



УДК 577.152.321\*3'14:577.112.4

**ВКЛЮЧЕНИЕ ГАЛАКТОЗНЫХ ОСТАТКОВ В УГЛЕВОДНУЮ ЧАСТЬ  
АМИЛОГЛЮКОЗИДАЗЫ ИЗ *ASPERGILLUS*,  
СОПРОВОЖДАЮЩЕЕСЯ ИЗМЕНЕНИЕМ ЛЕКТИНОВОЙ  
СПЕЦИФИЧНОСТИ ФЕРМЕНТА***Михайлов В. И., Семенов Е. П., Видершайн Г. Я.**Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР, Москва*

На примере фермента гликопротеидной природы — амилоглюкозидазы из *Aspergillus* — показана возможность химической модификации ферментов-гликопротеидов, приводящей к изменению их лектиновой специфичности. Модификация осуществляется в два этапа. На первом гликопротеид подвергают окислению периодатом натрия, на втором этапе окисленный фермент вводят в конденсацию с галактозидами, содержащими аминогруппу в агликоновой части, в частности с галактопиранозил- $\beta$ -(1-4)-1-дезоксигалакто-1-аминосорбитом, методом восстановительного аминирования в присутствии цианборгидрида натрия. В результате модификации фермент изменяет свою лектиновую специфичность: с одной стороны, теряет способность связываться с конканавалином А, с другой — приобретает сродство к галактозоспецифичному лектину — RCA<sub>1</sub>. Модификация не приводит к существенному изменению активности, рН-оптимума работы и рН-стабильности модифицированного фермента.

В настоящее время известно значительное количество энзимопатий, связанных с врожденным отсутствием или недостаточностью лизосомных гидролаз в клетках различных органов человека и животных [1-3]. Следствием подобных заболеваний является аномальное накопление в лизосомах промежуточных продуктов метаболизма, что приводит в конечном итоге к гибели клеток. Одним из подходов к коррекции наследственных энзимопатий может стать заместительная энзимотерапия — введение в организм больного отсутствующего фермента [4, 5]. Необходимое условие эффективности энзимотерапии — селективное связывание экзогенного фермента клетками пораженного органа. Для решения этой задачи представляется перспективным направленное гликозилирование вводимого фермента, так как известно, что природа концевых углеводных остатков в молекуле гликоконъюгатов определяет в ряде случаев их избирательное поглощение клетками определенного типа [6, 7]. Так, концевые остатки маннозы обеспечивают захват гликопротеидов клетками ретикулоэндотелия [8] и почек [9], остаток галактозы служит маркером узнавания для гепатоцитов [10]; кроме того, в плазматических мембранах гепатоцитов обнаружены рецепторы, обеспечивающие захват гликопротеидов с концевыми остатками N-ацетилглюкозамина [11] и фукозы, соединенной  $\alpha$ -(1-3)-связью с предшествующим остатком N-ацетилглюкозамина [12].

Большинство известных в настоящее время химических методов гликозилирования белков основано на реакциях присоединения углеводов к боковым функциональным группам аминокислотных остатков [13, 14]. С нашей точки зрения, особый интерес представляет возможность включения новых маркерных сахаров в состав углеводных цепей ферментов гликопротеидной природы. Очевидно, что присоединения нового углеводного маркера к пептидной части такого фермента недостаточно, так как модифицированный гликопротеид при этом будет содержать минимум два типа концевых углеводных остатков с различной маркерной специфичностью. В этом случае задача заключается не в простом введении нового углеводного остатка в фермент-гликопротеид, а в замене природного углеводного маркера на новый маркер.

В настоящей работе на примере амилоглюкозидазы ( $\alpha$ -1,4-глюкан-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) из грибов *Aspergillus* предлагается метод

химической модификации ферментов гликопротеидной природы, позволяющий изменять их маркерную специфичность путем введения иных, чем в нативном полимере, концевых углеводных остатков. Коммерческий препарат амилоглюкозидазы как объект модификации выбран нами потому, что этот гликопротеид специфически связывается с конканавалином А (Con A) и не реагирует с галактозоспецифичным лектином из *Ricinus communis* (RCA<sub>1</sub>). Эти реакции с лектинами позволяют контролировать как реакцию окисления концевых углеводных остатков, так и включение остатков галактозы в окисленный периодатом натрия фермент.

Предлагаемый метод галактозилирования амилоглюкозидазы включает в себя два основных этапа. На первом из них проводили периодатное окисление углеводного компонента фермента, в результате которого происходит модификация как концевых углеводных остатков, так и остатков внутри цепи, содержащих вицинальные диольные группировки. В результате окисления образуются альдегидные группы в количестве 2 моль на 1 моль окисленных остатков. Далее окисленная периодатом натрия амилоглюкозидаза подвергается восстановительному аминированию галактопиранозил-β-D-(1-4)-1-дезоксип-1-аминсорбитом (лактитоламином) в присутствии восстановителя — цианборгидрида натрия.

Для выбора оптимальных условий окисления углеводных остатков в составе амилоглюкозидазы изучено влияние различных концентраций окислителя и времени реакции. Как выяснилось (рис. 1), для полного окисления углеводной части фермента достаточна концентрация периодата натрия, равная 25 мМ. Дальнейшее увеличение концентрации окислителя не приводит к заметному возрастанию количества альдегидных групп. Изучение зависимости степени окисления амилоглюкозидазы от времени реакции показало (рис. 2), что для практически полного окисления углеводного компонента при действии 25 мМ раствора NaIO<sub>4</sub> достаточно 60 мин. Следует отметить удовлетворительное совпадение результатов определения альдегидных групп титриметрическим методом с использованием гидрохлорида гидроксиламина и методом Парка и Джонсона (см. «Экспериментальную часть»). Первый из них основан на реакции альдегидов с гидроксиламином с образованием оксимов и освобождением эквивалентного количества HCl, второй — на свойстве альдегидов восстанавливать гексацианоферрат (III) в гексацианоферрат (II). Совпадение количества альдегидных групп, определенного этими методами, по-видимому, свидетельствует о корректности результатов определения.

Полноту окисления остатков сахаров, обеспечивающих связывание амилоглюкозидазы с Con A, контролировали по изменению способности окисленного периодатом фермента специфически адсорбироваться на Con A-сефарозе и элюироваться с носителя раствором метил-α-D-маннопираноза. Как видно из рис. 3, нативная амилоглюкозидаза полностью связывается с Con A-сефарозой и элюируется при концентрации метил-α-D-маннозида 36 мМ (пик А). После полного окисления 25 мМ NaIO<sub>4</sub> основная часть фермента (84%) полностью теряет способность связываться с лектином (пик Б<sub>1</sub>), а оставшаяся часть элюируется при концентрации метил-α-D-маннозида 2 мМ. Исходя из результатов хроматографии окисленной амилоглюкозидазы на Con A-сефарозе, можно предположить, что фермент состоит по крайней мере из двух форм, условно обозначенных нами Б<sub>1</sub> и Б<sub>2</sub> (рис. 3), различающихся по структуре углеводного компонента. Остаточная способность формы Б<sub>2</sub> связываться с Con A-сефарозой объясняется, по-видимому, сохранением внутрицепочечных остатков маннозы, устойчивых к действию окислителя и сохраняющих способность реагировать с лектином.

Сравнительное изучение некоторых ферментативных свойств исходной и окисленной амилоглюкозидазы касалось оптимума pH работы фермента и pH-стабильности с использованием окисленного фермента, полученного в наиболее жестких условиях окисления — 5 ч при концентрации NaIO<sub>4</sub> 100 мМ (рис. 4, 1, 2; рис. 5, 1, 2). Окисление фермента в этих условиях не оказывает существенного влияния на его удельную активность и pH-стабильность. Следует отметить, что аналогично наблюдаемому нами

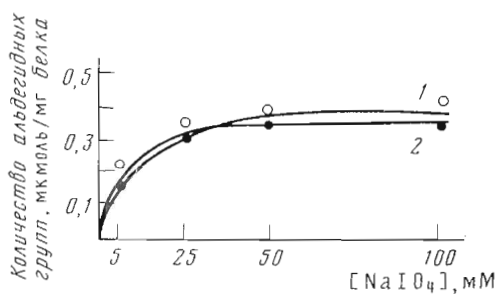


Рис. 1

Рис. 1. Окисление амилоглюкозидазы под влиянием различных концентраций  $\text{NaIO}_4$  (продолжительность реакции 5 ч): 1 — определение альдегидных групп с использованием  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , 2 — определение методом Парка — Диконсона

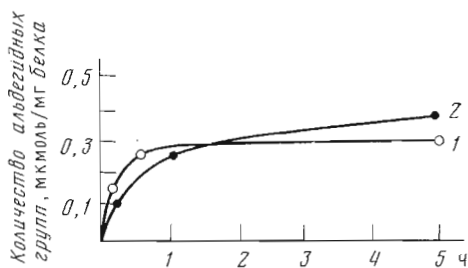


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость степени окисления амилоглюкозидазы 25 мМ  $\text{NaIO}_4$  от продолжительности реакции: 1 — определение с использованием  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , 2 — определение методом Парка — Диконсона

окисление ферментов-гликопротеидов — *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-гексозаминидазы из фибробластов кожи человека [15],  $\beta$ -глюкуронидазы и *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-глюкозаминидазы из печени крысы [16], а также  $\alpha$ -глюкозидазы печени человека [17] 0,7–11 мМ периодатом натрия приводило к уменьшению [15, 16] или к полному исчезновению [17] сродства этих ферментов к *Sol A*. В то же время такая обработка существенно не влияла на ферментативную активность и стабильность гликозидазы (исключение составила *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-глюкозаминидаза из печени крысы, окисление которой сопровождалось потерей 50% исходной активности [16]).

Включение остатков галактозы (в составе лактитоламина) в амилоглюкозидазу подтверждается положительной реакцией преципитации галактозилированного фермента с  $\text{RCA}_1$ . Образование преципитата ингибировалось 0,1 М лактозой. Исходный фермент и окисленная периодатом амилоглюкозидаза не образовывали преципитата с этим лектином. Кроме того, если исходный фермент не задерживается на  $\text{RCA}_1$ -сефарозе, то галактозилированная амилоглюкозидаза полностью адсорбируется на этом носителе и элюируется с колонки 0,1 М лактозой (рис. 6).

О количестве остатков галактозы, включенных в состав периодат-окисленного фермента, в зависимости от продолжительности восстановительного аминирования судили по величине радиоактивности фермента, галактозилированного [ $^3\text{H}$ ]лактитоламином (рис. 7). Максимальное включение наблюдалось через 6 ч. В различных экспериментах степень включения лактитоламина в состав амилоглюкозидазы колебалась от 71 до 85% от общего числа альдегидных групп.

Из рис. 4, 3 и 5, 3 видно, что реакция восстановительного аминирования лишь в незначительной степени изменяет рН-зависимость активности и стабильности модифицированного фермента. Эти изменения касаются в основном кислых областей рН, при которых наблюдается некоторое снижение удельной активности и рН-стабильности модифицированного фермента.

Аналогичное изменение лектиновой специфичности амилоглюкозидазы при незначительном изменении ее ферментативных свойств мы наблюдали также при применении в качестве лиганда *n*-аминофенил- $\beta$ -*D*-галактопиранозид. В этом случае использовали немеченый лиганд и включение его в состав окисленного периодатом натрия фермента контролировали при помощи как  $\text{RCA}_1$ , так и антисыворотки к *n*-аминофенил- $\beta$ -*D*-галактозному гаптену (см. «Экспериментальную часть»). При анализе методом двойной иммунодиффузии в геле агарозы мы наблюдали образование полосы преципитации между галактозилированным ферментом и антисывороткой, тогда как результаты реакции при использовании исходной или периодат-окисленной амилоглюкозидазы были отрицательными.

В результате галактозилирования амилоглюкозидазы описанным выше методом фермент изменяет свою лектиновую специфичность: с одной сто-

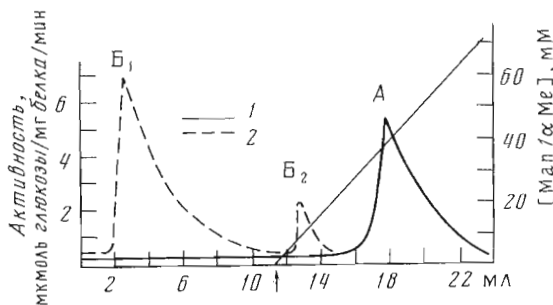


Рис. 3. Хроматография амилоглюкозидазы до (1) и после (2) окисления 25 мМ  $\text{NaIO}_4$  на Сеп А-сефарозе (стрелка — начало элюции буфером А, содержащим метил- $\alpha$ -D-маннопиранозид в линейно возрастающей концентрации)

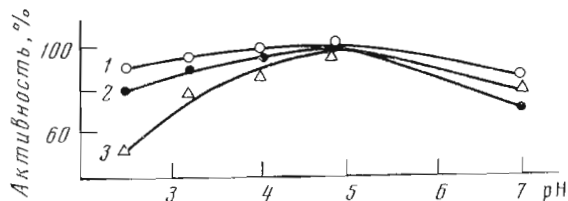


Рис. 4. pH-Зависимость активности исходной амилоглюкозидазы (1), амилоглюкозидазы после окисления 100 мМ  $\text{NaIO}_4$  в течение 5 ч (2) и после включения остатков галактозы (3)

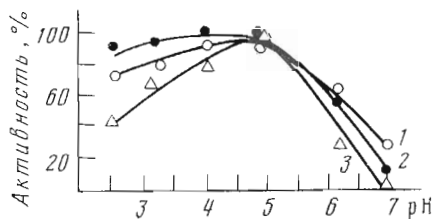


Рис. 5. pH-Стабильность амилоглюкозидазы на различных стадиях модификации (обозначения те же, что и на рис. 4)

роны, теряет способность связываться с  $\text{Con A}$  (это касается формы  $B_1$  фермента), с другой — приобретает способность связываться с  $\text{RCA}_1$ . Галактозилирование незначительно изменяет ферментативные свойства амилоглюкозидазы. По нашему мнению, это объясняется тем, что модификация практически не затрагивает пептидного кора фермента и связана лишь с изменением структуры его углеводного компонента. Достоинством предлагаемого метода является относительная быстрота и эффективность восстановительного аминирования по сравнению, например, с реакцией восстановительного аминирования при присоединении мальтозы к бычьему сывороточному альбумину под действием цианборгидрида в работе [18]. Авторы этой работы отмечают, что включение мальтозы по 15 из 59 остатков Lys в бычьем сывороточном альбумине происходило только через 200 ч реакции восстановительного аминирования при  $37^\circ\text{C}$ .

При выборе метода химической модификации тех или иных ферментов с целью включения в их состав новых углеводных остатков и придания им маркерных свойств важно учитывать, что большинство лизосомных гидролаз млекопитающих является гликопротеидами [19]. Как уже отмечалось, изменение маркерных свойств таких ферментов требует модификации природных концевых остатков углеводов и включения новых углеводных маркеров. Именно эта задача, как нам кажется, может быть решена с помощью предлагаемого химического метода изменения маркерных свойств

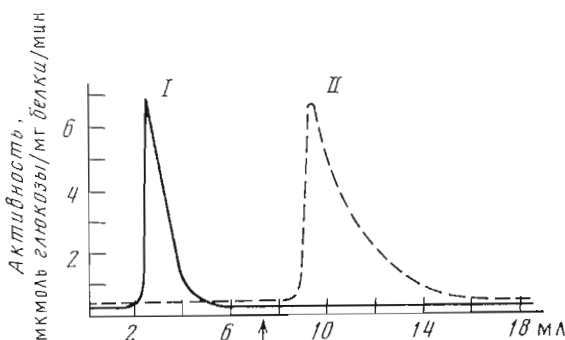


Рис. 6. Хроматография исходной (I) и галактозилированной (II) амилоглюкозидазы на  $RCA_1$ -сефарозе (стрелка — начало элюции 0,15 М раствором NaCl, содержащим 0,1 М лактозу)

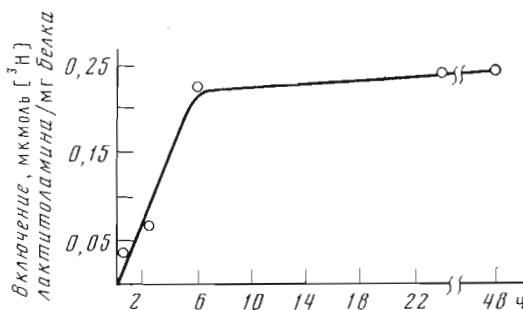


Рис. 7. Включение остатков галактозы в амилоглюкозидазу, окисленную 25 мМ  $NaIO_4$  (1 ч, 4° С)

ферментов гликопротеидной природы, направленное гликозилирование которых необходимо при разработке подходов к коррекции лизосомных болезней накопления.

### Экспериментальная часть

Амилоглюкозидаза (глюкоамилаза, КФ 3.2.1.3) из *Aspergillus* (Koch-Light, Англия) частично очищена хроматографией на колонке с  $Con A$ -сефарозой (Pharmacia, Швеция) с целью получения фермента, обладающего наибольшим сродством к  $Con A$ . Для этого 5 г препарата фермента (3 ед. акт./мг белка) суспендировали в 100 мл 0,05 М ацетатного буфера (рН 5,0), содержащего 0,15 М NaCl, перемешивали 30 мин и центрифугировали при 10 000g, осадок промывали тем же буфером, центрифугировали, объединяли надосадочную жидкость и наносили на колонку с  $Con A$ -сефарозой объемом 20 см<sup>3</sup>.  $Con A$ -сефароза была предварительно уравновешена буфером А (0,1 М ацетатный буфер (рН 5,5), содержащий 1,0 М NaCl, 1 мМ  $MnCl_2$  и 1 мМ  $CaCl_2$ ). Десорбцию связанной с  $Con A$ -сефарозой амилоглюкозидазы осуществляли буфером А с 0,2 М метил- $\alpha$ -D-маннопиранозидом (Chemapol, Чехословакия). Скорость нанесения образца на колонку, а также скорость элюции равнялась 18 мл/ч. Фракции, обладающие активностью амилоглюкозидазы, объединяли, белок отделяли от низкомолекулярных соединений, сгущали фильтрованием через мембранный фильтр РМ-10 в ячейке Amicon и затем высушивали лиофилизацией.

Галактозооксидаза из низших грибов (КФ 1.1.3.9; 25 ед. акт./мг белка) любезно предоставлена И. Я. Захаровой (Институт микробиологии и вирусологии АН УССР);  $RCA_1$ , выделенный по методу [20], получен от Н. Д. Габриэлян (Институт биоорганической химии АН СССР). Использовали периодат натрия (Мерск, ФРГ), боргидрид натрия, мальтозу, лактозу, галактозу (Союзреактив, СССР); [<sup>3</sup>H]боргидрид натрия (Изотоп, Ленинград), цианборгидрид натрия (Fluka, Швейцария). *n*-Аминофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид получен из коммерческого препарата *n*-нитрофенил-

$\beta$ -D-галактопиранозида (Сhemapol, ЧССР) методом прямого гидрирования в метаноле в течение 6 ч в присутствии платинового катализатора по методу [21].

RSA<sub>1</sub>, иммобилизованный на BrCN-активированной сефарозе 4В, и кроличья антисыворотка к бычьему сывороточному альбумину с ковалентно присоединенными остатками *p*-аминофенил- $\beta$ -D-галактопиранозида были получены и любезно предоставлены нам Д. М. Беленьким (Институт биологической и медицинской химии АМН СССР).

*Определение активности амилоглюкозидазы.* Реакционная смесь объемом 0,3 мл содержала 40 мкмоль ацетатного буфера (рН 5,0), 4,4 мкмоль мальтозы и нативную или химически модифицированную амилоглюкозидазу (1–4 мкг белка). Инкубацию проводили 15 мин при 37°С, реакцию останавливали прогреванием смеси в кипящей водяной бане в течение 3 мин. Количество образовавшейся глюкозы определяли глюкозооксидазным методом [22].

При изучении рН-зависимости активности амилоглюкозидазы применяли описанный выше метод определения активности с использованием 0,1 М цитратно-фосфатного буфера с рН 2,6; 3,2; 4,1; 5,1; 6,2 и 7,0. Для исследования рН-стабильности фермента преинкубировали амилоглюкозидазу в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере при указанных значениях рН в течение 1,5 ч при 20°С, после чего определяли активность амилоглюкозидазы в 0,2 М ацетатном буфере.

Периодатное окисление амилоглюкозидазы (5 мг) проводили в 0,2 М ацетатном буфере (рН 5,0) при концентрации NaIO<sub>4</sub> 5–100 мМ при 4°С в темноте. Время окисления варьировали от 5 мин до 5 ч. Реакцию останавливали нанесением смеси на колонку с биогелем Р-4 объемом 70 см<sup>3</sup> для отделения фермента от низкомолекулярных компонентов. Определение альдегидных групп в составе амилоглюкозидазы (см. рис. 2) проводили титриметрическим методом с использованием 1,0 М NH<sub>2</sub>OH·HCl при рН 3,05 [23], а также методом Парка и Джонсона [24].

Содержание белка определяли спектрофотометрически по величине оптического поглощения при 280 нм, так как установлено, что наличие альдегидных групп в составе окисленного периодатом фермента мешает определению белка методом Лоури. При концентрации нативной амилоглюкозидазы 1 мг/мл, определенной методом Лоури, величина A<sub>280</sub> составила 1,6.

*Галактопиранозил- $\beta$ -(1-4)-1-дезоксигалактозил-1-аминосорбит (лактозиламин).*  
а) *получение галактопиранозил- $\beta$ -(1-4)-1-дезоксигалактозил-1-аминоглюкозы (лактозиламина).* Суспендировали 17 г лактозы в 280 мл метанола, насыщенного аммиаком при 0°С, и перемешивали при этой температуре до полного растворения. Смесь оставляли для кристаллизации на 12 сут при 4°С. Кристаллы отфильтровывали, промывали холодным метанолом и высушивали в вакууме. Получено 3,2 г лактозиламина (выход 19%). Продукт дает положительную реакцию с вингидриновым реактивом. ТСХ (Silufol, ЧССР) в системах метанол — хлороформ (5 : 1) и метилэтилкетон — муравьиная кислота — трет-бутанол — вода (6 : 3 : 8 : 3). R<sub>f</sub> 0,23 и 0,30 соответственно.

б) *восстановление лактозиламина.* К раствору 50 мг NaBH<sub>4</sub> в 1,5 мл диметилсульфоксида (свежеперегнанного над КОН) добавляли 50 мг лактозиламина и выдерживали 24 ч при 20°С, добавляли дауэкс 50×8 (H<sup>+</sup>); после окончания выделения H<sub>2</sub> смесь наносили на колонку с дауэксом 50×8 (H<sup>+</sup>) объемом 25 см<sup>3</sup>, промывали 100 мл H<sub>2</sub>O, элюировали лактилоамин 0,5 М водным аммиаком. Аммиак удаляли многократной отгонкой в вакууме с метанолом. Дальнейшую очистку проводили с использованием препаративной хроматографии на бумаге Whatman № 3 в системе растворителей этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода (5 : 5 : 1 : 3). Выход продукта составил 70–75% по данным реакции с фенол-сернилотным реактивом [25] и анализа продуктов кислотного гидролиза галактозооксидазным методом [26].

*Синтез [<sup>3</sup>H]лактозиламина* проводили по описанной выше методике с использованием [<sup>3</sup>H]боргидрида натрия с удельной радиоактивностью 290 мКи/ммоль. Величину радиоактивности образцов измеряли в сцинтилляционном счетчике Mark II с использованием сцинтиллятора ЖС-8. Эф-

фективность счёта составила 40%. Радиоактивный продукт идентифицирован как лактитоламин по данным хроматографии на бумаге до и после кислотного гидролиза (0,1 н.  $H_2SO_4$ , 7 ч,  $100^\circ C$ ) в системе растворителей этилацетат — пиридин — уксусная кислота — вода (5:5:1:3). Удельная радиоактивность [ $^3H$ ]лактитоламина составила 12,3 мКи/ммоль.

Включение [ $^3H$ ]лактитоламина в окисленную периодатом натрия амилоглюкозидазу (реакция восстановительного аминирования). В типичном случае реакционная смесь объемом 0,6 мл содержала 14,3 мкмоль [ $^3H$ ]лактитоламина, 159 мкмоль цианборгидрида натрия, 0,5 мг окисленной амилоглюкозидазы с содержанием альдегидных групп 0,1–0,35 мкмоль/мг белка в 165 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 6,5). Время реакции при  $20^\circ C$  варьировали от 15 мин до 48 ч (рис. 7); реакцию останавливали нанесением смеси на колонку с биогелем Р-4 (объемом 70 мл). При этом фермент отделяли от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси.

Включение *n*-аминофенил- $\beta$ -D-галактопиранозида в окисленную амилоглюкозидазу и выделение модифицированного белка проводили аналогично.

Хроматографический анализ исходной и окисленной амилоглюкозидазы (0,2 мг) проводили на колонке с *Соп А*-сефарозой объемом 1,7 см<sup>3</sup> в буфере А. Десорбцию фермента осуществляли линейным градиентом концентрации метил- $\alpha$ -D-маннопиранозида (0–0,08 М) в буфере А (рис. 3).

Хроматографию исходного и галактозиллированного фермента (0,2 мг) проводили на колонке с *RCA*<sub>1</sub>-сефарозой объемом 1,5 см<sup>3</sup> в 0,15 М NaCl. Десорбцию осуществляли 0,1 М лактозой в 0,15 М NaCl.

Авторы выражают глубокую благодарность Д. М. Бельскому за постоянный интерес и помощь в настоящей работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Paigen K.* In: *Lysosomes and lysosomal storage diseases*/Ed. Callahan Y. W. N. Y.: Raven Press, 1981, p. 1–15.
2. *Розенфельд Е. Л.* Успехи биол. химии, 1982, т. 22, с. 167–185.
3. *Видершайн Г. Я.* Биохимические основы гликозидозов. М.: Медицина, 1980. 287 с.
4. *Holcenberg J. S.* Ann. Rev. Biochem., 1982, v. 51, p. 795–812.
5. *Видершайн Г. Я.* Вopr. мед. химии, 1982, т. 28, вып. 3, с. 22–31.
6. *Ashwell G., Harford J.* Ann. Rev. Biochem., 1982, v. 51, p. 531–554.
7. *Видершайн Г. Я.* Успехи биол. химии, 1979, т. 20, с. 46–70.
8. *Brown T. L., Henderson L. A., Thorpe S. R., Baynes J. W.* Arch. Biochem. and Biophys., 1978, v. 188, № 2, p. 418–428.
9. *Ashwell G., Morell A.* Trends Biochem. Sci., 1977, v. 2, p. 76–78.
10. *Hudgin R. L., Pricer W. E., Ashwell G. J.* Biol. Chem., 1974, v. 249, № 17, p. 5536–5543.
11. *Stockert R. J., Morell A. G., Scheinberg I. H., Einstein A.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 68, № 3, p. 988–993.
12. *Prieels J.-P., Pizzo S. V., Glasgow L. R., Paulson J. C., Hill R. L.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 5, p. 2215–2219.
13. *Stowell C. P., Lee Y. C.* Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1980, v. 37, p. 225–281.
14. *Aplin J. D., Wriston J. C.* CRC Crit. Rev. Biochem., 1981, v. 10, № 4, p. 259–306.
15. *Hickman S., Sapiro L. J., Neufeld E. F.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 57, № 1, p. 55–61.
16. *Stahl P., Six H., Rodman J. S., Schlesinger P., Tulsiani D. R. P., Touster O.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 11, p. 4045–4049.
17. *Мухайлов В. И., Бельский Д. М.* Вopr. мед. химии, 1982, т. 28, вып. 3, с. 48–49.
18. *Schwartz B. A., Gray G. R.* Arch. Biochem. and Biophys., 1977, v. 181, № 2, p. 542–549.
19. *Wiederschain G. Ya.* Adv. Clin. Enzymol., 1982, v. 2, p. 150–157.
20. *Луцки М. Д., Панасюк Е. М., Луцкий А. Д.* Лектины. Львов: изд-во ЛГУ, 1981.
21. *McBroom C. R., Samanen C. H., Goldstein I. J.* Methods Enzymol., 1972, v. 28, p. 212–219.
22. *Лукомская И. С., Городецкий В. К.* Биохимия, 1961, т. 26, вып. 3, с. 477–482.
23. *Strole U.* Macromolekulare Chemie, 1956, B. 20, S. 19–23.
24. *Park J. T., Johnson M. J. J.* Biol. Chem., 1949, v. 181, № 1, p. 149–153.
25. *Dubois M., Giller K., Hamilton J., Rebers P., Smith F.* Anal. Chem., 1956, v. 28, p. 350–356.
26. *Кук Дж.* В кн.: Биохимическое исследование мембран/Ред. Мэдди Э. М.: Мир, 1979, с. 288–289.

Поступила в редакцию  
18.VII.1984  
После доработки  
4.IX.1984

INCORPORATION OF GALACTOSE RESIDUES INTO CARBOHYDRATE MOIETY  
OF AMYLOGLUCOSIDASE FROM *ASPERGILLUS* ACCOMPANIED BY CHANGES IN  
LECTIN SPECIFICITY OF THE ENZYME

MIKHAILOV V. I., SEMENYUK Ye. P., WIEDERSCHAIN G. Ya.

*Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical  
Sciences of the USSR, Moscow*

Chemical modification of enzymes of glycoprotein nature leading to changes in their lectin specificity was demonstrated using amyloglucosidase from *Aspergillus*. Modification involves two steps. At the first one, the glycoprotein was subjected to periodate oxidation; at the second, the oxidized enzyme was condensed with galactosides containing the amino group in their aglycon portion, in particular, with galactopyranosyl- $\beta$ -(1-4)-1-deoxy-1-aminosorbitol. For this purpose, reductive amination in the presence of sodium cyanoborohydride was employed. As a result of modification, some changes in the lectin specificity of the enzyme were observed: on one side, it lost the ability to bind to concanavalin A; on the other side, it acquired affinity for the galactose-specific lectin RCA<sub>1</sub>. Modification did not lead to essential changes in the specific activity, pH optimum or pH stability of the modified enzyme.