



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 18 * № 4 * 1992

УДК 577.154.26.02+543.31

© 1992 г. *Л. А. Елякова, П. С. Дмитренок*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВТОРИЧНО-ИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ СОСТАВА СМЕСЕЙ ГЕНЦИООЛИГОСАХАРИДОВ И ИХ АЦЕТАТОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ГИДРОЛИЗОМ ПУСТУЛАНОВ

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

Проведено сравнительное исследование структуры пустуланов из лишайников *Umbilicaria rossica* и *Haeumatoma laponicum*, различающихся по содержанию ацетатных групп. Полученные после ферментативной деградации (под действием эндо- β -1,6-глюканазы P_0 из морского моллюска *Chlamys albida*) фракции генциоолигосахаридов (ОС) были охарактеризованы по олигосахаридному составу тремя методами: аналитической гель-фильтрацией на биогеле P-2 JEOL JLC-6AH-анализатора; жидкостной хроматографией на колонке Durrgum DA-XB-II углеводного анализатора Biotronik в системе боратных буферов; SI-масс-спектрометрией. Показано, что последним методом можно быстро определять наличие во фракциях генциоолигосахаридов и их ацетатов, а при введении предложенных поправочных коэффициентов для содержания соответствующего ОС в SIMS-анализе (для $G_2 = 0,5$, $G_3 = 1$, $G_4 = 2$, $G_5 = 3$, $G_6 = 4$) возможно полуколичественно характеризовать состав ОС. Выяснена лучшая доступность ферментативному разрыву пустуланазой P_0 менее ацетилированных участков β -1,6-глюканов.

Известно, что природные β -1,6-глюканы лишайников — пустуланы — в той или иной мере ацетилированы по C-3-положению [1, 2]. Мы провели сравнительное исследование структуры двух пустуланов: из *Umbilicaria rossica* (U), выделенного нами по методу [3], и из *Haeumatoma laponicum* (H), выделенного по методу [4], образец которого был любезно предоставлен нам Л. С. Степаненко *. По содержанию ацетатных групп (данные микронализа) препараты пустуланов U и H различались (4 и 0,2% соответственно). Был проведен ферментолиз пустуланов U (двух образцов: U-1 и U-2) и H действием эндо- β -1,6-глюканазы из *Chlamys albida*, обозначаемой далее P_0 [5]. Сумму продуктов ферментолиза осаждали 3,5 объема этанола. Последующее разделение осажденных таким образом генциоолигосахаридов (ОС) на биогеле P-2 (1,6×130 см) позволило выделить фракции 1–5 со средними степенями полимеризации (СП) от 2 до 7 и отделить высшие олигосахариды, выходящие со свободным объемом колонки.

Эти фракции, а также оставшиеся в супернатанте неосажденными мелкими олигосахариды были сравнены по составу (табл. 1–3) тремя методами: 1) аналитической гель-фильтрацией на биогеле P-2 Jeol JLC-6AH-анализатора с обнаружением сахаров орцин-сернокислотным реагентом; 2) жидкостной хроматографией на углеводном анализаторе Biotronik (ионообменная смола Durrgum DA-XB-II) в системе боратных буферов с обнаружением углеводов бицинхоновым реагентом по восстановляющим концам; 3) вторично-ионной масс-спектрометрией (SIMS), в последнее время нашедшей применение в анализе олигосахаридов [6].

* ТИБОХ ДВО.

Таблица 1

Сравнение полученных и рассчитанных результатов SIMS-анализа генциоолигосахаридов из супернатанта пустулана Н с данными других методов

СП	SIMS *		Jeol (J)	Biotronik (B)
	прямой (S)	в пересчете с предла- гаемыми коэффициен- тами ** (S')		
2	29,7	9,5(0,5)	8	11,5
3	19,5 ***	12,0(1)	11	28,0
4	27,2	34,0(2)	38	45,0
5	10,6	20,0(3)	22	15,4
6	6,8	18,0(4)	25	
7	2,1	6,0(5)	4	
2	32,0	12,3	11,0	11,5
3	21,0	16,0	15,5	28,0
4	29,8	46,0	53,5	45,0
5	11,7	29,3	31,0	15,4

* Интенсивность пиков отдельных ОС в процентах по отношению к сумме интенсивностей всех значимых пиков в спектре.

** Коэффициент приведен в скобках; пересчет см. «Экспер. часть».

*** Содержится еще 4,3%monoацетата G_3 (см. табл. 3). Нижняя часть таблицы представляет данные того же самого анализа, но в пересчете без учета олигосахаридов с СП > 5 (для методов S, S' и J).

Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки. Так, разделение на биогеле P-2 (Jeol) наиболее полно характеризует состав углеводов смеси по СП, но не отличает олигосахариды от их ацетилированных производных. Разделению на смоле Durrum (Biotronik) в боратных буферах подвергались только олигосахариды с малой СП (2–5). Наконец, SI-масс-спектрометрия отмечала последний предел масс, соответствующий гентамеру ($G_7 + Na^+$, $M = 1175$). Здесь генциоолигосахариды и их ацетаты фиксировались как молекулярные аддукт-ионы $M + Na^+$ (иногда отмечались миорные пики $M + H^+$ и $M + Na^+ - H_2O$) и уверенно были различимы олигосахариды и их производные с одной, двумя и тремя ацетатными группами (табл. 3).

Анализ выявил различия между неосаждаемыми этанолом низкомолекулярными олигосахаридными фракциями пустуланов Н и У по количеству содержащихся в них ацетилированных форм (Н содержит 0,47% ацетатов, У – от 1 до 2,3%). В соответствии с этим в SIMS-анализе низкомолекулярных фракций из продуктов ферментативного гидролиза У-1-пустулана процентное соотношение суммы всех неацетилированных олигосахаридов к ацетилированным составляло 70 : 30, У-2-пустулана – 80 : 20, тогда как для аналогичной фракции из Н-пустулана – 96 : 4 (табл. 3). Так как содержание ацетилированных ОС в низкомолекулярной фракции из Н-пустулана ничтожно, эта фракция была взята в качестве контрольной смеси при разделении на углеводных анализаторах Jeol и Biotronik. Для идентификации пиков на Biotronik (рисунок) мы имели только глюкозу и генциобиозу, время удерживания (τ) которых на смоле Durrum в используемом режиме было 108 и 125 мин соответственно. Олигосахариды с СП 3, 4, 5 были предположительно идентифицированы по времени выхода с колонок анализатора из результатов построения зависимости $lg \tau$ от СП (без учета τ для глюкозы). Таким образом, генциотриозе (G_3) мы приписали пик с $\tau = 96$, генциотетраозе (G_4) – 85, генциопентаозе (G_5) – 65–67 мин. В этом случае качественный состав смеси по анализу на Biotronik приблизительно совпадает с незави-

Таблица 2

Сравнение результатов анализа смесей генциоолигосахаридов тремя методами*

Спц	Супернатант U-1				Супернатант U-2				Осадок U-1, разделенный на биогеле P-2 **							
									Фракция 2				Фракция 3			
	S	S'	J	B	S	S'	J	B	S	S'	J	B	S	S'	J	B
2	35,0	23,6	25,6	14,9	36,5	20,4	21	15	40,5	21,5	24	16	Следы	1,1	Нет	5
3	14,8	21,0	20,4	27,0	15,5	17,4	12	21	25,7	28,0	30	15	10,2	11,0	8	5
4	18,7	51,3	45,0	55,0	22,7	51,0	48	55	18,7	40,0	38	49	21,5	47,1	31	33
5	1,1	4,6	9,0	1,5	3,3	11,1	11	9	3,4	11,0	3	4	7,2	23,0	26	10
6	Следы				1,5								4,1	17,0	33	15

* Обозначение методов см. табл. 1.

** См. табл. 3.

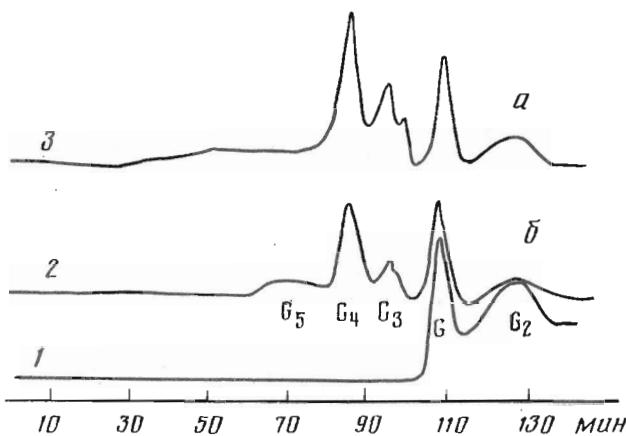
Таблица 3

Интенсивность пиков квазимолекулярных ионов в SIMS-анализе продуктов ферментативного гидролиза пустуланов

Олигосахарид	Молекулярная масса	Пустулан U-1						Супернатант пустуланов	
		фракции осадка, разделенного на биогеле Р-2				супернатант			
		1	2	4	5	фр. А *	фр. В *	U-2	H
G ₂ +Na ⁺	365	77	40,4	11,0	След	35,0	14,8	36,5	29,7
G ₂ +Na ⁺ +Ac	407		След.	8,0		5,3	14,2	6,0	
G ₃ +Na ⁺	527	16	25,7	12,4	10,2	14,8	След	15,5	19,5
G ₃ +Na ⁺ +Ac	569		7,8	7,0	11,2	7,2	10,2	5,4	4,3
G ₃ +Na ⁺ +2Ac	611	7			8,2	1,6	10,2		
G ₄ +Na ⁺	689		18,7	46,3	21,5	18,7	След.	22,7	27,2
G ₄ +Na ⁺ +Ac	731		4,0	8,0	11,2	6,4	6,6	6,0	
G ₄ +Na ⁺ +2Ac	773					1,1	13,1		
G ₄ +Na ⁺ +3Ac	815						4,1		
G ₅ +Na ⁺	851		3,4	3,4	7,2	1,1	След	3,3	10,6
G ₅ +Na ⁺ +Ac	893			2,0	11,2	1,6	»	1,8	
G ₅ +Na ⁺ +2Ac	935				5,1	6,6	10,3		
G ₅ +Na ⁺ +3Ac	977						4,4		
G ₆ +Na ⁺	1013			1,3	4,1	След		1,5	6,8
G ₆ +Na ⁺ +Ac	1055			4,0	6,4	0,53		1,4	
G ₆ +Na ⁺ +2Ac	1097				3,6	0,21	7,4		
G ₆ +Na ⁺ +3Ac	1139						4,7		
G ₇ +Na ⁺	1175							След	2,1
Glc _n /Glc _n OAc, %		100/0	88,2/11,8	74/26	43/ 56,9	69,6/30,5	14,8/85,2	79,5/20,6	95,9/4,3
CII **		2	2,5	3,3	5	3,2	7,3	3	3
Содержание OAc-групп, %		0,52	2,08	1,05	3,28	2,31	5,9	0,88	0,23
Glc/OAc, моль/моль			10	20	6	8-10	3-4	20	

* Фракции А и В получены дополнительным осаждением олигосахаридов супернатанта U-1 и объемами этанола, причем фракция В осталась вновь в супернатанте.

** Определена из отношения общего количества сахаров (фенол-сернокислотный метод [7]) и количества восстанавливющих групп в аликовите (метод Нельсона [8]).



Анализ генциоолигосахаридов на смоле Durrum DA-N8-11 углеводного анализатора Biotronik: 1 — стандартная смесь глюкозы (G) и генциобиозы (G₂); 2 — супернатант из Н-пустулана; 3 — супернатант из пустулана U-I фракции А. Дополнительные миорные пики, по-видимому, при- надлежат ацетилированным генциоолигосахаридам

симыми результатами анализа этой фракции на колонке P-2 Jeol (табл. 1).

Если считать результаты количественных анализов на Jeol- и Biotronik-анализаторах истинными, видно, что SIMS-анализ этой же смеси дает иные цифры (табл. 1), причем интенсивности пиков квазимолекулярных ионов уменьшаются в ряду: G₂>G₃>G₄>G₅>G₆>G₇, поэтому из результатов SIMS-анализа об истинном количестве ОС с СП 2–7 нельзя было судить. Для полукачественных расчетов результатов SIMS-анализа мы предлагаем подобранные нами эмпирические коэффициенты (для G₂ – 0,5; G₃ – 1; G₄ – 2; G₅ – 3; G₆ – 4), при введении которых результаты SIMS-анализа (табл. 1) становятся сопоставимыми с двумя другими анализами.

Пользуясь этими коэффициентами, мы сравнили составы еще нескольких смесей ОС, получаемые из анализов SIMS, Jeol и Biotronik (табл. 2). И на этих примерах при пересчете с предлагаемыми коэффициентами были получены приблизительно совпадающие результаты (табл. 2). Таким образом, SI-масс-спектрометрией можно быстро полукачественно характеризовать состав генциоолигосахаридов, получаемых при ферментативной фрагментации разных образцов пустулана, по крайней мере для тех случаев, когда количество неацетилированных ОС превалирует над ацетилированными. Остается неясным: в такой ли убывающей пропорции с увеличением массы образовывались в условиях SIMS ацетилированные олигосахариды, как их неацетилированные формы? Из литературы известно [7], что перметильные и перацетильные производные олигосахаридов в условиях FAB-анализа показывают в 10–50 раз большую интенсивность, чем незамещенные олигосахариды, несмотря на увеличение молекулярной массы за счет Me- и Ac-групп. Поэтому количественный состав ацетилированных ОС мы не рассчитывали, а сравнивали только их относительные количества (по отношению к ОС). Результаты SIMS-анализа ОС низкой молекулярной массы, вероятно, зависят от общего состава анализируемой смеси, т. е. от их доли в общем составе фракций.

Выполненные анализы позволили установить следующие закономерности ферментолиза пустуланов эндо- β -1,6-глюканазой Р₀ (см. табл. 1–3).

1. Проведенное аналогичное фракционирование гидролизатов двух образцов U-пустуланов и одного образца Н-пустулана показало, что содержание ацетатов в Н-фракциях было низким и не превосходило 1,8%.

тогда как в U-фракциях достигало максимум 5,5% для одного из U-пустуланов и даже 11,5% — для другого.

2. При осаждении 3,5 объемами спирта в супернатанте остается относительно больше ацетилированных ОС, чем в осадке (вероятно, из-за лучшей растворимости ацетатов ОС в спирте). Так, для приблизительно одинаковых по СП низкомолекулярных фракций в супернатанте U-1-пустулана (СП 3,2) соотношение неацетилированных сахаров к ацетилированным равно ~70/30, тогда как при фракционировании на колонке с биогелем Р-2 осадка U-1 во фракции 1 (СП 2) — 100/следы, а во фракции 2 (СП 2,5) — 88/12. Эта закономерность сохраняется и для более высокомолекулярных фракций: для фракции 5 (СП 5) из осадка U-1 — 43/57, для похожей (СП 7) фракции из супернатанта — 15/85.

3. Гидролизованными до мелких генциолигосахаридов оказались менее ацетилированные участки пустуланов. Действительно, процентное содержание ацетатных групп в низкомолекулярных фракциях меньше. Фракции большей СП (их анализ SIMS- и Biotronik-методами невозможен), сохранившиеся негидролизованными, оказались более ацетилированными. Например, вышеупомянутая фракция с содержанием ацетатных групп 5,5% имела СП 65.

4. Доля ацетилированных продуктов увеличивается с увеличением СП: с СП > 5 количество ацетилированных ОС уже превосходит количество неацетилированных (табл. 3).

5. Интересной особенностью является состав ацетилированных ОС: для биозы присутствует только моноацетат, для триозы и тетраозы — моно- и диацетаты, для пентаозы и гептоозы — моно-, ди- и триацетаты, т. е. всегда имеется по меньшей мере одно неацетилированное звено. Это или отражение действительного строения пустулана из *Umbilicaria rossica*, или проявление специфичности действия фермента, расщепляющего связь рядом с неацетилированным мономером. Если считать, что одна ацетатная группа составляет ~20% молекулярной массы моноацетата глюкозы, в проанализированных нами фракциях одна ацетатная группа приходится максимально на 3—4 молекулы глюкозы (табл. 3). Во всяком случае, более ацетилированные участки, вероятно, не подвергались ферментолизу.

Экспериментальная часть

Получение U-пустуланов. Порцию сухого лишайника дважды экстрагировали водой на кипящей водяной бане в течение 3 и 6 ч. Объединенный экстракт отфильтровывали и пустулан осаждали 3 объемами этанола. Осадок отделяли фильтрованием и сушили. Затем осадок вновь растворяли в воде, нерастворимую часть отделяли фильтрованием и отбрасывали, фильтрат замораживали. После оттаивания хлопья пустулана отделяли центрифугированием, промывали дважды холодной водой, суспендировали в ацетоне, отфильтровывали и сушили. Выход продукта U-1 (темно-серый порошок) составил ~7% от веса лишайника. $M \sim 35$ кДа. При следующем переосаждении 1 объемом спирта из раствора пустулана U-1 выпадал черный осадок — образец пустулана U-2.

Фермент. Эндо- β -1,6-глюканазу Р₀ выделяли как описано в работе [5]. Удельная активность (ед./мг) выражена в микроэквивалентах восстанавливающих сахаров в 1 мин на 1 мг фермента.

Ферментативный гидролиз проводили до практического прекращения нарастания количества восстанавливающих сахаров, образующихся в процессе ферментативной реакции (определение по методу Нельсона [9]).

а) 50 г пустулана U-1 (по взвешиванию) растворяли в 500 мл воды при нагревании (получали густой вязкий раствор). Добавляли 700 мл эндо- β -1,6-глюканазы Р₀ (фракция с колонки SP-сепадекса C-25 с удель-

ной активностью 0,06 ед./мг, концентрацией 2 мг/мл [5]) и 5 мл толуола для предотвращения заражения микробами. После 2 сут инкубации при 20°С заметно разжиженную реакционную смесь осаждали 1 объемом холодного этанола, отделяли 17 г черного осадка. Надосадочную жидкость упаривали на роторном испарителе при 50°С до 300 мл и осаждали 3,5 объемами холодного этанола. Осадок отцентрифугировали (~5 г). Порции осадка (по 100 мг) делили на колонке биогеля P-2 (1,6×130 см), элюировали водой. Супернатант обессоливали на катионите и анионите и упаривали досуха (~7 г).

б) Черную массу U-2 (10 г) растворяли в воде на кипящей водяной бане, нерастворимую часть удаляли фильтрованием сначала через вату, потом через стеклянный фильтр № 1. К 250 мл полученного раствора добавляли 3,5 мл Р_о (фракция с колонки сефадекс G-50 [5], уд. акт. 1,5 ед./мг, концентрация 0,1 мг/мл). Через сутки инкубации при 20°С реакцию останавливали 5-минутным кипячением, охлажденный раствор осаждали 3,5 объемами холодного этанола. Осадок отделяли, супернатант упаривали досуха.

в) 250 мг светлого аморфного порошка Н-пустулана растворяли в 8 мл горячей воды. По охлаждении до 20°С добавляли 1,5 мл Р_о (фракция с колонки сефадекс G-50, уд. акт. 1,5 ед./мг, концентрация 0,1 мг/мл [5]). Инкубацию проводили 4 ч при 20°С. Реакцию останавливали 3-минутным кипячением. После охлаждения добавляли 3,5 объема холодного этанола. Далее — как в пункте «б».

Анализ продуктов реакции проводили:

1. С помощью жидкостного хроматографа Jeol (модель JLС-6АН, Япония) на биогеле P-2 (колонка 0,9×90 см), элюция 0,05 М натрий-ацетатным буфером (рН 5,2) в 0,2 М NaCl со скоростью 7—9 мл/ч. Картины разделения аналогичны приведенным в работе [10]. Сахара определяли колориметрически при 440 нм реакцией с 0,15% раствором орцина в 70% H₂SO₄ при 95°С. Для анализа требовалось ~1 мг продукта. Обсчет хроматограмм проводили вручную, по площади соответствующих пиков.

2. С помощью автоматического анализатора сахаров Biotronik LG 5000 (ФРГ), используя стеклянную термостатированную при 57°С колонку (0,6×25 см) с анионообменной смолой Dittgum DA-XB-II. Углевод-боратные комплексы были элюированы в следующем режиме боратными буферами: А (0,2 М, рН 9,0) — 65 мин, В (0,3 М, рН 10,0) — 50 мин, С (0,8 М, рН 10,0) — 2 мин, с последующей регенерацией (10% K₂B₄O₇, 15 мин) и уравновешиванием колонки буфером А (20 мин). После колонки восстанавливающие углеводы были обнаружены методом, основанным на восстановлении реагента бицинхониат-Cu²⁺-аспарагиновая кислота [11].

3. *Масс-спектрометрией.* Спектры SIMS получали на масс-спектрометре LKB-2091, оснащенном усовершенствованной цезиевой пушкой (разработка Ю. И. Хасина, НТО АН СССР, Ленинград). Первый вариант вушки описан в работе [12]. Ускоряющее напряжение 1,7—2,3 кВ, энергия ионов цезия 6—8 кэВ, ток накала пушки-ионизатора 120 мА. 1—2 мкл раствора образца концентрации 10⁻³—10⁻¹ М смешивали с 1 мкл глицерина на мишени и после откачки в вакуумном шлюзе вводили в ионный источник масс-спектрометра. Спектр оставался стабильным в течение 20 мин. Калибровку шкалы массовых чисел проводили по кластерам глицерина до *m/z* 750, выше — по кластерам CsI. Интенсивность пиков отдельных ОС определяли в процентах по отношению к сумме интенсивностей значимых пиков в спектре. Для полуколичественной оценки состава ОС после переножжения результатов анализа SIMS на соответствующие предлагаемые коэффициенты полученные данные были нормализованы (приведены к 100%).

Содержание ацетатных групп в пустуланах и их фракциях определяли микронализом по методу [13].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kjolberg O., Kvernheim A. L. // Acta chem. scand. 1984. V. 38. № 9. P. 735–739.
2. Nishikawa Y., Tanaka M., Shibata S., Fukuoka F. // Chem. Pharm. Bull. 1970. V. 18. № 7. P. 1431–1434.
3. Heckendorf A. H., Shimizu V. // Phytochemistry. 1974. V. 13. № 4. P. 2181–2183.
4. Максимов О. Б., Горшкова Р. Н., Степаненко Л. С., Мищенко Н. П., Кризоцеко-ва О. Е. // Химия природ. соед. 1990. № 3. С. 400–401.
5. Rudakova V. Ya., Shevchenko N. M., Elyakova L. A. // Comp. Biochem. Physiol. 1985. V. 81B. № 3. P. 677–682.
6. Egge H., Peter-Katalinic J. // Mass-Spectrom. Rev. 1987. V. 6. P. 331–393.
7. Dell A., Ballon C. E. // Carbohydr. Res. 1983. V. 120. № 1. P. 95–111.
8. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. H., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 1. P. 350–356.
9. Nelson N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. № 2. P. 375–381.
10. Назарова Н. И., Ельякова Л. А. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1189–1196.
11. Sinner M., Puls J. // J. Chromatogr. 1978. V. 156. P. 197–203.
12. Хасин Ю. И., Дмитренок П. С., Ельяков Ю. Н. // Научное приборостроение. Л.: Наука, 1990. С. 81–85.
13. Ludowiec J., Doreman A. // Biochim. et biophys. acta. 1960. V. 38. № 1. P. 212–217.

Поступила в редакцию
29.V.1991

После доработки
9.IX.1991

L. A. ELYAKOVA, P. S. DMITRENOV

APPLICATION OF THE SECONDARY ION MASS-SPECTROMETRY FOR DETERMINATION OF COMPOSITIONS OF GENTIOOLIGOSACCHARIDES AND THEIR ACETATES MIXTURES OBTAINED BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PUSTULANES

Pacific Institute of the Bioorganic Chemistry, Far East Division,
Russian Academy of Sciences, Vladivostok

A comparative study of structures of pustulananes from lichens *Umbelicaria rossica* and *Haematoma lapponicum*, which differ in the contents of their acetate groups, has been performed. Gentiooligosaccharide (GOS) fractions obtained after enzymatic degradation (by the action of endo- β -1,6-glucanase P₀ from marine mollusk *Chlamys albidas*) have been characterized by means of analytic gel-filtration on Biogel P-2 of Jeol 5AH-analyser, HPLC on a Durum Da-XB-II column of carbohydrate analyser Biotronik in a system of borate buffers and SI-mass-spectrometry. The last method has been shown to afford quick determination of GOS and their acetates in the fraction and, using suggested correction factors (for G₂ – 0,5; G₅ – 1; G₆ – 2; G₈ – 3; G₉ – 4; where G_n is a percentage of the corresponding GOS in SIMS analysis), gives semiquantitative characterization of the GOS composition. Some regularities of enzymolysis of β -1,6-glycans with pustulanase P₀ (better accessibility for enzymic attack of less acetylated polysaccharide regions) have been elucidated.