



УДК 577.153.072

**ОЧИСТКА ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ  
НА АФФИННОМ СОРБЕНТЕ, СОДЕРЖАЩЕМ ПРОИЗВОДНОЕ  
ФЕНИЛБОРНОЙ КИСЛОТЫ**

*Акпаров В. Х.*

*ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва*

*Нуцубидзе Н. Н., Ротанова Т. В.*

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

Предложен вариант аффинной хроматографии панкреатической липазы, позволяющий повысить удельную активность препарата более чем в 20 раз. В качестве аффинного сорбента использован неорганический носитель с ковалентно связанным лигандом — производным фенилборной кислоты. Показана применимость предложенного метода на различных стадиях очистки липазы.

Панкреатическая липаза (КФ 3.1.1.3) в последнее время интенсивно изучается в различных лабораториях [1—4]. Большой интерес к этому ферменту обусловлен тем, что липолиз является ферментативным процессом, происходящим на границе раздела фаз. Исследование закономерностей функционирования липазы и механизма ее активации требует использования высокоочищенных препаратов фермента. Однако предложенные до настоящего времени методы выделения липазы еще недостаточно эффективны. Большие возможности в этом направлении открываются при использовании аффинной хроматографии. Так, в ряде работ в качестве аффинных сорбентов были использованы гидрофобизированные стеклянные шарики [5], сефароза, модифицированная лауриламином [6], алифатическими аминами [7], фенил- и октил-сефароза [8], пальмитоилцеллюлоза [9], сефароза, модифицированная колипазой [10]. Во всех этих работах, кроме последней, использован вариант гидрофобной аффинной хроматографии, основанный на высоком сродстве липазы к поверхностям раздела фаз. Дополнительные возможности аффинной хроматографии в применении к липазе связаны с тем, что этот фермент относится к классу серин-гистидиновых гидролаз [11, 12] и подобно другим ферментам этого класса специфически ингибируется борорганическими кислотами [13]. При этом борорганические кислоты взаимодействуют не только с сорбционным, но и с каталитическим участком активного центра «серинового» фермента, образуя с остатками серина и гистидина комплекс, моделирующий переходное состояние в реакции образования и гидролиза ацилфермента [14]. Ранее сообщалось об успешном использовании такого взаимодействия для аффинной хроматографии трипсина, химотрипсина и субтилизина [15]. В настоящей работе предлагается новый вариант аффинной хроматографии липазы, в котором в качестве аффинного сорбента

используется производное фенолборной кислоты, ковалентно связанное с неорганическим носителем (далее — РВ-сорбент).

РВ-сорбент по способу действия сходен с ранее описанными сорбентами [15], в которых производные фенолборной кислоты ковалентно связаны с сефарозой, но отличается от них значительно более высоким содержанием лиганда.

С помощью РВ-сорбента была проведена хроматография препаратов липазы, полученных на различных стадиях очистки по стандартной методике [16]. Основными этапами этой методики являются обезжиривание гомогената поджелудочной железы свиньи обработкой органическими растворителями с образованием так называемого «делипидизованного порошка», фракционирование водного экстракта последнего сульфатом аммония, отделение кислых фосфатидов путем обработки бутиловым спиртом, диализ и хроматография на DEAE-целлюлозе, гель-фильтрация на сефадексе G-100.

На рис. 1 приведены результаты аффинной хроматографии водного экстракта «делипидизованного порошка» на РВ-сорбенте. Как видно из рисунка, при pH 7,5 липаза сорбируется на аффинном носителе. При этом значительная часть белкового материала (около 90%), не содержащего липазной активности, не задерживается на колонке. Для элюции липазы было использовано известное свойство арилборных кислот, заключающееся в их способности образовывать при pH 9,0 бидецические комплексные соединения с углеводами, содержащими *цис*-диольную группировку, в частности с пентаэритритом [17]. Пропускание через колонку пентаэритрита (градиент концентрации в фосфатном буфере, pH 9,0) приводит к практически полной десорбции липазы (выход по активности более 83%, см. таблицу). В специальном опыте было показано, что изменение pH до 9,0 в отсутствие пентаэритрита не приводит к элюции липазы. Удельная активность выделенного препарата липазы возросла по сравнению с исходной величиной в 7,9 раза. Следует, однако, отметить, что в отдельных фракциях степень очистки превышала 20 раз (см. график удельной активности на рис. 1).

Факт десорбции липазы с аффинного носителя пентаэритритом служит подтверждением того, что, как и предполагалось, взаимодействие липазы с РВ-сорбентом является разновидностью ковалентной хроматографии, а именно ковалентной хроматографией, основанной на средстве лиганда к каталитическому участку активного центра липазы.

РВ-сорбент был использован также для аффинной хроматографии препарата липазы, полученного после стадии хроматографии на DEAE-целлюлозе по методике [16]. В этом случае удельная активность исходного материала была в 40 раз выше, чем в предыдущем (см. таблицу). Из рис. 2 видно, что и для этого сравнительно высоко очищенного препарата фермента применение аффинного сорбента, содержащего фенолборную кислоту, позволяет отделить большое количество белка, не обладающего липолитической активностью. Десорбция липазы была осуществлена 0,6 М раствором пентаэритрита в фосфатном буфере (pH 9,0), выход фермента составил более 95% по активности, удельная активность выделенного препарата возросла в 2,2 раза по сравнению с исходной (в отдельных фракциях получено 8-кратное увеличение удельной активности).

Из полученных результатов следует, что аффинная хроматография на РВ-сорбенте может быть применена на различных стадиях очистки панкреатической липазы, причем использование ее на начальных этапах очистки фермента позволяет отделить около 90% балластного белкового материала (см. таблицу). Однако в препаративном отношении эта методика пока трудно осуществима, так как требует больших количеств относительно труднодоступного аффинного сорбента. Включение же стадии аффинной хроматографии на конечных этапах очистки липазы, когда количество посторонних белков невелико, позволяет тем не менее увеличить удельную

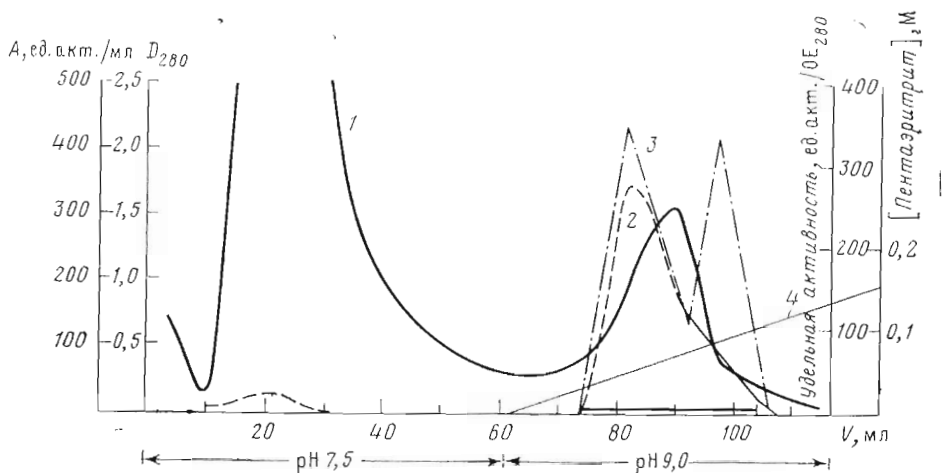


Рис. 1. Хроматография экстракта «делипидизованного порошка» на РВ-сорбенте (условия приведены в «Экспериментальной части»). 1 — поглощение при 280 нм ( $D$ ), 2 — активность липазы во фракциях ( $A$ ), 3 — удельная активность липазы ( $A/D$ ), 4 — градиент концентрации пентаэритрита в 0,05 М фосфатном буфере, pH 9. Здесь и на рис. 2 отмечены объединяемые фракции

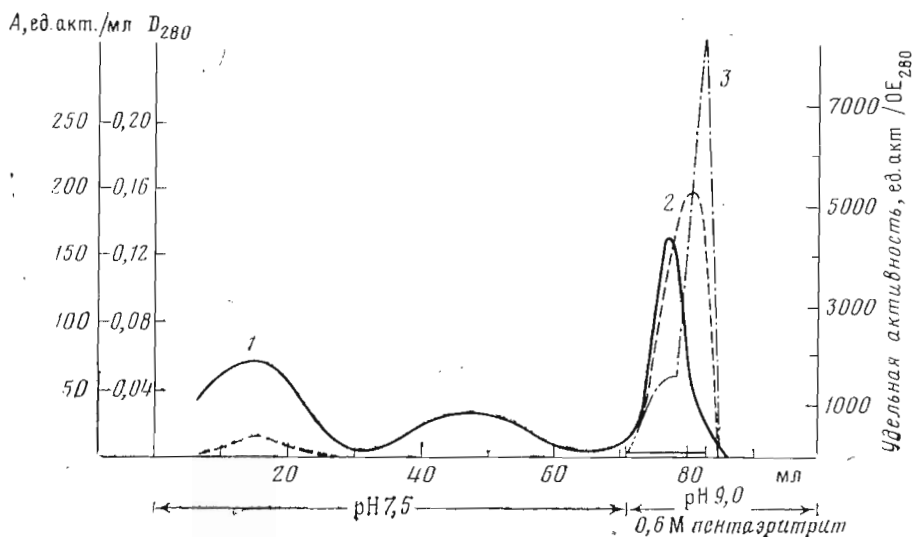


Рис. 2. Хроматография препарата липазы, полученного после хроматографии на DEAE-целлюлозе по методике [16], на РВ-сорбенте (условия приведены в «Экспериментальной части»). Обозначения см. в подписи к рис. 1

активность препарата фермента (возможно, за счет избирательной сорбции активного фермента и отделения его таким образом от инактивировавшейся в процессе выделения липазы). В настоящее время нами разрабатывается комплексная методика выделения липазы, включающая как традиционные стадии, так и аффинную хроматографию.

### Экспериментальная часть

Активность препаратов липазы определяли по модифицированной методике [18], используя в качестве субстрата трибутирин. Для этого к 1 мл субстратной смеси (готовили как в [18] без изменений) добавляли 1 мл раствора фермента и регистрировали время, необходимое для изме-

**Очистка панкреатической липазы на аффинном сорбенте, содержащем  
фенилборную кислоту**

Препарат липазы по методике [16]	Нанесено			Элюировано			Степень очистки, % раз	Выход, %
	Белок, ОЕ <sub>280</sub>	Активность		Белок, ОЕ <sub>280</sub>	Активность			
		общая, ед. акт.	удельная, ед. акт./ ОЕ <sub>280</sub>		общая, ед. акт.	удельная, ед. акт./ ОЕ		
Экстракт «делипидизованного порошка»	240	6000	25	25,4	5000	196,8	7,9	83,3
Липаза после DEAE-хроматографии	2,36	2300	970	1,02	2200	2160	2,2	95,6

нения окраски смеси от желтой до красной (по нейтральному красному) при 37° С. За единицу активности липазы принимали такое ее количество, которое вызывало изменение окраски фермент-субстратной смеси за 10 мин; 1 ед. акт. соответствует выделению  $6,3 \cdot 10^{-6}$  моль масляной кислоты.

*Аффинная хроматография экстракта «делипидизованного порошка» (рис. 1).* 300 мг «делипидизованного порошка» (см. [16]) суспендировали в 6 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,5), содержащего 2 мМ диизопротилфторфосфат, через 30 мин (20° С) центрифугировали, супернатант (40 ОЕ<sub>280</sub>/мл, активность 1000 ед./мл) наносили на колонку с 1 мл РВ-сорбента, уравновешенную 0,05 М фосфатным буфером, рН 7,5. Сорбированную липазу элюировали линейным градиентом концентрации (0–0,25 М) пентаэритрита в 0,05 М фосфатном буфере, рН 9,0; общий объем 100 мл, объем фракции 5 мл. Объединены фракции, содержащие липазу (объем 30 мл, 0,85 ОЕ<sub>280</sub>/мл, активность 167 ед. акт./мл).

*Аффинная хроматография препарата липазы, полученного в результате хроматографии на DEAE-целлюлозе по методике [16] (рис. 2).* Раствор липазы (1 мл, 2,36 ОЕ<sub>280</sub>/мл, 2530 ед. акт./мл) наносили на колонку с 1 мл РВ-сорбента как описано выше, промывали 0,05 М фосфатным буфером, рН 7,5, элюировали 0,6 М раствором пентаэритрита в 0,05 М фосфатном буфере, рН 9,0, объем фракции 4 мл. Объединены фракции, содержащие липазу (объем 12 мл, 0,09 ОЕ<sub>280</sub>/мл, активность 183 ед. акт./мл).

Авторы приносят благодарность проф. В. К. Антонову и проф. В. М. Степанову за полезное обсуждение результатов работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sémériva M., Desnuelle P. (1979) Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 48, 319–370.
2. Brockerhoff H. (1973) Chem. Phys. Lipids, 10, 215–222.
3. Borgström B., Donnér J. (1977) FEBS Lett., 83, 23–26.
4. Cohen H., Shen B. W., Snyder W. R., Law J. H., Kézdy F. J. (1976) J. Colloid Interface Sci., 56, 240–250.
5. Momsen W. E., Brockman H. L. (1978) J. Lipid Res., 19, 1032–1037.
6. Kosugi Y., Suzuki H., Kamibayashi A. (1975) Japan Kokai 7577, 586 (Cl C07G); Chem. Abstr. (1975) 83, 174 782.
7. Kosugi Y., Suzuki H. (1974) Hakko Kagaku Zasshi, 52, 477–582; Chem. Abstr. (1974) 81, 147 672.
8. Lairon D., Nalbone G., Lafont H., Leonardi J., Domingo N., Hauton J. C., Verger R. (1978) Biochemistry, 17, 205–208.
9. Horiuti Y., Imamura S. (1977) J. Biochem. (Tokyo), 81, 1639–1651.
10. Patton J. S., Andersson L. (1978) FEBS Lett., 86, 179–182.
11. Sémériva M., Chapus C., Bovier-Lapierre C., Desnuelle P. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 58, 808–813.
12. Антонов В. К., Гиnodман Л. М., Ротанова Т. В., Нуцубидзе Н. Н. (1978) Биоорганической химия, 4, 276–278.
13. Ротанова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гиnodман Л. М., Антонов В. К. (1976) Биоорганической химия, 2, 837–845.
14. Rawn J. D., Lienhard G. E. (1974) Biochemistry, 13, 3124–3130.

15. Akparov V. Kh., Stepanov V. M. (1978) *J. Chromatogr.*, 155, 329–336.
16. Verger R., de Haas G. H., Sards L., Desnuelle P. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, 188, 272–282.
17. Шварц Е. М. (1968) Комплексные соединения бора с полиоксисоединениями, с. 40, «Зинатне», Рига.
18. Асатиани В. С. (1969) Ферментные методы анализа, с. 482–484, «Наука», М.

Поступила в редакцию  
5.X.1979

## PURIFICATION OF PANCREATIC LIPASE ON THE AFFINITY ADSORBENT CONTAINING A PHENYLBORONIC ACID DERIVATIVE

AKPAROV V. KH., NUTSUBIDZE N. N., ROTANOVA T. V.

*Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,  
Moscow; M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

A procedure for affinity chromatography of porcine pancreatic lipase has been suggested which gives a 20-fold increase in the enzyme specific activity. Inorganic carrier containing a derivative of phenylboronic acid as a ligand was applied as affinity adsorbent. It was shown that the procedure can be employed at different steps of the lipase purification.

---