

<https://doi.org/10.3176/biol.1968.4.03>

Э. ВЯРК, Х. КЭЭРБЕРГ, О. КЭЭРБЕРГ, Т. ПЯРНИК

ОБ ЭКСТРАГИРУЕМОСТИ ПРОДУКТОВ ФОТОСИНТЕЗА РАСТВОРАМИ ЭТАНОЛА

При кратковременном фотосинтезе в среде, содержащей $^{14}\text{CO}_2$, в зеленом листе образуется целый ряд меченых соединений, успех и результаты исследования которых зависят от применяемой методики экстрагирования. Способ экстрагирования и используемые при этом растворители должны обеспечивать полное выделение исследуемых соединений из растительного материала, а также их наименьшее разрушение. Одним из наиболее распространенных сольвентов является 80%-ный этанол, в котором растворяется значительная часть соединений, образовавшихся при фотосинтезе. Для более полного извлечения продуктов фотосинтеза, в частности фосфорных эфиров сахаров, растительный материал обрабатывают дополнительно 20- и 40%-ным этанолом. С этой же целью некоторые авторы (Школьник и др., 1963; Школьник и др., 1965) применяют (для экстрагирования) подкисленные растворы этанола. В каждом конкретном случае методика экстрагирования определяется задачей исследования. Однако практически выбор методики часто затрудняется тем, что литература содержит мало данных об относительной эффективности различных сольвентов. Поэтому в настоящей работе мы сравнивали экстрагируемость продуктов фотосинтеза в растворах этанола разных концентраций и рН. Исследовали также, зависит ли экстрагируемость продуктов от того, проводилась ли экстракция непосредственно после фиксации или через несколько часов. Целью работы была разработка методики экстрагирования, позволяющей определять в одном и том же материале содержание и радиоактивность следующих соединений: аминокислот, органических кислот (не летучих и устойчиво сохраняющихся в растворах этанола), фосфорных эфиров сахаров, сахаров и крахмала.

Материал и методика

В опытах были использованы 14-дневные растения фасоли, выращенные под люминесцентными лампами. Из первых после семядолей листьев вырезали диски диаметром 24 мм, которые экспонировались в среде с $^{14}\text{CO}_2$ на свету от прожекторной лампы мощностью 500 вт. Используемая экспозиционная установка описана ранее (Пярник, Кээрберг, 1966). Непосредственно после экспозиции каждый диск фиксировали кипячением в 80%-ном этаноле в течение 2 мин. Продукты фотосинтеза экстрагировали одним из способов, описанных ниже. Определенные количества каждого экстракта наносили на алюминиевые чашечки, высушивали и по радиоактивности полученных препаратов рассчитывали общую радиоактивность экстракта. Оставшийся

после экстрагирования нерастворимый материал высушивали, перетирали в ступке и измеряли его радиоактивность по методу, описанному О. Заленским и др. (1955).

Отдельные соединения, содержащиеся в экстрактах, разделяли при помощи двухмерной хроматографии на бумаге. Для этого экстракты высушивали под струей воздуха и осадок растворяли в 1 мл дистиллированной воды. Определенный объем (0,04 мл) полученного раствора наносили на лист хроматографической бумаги FN-11 (производство ГДР) размером 47×58 см и затем хроматографировали в нисходящем токе растворителя. Использовали следующие системы растворителей: в первом направлении этанол—аммиак—вода (80:4:16 по объему), во втором направлении *n*-бутанол—ледяная уксусная кислота—вода (37:9,5:25 по объему). Хроматографирование в обоих направлениях продолжалось 24 ч, температура 20—22° С. Положения радиоактивных пятен на хроматограммах определяли при помощи радиоавтографии. Для этого хроматограммы накладывали на рентгеновскую пленку РМ-1, где они выдерживались в течение 30 суток. По проявленной пленке устанавливали расположение радиоактивных пятен на хроматограммах, вырезали их и измеряли относительные радиоактивности при помощи широкооконого счетчика СБГ-10. Для идентификации отдельных меченых соединений их элюировали из бумаги и хроматографировали вторично вместе с аутентичными соединениями.

Результаты и обсуждение

Чтобы выяснить экстрагируемость отдельных продуктов фотосинтеза с разными растворителями, диски из листьев, экспонированные и фиксированные в одинаковых условиях, обрабатывали соответственно 80%-ным этанолом, 40%-ным этанолом и дистиллированной водой. Экстракцию с каждым растворителем проводили 3 раза. Оставшийся после этого растительный материал обрабатывали дополнительно подкисленным 96%-ным этанолом (рН доведена до 2,0 с 5 н. HCl). Каждая обработка продолжалась 15 мин, температура 86°, количество растворителя на один диск — 5 мл. Фиксирующий раствор во всех вариантах объединяли с первым (нейтральным) экстрактом.

Результаты радиохроматографического анализа отдельных экстрактов показывают, что с 80%-ным этанолом (табл. 1, I вариант) полностью экстрагируются сахара, аминокислоты, органические кислоты и некоторые неидентифицированные соединения. Частично извлекаются и фосфорные эфиры, основная часть которых выходит при последующей обработке материала подкисленным 96%-ным этанолом, 40%-ным этанолом (табл. 1, II вариант) извлекаются в качественном отношении те же соединения, что и 80%-ным. Однако общая радиоактивность экстракта 40%-ного этанола значительно превышает радиоактивность экстракта 80%-ного этанола. Эта разница обусловлена более хорошей экстрагируемостью фосфорных эфиров более разбавленными растворами этанола. В 80%-ном этаноле на фосфорные эфиры приходится 8,6, в 40%-ном этаноле — 25,5% общей радиоактивности материала. В связи с этим при последующем экстрагировании подкисленным 96%-ным этанолом из материала выделяется различное количество фосфорных эфиров: в I варианте оно составляет 28,5, во II варианте — 10,5% общей радиоактивности.

Соединения, экстрагируемые дистиллированной водой (III вариант), обладают наибольшей суммарной радиоактивностью — 80,9% общей радиоактивности материала. Радиоактивность экстракта, подкисленного 96%-ным этанолом, в этом варианте составляет всего лишь 2,3%.

Однако следует обратить внимание на то, что при экстрагировании дистиллированной водой происходят существенные изменения во фракции сахаров. По сравнению с I и II вариантами относительная радиоактивность глюкозы и фруктозы повышается здесь почти в 3 раза — веро-

Таблица 1

Относительная радиоактивность продуктов фотосинтетической ассимиляции $^{14}\text{CO}_2$, экстрагированных растворами этанола разных концентраций и pH (% от общей радиоактивности материала)

Соединения	I		II		III	
	80%-ный этанол	Подкисленный 96%-ный этанол	40%-ный этанол	Подкисленный 96%-ный этанол	Дистил. вода	Подкисленный 96%-ный этанол
Фосфорные эфиры	8,6	28,5	25,5	9,5	36,6	1,4
Сахара	16,8	—	21,8	—	21,8	—
из них:						
Сахароза	15,2	—	20,1	—	18,8	—
Мальтоза	0,9	—	0,9	—	0,9	—
Глюкоза, фруктоза	0,7	—	0,8	—	2,1	—
Аминокислоты	9,7	—	11,9	—	10,1	—
из них:						
Аланин	5,9	—	6,9	—	6,1	—
Серин, глицин	3,3	—	4,5	—	3,5	—
Аспарагиновая	0,3	—	0,3	—	0,3	—
Глутаминовая	0,2	—	0,2	—	0,2	—
Органические кислоты	5,2	—	4,0	—	8,4	—
из них:						
Яблочная	0,2	—	0,1	—	0,3	—
Гликолевая	0,1	—	0,1	—	0,3	—
Глицериновая	4,9	—	3,8	—	7,8	—
Идентифицированные соединения	3,0	3,8	3,9	1,0	4,0	0,9
Всего экстрактов	43,3	32,3	67,1	10,5	80,9	2,3

Условия при экспозиции: продолжительность 3 мин, интенсивность радиации $2,1 \cdot 10^{-2}$ ат/см², концентрация CO_2 — 0,03%, температура — 20°, количество дисков в одном варианте — 5.

ятию, за счет моносахаридов, освобождаемых при частичном разложении полисахаридов и фосфорных эфиров сахаров.

При использованных нами хроматографических растворителях отдельные фосфорные эфиры не отделялись друг от друга и образовывали на хроматограммах одну меченую зону. Поэтому в вышеизложенном опыте (табл. 1) определена только суммарная радиоактивность зоны фосфорных эфиров. Для изучения экстрагируемости отдельных компонентов этой зоны, фосфорные эфиры были дефосфорилированы. С этой целью зоны фосфорных эфиров, вырезанные из хроматограмм экстрактов 80%-ного и подкисленного 96%-ного этанола, инкубировали в растворе кислой фосфатазы (с добавлением толуола) в течение 48 ч при 38°. Дефосфорилированные соединения элюировали из бумаги дистиллированной водой и разделяли хроматографически при помощи тех же растворителей, которые применялись при анализе растительных экстрактов. Попытки элюировать фосфорные эфиры до обработки фосфатазой не дали результата, так как в процессе хроматографирования они прочно адсорбируются к бумаге и, вследствие этого, дистиллированной водой извлекаются лишь частично (Wilson, Calvin, 1955). Для идентификации соединений, образовавшихся при дефосфорилировании фосфорных эфиров, использовали стандартные растворы сахаров и органических кислот, которые наносили на хроматограмму вместе с исследуемым раствором. Хроматограммы проявляли на сахара и органические кислоты соответственно с парааминофенолом и бромкрезол зеленым.

Таблица 2

Экстрагируемость фосфорных эфиров 80%-ным и подкисленным 96%-ным этанолом (% от радиоактивности данного соединения)

Соединения	80%-ный этанол	Подкисленный 96%-ный этанол
Глюкозо-фосфаты	54	46
Фруктозо-фосфаты	64	36
Пентозо-фосфаты	66	34
Фосфорглицериновая кислота	6	94
Неидентифицированные соединения	52	48
Всего:	44	56

Условия при экспозиции: продолжительность 3 мин, интенсивность радиации $3,0 \cdot 10^{-2}$ вт/см², концентрация CO₂—0,045%, температура — 25°, количество дисков в одном варианте — 6.

этанолом извлекалось 44% и подкисленным 96%-ным этанолом 56% общей радиоактивности фракции фосфорных эфиров.

На основе полученных результатов можно сказать, что аминокислоты, органические кислоты и сахара хорошо экстрагируются 80- и 40%-ным этанолом и применение подкисленного 96%-ного этанола необходимо только для экстрагирования более прочно связанных фосфорных эфиров. Причиной неполного выделения последних 80%-ным этанолом считают образование комплексов фосфорных эфиров с кальцием, содержащимся в исследуемой ткани (Cole, Ross, 1966). При использовании подкисленного этанола этот комплекс разлагается и фосфорные эфиры полностью выходят из ткани. Исследования показали также, что подкисленный этанол окончательно инактивирует фосфатазы (Cole, Ross, 1966). Поэтому для экстрагирования фосфорных эфиров часто предпочитают подкисленный этанол. Обработка материала с подкисленным этанолом применяется также при исследовании фотосинтетического образования крахмала в среде с ¹⁴CO₂ (Porter и др., 1959). При этом критерием синтеза крахмала часто служит радиоактивность глюкозы, полученной при его гидролизе.

Если фосфорные эфиры предварительно не удалены из материала, то при жесткой обработке, требуемой для гидролиза крахмала, глюкозо-фосфаты могут разлагаться и дать глюкозу. Радиоактивность этой глюкозы прибавляется к радиоактивности глюкозы, полученной при гидролизе крахмала, и вследствие этого результаты будут завышены. Эта ошибка может быть довольно значительной, поскольку фосфорные эфиры обладают высокой удельной радиоактивностью.

Однако, если в одном и том же материале определяют содержание фосфорных эфиров и дисахаридов, то нельзя применять для экстрагирования только подкисленные растворители, поскольку дисахариды разлагаются уже в слабокислой среде. В таком случае необходимо сначала экстрагировать сахара 80%-ным этанолом и затем обрабатывать материал подкисленным 96%-ным этанолом.

Больше всего меченых соединений выделяется из материала при обработке дистиллированной водой (табл. 1). Применение горячей ди-

Результаты опыта, представленные в табл. 2, показывают, что с 80%-ным этанолом относительно плохо экстрагируется фосфорглицериновая кислота — только 6% ее общей радиоактивности. Экстрагируемость остальных фосфорных эфиров с 80%-ным этанолом составляет 50—70%. Соответственно, с подкисленным 96%-ным этанолом выделяется большинство фосфорглицериновой кислоты (94%) и та часть других фосфорных эфиров, которая осталась в материале после экстрагирования 80%-ным этанолом. Всего в данном опыте 80%-ным

стиллированной воды для экстрагирования фосфорных эфиров, аминокислот и органических кислот вполне целесообразно. Однако оно не пригодно при исследовании сахаров, поскольку в горячей дистиллированной воде растворяются крахмал и некоторые фруктозаны. В ходе анализа (например, при сгущении водяных экстрактов, требующем их длительного выдерживания) эти полисахариды, а также фосфорные эфиры могут частично разлагаться, что приводит к искаженным результатам в отношении моносахаридов. Кроме того, экстрагирование водой лишает возможности в дальнейшем определить крахмал в том же материале. Приведенные выше обстоятельства следует учитывать также в тех случаях, когда для экстрагирования применяются растворы этанола низких концентраций. По данным К. Нишида (Nishida, 1962), крахмал частично растворяется уже в 20%-ном этаноле.

Во всех опытах, приведенных выше, обработку каждого диска листа проводили отдельно, непосредственно после экспозиции в атмосфере с $^{14}\text{CO}_2$ и фиксации в 80%-ном этаноле. Однако в опытах с большим количеством повторностей это довольно трудоемко. Поэтому мы проверили, нельзя ли сохранять диски после фиксации до конца опыта в холодном 80%-ном этаноле и затем экстрагировать меченые соединения из всех дисков одного варианта вместе. Для первых повторностей время выдерживания в этом опыте составляло не менее 3 ч. В контрольном варианте каждый диск обрабатывали сразу после фиксации. В обоих вариантах экстракцию проводили сначала 80%-ным этанолом и затем подкисленным 96%-ным. Полученные результаты приведены в табл. 3.

В большинстве соединений, выделенных в опытном и контрольном вариантах, существенных различий не наблюдалось. Исключение составляют лишь соединения, неподвижные в использованных системах растворителей и оставшиеся в стартовом пятне, относительная радиоактивность которых при выдерживании значительно увеличивается. Возможно, что эти соединения принадлежат к липопротеидным или полисахаридным веществам, которые при выдерживании растворяются и выделяются в этаноловый экстракт.

Таблица 3

Влияние выдерживания фиксированного материала на относительную радиоактивность продуктов фотосинтеза (в процентах от общей радиоактивности материала)

Соединения	Контроль	Опыт
Фосфорные эфиры	60,2	54,5
Сахара	13,2	15,4
из них:		
Сахароза	10,4	12,6
Мальтоза	2,4	2,4
Глюкоза	0,4	0,4
Аминокислоты	7,7	9,0
из них:		
Аланин	3,9	4,3
Серин + Глицин	3,4	3,9
Аспарагиновая	0,4	0,8
Органические кислоты	4,4	5,4
из них:		
Яблочная	0,9	2,0
Гликолевая	0,1	0,2
Глицериновая	3,4	3,2
Стартовое пятно	2,9	10,4
Всего в экстракте	88,4	94,7

Условия при экспозиции: продолжительность 1 мин, интенсивность радиации $2,8 \cdot 10^{-2}$ вт/см², концентрация CO_2 — 0,03%, температура — 26°, количество дисков в одном варианте — 5.

Чтобы проверить, нет ли среди этих веществ крахмала, стартовое пятно элюировали горячей дистиллированной водой и гидролизовали 2н. серной кислоты при 105° в течение 16 ч. Гидролизат нейтрализовали с ВаСО₃ (по конго красному). Нейтрализованный раствор центрифугировали, фильтровали и хроматографировали в восходящем токе растворителя и-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5 по объему). Пятно глюкозы вырезали и подсчитали его радиоактивность. Поскольку оно оказалось нерадиоактивным, то, следовательно, стартовое пятно не содержало полисахаридов типа крахмала.

Длительное выдерживание растительной ткани в среде, содержащей воду, не желательно при исследовании фосфорных эфиров, поскольку, по данным некоторых авторов (Cole, Ross, 1966), фосфатазы частично сохраняют свою активность при фиксации в 80%-ном этаноле. Это может привести к разложению фосфорных эфиров во время последующего выдерживания ткани в холодном этаноле. Относительно длительное (15 мин) экстрагирование горячим этанолом непосредственно после фиксации окончательно инактивирует ферменты и тем самым предотвращает разложение лабильных соединений и выделение из исследуемого материала соединений, остающихся в стартовом пятне.

Таким образом, для определения в одном и том же материале фосфорных эфиров, аминокислот, органических кислот, сахаров и крахмала можно предложить следующую схему экстрагирования. Непосредственно после фиксации 80%-ным этанолом растительный материал обрабатывают сначала 80%-ным и затем подкисленным (рН 2,0) 96%-ным этанолом. Нейтральные и подкисленные экстракты высушивают отдельно (до полного удаления кислоты) и остатки растворяют в дистиллированной воде. Полученные растворы сливают вместе и применяют для хроматографического анализа фосфорных эфиров, аминокислот, органических кислот и сахаров. В оставшемся после такой обработки материале можно определять крахмал путем кислотного (Bailey, 1958) или ферментативного (Оголевец, 1966) гидролиза.

ЛИТЕРАТУРА

- Заленский О. В., Семихатова О. А., Вознесенский В. Л., 1955. Методы применения радиоактивного углерода С¹⁴ для изучения фотосинтеза. М.—Л., Изд. АН СССР.
- Оголевец И. В., 1966. Об активности ферментов при отрицательных температурах. Физиол. растений **13** (5) : 871—875.
- Пярник Т., Кээрберг О., 1966. Усовершенствованная камера для кратковременных экспозиций листьев в атмосфере радиоактивного углекислого газа. Изв. АН ЭССР, Сер. биол. **15** (1) : 32—37.
- Школьник П. Я., Абдурахманова З. Н., Доман Н. Г., 1963. О методах выделения ранних продуктов фотосинтеза. Докл. АН ТаджССР **6** (5) : 40—45.
- Школьник П. Я., Доман Н. Г., Спёкторов К. С., Линькова Е. А., 1965. Нерастворимые продукты фотосинтеза синхронной культуры *Chlorella pyrenoidosa* на разных стадиях ее развития. Физиол. растений **12** : 1005—1011.
- Bailey R. W., 1958. Carbohydrates in pasture species. J. Sci. Food Agric. **9** : 743—747.
- Cole C. V., Ross C., 1966. Extraction, separation and quantitative estimation of soluble nucleotides and sugar phosphates in plant tissues. Analyt. Biochem. **17** : 526—539.
- Nishida K., 1962. Effects of internal and external factors on photosynthetic ¹⁴CO₂ fixation in general and on formation of ¹⁴C maltose in Acer leaf in particular. Physiol. Plant. **15** : 47—58.
- Porter H. K., Martin R. V., Bird J. F., 1959. Synthesis and dissolution of starch labelled with ¹⁴carbon in tobacco leaf tissue. J. Exptl Bot. **10** : 264—276.
- Wilson A. J., Calvin M., 1955. The photosynthetic cycle. CO₂ dependent transients. J. Amer. Chem. Soc. **77** : 5948—5957.

E. VÄRK, H. KEERBERG, O. KEERBERG, T. PÄRNİK

FOTOSÜNTEESI PRODUKTIDE EKSTRAHEERIMISEST ETANOOLI LAHUSTEGA

Resüme

Võrreldi turgioalehtedes fotosünteesil moodustunud ühendite ekstraheeritavust etanooli 80- ja 40%⁰-lise vesilahusega, destilleeritud veega ning soolhappega hapustatud 96%⁰-lise etanooliga (pH 2,0). Töö eesmärgiks oli välja töötada ekstraheerimismetoodika, mis võimaldaks ühes ja samas materjalis määrata aminohapete, orgaaniliste hapete, suhkrute fosforestreite, suhkrute ja tärglisesisaldust ning radioaktiivsust.

80- ja 40%⁰-lise etanooliga ekstraheerusid uuritavast materjalist täielikult suhkrud, aminohapped, orgaanilised happed ja mõned identifitseerimata ühendid. Suhkrute fosforestrid eraldusid osaliselt. Destilleeritud veega ja hapustatud 96%⁰-lise etanooliga ekstraheerusid fosforestrid täielikult. Destilleeritud vett ja madala kontsentratsiooniga etanoolilahust ei ole aga sobiv kasutada esimese ekstraheerimise solvendiks, sest see välistab võimaluse samas materjalis määrata tärglist. Esimeseks ekstraheerimissolvendiks ei ole kohane ka hapustatud etanool, sest happelises keskkonnas disahhariidid lagunevad.

Saadud tulemuste põhjal jäädi peatuma järgmisel ekstraheerimisskeemil: kohe pärast uuritava materjali fikseerimist 80%⁰-lise etanooliga ekstraheeritakse fotosünteesiproduktid kuuma 80%⁰-lise etanooliga. Sellele järgneb ekstraheerimine hapustatud 96%⁰-lise etanooliga. Neutraalne ja hapustatud etanooliekstrakt aurutatakse eraldi kuivaks, kuni happe jäägid on viimasest täielikult eraldunud, ning jäägid lahustatakse destilleeritud vees. Saadud lahused valatakse kokku ja kasutatakse fosforestreite, aminohapete, orgaaniliste hapete ja suhkrute kromatograafiliseks analüüsiks. Ekstraheerimisest järelejäänud taimses materjalis määratakse tärglist.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia InstituutSaabus toimetusse
28. VIII 1967

E. VÄRK, H. KEERBERG, O. KEERBERG, T. PÄRNİK

ON THE EXTRACTION OF THE PRODUCTS OF PHOTOSYNTHESIS BY ETHANOL OF DIFFERENT CONCENTRATIONS

Summary

The solubility of the products of photosynthesis in kidney bean leaves in 80-per cent ethanol, distilled water and 96-per cent acidified ethanol (pH 2.0) was studied. Our aim was to work out an extraction method which would enable the determination of the content and radioactivity of amino acids, organic acids, sugar phosphates, sugars and starch in the same material.

Sugars, amino acids, organic acids and some unidentified compounds were completely extracted from the material by 80-per cent and 40-per cent ethanol. Sugar phosphates were extracted by these solvents partly, but their complete extraction was achieved by distilled water and 96-per cent acidified ethanol. Distilled water and ethanol of low concentration could not be used as the first solvents because they made the ensuing determination of starch in this material impossible.

The results of our experiments led us to the following extraction scheme. After killing the leaves by boiling in 80-per cent ethanol, the products of photosynthesis were extracted by 80-per cent ethanol followed by the extraction in acidified 96-per cent ethanol. The extracts of neutral 80-per cent ethanol and acidified 96-per cent ethanol were evaporated separately (until the traces of the acid were removed). The residues were dissolved in distilled water. The solutions obtained in this way were poured together and used for the estimation of sugar phosphates, amino acids, organic acids and sugars by paper chromatography.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental BiologyReceived
Aug. 28, 1967