

МЕТОДИКА

METHODS

УДК 581.133.5

О КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ЭКСТРАКЦИИ НАТИВНЫХ ЛИПИДОВ
ИЗ КЛЕТОК ХЛОРЕЛЛЫ

Г. Л. КЛЯЧКО-ГУРВИЧ, В. Е. СЕМЕНЕНКО

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Академии наук СССР, Москва

При экстракции липидов стандартными методами из гомогената клеток, разрушенных в водной среде, наблюдали низкий выход липидов и изменение их жирнокислотного состава.

Разработан быстрый микрометод экстракции нативных липидов из клеток хлореллы. Принцип метода состоит в том, что клетки без предварительной фиксации разрушают с помощью стеклянных бус в дезинтеграторе в системе изопропанол — хлороформом (1:1) и теми же растворителями экстрагируют липиды. Промывка водой для удаления нелипидных примесей исключена. Количество липидов определяется по содержанию суммарных жирных кислот методом газо-жидкостной хроматографии с внутренним стандартом. Метод обеспечивает полноту экстракции 99% и достаточную нативность материала (содержание свободных жирных кислот 2—3%). Длительность экстракции около двух часов. Количество биомассы для экстракции в расчете на сухое вещество — 3—200 мг. Относительная квадратичная ошибка определения 1,9%.

Для изучения липидов хлореллы в физиологических опытах необходимо располагать методом быстрого количественного извлечения нативных липидов из малых навесок биомассы. В целом первичная процедура экстракции липидов из биологических объектов разработана еще недостаточно. Правда, принцип извлечения липидов бинарной смесью растворителей различной полярности, предложенный в 1957 г. Фолчем [1], значительно увеличил возможности экстракции полярных липидов по сравнению с ранее существовавшими методами. Введение воды в экстрагирующую смесь также способствовало более полному извлечению липидов [1]. Тем не менее общепринятые модификации метода Фолча [1—5] не обеспечивают полной экстракции липидов [4, 5]. В то же время при использовании полярных растворителей наряду с липидами извлекается ряд других соединений, отделение которых представляет большие трудности. В большинстве случаев их переводят в водную фазу, добавляя к полученному экстракту воду и хлороформ, так чтобы образовалась двухфазная система [1, 2]. Этот прием рекомендуется и в современных руководствах, хотя признается, что он приводит к потере части липидов, особенно полярных [3—5]. В настоящее время разработан метод исчерпывающей экстракции липидов растворителями различной полярности [6, 7]. Применение прибора, в котором осуществляется непрерывное перемешивание и полуавтоматическая смена растворителей, а также дополнительная экстракция растворителями, содержащими минеральные кислоты, позволило добиться выхода

99,95% липидов, судя по данным определения жирных кислот в остатке методом омыления с внесением внутреннего стандарта [6, 7]. Авторы отказались также от промывания экстракта липидов водой [6, 7]. Еще одно условие полного извлечения липидов — предварительное дезинтегрирование клеток [3, 4, 6]. Способ разрушения в большей степени определяется особенностями растительного материала и при экстракции липидов из клеток хлореллы представляет сложную задачу. При разрушении сухой биомассы липиды частично теряются на рабочих поверхностях дезинтегрирующего прибора. Для полного и количественного разрушения клеток водорослей лучшие результаты дает применение дезинтегратора со стеклянными бусами [8]. Однако попытки экстрагировать липиды стандартными методами из клеток хлореллы, обработанных таким образом, закончились неудачей, так как наблюдался очень низкий выход липидов и изменение их жирнокислотного состава. Очень низкий выход липидов в сходных условиях был получен также в работе Ивановой и Попова [9], а изменение жирнокислотного состава согласуется с данными других авторов о нарушении нативности липидов в водной среде [6, 10, 11].

Разрабатывая метод экстракции липидов, мы принимали во внимание перечисленные трудности, а также пути их преодоления другими авторами. В результате предлагается метод экстракции липидов смесью органических растворителей различной полярности, основанный на количественном разрушении клеток в тех же растворителях с помощью дезинтегратора со стеклянными бусами. Количество липидов в экстракте определяется как содержание суммы их жирных кислот методом газожидкостной хроматографии. Метод используется в нашей лаборатории в течение нескольких лет. Краткое описание его было дано ранее [12].

МЕТОДИКА

Реактивы. Метанол (хч), изопропанол (ч), ацетон (ос. ч), хлороформ (м), бензол (ос. ч) и гептан (эталон) непосредственно перед употреблением перегоняли. Гептадеценую кислоту выделяли из «сырого жира» дрожжей и превращали в метиловый эфир по методу, описанному ранее [13, 14]. В качестве инертного газа использовали азот (ос. ч). Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках с силикагелем (Woelm TLC без связующего материала, Woelm, Eschwege, West german). При газожидкостной хроматографии фазой служил полиэтиленгликольадипат (Реахим). Для разрушения клеток применяли стеклянные бусы диаметром 0,3—0,5 мм.

Растительный материал. Водоросли (штаммы *Chl. rupeoidosa* 82 и *Chl. sp. K*) выращивали на минеральной среде Тамия при постоянном освещении и барботировании воздухом, содержащим 1,5% CO₂ [15]. Суспензию клеток центрифугировали и промывали кипяченой водопроводной водой или фосфатным буфером 0,67 М, рН 4,4 или 7,4. Осадок использовали для экстракции липидов и для определения сухой массы в единице объема суспензии [15]. Часть материала высушивали в вакууме на холоду.

Разрушение клеток и экстракция липидов. Осадок клеток суспендировали в смеси органических растворителей (см. ниже) или в фосфатном буфере и дезинтегрировали с помощью стеклянных бус в приборе, конструкция которого была разработана ранее [8]. Разрушение проводили в той же пробирке, что и центрифугирование суспензии клеток. Размеры пробирки и петли дезинтегратора, а также количество реактивов изменяли в зависимости от величины навески [8] (табл. 1).

Для разрушения клеток в органических растворителях к осадку клеток после центрифугирования добавляли сначала бусы, а затем

Таблица 1

Условия разрушения клеток и экстракции липидов в зависимости от величины навески

Навеска, мг	Диаметр пробирки, мм	Диаметр петли, мм	Объем растворителя, мл	Насыпной объем бус, мл	Диаметр фильтра, мм
3—10	22	13	3	2	20
50—200	40	19	20	20	30

смесь изопропанола и хлороформа (1:1, *v/v*) с 0,001% ионола; в некоторых опытах изопропанол заменяли метанолом. Содержимое пробирки перемешивали, чтобы на дне не оставалось осадка клеток, и оставляли в холодильнике на 15 мин. Пробирку закрывали тефлоновой крышкой, помещали в гнездо дезинтегратора и разрушали клетки в течение 15 мин при 6,5—7,0 тыс. об/мин. [8]; в отдельных опытах разрушение проводили в атмосфере азота. После разрушения гомогенат с бусами фильтровали через установленный в химической воронке стеклянный патрон с дном из шифона, закрепленного тефлоновым кольцом. Обломки клеток, прошедшие в фильтрат, осаждали последующим центрифугированием, а надосадочную жидкость сохраняли. Бусы на фильтре и осадок клеток в центрифужной пробирке 2—3 раза промывали органическими растворителями с центрифугированием до их обесцвечивания. Фракции надосадочной жидкости объединяли, растворители отгоняли в вакууме, остаток количественно переносили бензолом в градуированную пробирку и хранили при (—3)—(—5°) до анализа.

Клетки, суспендированные в фосфатном буфере, разрушали таким же образом, а затем из бесклеточного водного гомогената стандартными методами экстрагировали липиды [1, 2, 16]. Из биомассы, высушенной в вакууме на холоду, липиды выделяли по методу, разработанному ранее [17].

Определение массы липидов. К аликвотному количеству раствора липидов добавляли в качестве внутреннего стандарта гептадеценовую кислоту [6, 7], так чтобы соотношение проба/стандарт было 12—20 (число жирных кислот в липидах $n=9$), и смесь подвергали метанолу. Количественный состав и массу метиловых эфиров жирных кислот определяли на газовом хроматографе ХРОМ-4 (Чехословакия). Калибровку прибора по соотношению веса пробы и стандарта [18] не проводили.

Определение полноты извлечения липидов из клеток. Для оценки количества липидов, которые не удалось извлечь, осадок обломков клеток после экстракции липидов омыляли в присутствии того же стандарта, что и при определении количества экстрагированных липидов, и тем же способом определяли массу жирных кислот; рассчитывали их содержание в процентах от суммы кислот [6, 7]. Критерием полноты экстракции служило также обесцвечивание растительного материала.

Определение нативности липидов в экстракте. Критерием нативности липидов было низкое содержание свободных жирных кислот в экстракте. Экстракт липидов хроматографировали на пластинках с силикагелем в системе гексан—эфир—уксусная кислота (2:4:0,05%) [19]. Содержание свободных жирных кислот оценивали полуколичественно путем сравнения интенсивности окраски их пятен на хроматограмме, обработанной парами иода, с окраской пятен линолевой кислоты различной концентрации, нанесенных в качестве стандарта на ту же хроматограмму [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе испытывали различные варианты экстракции липидов из клеток хлореллы: 1) разрушение клеток и экстракция липидов по методу, разработанному ранее [17]; 2) экстракция липидов одновременно с разрушением клеток в органических растворителях (смесь изопропанол—хлороформ—2А или метанол—хлороформ—2Б); 3) разрушение клеток в фосфатном буфере с последующей экстракцией смесью метанол—хлороформ [1, 2]; 4) разрушение клеток в фосфатном буфере с последующей экстракцией смесью изопропанол—гептан [16].

В табл. 2 приведены данные по количественному содержанию липидов в клетках хлореллы при определении перечисленными методами. В вар. 1 и 2 получены практически одинаковые результаты. При

Таблица 2
Содержание липидов (% от абс.-сухой массы клеток)
в экстрактах из клеток хлореллы в зависимости от метода
экстракции

Вариант	Chl. sp K		Chl. pyrenoidosa 82		
	I*	II	III	IV	V
1	9,4	—	—	9,1	23,5
2А	9,7	9,6	—	—	—
2Б	—	9,6	9,4	—	—
3	—	—	7,0	6,7	—
4	—	—	3,7	3,8	22,3

* I—V — серия опытов; приведены средние арифметические данные из 2—4 опытов в каждой серии. В серии V — данные по экстракции липидов из клеток, выращенных на среде без азота. Описание различий между вариантами дано в тексте.

этом в вар. 2 было установлено, что количество жирных кислот, не экстрагированных из клеток [6, 7], составляет 0,2—0,7% от их исходного содержания, т. е. в расчете на жирные кислоты экстрагируется больше 99% липидов. В вар. 3 и особенно 4 были получены заниженные значения содержания липидов. Однако в клетках, выращенных при недостатке азота и накопивших запасные липиды, даже в вар. 4 извлекается больше 90% липидов.

В экстракте липидов, полученных в вар. 2, свободные жирные кислоты составляли 2—3% от суммы связанных жирных кислот, что свидетельствует об удовлетворительной степени нативности липидов, хотя данная величина превышает значение, полученное для семян сои [6]. Однако не исключено, что в семенах сои истинное содержание свободных жирных кислот ниже, чем в клетках хлореллы [11]. В остальных вариантах степень нативности не определяли, но в вар. 1 экстракцию проводили с нагреванием, что может нарушить нативность липидов.

По жирнокислотному составу липиды вар. 2 (табл. 3) практически не отличаются от вар. 1 [17], в котором жирные кислоты экстрагировали из фиксированного материала. В вар. 4 (табл. 3) жирнокислотный состав характеризуется пониженным содержанием полиненасыщенных кислот, что может быть связано с их окислительным разрушением. В вар. 3 у штамма *Chl. pyrenoidosa* 82 также наблюдалось уменьшение количества полиненасыщенных кислот. В то же время липиды *Chl. sp. K* в вар. 3 сравнительно мало отличаются по жирнокислотному составу от вар. 2. У этого штамма липиды, экстрагированные разными методами (вар. 3 и 4) из одного и того же водного гомогената, различаются по жирнокислотному составу; следовательно, отмеченные выше изменения происходят не при разрушении клеток, а в ходе последующей экстракции (табл. 3).

Данные табл. 2 и 3 показывают, что применимость различных методов экстракции в большой степени зависит от природы биологического материала. Однако в вар. 2 при экстракции из клеток разных штаммов и разного физиологического состояния в течение ряда лет получали удовлетворительные результаты, и поэтому данный вариант был принят как рабочий метод.

В основу разработанного метода положен общепринятый принцип экстракции липидов бинарной смесью растворителей в присутствии следов воды и антиоксиданта [1—7, 9]. При этом клетки разрушали в

Таблица 3

Жирнокислотный состав липидов в зависимости от методов их экстракции

Вариант	Жирные кислоты *, вес. %								
	16:0	16:1	16:1 ^a	16:2	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3
Chl. sp K; 310—550 млн. клеток/мл **									
2А	21,0 _a	8,7 _a	1,2 _a	17,7 _a	3,7 _a	0,5 _a	6,7 _a	33,6 _a	6,7 _a
2Б	22,0	7,7	1,1	18,6	3,7	0,3	7,3	32,8	6,5
3	23,2 _a	8,9 _a	1,7 _b	17,7 _a	3,4 _a	1,0 _b	4,7 _b	33,5 _a	6,8 _a
4	20,9 _a	9,3 _b	1,0 _a	18,6 _a	1,7 _b	6,5 _b	10,6 _b	26,2 _b	5,2 _a
Chl. rugenoidosa 82; 170 млн. клеток/мл ***									
2Б	23,6	4,8	Следы	11,3	11,2	1,3	4,0	19,3	25,8
3	25,4 _a	9,0 _b	»	9,5 _b	10,5 _a	3,1 _b	6,1 _b	17,8 _a	18,5 _b
4	21,0 _b	20,2 _b	»	11,2 _a	8,1 _b	5,1 _b	7,4 _b	11,6 _b	15,4 _b

* Сокращенные названия жирных кислот: 16:0 — пальмитиновая; 16:1 — пальмитолеиновая; 16:1^a — транс-3-гексадеценавая; 16:2 — гексадекадиеновая; 16:3 — гексадекатриеновая; 18:0 — стеариновая; 18:1 — олеиновая; 18:2 — линолевая; 18:3 — линоленовая.

** В каждом варианте приведены средние арифметические данные для серии, состоящей из 2—4 опытов.

*** Данные одного из опытов; в этом опыте изменения жирнокислотного состава липидов в вар. 3 и 4 выражены меньше, чем в остальных опытах; а, б, в — достоверность разницы между результатами, полученными в различных вариантах по сравнению с вариантом 2Б: а < 95%; 95% < б < 99%; 99% < в.

том же экстрагенте. Гидрофобное взаимодействие липидов с менее полярным растворителем и разрыв их водородных связей под действием спиртов ослабляют связь липидов с другими компонентами клетки и способствуют разрушению клеточных структур, что в свою очередь облегчает экстракцию. Разрушение в органических растворителях [4, 21] позволяет избежать происходящего в водной среде нарушения нативности липидов и окислительного разрушения полиненасыщенных жирных кислот. В то же время, как было отмечено выше, вода способствует более полной экстракции липидов [3, 4, 7, 21]. В наших опытах при центрифугировании суспензии вокруг клеток и на поверхности их осадка остается определенное количество воды. В присутствии бус и органического растворителя создается как бы двухфазная система, где вода сосредоточена на поверхности бус, и поверхность раздела достигает значительной величины. Очевидно, бусы не только участвуют в разрушении клеток, но и влияют на фазовое состояние системы. Ранее бусы использовали при экстракции липидов из водорослей: клетки хлореллы встряхивали 2 ч в склянке с большим количеством бус (диаметр — 2 мм) в смеси органических растворителей, но, так как клетки при этом не разрушались, выход липидов не превышал 93% [9].

В ходе работы было установлено, что промывание экстракта липидов водой или NaCl [1, 2] для удаления нелипидных примесей приводит к потере 5—20% липидов. Поэтому эта процедура была исключена. В настоящее время от промывания водой отказываются многие исследователи.

дователи [6, 10, 21, 22]. В случае необходимости ее использования потери могут быть несколько уменьшены обратным промыванием водной фазы хлороформом [23, 24]. Замена изопропанола метанолом (табл. 2, 3) и изменение соотношения между спиртом и хлороформом почти не влияли на полноту экстракции и жирнокислотный состав липидов.

Полученные данные говорят о том, что разработанный метод дает удовлетворительные результаты по полноте экстракции липидов (99%) и сохранению их нативности, а также по жирнокислотному составу липидов. При этом не требуется обезвоживания и предварительной фиксации растительного материала, а также можно отказаться от применения инертных газов. Метод может быть использован для навесок 3—200 мг в расчете на сухое вещество при содержании липидов 5—10%. Благодаря проведению центрифугирования суспензии, разрушения клеток и экстракции липидов в одной и той же пробирке затрата времени на все операции не превышает 1,5—2,0 ч. Статистическая обработка данных свидетельствует о хорошей точности метода и воспроизводимости результатов (для 5 опытов при 2—3 биологических повторностях в каждом относительная стандартная ошибка составила 1,9%). Очевидно, метод приложим не только для работы с одноклеточными водорослями, но и с другими объектами. В настоящее время опубликован сходный метод экстракции липидов из дрожжей [25].

Авторы признательны А. Г. Верещагину за интересное и детальное обсуждение этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., 226, 497, 1957.
2. Bligh E. G., Dyer W. J. Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 911, 1959.
3. Кейтс М. Техника липидологии. «Мир», 1975.
4. Cristie W. W. Lipid analysis. Oxford, Pergamon Press, 1973.
5. Radin N. S. In: Methods of Enzymology, XIV, 245. N. Y.—London, 1969.
6. Жуков А. В., Верещагин А. Г. Физиол. растений, 21, 659, 1974.
7. Жуков А. В., Верещагин А. Г. Физиол. растений, 21, 1083, 1974.
8. Семенов В. Е., Касаткина Т. И. Физиол. растений, 19, 169, 1972.
9. Иванова Б., Попов А. Прикл. биохим. и микробиол., 8, 99, 1972.
10. Wells M. A., Dittmer Y. C. Biochemistry, 2, 1259, 1963.
11. Decker M., Tanner W. FEBS Lett., 60, 346, 1975.
12. Клячко-Гурвич Г. Л., Семенова А. Н. Физиол. растений, 23, 726, 1976.
13. Жуков А. В., Давыдова И. М., Верещагин А. Г. Прикл. биохим. и микробиол., 6, 627, 1970.
14. Клячко-Гурвич Г. Л., Семенова А. Н. Физиол. растений, 24, 75, 1977.
15. Владимирова М. Г., Семенов В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. Изд-во АН СССР, 1962.
16. Dole V. P. J. Clin. Invest., 35, 150, 1956.
17. Верещагин А. Г., Клячко-Гурвич Г. Л. Биохимия, 30, 543, 1965.
18. Жуков А. В., Верещагин А. Г. Ж. аналит. химии, 25, 2222, 1970.
19. Althaus H. H., Neuhoff V. Z. Physiol. Chem., 354, 1073, 1973.
20. Бояркин А. Н. В сб.: Памяти акад. Максимова, 318. Изд-во АН СССР, 1957.
21. Packter N. M., Stumpf P. K. Biochem. et Biophys. acta, 409, 274, 1975.
22. Kaschnitz R., Peterlik M., Weiss H. A. Analyt. Biochem., 30, 146, 1969.
23. Родионов В. С., Нюппиева К. А., Захарова Л. С. Биохимия, 39, 215, 1974.
24. Яковенко Г. М., Михно А. И. Физиол. и биохим. культ. растений, 3, 651, 1971.
25. Kaneko H., Iton T. Lipids, 11, 821, 1976.

Поступила в редакцию
12.VII.1977