БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 1998, том 24, № 3, с. 211–218

УДК 577.152.321.6.14:547.458.062

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ КАК СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ β-1,3;1,6-ГЛЮКООЛИГОСАХАРИДОВ В СМЕСИ ЛАМИНАРИОЛИГОСАХАРИДОВ. ОЛИГОСАХАРИДЫ СО СТЕПЕНЬЮ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ 5 И 6*

© 1998 г. **Л. А. Елякова#, И. Ю. Бакунина, В. А. Мамонтова, В. В. Исаков**

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 30.01.97 г. Принята к печати 28.10.97 г.

Предложенный нами ранее (Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 55–58) способ применен для обнаружения и идентификации 1→3;1→6-β-*D*-глюкоолигосахаридов со степенью полимеризации (СП) 5 и 6 при использовании их в качестве доноров (акцептор – *n*-нитрофенил-β-*D*-глюкозид, GNp) в реакции трансгликозилирования, катализируемой эндо-1→3-β-*D*-глюканазой ЛIV, с последующим ВЭЖХ-анализом образующихся продуктов. Кроме гомологической серии *n*-нитрофенилламинариолигозидов (lG_nNp, n = 2–6) в продуктах реакции обнаружены олигозиды смешанной 1→3;1→6-β-*D*-структуры (iG_nNp), время удерживания (τ) которых ВЭЖХ-колонкой больше, чем у соответствующих по степени полимеризации lG_nNp, и значения lgτ которых не укладываются на прямую (выше ее), соответствующую Np-ламинариолигозидам. Обнаружены изомерные тетра-, пента- и гексамеры, некоторым из них приписаны структуры с привлечением данных ЯМР-спектроскопии. Предлагаемый способ определения состава смесей олигосахаридов прост, информативен и требует минимального расхода веществ.

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

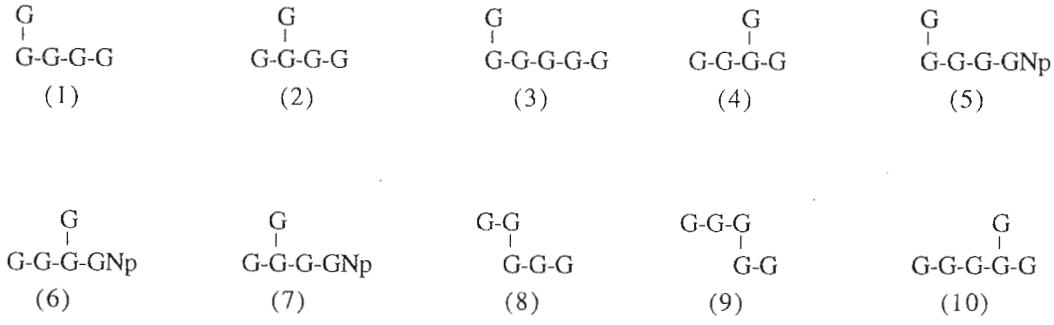
В предыдущей работе мы показали возможность определения состава смеси и установления строения некоторых разветвленных 1→3;1→6-β-*D*-глюкоолигосахаридов косвенным методом по полученным из них продуктам трансгликозилирования с использованием *n*-нитрофенил-β-*D*-глюкозида (GNp) в качестве акцептора. Как примеры ранее были идентифицированы продукты, образующиеся в реакции трансгликозилирования при использовании в качестве доноров изомерных ОС с СП 3 и 4 [1]. По причинам, указанным ранее [1], – главным образом из-за отсутствия удовлетворительных способов разделения смесей этих ОС – мы продолжили начатое, усложнив задачу: в качестве доноров, структура которых устанавливается, использовали вещества с СП 5 и 6. Таковыми явились ОС, выделенные рядом последовательных разделений (гель-фильтрация на различных носителях, препаративная хроматография на бумаге) из смесей продуктов ферментативного преобразования ламинарана. Так, воздействие на ламинаран эндоламинариназы Л0 дало биологически активные транслам и антивир [2, 3]; им сопутствуют более низкомолекулярные вещества (обозначены нами как "мелкие" (СП 2–6) и "средние" (СП 5–10) по результатам их деления на колонке с сефадексом G-50 [3, 4]), представленные наряду с обычными ламинариолигосахаридами веществами смешанного строения (см., например, схему 1).

Эндоламинариназа ЛIV обладает, как установлено нами [5, 6], концевым эффектом – значительной способностью к гидролизу первой β-1,3-связи с восстанавливающего конца субстрата. Поэтому с большой долей вероятности из донора на начальной стадии реакции трансгликозилирования в результате параллельного отщепления его концевой глюкозы следует ожидать и образования Np-глюкоолигозида с исходной степенью полимеризации ("молекулярный пик" при после-

*Предыдущее сообщение см. [1].

Сокращения: ОС – олигосахариды; GNp – *n*-нитрофенил-β-*D*-глюкопиранозид; lG_n и lG_nNp – β-1,3-ламинариолигосахариды и их *n*-нитрофенилгликозиды; iG_n и iG_nNp – изомерные β-1,3;1,6-глюкоолигосахариды и их *n*-нитрофенилгликозиды, n = 2–6.

#Автор для переписки.



G – остаток глюкозы; горизонтальная черточка – β-1→3-связь, вертикальная – β-1→6-связь.

Схема 1.

дующем хроматографическом разделении продуктов – см., например, схему 2А).

Реакция трансгликозилирования с ламинараном в виде донора мало информативна из-за небольшого количества β-1,6-разветвлений в нем (до 10%). Поэтому было необходимо предварительное получение фракций, обогащенных олигомерами определенной степени полимеризации, в данном случае 5–6 (список образцов представлен в "Экспериментальной части").

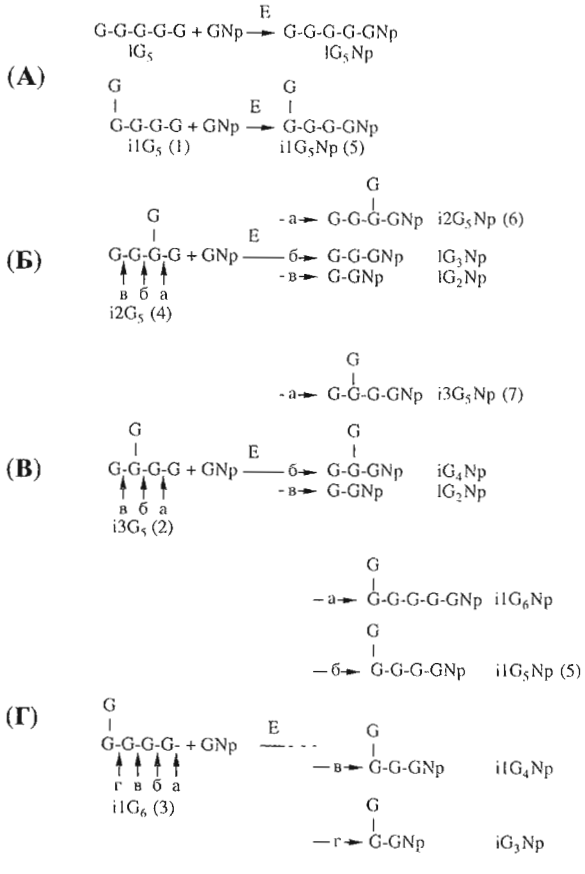


Схема 2. Образование продуктов трансгликозилирования при использовании доноров-олигосахаридов: (А) – с проявлением концевого эффекта и образованием "молекулярных пиков"; (Б) – (Г) – с разными вариантами расщеплений.

Для структурного анализа смесей ОС, использованных в настоящей работе, проведено детальное исследование сигналов аномерных протонов в спектрах ^{1}H-ЯМР. Как известно [7], сигналы аномерных протонов β-1,3-связанных глюкозных остатков наблюдаются в области 4.70–4.90 м. д., а β-1,6-связанных глюкозных остатков – в области 4.40–4.60 м. д. Кроме того, аномерные протоны восстанавливающих 3-связанных глюкозных остатков имеют химические сдвиги 5.28 (α-аномер) и 4.71 м. д. (β-аномер).

На основании этих данных, интегрируя сигналы H1 восстанавливающего остатка и сигналы H1 глюкозидных остатков, соединенных 1,3- и 1,6-связями, оценили степень полимеризации исследуемых ОС. Анализ спектров β-1,3;1,6-глюкоолигосахаридов с учетом эффектов гликозилирования [8] показал, что аномерные протоны моносахаридных остатков, имеющих замещения по С1- и С3-атомам (т.е. любой остаток в цепи), резонируют при 4.82 м. д., а аномерный протон невосстанавливающего конца, имеющий замещение только по С1-атому, резонирует в относительно сильном магнитном поле – 4.78 м. д. В случае, когда моносахаридный остаток замещен по С1- и С6-атомам, аномерный протон имеет химический сдвиг при 4.76 м. д. Необходимо отметить, что остаток, соседний с восстанавливающим концом и имеющий замещение по С3- и С1-атомам, дает два значения величин химических сдвигов аномерных протонов: при 4.79 (α-аномер) и 4.80 м. д. (β-аномер). В случае, если этот остаток является 1,3,6-замещенным, как в олигомере (4), наблюдается сдвиг сигналов этих ано-

Таблица 1. Характеристичные химические сдвиги сигналов аномерных протонов 1→3; 1→6-β-*D*-олигосахаридов

Структурные фрагменты	→3G1→3 (в β-1,3-связанной цепи)	G1→3 (невосстанавливающий конец)	G1 ↓ 6 G1→3	→3G1→ 3Gα, β (восстанавливающий конец)	G1 ↓ 6 →3G1→ 3Gα, β (как в (4))	→3G1 ↓ 6 G1→3
Хим. сдвиг			4.56	4.79 5.29(α)	4.56 5.29(α)	
H1	4.82	4.78	4.76	4.80 4.71(β)	4.79 4.71(β)	4.59

Таблица 2. Предполагаемые, на основании ^{1}H-ЯМР-спектров, составы смесей ОС

Номер образца	Степень полимеризации	Структурные компоненты
I	10	G1→[3G1-]$_6$→3G1→3G
II	4–5	G-G-G-G, (1)*
III	5	Преимущественно (1)
IV	5	G-G-G-G-G, (1), (4)*
V	5	G-G-G-G-G, (1), (4)
VI	5	Преимущественно G-G-G-G-G, а также (1), (4)*
VII	5	G-G-G-G-G*
VIII	5–6	G-G-G-G-G, (1), (8), (9), (4)

M
|

* Образец содержит также примесь оканчивающегося маннитом олигосахарида типа G-G-G-G.

мерных протонов в относительно сильное магнитное поле на 0.04 м. д.

Анализ спектров β-1,6-связанных моносахаридных остатков исследуемых веществ показал, что аномерный протон остатка, гликозилирующего в положение C6 любой другой остаток, имеет величину химического сдвига 4.56 м. д. В то же время, если первый остаток имеет дополнительное замещение по C3, то его аномерный протон резонирует в относительно слабом магнитном поле – 4.59 м. д. Полученные данные схематично представлены в табл. 1.

Отмеченные закономерности иллюстрируются спектрами ^{1}H-ЯМР нескольких из наших соединений: линейного β-1,3-олигосахарида (образец I, рис. 1а) и β-1,3;1,6-связанных олигосахаридов (образцы VI и V, рис. 1б, 1в). В спектре 1г (образец VIII) можно видеть отличия от спектров (б) и (в) в величинах химических сдвигов аномерных протонов. Это позволяет предположить в данном случае наличие включения β-1,6-связанных остатков в цепь подобно структурам (8) или (9).

На основании полученных закономерностей проанализированы спектры ^{1}H-ЯМР исследуемых образцов (табл. 2).

В качестве простейшего донора взята фракция 1→3-β-*D*-глюкоолигосахаридов, полученная формолизом 1→3-β-*D*-глюкана пахимана из *Poria cocos* (образец I). Из образца I получена контрольная хроматограмма ряда Np-ламинариолигозидов (lG$_n$Np) с СП 2–6, зависимость логарифма времени удерживания (τ) которых от СП представляет прямую (рис. 2Б). Как установлено ранее [1], lgτ для ОС смешанной структуры, содержащих β-1,3- и β-1,6-связи, будут попадать в область выше этой прямой (см. рис. 1 в работе [1]).

Такую же простую картину дает трансгликозилирование с образцом VII в качестве донора, содержащим преимущественно неразветвленные ОС (присутствие оканчивающейся маннитом структуры не фиксируется нашим методом).

При сравнении ВЭЖХ-хроматограмм начальных стадий реакции (до 20%-ной степени превращения субстрата) с другими образцами виден разный их состав (рис. 2). Кроме ряда обычных lG$_n$Np образуются изомерные продукты, τ которых больше. Отличительны "молекулярные пики" – образование таковых для ОС с СП 6 зафиксировано в образцах IV, VI и особенно заметно в образце VIII;

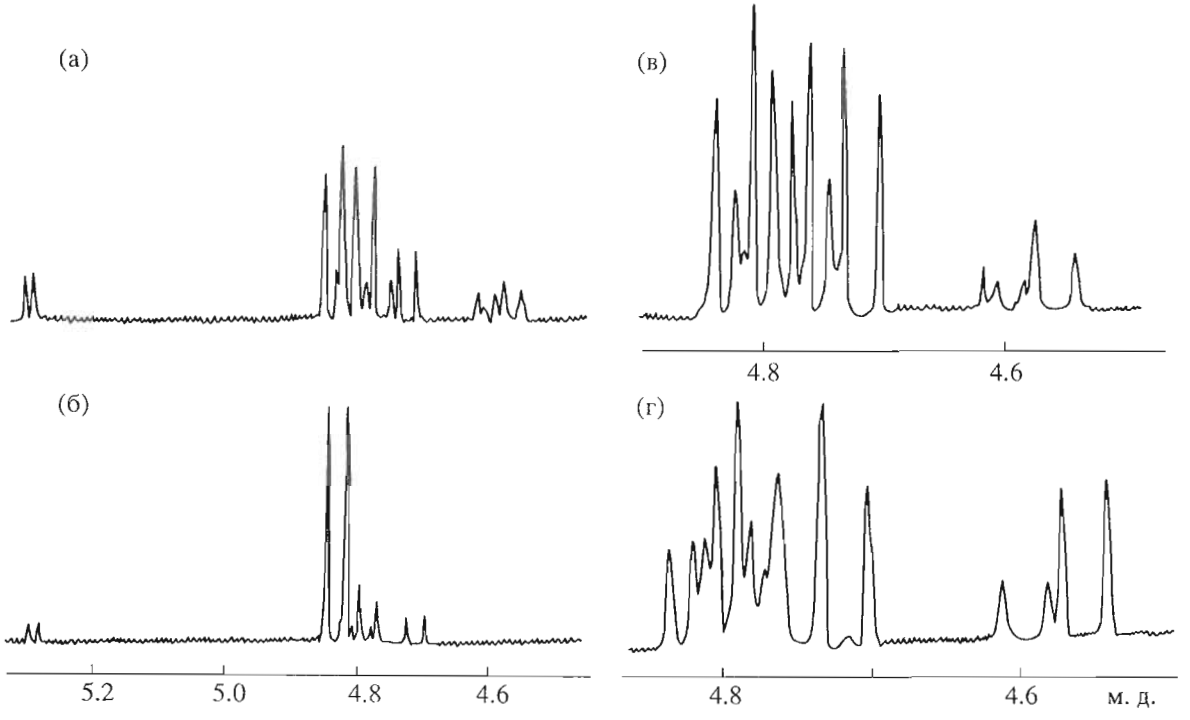


Рис. 1. ^{1}H-ЯМР-спектры β-1,3-связанного глюкоолигосахарида (а – образец I) и глюкоолигосахаридов, содержащих β-1,3;1,6-связи (б, в, г – образцы V, VI и VIII соответственно).

следовательно, только в этих образцах содержание олигомеров с СП 6 значительно.

Рассмотрим семейство пиков ОС с СП 5 (рис. 2). Кроме lG_5Np для них характерно преобладающее присутствие двух разных изомеров: $i1G_5Np$* (образец II) или $i2G_5Np$ (образцы V и VIII), тогда как в продуктах реакции из доноров III, IV образовались смеси с незначительным превалированием того или другого изомера.

Если опираться на данные ЯМР (табл. 2), то в образцах II и III преимущественно содержится пентаоза структуры (1) (схема 1), из которой образуется Np-изомер (5) (вероятная структура $i1G_5Np$). Другой изомер** с СП 5 может быть либо $i2G_5Np$ (6), либо $i3G_5Np$ (7). Выбор в пользу одного из них можно сделать по образованию из этих структур сопутствующих Np-олигозидов. Так, из $i2G_5$ кроме соединения "молекулярного пика" ($i2G_5Np$) (расщепление *а*, схема 2 Б) должны образоваться lG_3Np (расщепление *б*) и lG_2Np (расщепление *в*) при отсутствии Np-глюкозида с СП 4, тогда как из другого варианта пентамера смешанной структуры (2) ($i3G_5$), наоборот, кроме ОС "молекулярного пика" и lG_2Np должен образоваться также изомерный тетрамер iG_4Np (расщепление *б*) при отсутствии Np-глюкозида с СП 3 (схема 2 В).

Состав с отсутствием Np-изомеров с СП 4 отмечен в хроматограммах продуктов, полученных из донора VIII; следовательно, $i2G_5Np$ можно приписать скорее структуру (6), а исходному донору – структуру (4).

Теоретически из гексамера (3) или пентамера (1) может образоваться весь ряд соответствующих Np-глюкозидов при отсутствии только Np-ламинарибиозида (схема 2 Г).

Наиболее близки к такому "чистому" составу результаты с образцом III: здесь присутствуют $i1G_5Np$, $i1G_4Np$, iG_3Np при небольшом количестве Np-ламинарибиозида и других ламинариолигозидов, возможно, получившиеся из неразветвленных ламинариолигосахаридов.

Ряд продуктов трансгликозилирования из другого гексамера структуры (10) наиболее полно представлен в образце VIII: $i2G_6Np$, $i2G_5Np$ (Np-глюкозид с СП 4, как показано на схеме 2 Б, должен отсутствовать). Таким образом, гексамер и пентамер структур $i2G_6Np$, $i2G_5Np$ обнаруживаются в значительных количествах в продуктах энзимолиза ламинарана ферментом растительного происхождения (из табака).

*Цифра после буквы i в аббревиатуре обозначает номер одного из возможных вариантов изомерных структур.

**Продукты с включением β-1,6-связи в цепь β-1,3-олигомера типа (8) или (9), по данным ЯМР, не присутствуют в исследуемых образцах (кроме обр. VIII), и вероятность образования из них соответствующих Np-олигозидов не рассматривалась.

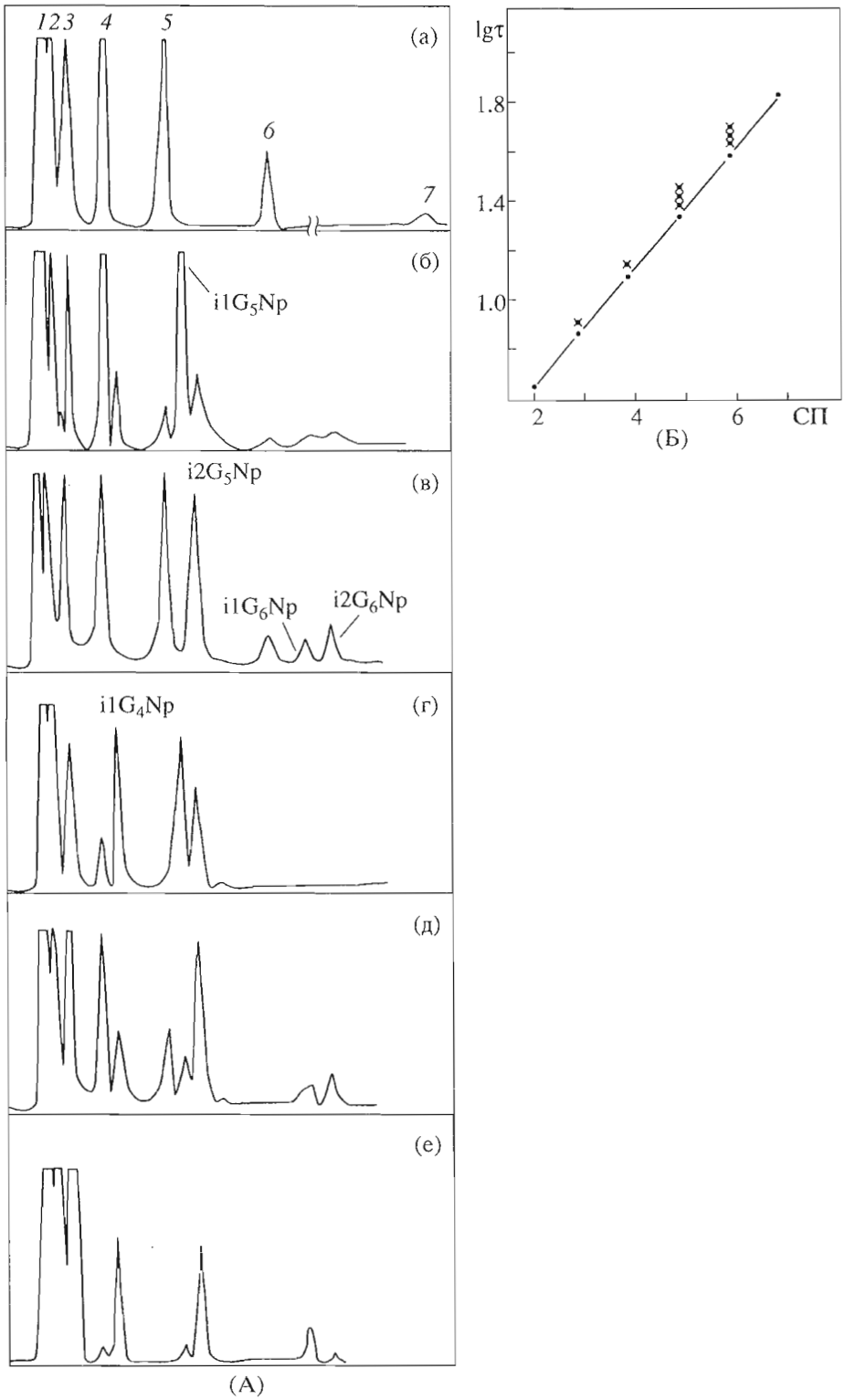


Рис. 2. ВЭЖХ продуктов трансгликозилирования, осуществляемого эндо-1→3-β-*D*-глюканазой ЛIV с использованием в качестве доноров образцов I (инкубация 15 мин – а), II (5 мин – б), VIII (15 мин – в), III (10 мин – г), IV (30 и 240 мин – д, е). Обозначения пиков на рисунке (а): *1* – Np-β-*D*-глюкозид (GNp); *2* – lG$_2$Np; *3* – lG$_3$Np; *4* – lG$_4$Np; *5* – lG$_5$Np; *6* – lG$_6$Np; *7* – lG$_7$Np. На следующих рисунках обозначены пики изомерных Np-олигозидов смешанного 1→3;1→6-β-строения: i1G$_4$Np, i1G$_5$Np, i2G$_5$Np и т.д. На рис. 2Б приведен график зависимости lgτ от степени полимеризации (СП) продуктов реакции трансгликозилирования. Точки на прямой соответствуют Np-ламинариолигозидам (СП 2-7), ВЭЖХ-хроматограмма которых приведена на рис. 2А. Крестиком обозначены lgτ изомерных Np-олигозидов смешанного строения.

Таблица 3. Результаты разделения продуктов трансгликозилирования (ВЭЖХ, DuPont, NH_2-колонка)

Продукт	Номер образца, время инкубации																		
	I	II		III		IV			V			VI		VII		VIII			
	15 мин	5 мин	4 ч	10 мин	4 ч	5 мин	30 мин	4 ч	5 мин	10 мин	4 ч	5 мин	10 мин	5 мин	10 мин	5 мин	10 мин	30 мин	2 ч
GNp	69.8	90.5	83.2	94.2	93.2	89.5	82.2	78.6	84.8	83.6	78.3	89.4	85.1	86.1	81.6	90.4	84.2	80.0	69.7
lG_2Np	13.2	1.9	8.83	0.55	2.1	3.12	8.7	11.7	3.2	5.57	13.2	2.33	4.5	5.32	5.26	2.87	3.57	5.67	8.0
lG_3Np	6.27	0.95	3.92	0.42	1.3	1.3	3.7	4.19	1.78	2.63	5.63	1.21	2.1	3.44	3.35	1.37	1.53	1.86	2.95
iG_3Np				0.14		0.2											0.02		c
lG_4Np	7.3	2.6	0.049	0.37	c	2.88	1.76	0.05	7.63	6.0	0.07	5.4	6.8	3.8	8.5	3.65	5.18	6.54	10.4
$i1G_4Np$		0.39	0.37	1.44	1.0	0.16	0.36	0.58	0.11	0.14	0.22		0.1	0.07	+	c	c	c	+
lG_5Np	1.9	0.33	0.017	+	c	0.65	0.15		1.6	0.716	+	1.06	0.86	0.16	1.1	0.85	1.64	2.08	2.87
$i1G_5Np$		2.44	0.26	1.48	0.2	0.32	0.4	0.217	+		0.05	c		+	+				
$i2G_5Np$		0.6	0.47	1.0	0.15	0.72	1.52	0.95	0.85	1.06	0.67	++	++	0.24	+++	0.7	1.24	1.62	2.43
$i3G_5Np$				+	c	c	+				+								
lG_6Np	0.58	+	c			0.26	+		++	0.027		+	+	+	++	0.09	0.34	0.39	0.21
$i1G_6Np$		+	0.16			0.074	++	0.404		c		+	+	+	+	++	0.49	0.54	0.67
$i2G_6Np$		++	c			0.14	0.27	0.18	+	c		+	0.26	+	0.12	++	0.7	0.94	0.93
$i3G_6Np$										c	+								

На более глубоких стадиях в продуктах реакций происходит обычное исчезновение с превращением в более короткие продукты, сначала IG_6Np и IG_5Np, затем IG_4Np, тогда как изомерные продукты гидролизуются медленнее, вследствие чего они даже накапливаются (табл. 3, рис. 2). За пределами исследования осталась разная скорость трансгликозилирования при одинаковых концентрациях энзима и субстратов. Медленно шел процесс с образцом III, замедленно – с образцом II, быстро – с образцами IV, VI, VIII, очень быстро – с образцами I, V, VII. Вероятно, это отражало содержание неразветвленных ламинариолигосахаридов в образцах.

Таким образом, продемонстрирована возможность идентификации сложных смесей изомерных β-1,3;1,6-глюкоолигосахаридов по образующимся хорошо разделяемым ВЭЖХ продуктам трансгликозилирования. В некоторых случаях отмечена возможность уточнения состава исходных смесей, что дополняет сведения ЯМР-спектроскопии, дающие усредненный результат. На основании полученных хроматограмм возможно в будущем проводить полуколичественное определение этим методом состава смесей ОС. Предлагаемый способ прост, информативен и требует минимального расхода веществ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Фермент. Эндо-1→3-β-*D*-глюканаза ЛIV из *Spisula sachalinensis* выделена в гомогенном состоянии согласно [9], а эндо-1→3-β-*D*-глюканаза из табака – согласно [10].

Доноры

Образец I. Фракция 1→3-β-*D*-глюкоолигосахаридов с СП 10, полученная из пахимана (*Poria cocos*) формолизом и дальнейшим фракционированием на колонке с биогелем P-4.

Образец II получен из "мелких" продуктов реакции ферментативного синтеза транслама [2] препаративной БХ на Ватмане 3ММ в системе бутанол–пиридин–вода (6 : 4 : 3) как смесь веществ с СП ~ 5.

Образец III. "Мелкие" продукты реакции ферментативного синтеза транслама (СП ~ 5), получены как указано в работе [3].

Образец IV. Фракция с СП ~ 5, получена делением "мелких" продуктов на колонке с биогелем P-6.

Образец V получен из "средних" продуктов реакции ферментативного синтеза транслама препаративной БХ как вещество с СП ~ 6 (см. выше).

Образец VI. "Мелкие" продукты реакции ферментативного гидролиза антивира ламинариназой ЛIV получены как указано в работе [3].

Образец VII получен из ламинарана действием ламинариназы ЛIV с дальнейшим фракционированием продуктов гель-фильтрацией на колонке Toyopearl TSK HW40 как смесь ОС с СП 4-5.

Образец VIII получен как конечный продукт энзиматического гидролиза ламинарана эндоламинариназой табака [10]; смесь с преобладанием ОС с СП 5-6.

Акцептор. *n*-Нитрофенил-β-*D*-глюкопиранозид – коммерческий препарат (Chemapol, Чехо-Словакия).

Условия реакции трансгликозилирования. К раствору 1 мг каждого донора и 2 мг GNp в 0.2 мл воды добавляли 25 мкл эндоламинариназы ЛIV (0.05 ед. акт.). В ходе инкубации при комнатной температуре через 5, 10, 15, 30, 60, 75, 120 и 240 мин отбирали аликвоты по 20 мкл, к которым для остановки реакции добавляли по 50 мкл ацетонитрила. Полученные пробы хранили в закрытых микропробирках Эппендорфа в морозильной камере холодильника. Для ВЭЖХ-анализа (хроматограф DuPont) брали 25 мкл пробы.

ВЭЖХ-анализ реакционных смесей трансгликозилирования при различных глубинах превращения выполняли на жидкостном хроматографе DuPont серии 8800 с колонкой (4.6 × 250 мм) Ultrasil-NH_2 (Beckman). Скорость 1 мл/мин, система ацетонитрил–вода (80 : 20); УФ-регистрация продуктов – при 280 нм. Глубину превращения определяли по количеству образующихся Np-производных.

^{1}H-ЯМР-спектры записаны на приборе Bruker M-250 при 80°C. Химические сдвиги измерены относительно внутреннего стандарта CH_3OH (δ 3.34).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Елякова Л.А., Назарова Н.И.* // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 55–60 (и ссылки в ней на предыдущие работы).
2. *Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А., Исаков В.В.* // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 218–225 (и ссылки в ней на предыдущие работы).
3. *Елякова Л.А., Лапшина Л.А., Реунов А.В., Можаева К.А.* // Докл. РАН. 1994. Т. 336. С. 710–711.
4. *Широкова Н.И., Абдурахманова Ж.А., Салихов Ш.И., Елякова Л.А.* // Биохимия. 1995. Т. 60. С. 470–477.
5. *Bezukladnikov P.V., Elyakova L.A.* // Carbohydr. Res. 1986. V. 152. P. 261–273.
6. *Назарова Н.И., Мазур А.К., Елякова Л.А.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 1478–1483.
7. *Usui T., Yokoyama M., Yamaoka N., Matsuda K., Tuzimura K., Sugiyama H., Seto S.* // Carbohydr. Res. 1974. V. 33. P. 105–116.
8. *Jansson P.E., Kenne L., Widmalm G.* // Carbohydr. Res. 1989. V. 188. P. 169–191.
9. *Sova V.V., Elyakova L.A., Vaskovsky V.E.* // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 212. P. 111–115.
10. *Moore A.E., Stone B.A.* // Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 258. P. 238–247.

Detection and Identification of β-1,3;1,6-Glucooligosaccharides in Laminarioligosaccharide Mixtures by Means of Enzymic Transglycosylation: Oligosaccharides with Polymerization Degree of 5–6

L. A. Elyakova, I. Yu. Bakunina, V. A. Mamontova, and V. V. Isakov

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

1→3;1→6-β-*D*-Glucooligosaccharides with polymerization degree of 5–6 were obtained from laminaran and analyzed by the previously developed method [1] by using them as donors and *p*-nitrophenyl β-*D*-glucoside as the acceptor in the transglycosylation reaction catalysed by endo-1→3-β-*D*-glucanase LIV. The resulting homologous *p*-nitrophenyl β-1,3-laminarioligosides with polymerization degree of 2–6 and the corresponding derivatives of mixed β-1,3;1,6-glucooligosaccharides with the same polymerization degree were analyzed by HPLC. The latter compounds exhibited higher retention times than the former with the same polymerization degree. Isomeric tetra-, penta-, and hexameric compounds were detected, and some of them were structurally characterized by means of NMR. The suggested method of analysis of oligosaccharide mixtures is simple, informative, and consumes a minimal quantity of sample.

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