



УДК 577.153.2.07.577.156.07

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА
ЛИПОПРОТЕИДЛИПАЗЫ ИЗ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*Вовк В. А., Левчук Т. П., Баласова И. Г.,
Яковлев В. А.

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Разработан метод выделения и очистки бактериальной липопротеидлипазы с применением гель-хроматографии на сефадексах G-50 и G-200 с выходом 40% и удельной активностью 900—2000 ед. При седиментационном анализе в препарате фермента обнаружен один основной симметричный пик с коэффициентом седиментации, изменяющимся от 17,3 до 18,3 S, и следы двух миворных компонентов с коэффициентами седиментации 4 и 7 S, количество которых увеличивается при хранении препарата. При диск-электрофорезе наблюдается одна полоса белка, обладающего ферментативной активностью. Очищенный препарат обладает липопротеидлипазной и липазной активностью. Высказывается предположение, что очищенный препарат является сложным высокомолекулярным комплексом гликолипипротеидной природы.

Ранее [1, 2] нами были найдены ряд штаммов бактерий из рода *Pseudomonas* с повышенной способностью продуцировать экзофермент с липопротеидлипазной активностью и найдены оптимальные условия для его биосинтеза. Цель настоящей работы — разработка метода получения высокоочищенного препарата липопротеидлипазы и изучение его физико-химических свойств.

Поскольку известно об ингибирующем действии растворов высокой ионной силы на липопротеидлипазу [3, 4] и о нестабильности ее после ионнообменной хроматографии [5], при выборе метода очистки фермента мы сознательно исключили фракционирование сернокислым аммонием и хроматографию на ионообменниках. Для концентрирования культуральной жидкости, предварительно освобожденной от клеточной массы центрифугированием, мы использовали метод Веселова [6], заключающийся в ступенчатом вымораживании воды с последующим удалением кристаллов льда центрифугированием. Инактивации фермента при этом практически не происходило. Вымораживание проводили в несколько стадий, пока концентрация сухого вещества не достигала 15—16%, поскольку дальнейшее увеличение концентрации могло привести к инактивации фермента за счет высокой концентрации солей. Концентрированный раствор фермента освобождали от солей и низкомолекулярных примесей на колонке с сефадексом G-50. Объединенные активные фракции повторно концентрировали вымораживанием.

Дальнейшую очистку осуществляли на колонке с сефадексом G-200. Из рис. 1 видно, что с помощью гель-хроматографии удалось освободиться от большой группы сопутствующих белков. Активная фракция находится в первом белковом пике, выходящем со свободным объемом колонки, что

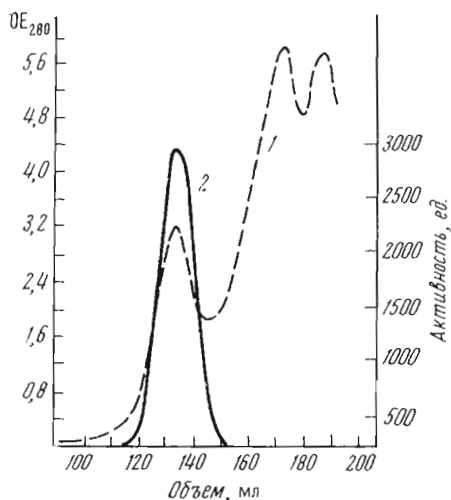


Рис. 1

Рис. 1. Гель-хроматография липопроteidлипазы на колонке с сефадексом G-200: 1 — контроль по белку, 2 — по активности. Колонка $75 \times 2,8$. Объем геля 500 мл. Свободный объем 135 мл. Элюент — 0,05 M трис-HCl буфер (pH 8,5). Скорость элюции 10 мл/ч

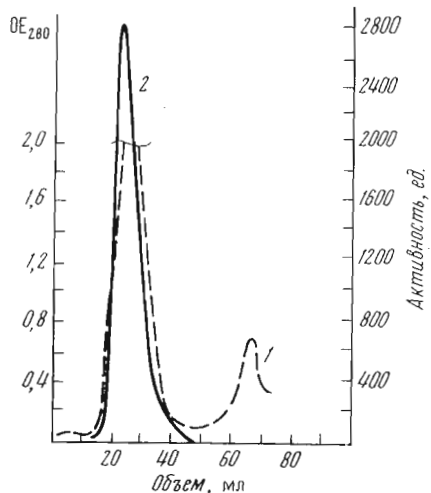


Рис. 2

Рис. 2. Гель-хроматография 10 мг препарата липопроteidлипазы на колонке с биоге-лем P-300: 1 — контроль по белку; 2 — по активности. Колонка $30 \times 1,9$. Объем геля 50 мл. Элюент — 0,05 M трис-HCl буфер (pH 8,5). Скорость элюции 1,0 мл/ч

свидетельствует о большом молекулярном весе фермента. Удельная активность фермента после этой стадии очистки возросла по сравнению с исходной в 34 раза. Выход составлял 43% от начальной активности культуральной жидкости. Попытки использовать для дальнейшей очистки повторную хроматографию на сефадексе G-200 или на сефарозе 6В оказались малоэффективными. Лучшие результаты были получены при гель-хроматографии на биогеле P-300. Из рис. 2 видно, что препарат липопроteidлипазы на биогеле разделился на 2 фракции (пики симметричные), причем активность была обнаружена только в первой фракции, выходящей со свободным объемом, как и в случае хроматографии на колонке с сефадексом G-200. Следует отметить, что, хотя удалось освободиться от низкомолекулярных белковых примесей, однако удельная активность фермента увеличилась незначительно, с 1200 до 1300 ед/мг белка. Результаты очистки фермента по стадиям, степень очистки и выход фермента суммированы в табл. 1.

Для оценки гомогенности полученных препаратов фермента использовали седиментационный анализ и диск-электрофорез. При ультрацентрифугировании в 0,05 M трис-HCl буфере (pH 8,5) в препарате, полученном после пропускания через сефадекс G-200, был обнаружен один основной симметричный пик с коэффициентом седиментации 18,3 S, что соответствует $M \sim 1\,000\,000$, и следы двух низкомолекулярных компонентов с коэффициентами седиментации 7 и 4 S, которые соответствуют молекулярным весам, приблизительно равным 150 000 и 60 000. После очистки препарата хроматографированием на биогеле P-300 в нем обнаружены те же компоненты (рис. 3).

На основании полученных данных можно предположить, что препарат липопроteidлипазы представляет собой высокомолекулярный комплекс, состоящий из нескольких компонентов. Причем было замечено, что этот комплекс нестабилен, поскольку при хранении препарата по данным седиментационного анализа изменялось количественное соотношение компонен-

тов в сторону увеличения низкомолекулярных. Отсюда становится понятным, почему в препарате присутствуют столь сильно отличающиеся по молекулярному весу минорные компоненты, которые должны были отделяться при гель-хроматографии на сефадексе G-200 и на биогеле P-300. Возможно, по этой причине наблюдались значительные колебания удельной активности (от 900 до 2 000 ед/мг белка) и коэффициентов седиментации (от 17,3 до 18,3 S для главного пика и от 7 до 9 S и от 2 до 4 S для минорных компонентов) для разных партий препарата фермента, несмотря на одинаковые условия их получения.

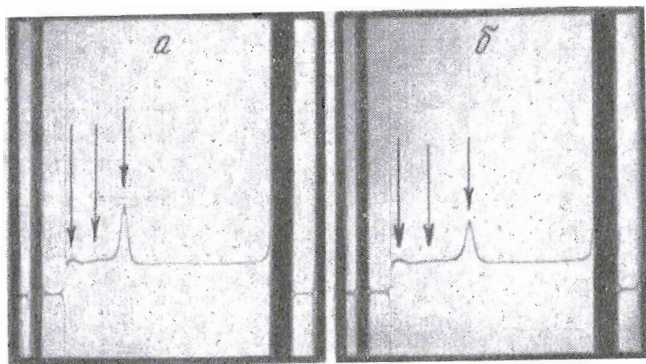


Рис. 3. Седиментограммы препарата липопротеиндиазы в 0,05 M трис-HCl буфере (рН 8,5) после гель-фильтрации на сефадексе G-200 (а) и на биогеле P-300 (б). 30 мм односекторная ячейка, 48 000 об/мин

При диск-электрофорезе в полнакриламидном геле препараты фермента (после хроматографии на сефадексе G-200 или на биогеле P-300) были гомогенными (рис. 4), что не согласуется с данными, полученными после ультрацентрифугирования, свидетельствующими о наличии в ферментном препарате небольших количеств одного или двух низкомолекулярных компонентов. Это несоответствие можно объяснить, если предположить, что при диск-электрофорезе происходит ассоциация компонентов за счет скачка рН и эффекта концентрирования в условиях опыта.

При изучении свойств фермента использовали препараты, полученные после гель-хроматографии на сефадексе G-200. В препарате с удельной активностью 1200 ед белок составлял 71,5%. В составе препарата были обнаружены гексозы, фосфолипиды, эфиры холестерина, холестерин, триглицериды и жирные кислоты.

Таблица 1

Очистка липопротеиндиазы из *Pseudomonas aeruginosa* ВКМ В-588

Стадия очистки	Объем, мл	Активность, ед/мл	Концентрация белка, мг/мл	Уд. активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	100	520	14,9	35		100
Концентрирование вымораживанием	30	1240				72
Гель-фильтрация на сефадексе G-50	40	776	5,17	150	~4	60
Концентрирование вымораживанием	7	4004				54
Гель-хроматография на сефадексе G-200	14	1608	1,34	1200	~34	43

Препарат фермента в трис-НСI буфере (рН 8,5) можно хранить при +4° практически без потери активности, по крайней мере, в течение месяца. В процессе лиофилизации произошло снижение активности на 59% и к концу второго месяца активность составляла 24% от исходной. Было показано, что сахароза (1 мг/мл раствора) является стабилизирующим агентом. После лиофилизации с сахарозой активность фермента уменьшилась всего на 8% и при хранении в течение двух месяцев не изменялась.

Мы определили, что рН-оптимум ферментного препарата равен 9,5 (рис. 5). При изучении зависимости стабильности липопроотеидлипазы от

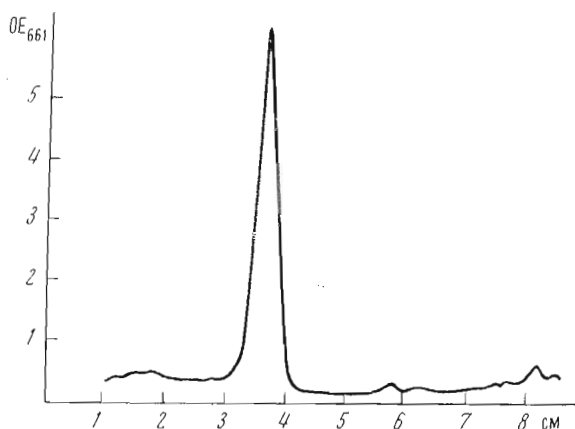


Рис. 4. Денситометрическая кривая электрофореграммы препарата липопроотеидлипазы после гель-фильтрации на сефадексе G-200 (оптическая плотность указана в условных единицах). 4%-ный полиакриламидный гель, буфер (рН 8,9), 5 мА/грубку, 1,5 ч. Окраска амидочерным 10Б. Небольшой второй пик является артефактом, так как он наблюдался также и в контроле без навесения образца фермента

температуры (рис. 6) и рН среды (рис. 7) установлено, что фермент инактивируется на 67% при 30-минутном прогревании (60°) и стабилен при выдерживании в растворах с рН от 4,5 до 11,5, по крайней мере, в течение 30 мин (4°). Необходимо отметить, что при рН 4,5 наблюдалось осаждение фермента. Специальными опытами было установлено, что длительное (10 ч) выдерживание осадка фермента в растворе рН 4,5 практически не сказывалось на его активности. С целью проведения седиментационного анализа осадок фермента растворяли в 0,05 М трис-НСI буфере (рН 8,5). При центрифугировании этого ферментного раствора обнаружили один несколько асимметричный пик, характеризующийся коэффициентом седиментации 23,4 S. Можно предположить, что при рН 4,5 происходит ассоциация компонентов фермента. Однако полученный комплекс нестабилен в буфере с рН 8,5 и через сутки распадается на три компонента с коэффициентами седиментации 16,5; 5,6 и 1,8 S.

При проверке специфичности выделенного фермента было обнаружено, что он способен гидролизовать как активированную, так и неактивированную эмульсию интралипид, т. е. обладает липопроотеидлипазной и липазной активностью, причем соотношение между липопроотеидлипазной и липазной активностями менялось от препарата к препарату в пределах от 1 : 1 до 1 : 2.

Несмотря на сравнительно большое количество сообщений о наличии в микроорганизмах ферментов с липопроотеидлипазной активностью, в высокоочищенном состоянии фермент был выделен только из *Pseudomonas* sp. [7] и из *Mucor javanicus* [8]. При очистке липопроотеидлипазы из *Pseudomonas* sp. [8] авторы использовали фракционирование бесклеточной культуральной жидкости (NH₄)₂SO₄, гель-фильтрацию на сефадексе G-200 и хромато-

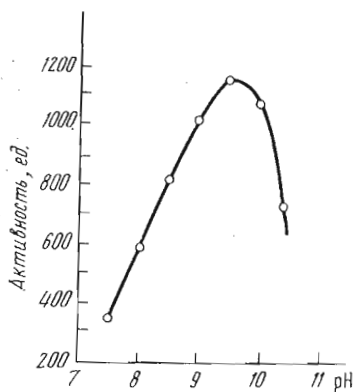


Рис. 5

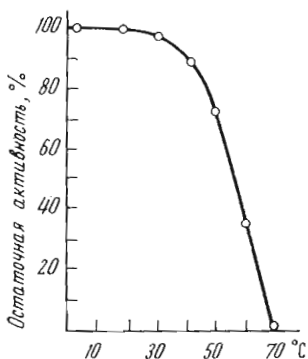


Рис. 6

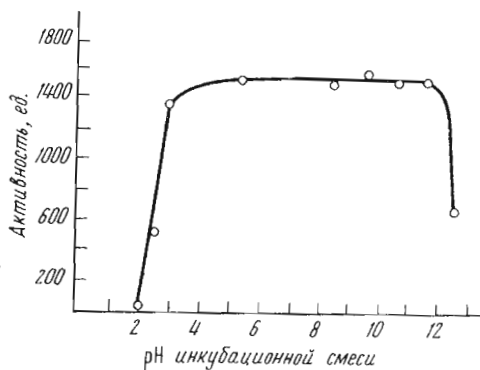


Рис. 7

Рис. 5. Активность липопротеидлипазы в зависимости от pH инкубационной среды

Рис. 6. Зависимость устойчивости препарата липопротеидлипазы от температуры. Препарат инкубировали в 0,05 M трис-HCl буфере (pH 8,5) при заданной температуре 30 мин и определяли активность в процентах от исходной

Рис. 7. Устойчивость липопротеидлипазной активности в зависимости от pH. Препарат инкубировали 30 мин в трис-HCl буфере заданного pH при 37° и определяли остаточную активность

графию на DEAE-целлюлозе. Общий выход активных фракций 53%. Очистка липопротеидлипазы из *Mucor javanicus* [9] включала фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, изоосаждение при pH 4,0, осаждение этанолом и гель-фильтрацию на сефадексе G-200. Фермент был получен с выходом 30% и степенью очистки 13.

Некоторые свойства полученного нами препарата и вышеуказанных очищенных препаратов липопротеидлипаз представлены в табл. 2. Видно, что все три препарата микробных липопротеидлипаз представляют собой комплексы гликолипопротеидной природы. Наши данные показывают, что ферментный комплекс нестабилен и в определенных условиях способен к диссоциации и ассоциации. Способность к образованию комплексов с фосфолипидами или липопротеидами показана также для панкреатической липазы [10], липазы из жировой ткани человека [11], ацетилхолинэстеразы [12]. Высказано предположение, что комплексование фермента с липидами имеет физиологическое значение в регуляции уровня активности [10—12].

Как известно, липопротеидлипазы животного происхождения строго специфичны и действуют только на триглицериды, входящие в состав липопротеидов. Животные липопротеидлипазы не расщепляют неактивированные эмульсии триглицеридов высших жирных кислот. Между тем выделенный нами ферментный препарат одинаково хорошо гидролизует как активированные эмульсии триглицеридов высших жирных кислот, так и неактивированные. Препарат липопротеидлипазы из *Mucor javanicus* также имеет как липопротеидлипазную, так и липазную активности. Являются ли обе активности свойством одного фермента, или же в получаемых препаратах имеются два самостоятельных фермента, пока остается невыясненным. Выяснение этого вопроса составляет предмет наших дальнейших исследований.

Таблица 2

Сравнение свойств очищенных препаратов микробных липопрогендиализ

Источник фермента	Растворимость	Поведение при ультрацентрифугировании	Максимум УФ-поглощения	М	Содержание			Уд. активность, ед./мл белка	Термостабильность	рН-стабильность	Отношение липопротеиновой к липазной активности	Работа
					белка	липидов	сахара					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ВКМ В-588	Хорошая в буфере при рН 5,5—11,5; растворы слегка мутные	В трис-НСl-буфере при рН 8,5 три пика: главный пик 17,3—18,3 S, минорные пики 7—9 S и 2—4 S	278, $E_{280}/E_{260} = 1,45$	1 000 000	72	+	+	900—2000*	<50° 4,5—11,5	4:1	Данная	
<i>Pseudomonas sp.</i> М-12-33	—	—	270, $E_{280}/E_{260} = 1,08$	—	20	67	12,5	—	<50° 4,0—9,0	[9, 11]		
<i>Mucor javanicus</i> АМ 6108	Неполностью растворяется; растворы мутные	Один пик в присутствии 1%-ного додецилсульфата натрия; 2,34 S	275 $E_{280}/E_{260} = 1,0$	Более 800 000	+	+	+	1950**	<50° 5,0—7,0	1:1 10:1***	[10]	

* С активированным интралипидом.

** С активированной эмульсией оливкового масла.

*** В присутствии фосфатидилинозитола.

Экспериментальная часть

Источником фермента служила культуральная жидкость *Pseudomonas aeruginosa* ВКМ В-588. Культуру выращивали, как описано ранее [2], на питательной среде, содержащей (в %): мясной бульон — 0,5 (по сухому весу); пептон — 1,5; глюкоза — 1,0; K_2HPO_4 — 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,05; KCl — 0,05; активированная эмульсия оливкового масла — 0,1 (по триглицеридам). Посевным материалом служила односуточная культура, выращенная на круговой качалке в 1%-ном мясном бульоне. Посевной материал вносили в количестве 10% от объема питательной среды.

Липопротеидлипазную активность определяли методом потенциометрического титрования жирных кислот, образующихся при гидролизе субстрата, на рН-стате («Radiometer», Дания). В качестве субстрата использовали коммерческую жировую эмульсию интралипид* («Vitlum», Швеция), после инкубации ее при 37° в течение 30 мин со свежей сывороткой крови человека (в тексте субстрат фигурирует под названием активированная эмульсия интралипид). Реакционная смесь (5 мл, рН 9,5, 37°) содержала: 0,5% активированной эмульсии интралипид $8 \cdot 10^{-3}$ М CaCl_2 , 0,05 М KCl . Реакцию начинали внесением фермента. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует освобождение 1 мкмоль жирных кислот за 1 ч.

Диск-электрофорез проводили с помощью прибора фирмы «Reanal» (Венгрия) «Модель 69» в 4%-ном полиакриламидном геле. Для геля использовали трис-НСI буфер (рН 8,9); для электродов — трис-глициновый буфер (рН 8,3). Длительность электрофореза — 1,5 ч, температура +4°. Белковые зоны окрашивали 1%-ным раствором амидочерного 10Б в 7%-ном растворе уксусной кислоты. Полученные электрофореграммы денситометрировали на сканирующем денситометре («Vitatron», Голландия, фильтр 661, щель $2,5 \times 0,5$).

Седиментационный анализ проводили на аналитической ультрацентрифуге «Spinco», модель Е («Beckman», Австрия) с регистрацией при помощи шпирен-оптики. Выделение липидной фракции из препарата фермента проводили по методу Фольча [13]. Состав липидной фракции изучали методом ТСХ в закрепленном слое силикагеля, используя систему растворителей: гексан, диэтиловый эфир, уксусная кислота (90 : 10 : 1).

Белок определяли по Лоури [14], принимая в качестве стандарта кристаллический бычий сывороточный альбумин («Koch-Light», Англия). Суммарное определение гексоз проводили по методу Динше в модификации Райта и Реберса [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлев В. А., Вовк В. А., Кузнецов В. А., Левчук Т. П. (1974) Микробиология, 43, 706—709.
2. Вовк В. А., Левчук Т. П., Яковлев В. А. (1974) Микробиология, 43, 820—824.
3. Korn E. D. (1957) J. Biol. Chem., 226, 827—832.
4. Fielding C. I. (1969) Biochim. et biophys. acta, 178, 499—507.
5. Robinson D. S. (1956) Quart. J. Exptl. Physiol., 41, 195—204.
6. Веселов Л. И. (1967) Прикл. биохимия и микробиология, 3, 329—335.
7. Narasaki T., Saiki T., Tamura G., Arima K. (1967) Agr. and Biol. Chem., 31, 993—995.
8. Saiki T., Takagi I., Suzuki T., Narasaki T., Tamura G., Arima K. (1969). Agr. and Biol. Chem., 33, 414—423.
9. Narasaki T. (1968) Tech. Bull. Fac. Agric., Kagawa Univ., 20, 49—56.
10. Kimura H., Kitamura T., Tsuji M. (1972) Biochim. et biophys. acta, 270, 307—316.
11. Schnatz I. D. and Cortner I. A. (1967) J. Biol. Chem., 242, 3850—3859.
12. Grafius M., Bond H., Millar D. (1971) Eur. J. Biochem., 22, 382—390.
13. Folch I., Lees M., Stenley G. H. (1957) J. Biol. Chem., 226, 497—509.

* Состав: соевое масло — 20 г, яичный лецитин — 1,2 г, глицерин — 2,5 г, стеариновая вода — до 100 мл.

14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275.
15. Wriaght B. G. and Rebers P. A. (1972) *Anal. Biochem.*, 49, 307—319.

Поступила в редакцию *
26.VIII.1974

**ISOLATION, PURIFICATION AND SOME PROPERTIES
OF LIPOPROTEINLIPASE FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

VOVK V. A., LEVCHUK T. P., BALYASOVA I. G., YAKOVLEV V. A.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

A method of isolation and purification of bacterial lipoproteinlipase by gel-filtration on Sephadex G-50 and G-200 has been developed. The enzyme was purified 34-fold with a yield of 40 per cent. The specific activity varied from 900 to 2000 μ moles FFA/mg protein/hr. By the sedimentation velocity experiments there was detected one major symmetrical peak with sedimentation coefficient varying from 17.3 S to 18.3 S and traces of two minor 4 S and 7 S components. The proportion of minor components was increasing upon storage. On polyacrylamide disc-electrophoresis only one band of enzyme activity could be detected. The enzyme preparations were shown to contain the lipid and sugar moieties.

* Статья из портфеля редакции журнала «Биохимия», дата поступления — 26.VI.1974