



УДК 577.152.321.6.14

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ β-1,3;1,6-ГЛЮКООЛИГОСАХАРИДОВ В СМЕСИ ЛАМИНАРИОЛИГОСАХАРИДОВ

© 1995 г. Л. А. Елякова, Н. И. Назарова

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

Поступила в редакцию 28.12.93 г. После доработки 08.06.94 г.

Показано, что прямые зависимости логарифма времени удерживания (τ) от степени полимеризации (СП) при ВЭЖХ гомологических серий *n*-нитрофенилламинари- (IG_nNp) и -генциоолигозидов (gG_nNp) имеют разные углы наклона: для gG_nNp значительно больше, чем для IG_nNp ; прямая для *n*-нитрофенилгликозидов олигосахаридов смешанной β-1,3;1,6-структуры располагается в промежутке между ними. На основании этого предлагается способ качественного обнаружения и полуколичественного определения β-1,3;1,6-глюкоолигосахаридов при использовании их в качестве доноров (акцептор – GNp) в реакции трансгликозилирования, катализируемой эндо-β-1,3-глюканазой ЛІV, с последующим ВЭЖХ-анализом образующихся продуктов. В качестве примера проведена идентификация веществ в смесях β-1,3;1,6-глюкотри- и тетрамеров, полученных ферментативным гидролизом различными эндо-β-1,3-глюканазами ламинараца. Показано присутствие в смеси триса-

харидов – преимущественно $G-\overset{G}{\underset{|}{G}}$ (6¹-β-*D*-глюкозилламинарибиозы) и небольшой примеси ламина-

ритриозы; в смеси тетрасахаридов – преимущественно $\overset{G}{\underset{|}{G}}-G-G$ (6³-β-*D*-глюкозилламинаритриозы)

и минорное количество $G-\overset{G}{\underset{|}{G}}-G$ (6²-β-*D*-глюкозилламинаритриозы); последняя присутствует также в составе смеси трисахаридов. Данные предлагаемого способа определения состава смесей олигосахаридов (по полученным из них продуктам трансгликозилирования) подтверждены результатами ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии и данными метилирования.

Ключевые слова: β-1,3;1,6-глюкоолигосахариды; эндо-β-глюканазы; трансгликозилирование; ВЭЖХ.

Реакция трансгликозилирования, осуществляемая ламинариназой ЛІV (из *Spizula sachalinensis*), заключается в переносе остатков глюкозы от донора – β-1,3-глюкана (ламинараца) на акцептор *n*-нитрофенил-β-*D*-глюкопиранозид (GNp) с образованием *n*-нитрофенилламинариолигозидов (IG_nNp), которые на хроматограмме ВЭЖХ (“Du Pont”, NH₂-колонка) представлены в виде серии пиков убывающей интенсивности, соответствующих гомологам: IG_2Np , IG_3Np , IG_4Np , IG_nNp [1, 2]. График зависимости логарифма времени удерживания (τ) от степени полимеризации (СП) ламинариолигосахаридов представляет собой прямую линию с определенным углом наклона (рис. 1, прямая б). Времена удерживания *n*-нитрофенилгенциоолигозидов (gG_nNp) на ВЭЖХ-колонке (при тех же условиях хроматографии) значительно больше, и для них подобная прямая имеет больший угол наклона, что установлено из анализа продуктов реакции трансгликозилирования, осу-

ществляемой эндо-β-1,6-глюканазой пестуланазой РО в присутствии β-1,6-глюкана пестулана и GNp (рис. 1, прямая а). Для продуктов реакции переноса ламинариназой ЛІV β-1,3-связанных остатков глюкозы из ламинараца на *n*-нитрофенилгенциобиозид (gG_2Np) – β-1,3;1,6- (IG_n, gG_2Np), где расположение β-1,6-связи на восстанавливаемом конце полученных олигомеров предопределено структурой акцептора, прямая $lg \tau$ от СП попадает, как и ожидалось, в промежуток (заштрихован), ограниченный двумя вышеуказанными стандартными прямыми (рис. 1, прямая в). Это создает предпосылки возможного использования реакции трансгликозилирования для обнаружения и идентификации изомерных β-1,3;1,6-глюкоолигосахаридов в смеси ламинариолигозидов.

Методы разделения изомерных олигосахаридов, число которых с увеличением СП возрастает, разработаны недостаточно. Так, хроматография на бумаге в стандартных условиях

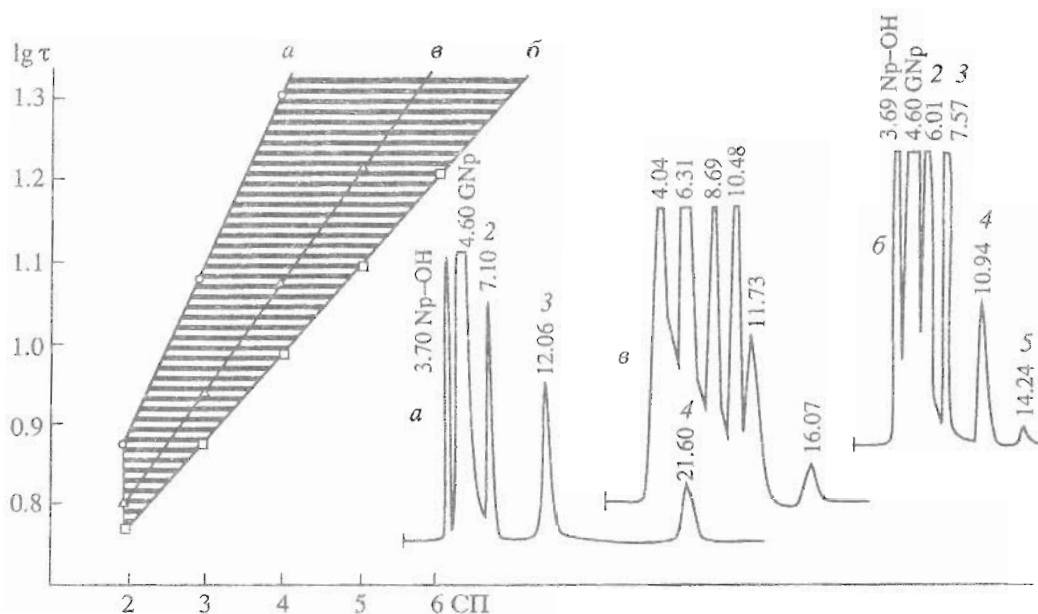


Рис. 1. ВЭЖХ продуктов трансгликозилирования, осуществляемого β -1,6-глюканазой РО (пустуланазой) (а) и β -1,3-глюканазой ЛІВ (б, в) с использованием в качестве доноров пустулана (а) и ламинарана (б, в), а в качестве акцепторов *n*-нитрофенил- β -D-глюкозида (а, б) или *n*-нитрофенилгенциобиозида (в), а также график зависимости $\lg \tau$ от степени полимеризации (СП) продуктов реакций в системах а - в. Обозначены пики, соответствующие известным образцам: *n*-нитрофенол - Np-OH, *n*-нитрофенил- β -D-глюкозид - GNP, *n*-нитрофенилгенцио- и ламинариолигосахариды: gG_2 Np и IG_2 Np (2), gG_3 Np и IG_3 Np (3), gG_4 Np и IG_4 Np (4) и IG_5 Np (5) и их время выхода (τ , мин).

(бутанол-пиридин-вода, 6 : 4 : 3) позволяет достоверно идентифицировать ламинарибиозу (IG_2), тогда как генциобиоза (gG_2) и ламинаритриоза (IG_3) имеют одинаковые R_f . Поэтому изомерные три- и тетрасахариды в смеси с серией неразветвленных ламинариолигосахаридов бумажной хроматографией практически трудно идентифицировать. Анионообменная хроматография серий ламинари-, генцио- и целлоолигосахаридов [3] в качестве препаративного варианта не подходит, так как разделение ведется в щелочных условиях.

В качестве примера применения предлагаемого метода для идентификации β -1,3;1,6-глюко-

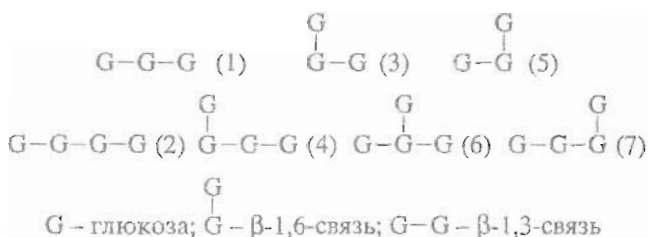


Схема 1. Схематическое изображение всех возможных три- и тетрасахаридов, получающихся при гидролизе используемого ламинарана. Для простоты восприятия генцио-(β -1,6)-связь изображена в виде вертикальной линии независимо от того, как расположена она в цепи: с невозстанавливающего конца молекулы или в виде разветвления.

олигосахаридов мы анализировали продукты реакции ферментативного трансгликозилирования, где донорами служили смеси три- и тетрамеров, накапливающихся (как показано ранее [4]) в результате гидролиза ламинарана ламинариазами ЛІВ и ЛО соответственно (см. схемы 1 и 2). Из схемы 2 следует, что из доноров (1), (2), (5), (6) и (7) в присутствии акцептора *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозида и фермента ЛІВ могут быть синтезированы только *n*-нитрофенилламинариолигозиды (IG_n Np) (при расщеплении по варианту "а", см. подписи к схемам). При введении в реакцию в качестве доноров олигомеров (3), (4) и (6) после расщепления по варианту "б" должны получаться только β -1,6;1,3-связанные Np-глюкозиды.

При рассмотрении ВЭЖХ-картин продуктов, образовавшихся в реакции трансгликозилирования трисахаридной фракции (рис. 2), видно, что получены IG_2 Np и IG_3 Np, что указывает на возможное присутствие в исходной смеси тримеров типа (1) и (5) (схема 1), участвующих в качестве доноров. Наличие третьего пика с τ 9.08 (рис. 2), идентифицируемого как изомер, так как время удерживания его больше, чем у IG_4 Np, и $\lg \tau$ не укладывается на прямую, соответствующую Np-ламинариоглюкозидам (рис. 2д), свидетельствует, что в реакции трансгликозилирования участвовали, вероятно, соединения типа (4) или (6), дающие (после расщепления по варианту "б", см. схему 2)

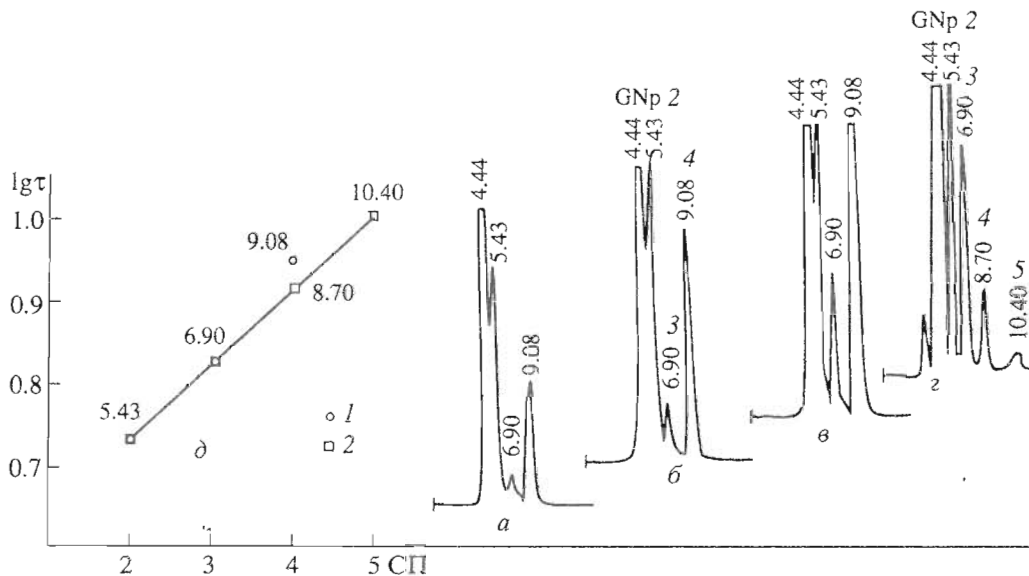


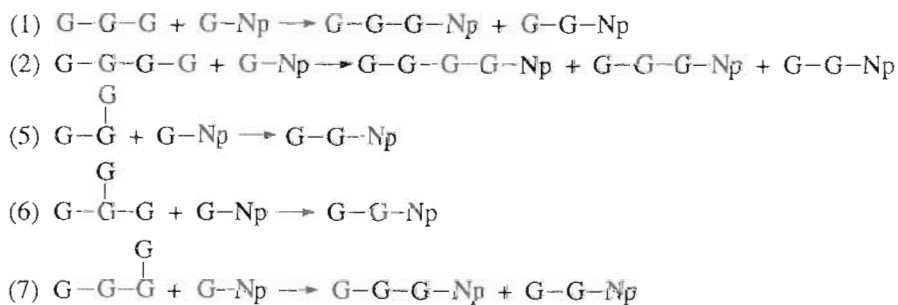
Рис. 2. ВЭЖХ стандартной смеси IG_3Np (2) и продуктов трансгликозилирования, осуществляемого глюканазой ЛІV в смеси фракции трисахаридов и GNp , по достижении степени превращения 1.6 (а), 3.8 (б) и 8% (в). Над пиками – τ , мин; δ – график зависимости $lg(\tau, \text{мин})$ от степени полимеризации для олигосахаридов рис. а - в (1) и 2 (2).

разветвленный тетрамер в качестве продукта реакции.

Состав продуктов реакции трансгликозилирования с тетрамерной фракцией в качестве донора был другим: IG_3Np и два вещества с τ 9.08 и 9.86, $lg \tau$ которых попадает (рис. 3г) в “заштрихованное пространство” (рис. 1), соответствующее β -1,3; 1,6-структурам. Отсутствие здесь IG_2Np на всех ста-

диях реакции дает основание предположить, что в тетрасахаридной фракции отсутствуют ламинариолигосахариды или разветвленные олигомеры, которые в условиях трансгликозилирования были бы расщеплены по варианту “а”. Следовательно, тетрасахаридная фракция была подвергнута трансгликозилированию по варианту “б” (схема 2), в результате чего продуктами могут быть вещества (9) и (10).

вариант “а”



вариант “б”

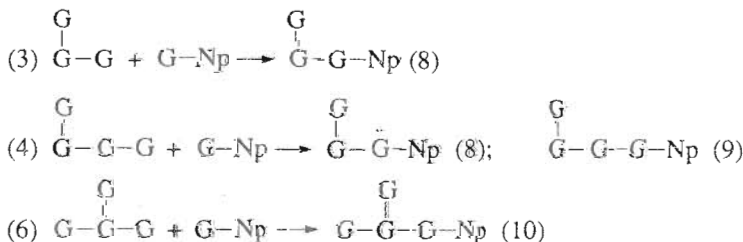


Схема 2. Образование продуктов ферментативного трансгликозилирования при использовании доноров – олигосахаридов (1) - (7) с их расщеплением по варианту “а” (в линейной цепи или “слева” от разветвления) или по варианту “б” (в линейной цепи или “справа” от разветвления).

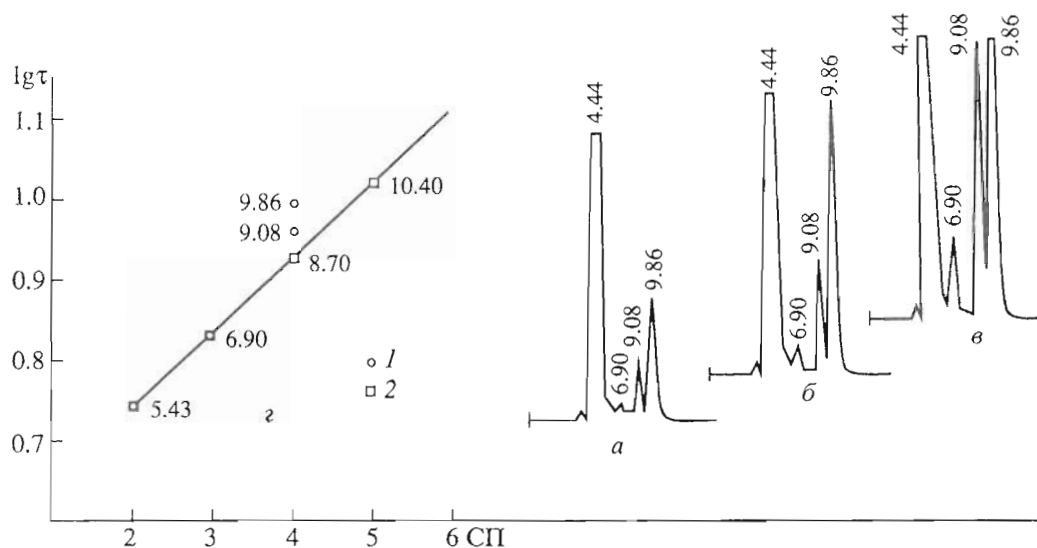


Рис. 3. ВЭЖХ продуктов трансгликозилирования, осуществляемого глюканазой ЛІV в смеси фракции тетрасахаридов и G_nN_p, по достижении степени превращения 1.5 (а), 3.2 (б) и 6.7% (в). Над пиками – τ, мин; г – график зависимости lg(τ, мин) от степени полимеризации для олигосахаридов рис. а – в (1). На прямой изображены также точки, соответствующие стандартному набору IG_nN_p (2), ВЭЖХ которого приведена на рис. 2г.

Но данные ПМР-спектра: сигналы аномерных протонов при δ, равных 4.49 м. д. (1H); 4.69 (1H); 4.76 и 4.74 (в сумме 1H); 4.66 и 5.23 (в сумме 1H) – указывают на наличие в тетрасахаридной фракции тетрасахарида (4) (схема 1) с β-1,6-связью с невосстанавливающего конца. Результаты ¹³C-ЯМР-спектроскопии подтверждают этот вывод: C3-атомы, участвующие в образовании β-1,3-гликозидной связи, резонируют при 86.3 (1C); 86.0 и 83.7 м. д. (в сумме 1C). Наличие в спектре сигналов с δ 76 (C5) и 69.9 (C6) м. д. определяет соединение с фрагментом генциобиозы, т.е. тетрасахарид структуры (4) (схема 1) составляет 80 - 90% тетрасахаридной фракции. Данные метилирования [5], представленные в таблице, указывают на присутствие в тетрасахаридной фракции двух изомеров ((4) и (6)) с превалированием первого.

В дополнение к этим результатам приводим хроматограммы (рис. 4а – в), выполненные на углеводном анализаторе “Biotronik”. Ранее [6] были подобраны условия разделения на нем смеси IG₂, Glc, gG₂ с использованием боратных буферов (время удерживания τ соответственно 90, 110 и 120 мин), при которых содержащий фрагмент генциобиозы

Содержание остатков глюкозы с разными типами связи (%) в тетрасахаридной фракции по результатам метилирования

Glcβ1-	-3Glcβ1-	-6Glcβ1-	-3Glcβ1- 6 1
30.4	32.4	29.0	7.4

(gG₂) тримеры элюируются с колонки с временами (τ), большими, чем у ламинарибиозы (рис. 4б), а тетрамеры – с τ большими, чем у ламинаритриозы (рис. 4в). Принимая во внимание все вышеизложенное, изомерному тримеру, преобладающему в исследуемой трисахаридной фракции и имеющему время выхода с колонки 100 мин (рис. 4б),

следует, вероятно, приписать структуру (5) $\begin{matrix} G \\ | \\ G-G-G \end{matrix}$ (6¹-β-D-гликозилламинарибиозы), при ферментативном трансгликозилировании которой образуется IG₂N_p. Небольшое количество в трисахаридной фракции ламинаритриозы (рис. 4б) ответственно за появление в продуктах IG₃N_p. Тетрамер, преобладающий в исследуемой смеси тетрасахаридов, с τ 85 мин (рис. 4в), дает пик 9.86 (рис. 3), что соответствует исходной структуре (4),

$\begin{matrix} G \\ | \\ G-G-G \end{matrix}$ (6³-β-D-гликозилламинаритриозы), а минорный пик с τ 9.08 (рис. 3) произошел из со-

единения (6), $\begin{matrix} G \\ | \\ G-G-G \end{matrix}$ (6²-β-D-гликозилламинаритриозы). Очевидно, в исследуемой трисахаридной смеси также имеется примесь этого соединения (6), судя по образованию в результате трансгликозилирования пика с τ 9.08 (рис. 2).

Таким образом, показана возможность качественного обнаружения и полуколичественного определения соединений с β-1,3;1,6-связями в смеси с β-1,3-олигомерами с помощью реакции трансгликозилирования, катализируемой ЛІV, с последующим анализом ВЭЖХ полученных продуктов.

Предлагаемый способ предположительно может быть применим для анализа более сложных структур глюкоолиго- и полисахаридов β -1,3;1,6-природы: различных ламинаранов, микробальных и дрожжевых глюканов, глюканов из фитоторы, что является предметом нашего дальнейшего исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ферменты. Эндо-1,3- β -глюканазы Л1V, Л0 и эндо-1,6- β -глюканаза пustuланаза PO выделены из кристаллических стебельков моллюсков *Spisula sachalinensis* и *Chlamys albidus* [7 - 9] в гомогенном состоянии.

Субстраты. Ламинаран (β -1,3-глюкан) из морской водоросли *Laminaria cichorioides*, полученный по методу [10], представляет собой линейный β -1,3-глюкан с β -1,6-разветвлениями в виде единичных остатков глюкозы. Пустулан β -1,6-глюкан выделен нами из лишайника *Umbellicaria rustica* [7]. Фракции три- и тетрамеров получили делением продуктов ферментативного гидролиза ламинарана эндо- β -1,3-глюканазами Л1V и Л0 [4] на колонке (1.6 \times 130 см) с биогеелем P-2 (элюция водой, скорость 16 - 18 мл/ч, 50°C).

Акцепторы. *n*-Нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (GNp) – коммерческий препарат (Chemapol, Чехо-Словакия), *n*-нитрофенилгенциобиозид (gG₂Np) получен нами реакцией трансгликозилирования, катализируемой эндо- β -1,6-глюканазой PO с использованием донора – пustuлана и акцептора – GNp, как описано [7].

Условия реакции трансгликозилирования. Реакционные смеси содержали 0.5 - 2 мМ субстрат (пustuлан или ламинаран), 25 мМ вышеуказанный акцептор (GNp или gG₂Np) и 0.01 - 0.02 ед. акт. β -глюканаз PO или Л1V в 50 мМ Na-ацетатном буферном растворе, pH 5.2. Температура реакции 22°C. В реакциях с участием исследуемых фракций три- и тетраолигосахаридов в качестве доноров концентрации их составляли 8 - 10 мг/мл, а GNp – 5 мг/мл.

ВЭЖХ-анализ реакций трансгликозилирования при различных глубинах превращения выполняли на жидкостном хроматографе Du Pont серии 8800, колонка Ultrasil-NH₂, 4.6 \times 250 мм (Beckman). Скорость 1 мл/мин, система: ацетонитрил – 5 мМ Na-ацетатный буфер, pH 4.0 - 4.3 (80 : 20). УФ-регистрация продуктов синтеза при 280 нм. Глубина превращения определялась количеством вновь образующихся (из GNp) в реакции трансгликозилирования продуктов (G_nNp).

Метилирование фракций три- и тетрасахаридов выполнили по методу [5].

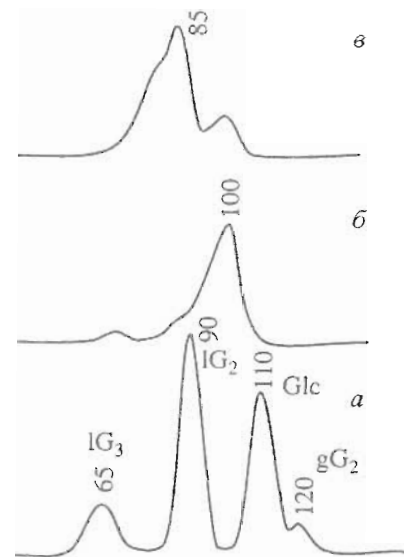


Рис. 4. Хроматограммы стандартной смеси IG₃, IG₂, Glc, gG₂ (а) и исследуемых трисахаридной (б) и тетрасахаридной (в) фракций, полученные на жидкостном анализаторе "Biotronik". Над пиками – время выхода (мин).

¹H- и ¹³C-ЯМР-спектры записаны на приборе M-250 Bruker при 80°C. Химические сдвиги измерены относительно внутреннего стандарта CH₃OH, δ 3.34 и 50.15 м. д. для ¹H- и ¹³C-ЯМР соответственно. Анализ на автоматическом анализаторе сахаров "Biotronik" выполнен как ранее описано [6].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Назарова Н.И., Елякова Л.А. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1189 - 1196.
2. Mazur A.K., Nazarova N.I., Elyakova L.A. // FEBS Lett. 1985. V. 192. № 1. P. 43 - 46.
3. Lee Y.C. // Anal. Biochem. 1990. V. 189. P. 151 - 162.
4. Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Elyakova L.A. // Carbohydr. Res. 1986. V. 148. № 1. P. 57 - 62.
5. Nakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. № 1. P. 205 - 208.
6. Елякова Л.А., Дмитренко П.С. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 4. С. 555 - 561.
7. Елякова Л.А., Рудакова В.Я., Сундукова Е.В., Исаков В.В. // Химия природ. соедин. 1986. № 4. С. 469 - 471.
8. Sova V.V., Elyakova L.A., Vaskovsky V.E. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 212. № 1. P. 382 - 393.
9. Privalova N.M., Elyakova L.A. // Comp. Biochem. and Physiol. 1978. V. 60B. № 3. P. 225 - 228.
10. Elyakova L.A., Zvyagintseva T.N. // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. № 2. P. 241 - 248.

Enzymatic Transglycosylation as a Means of β -1,3;1,6-Glucooligosaccharide Detection and Identification in Laminarioligosaccharide Mixtures

L. A. Elyakova and N. I. Nazarova

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

Abstract – A homologous series of *p*-nitrophenyllaminarioligosides ($1G_nNp$) and *p*-nitrophenylgentiooligosides (gG_nNp) were analyzed by HPLC, and their retention time logarithms ($\log \tau$) were plotted against the degree of polymerization (d.p.). This gave straight lines for both series, with the slope for gG_nNp being considerably steeper than that for $1G_nNp$. For *p*-nitrophenylglycosides of the oligosaccharides with mixed β -1,3;1,6-structure, the analogous plot lies between the above-mentioned lines. On the basis of these facts, a method of qualitative detection and semiquantitative determination of β -1,3;1,6-glucooligosaccharides is proposed, involving the latter as donor components in a transglycosylation reaction with the G_{Np} acceptor catalyzed by the endo- β -1,3-glucanase LIV. The formed products are subsequently analyzed by HPLC. As an example, identification of components was carried out in mixtures of β -1,3;1,6-glucotri- and tetramers obtained by digestion of laminaran with different endo- β -1,3-glucanases. A mixture of trisaccharides was shown to contain

mainly $G-\overset{G}{\underset{|}{G}}$ (6^1 - β -D-glucosyllaminaribiose) with a small laminaritriose admixture. The tetrasaccharide fraction consisted mainly of $\overset{G}{\underset{|}{G}}-G-G$ (6^3 - β -D-glucosyllaminaritriose) and a minor amount of $G-\overset{G}{\underset{|}{G}}-G$ (6^2 - β -D-glucosyllaminaritriose). The latter was present in the trisaccharide mixture as well. The validity of the proposed procedure was confirmed by 1H and ^{13}C NMR data, and by results obtained via the methylation method.

Key words: β -1,3;1,6-glucooligosaccharides; endo- β -D-glucanase; transglycosylation; HPLC.