



p/c

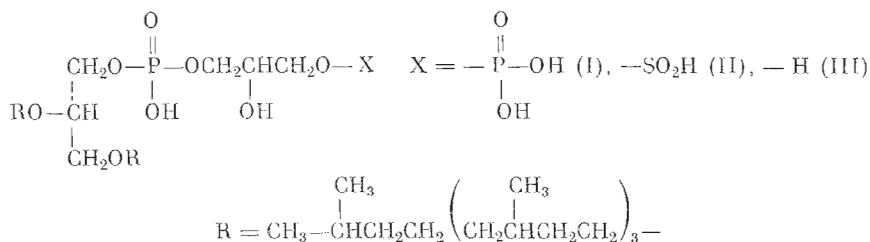
УДК 547.915.5

О СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФОСФОЛИПАЗЕ ГАЛОБАКТЕРИЙ

Вавер В. А., Симонова Т. П.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Галобактерии — микроорганизмы, развивающиеся в насыщенных солевых растворах, продуцируют необычные фосфолипиды — дифитаниловые аналоги фосфатидилглицерофосфата (I), фосфатидилглицеросульфата (II) и фосфатидилглицерина (III) [1, 2]:

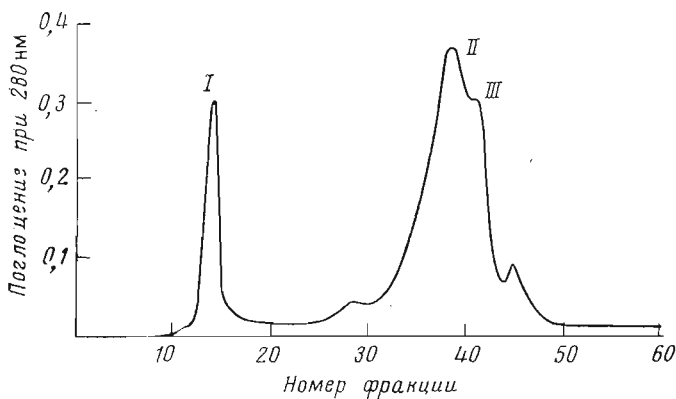


От обычно встречающихся глицерофосфатидов фосфолипиды галобактерий отличаются не только тем, что все они являются производными диалкилового (дифитанилового) эфира глицерина, но и необычной для природных липидов *D*-конфигурацией [1, 2]. В связи с необычной структурой и конфигурацией фосфолипиды галобактерий не расщепляются ни одной из известных липаз растительного, животного или микробного происхождения [1].

Нами найдено, что в клетках и культуральной жидкости *Halobacterium halobium* содержится специфическая липаза — дифитанилглицерилфосфорилглицерофосфат-глицеродифосфогидролаза (КФ 3.1.4) [3], расщепляющая соединение (I) с образованием 2,3-ди-*O*-фитанил-*sn*-глицерина и 1,3-глицеридифосфата.

Фосфолипазная активность лизатов клеток, культуральной жидкости *H. halobium* и белковых фракций, выделенных гель-фильтрацией

Среда	Активность, мкмоль субстр./ч·мг белка	Среда	Активность, мкмоль субстр./ч·мг белка	
Лизат, насыщенный NaCl	1,6 · 10 ⁻³	Фракция:	2,3 · 10 ⁻²	
Водный лизат	0			I
Водный лизат, реактивированный NaCl	2,3 · 10 ⁻³			II
Культуральная жидкость	1,5 · 10 ⁻³			III
			0	



Гель-фильтрация культуральной жидкости *H. halobium* на сефадексе G-100

Фосфолипазная активность была обнаружена при инкубации насыщенного хлористым натрием лизата клеток галобактерий, полученного по методу [4], и (или) культуральной жидкости с фосфолипидом (I).

Из культуральной жидкости *H. halobium* гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-100 была выделена белковая фракция, обогащенная фосфолипазой.

К 2,5 г пасты клеток *H. halobium*, выращенных на синтетической среде [5], добавляли 10 мл воды и 250 мкг ДНКазы (Worthington, США). Смесь перемешивали 2 ч при 20°, половину лизата отделяли и насыщали хлористым натрием. Обе порции лизата центрифугировали (23 000g, 30 мин), супернатанты отделяли, анализировали на содержание белка [6].

На колонку (85 × 2,5 см) с сефадексом G-100 в растворе, содержащем 25% NaCl, 1,6% MgCl₂ и 0,2% KCl [5], наносили 10 мл культуральной жидкости *H. halobium*, содержащей 100 мг суммарного белка. Белки элюировали указанным выше солевым раствором. Фракции по 12 мл отбирали с помощью автоматического коллектора Ultra Rac, снабженного Увикордом-II (ЛКВ, Швеция). Полученные результаты приведены на рисунке.

К 1 мл супернатанта, культуральной жидкости или белковых фракций, полученных гель-фильтрацией (содержание белка 5—10 мг/мл), прибавляли суспензию 0,5 мг фосфолипида (I), меченного ³H с уд. акт. 1,7 · 10⁵ имп/мин · мг в 1 мл 4 М раствора NaCl. Смесь инкубировали 2 ч при 60°. Продукты реакции распределяли в системе хлороформ — метанол — вода (1 : 1 : 1), хлороформный слой отделяли, упаривали и наносили на пластинку (6 × 9 см) с силикагелем КСК (150—200 меш), закрепленным 0,5% гипса. Хроматограмму проявляли в системе гексан — эфир — уксусная кислота (70 : 30 : 1). Зону, соответствующую по R_f дифитанилглицерину, вырезали. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике Mark II (Nuclear Chicago) со сцинтиллятором, предложенным Брейем и соавт. [7].

Фосфолипаза *H. halobium* подобно большинству известных ферментов галобактерий [8] дезактивируется в воде, но полностью реактивируется в 4 М растворе хлористого натрия (таблица).

В настоящее время нами изучаются возможности выделения фосфолипазы *H. halobium* и использования ее для ферментативной делипидизации пурпурных мембран галобактерий.

Работа проводится в рамках проекта «Родопсин» под общим руководством акад. Ю. А. Овчинникова.

Авторы приносят благодарность ст. научн. сотр. ИБФ АН СССР канд. хим. наук Л. Н. Чекулаевой за помощь в получении меченых фосфолипидов галобактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kates M. (1972) in *Ether Lipids, Chemistry and Biology* (Snyder F., ed.), pp. 351—398, Acad. Press, N. Y.
2. Hancock A. J., Kates M. (1973) *J. Lipid Res.*, **14**, 422—429.
3. Классификация и номенклатура ферментов (1962) с. 129, Изд-во иностр. лит., М.
4. Oesterhelt D., Stoeckenius W. (1971) *Nature New Biol.*, **233**, 149—152.
5. Sehgal S. N., Kates M., Gibbons N. E. (1962) *Can. J. Biochem. and Physiol.*, **40**, 69—81.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Fair A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
7. Bray G. A. (1960) *Anal. Biochem.*, **1**, 279—285.
8. Lany J. K. (1974) *Bacteriol. Rev.*, **38**, 272—290.

Поступило в редакцию
6.IV.1977

ON THE SPECIFIC PHOSPHOLIPASE OF EXTREMELY HALOPHILIC BACTERIA

VAVER V. A., SIMONOVA T. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Halobacterium halobium cells and the cultural broth were shown to contain a specific phospholipase. The enzyme hydrolyses 2,3-di-O-phytanyl-*sn*-glycerol-1-phosphoryl-3'-*sn*-glycerol-1'-phosphate with the formation of glycerol-1,3-diphosphate and 2,3-di-O-phytanyl-*sn*-glycerol. The halobacteria phospholipase is inactivated in water, but regain the activity in 4 M salt solution.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20/VI-1977 г.	Т-13176	Подписано в печати 5/VIII-1977 г.	Тираж 850 экз.
Зак. 2513	Формат бумаги 70×108 ^{1/16}	Усл. печ. л. 12,6	Бум. л. 4 ^{1/2} Уч.-изд. л. 13,0

2-я типография издательства «Наука», Москва, Шубинский пер., 10