вклад C=C-связей полиеновой цепочки молекулы каротиноида: соотношение амплитуд полос 1526 см<sup>-1</sup>/1160 см<sup>-1</sup> и 1526 см<sup>-1</sup>/1003 см<sup>-1</sup> (КР-спектроскопия) и их метильных групп (~2940 см<sup>-1</sup>), а также вклад C–H плоскостных деформационных колебаний ароматических колец (полоса 1050 см<sup>-1</sup>) молекул каротиноидов (ИК-спектроскопия) (рис. 1 и 4).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. Yoshii, T. Hanyuda, I. Wakana, et al., Phycological Soc. of America **40**, 1170 (2004).
2. P. Jahns and A. R. Holzwarth, Biochim. Biophys. Acta **1817**, 182 (2012).
3. N. P. Kutuzov, A. R. Brazhe, G. V. Maksimov, et al., Biophys. J. **107** (4), 891 (2014).
4. P. Jahns, D. Latowski, and K. Strzalka, Biochim. Biophys. Acta **1787**, 3 (2009).
5. E. G. Maksimov, E. A. Shirshin, N. N. Sluchanko, et al., Biophys. J. **109** (3), 595 (2015).
6. S. Takaichiemail, Mar. Drugs **9** (6), 1101 (2011).
7. Koyama Y. and R. Fuji, in *Photochemistry of Carotenoids*, ed. by H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton and R. J. Cogdell (Kluwer Acad. Publ., 2004), pp. 161–188.

8. B. Robert, in *Photochemistry of Carotenoids*, ed. by H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton and R. J. Cogdell (Kluwer Acad. Publ., 2004), pp. 189–201.
9. W.-L. Liu, Zh.-G. Wang, Zh.-R. Zheng, et al., *J. Phys. Chem. A* **11**, 10580 (2008).
10. A. Andreeva, V. Apostolova, and M. Velitchkova, *Spectrochim. Acta, Part A: Biomolecular Spectroscopy* **78**, 1261 (2011).
11. W.I. Gruszecki, M. Gospodarek, W. Grudzinski, et al., *J. Phys. Chem. B* **113**, 2506 (2009).
12. B. Bethmann and G. Schönknecht, *New Phytologist* **183** (2), 327 (2009).
13. M. Denesh, V. K. Andrianov, A. A. Bulychev, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1325** (1), 63 (1997).
14. A. Katz, M. Bental, H. Degani, et al., **96** (1), 110 (1991).
15. А. Н. Журавская, И. В. Воронов и Е. Р. Поскачина, *Наука и образование*, № 4, 65 (2011).
16. С. N. Radenović, G. V. Maksimov, E. V. Tyutyayev, et al., in *Plant Physiology and Biochemistry* (Elsevier, Netherlands, 2014.), vol. 81, pp. 208–211.
17. Г. В. Максимов, Ч. Н. Раденович., Ю. Е. Борисова и др., *Биофизика* **41**, 400 (1996).
18. С. Пюоаia, М. Р. Johnson, С. D. P. Duffy, et al., *J. Biol. Chem.* **286** (1), 91 (2011).
19. А. Браун, Д. Флойд и М. Сейнсбери, *Спектроскопия органических веществ* (Мир, М., 1992).

## IR Spectroscopy and Raman Spectroscopy in the Study of Algae *Cladophora rivularis* Carotenoids

V.V. Shutova\*, E.V. Tyutyayev\*, A.A. Churin\*\*, V.Yu. Ponomarev\*\*,  
G.A. Belyakova\*\*, and G.V. Maksimov\*\*

\*Ogarev Mordovia National Research University, ul. Bolshevistskaya 68, Saransk, Republic of Mordovia, 430005 Russia

\*\*Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia

With the use of Raman spectroscopy and infrared spectroscopy it was found that during normal algae function (pH changes from 8.0 to 9.0) the content of carotenoids increases and molecules change their conformation: the contribution of  $-C=C-$  bonds of the polyene chain of carotenoid molecule (Raman spectroscopy) is reduced and the contribution of methyl groups ( $\sim 2940\text{ cm}^{-1}$ ) and aromatic C–H-plane deformation vibrations (band  $1050\text{ cm}^{-1}$ ) of carotenoid molecules (infrared spectroscopy) is lessened. It is the authors' opinion that the change in extracellular pH within the normal range has no influence on the content of chlorophyll *a* and *b*, but tend to increase the content and alter a conformation or structure of carotenoid molecules.

*Key words:* algae, carotenoid, Raman spectroscopy, infrared spectroscopy