



УДК 577.152.321*6'14

ПОЛУЧЕНИЕ *n*-НИТРОФЕНИЛ-ЛАМИНАРИОЛИГОЗИДОВ РЕАКЦИЕЙ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ ЭНДО-1,3- β -D-ГЛЮКАНАЗОЙ ИЗ МОРСКОГО МОЛЛЮСКА

© 1998 г. Т. Н. Звягинцева[#], Т. Н. Макарьева, С. П. Ермакова, Л. А. ЕляковаТихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 10.02.97 г. Принята к печати 30.10.97 г.

Исследованы возможности препаративного синтеза *n*-нитрофенил(Np)-1,3- и Np-1,3;1,6- β -D-глюкоолигозидов реакцией трансгликозилирования, катализируемой эндо-1,3- β -D-глюканазой (ЛIV) из морского моллюска *Spisula sachalinensis*. В качестве доноров использованы 1,3;1,6- β -D-глюканы с различным содержанием β -1,6-глюкозидных связей – ламинараны из *Laminaria cichorioides* (10%), *L. gurjanovae* (2%), *Fucus evanescens* (35%) и транслам (25%), в качестве акцептора – β -D-Np-глюкозид (Glc-Np). Максимальный выход продуктов трансгликозилирования наблюдается при использовании в качестве донора ламинарана из *L. cichorioides*, для доноров с меньшим или большим содержанием β -1,6-глюкозидных связей реакция трансгликозилирования менее эффективна, причем для ламинарана из *F. evanescens* и транслама в продуктах реакции отсутствует Np-ламинарибиозид. В оптимальных условиях (10 мг/мл ламинарана из *L. cichorioides* и 5 мг/мл Glc-Np) максимальный выход Np-ламинарибиозида, -триозида, -тетраозида и -пентаозида составил 19, 8, 3 и 1% соответственно. Np-Ламинарибиозид и -триозид были выделены хроматографией на силикагеле, структура установлена ¹³C-ЯМР-спектроскопией, получены их физико-химические характеристики.

Ключевые слова: эндо-1,3- β -D-глюканазы; трансгликозилирование; субстратная специфичность; 1,3;1,6- β -D-глюканы; ламинараны; Np-ламинариполиозиды; морские моллюски; бурые водоросли.

Энзиматический синтез олигосахаридов и их гликозидов в процессе реакции трансгликозилирования, отличающийся высокой стерео- и региоселективностью, является достойной альтернативой химическому. Механизмы этого процесса под действием гликозидаз и гликозилтрансфераз рассматриваются во многих обзорах [1–3].

Ранее нами было показано, что эндо-1,3- β -D-глюканазы из морских моллюсков *Spisula sachalinensis* (ЛIV) и *Chlamys albidus* (Л0), являясь типичными гидролазами [4, 5], обладают в то же время по сравнению с эндогликаназами из наземных источников (лизоцимами, α -амилазами, эндоцеллюлазами) повышенной способностью к реакциям трансгликозилирования [6], т.е. к реакциям переноса гликоновой части субстрата не только на воду (реакция гидролиза), но и на различные гидроксилсодержащие вещества (реакция трансгликозилирования), способные быть акцепторами, например на метил- и фенилгликозиды, спирты и т.д. [7]. Для этих ферментов при

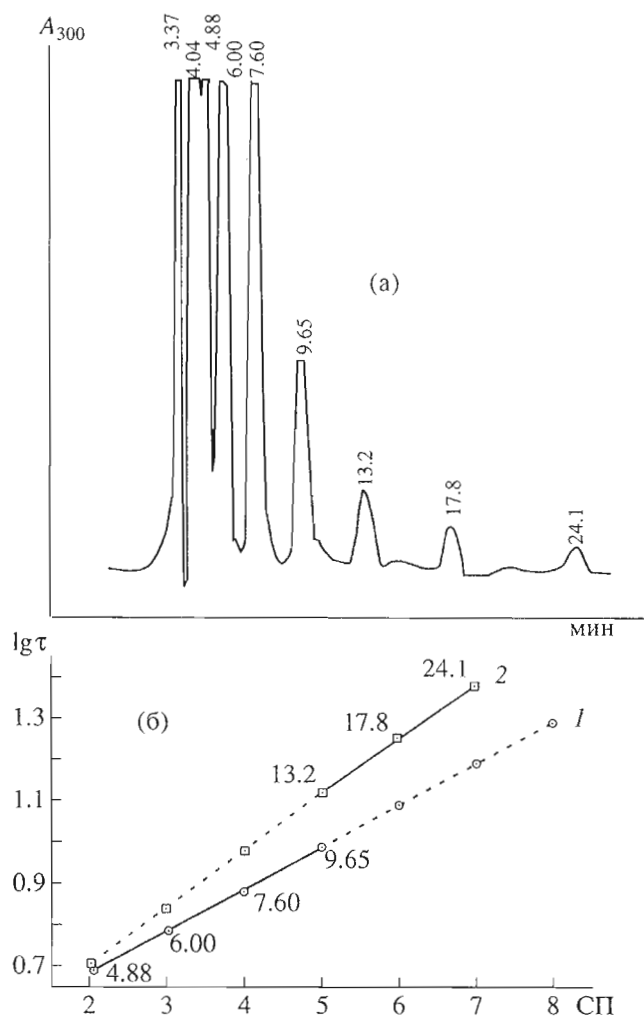
использовании в качестве донора гликозильных остатков ламинарана из *L. cichorioides*, а в качестве акцептора – *n*-нитрофенил- β -D-глюкозида (Np-глюкозид, Glc-Np) величина k_t/k_r равна 2×10^4 (k_t и k_r – константы скорости реакций трансгликозилирования и гидролиза) [6]. Для амилаз и лизоцима это отношение составляет примерно 10^2 [8].

В процессе изучения специфичности и механизма действия эндо-1,3- β -D-глюканаз из морских моллюсков было обнаружено, что глюканаза ЛIV в реакции трансгликозилирования катализирует синтез только β -1,3-глюкозидных связей, в то время как Л0 – еще и β -1,4-глюкозидных [7, 9, 10].

Целью данной работы является изучение влияния структуры и концентрации субстратов на реакцию трансгликозилирования, катализируемую высокоспецифичной эндо-1,3- β -D-глюканазой ЛIV из морского моллюска, и возможности препаративного получения с помощью этой реакции Np-ламинариполиозидов.

Для дальнейшего изучения специфичности и механизма действия глюканазы ЛIV в реакциях

[#]Автор для переписки.



ВЭЖХ продуктов реакции трансгликозилирования, катализируемой глюканазой ЛІV, с использованием в качестве донора ламинарана (I) (10 мг/мл) в присутствии Glc-Np (5 мг/мл). Время реакции 17 ч. Колонка Ultrasil-NH₂ (10 × 250 мм, Beckman): (а) – профиль элюции продуктов реакции. Над пиками указаны времена удерживания (τ, мин). Отнесение пиков см. табл. 1; (б) – зависимость lgτ продуктов реакции от их степени полимеризации. Сплошной линией соединены экспериментально полученные точки, пунктир – экстраполяция экспериментальных прямых для Np-1,3-β-D-(I) и Np-1,3;1,6-β-D-глюкоолигозидов (2).

трансгликозилирования, катализируемых ею, и выбора условий получения Np-ламинариолигозидов в препаративных масштабах в качестве доноров были использованы четыре 1,3;1,6-β-D-глюкана различной структуры (ламинараны из *L. cichorioides* (I), *L. gurjanovae* (II), *F. evanescens* (III), транслам (IV)). В качестве акцептора был взят Np-глюкозид. Основное различие между выбранными в качестве доноров 1,3;1,6-β-D-глюканами состоит в содержании и расположении в их молекулах β-1,6-связанных остатков глюкозы [7, 11]. Так, ламинараны из *L. gurjanovae* (II), *L. cichorio-*

ides (I) и *F. evanescens* (III) содержат в виде единичных ответвлений соответственно 2, 10 и 35% β-1,6-связанных остатков глюкозы либо генциобиозы (генциобиоза в заметных количествах содержится только в ламинаране (III)), распределенных относительно равномерно вдоль цепи 1,3-β-D-глюкана [11]. Последний глюкан – транслам (IV), полученный ферментативной трансформацией ламинарана (I) [12], содержит около 20–25% сконцентрированных в основном у невосстановливающего конца молекулы β-1,6-связанных остатков глюкозы, часть из которых существует в виде ответвлений, как в ламинаранах, а часть (около 8%, т.е. более трети) включена в основную цепь. Помимо этого молекулярная масса транслама (8–10 кДа) примерно в 2 раза превышает молекулярную массу ламинаранов (3–5 кДа) [12].

В оптимальных для действия фермента условиях [4, 5] проводили реакцию гликозилирования Np-глюкозида, используя в качестве доноров глюканы (I)–(IV) в различных концентрациях и анализируя продукты реакции методом ВЭЖХ. Типичная хроматограмма продуктов реакции трансгликозилирования приведена на рисунке (пики с τ 3.37 и 4.04 мин принадлежит *n*-нитрофенолу и Np-глюкозиду соответственно, а начиная с τ 4.88 мин – Np-глюкоолигозидам, образующимся в процессе реакции трансгликозилирования). На рисунке представлены также зависимости времени удерживания (lgτ) от степени полимеризации (СП) Np-глюкоолигозидов.

При действии глюканазы ЛІV на ламинаран (I) в высоких концентрациях (10 мг/мл) в присутствии Np-глюкозида образуются два ряда Np-глюкоолигозидов (табл. 1, рисунок, б). Первый член ряда, представленного прямой 1 (τ 4.88 мин), как было показано ранее [10, 13], является Np-ламинарибиозидом. Следующие пики (рисунок, а) соответствуют членам этого ряда и являются его гомологами – Np-ламинаритри-, -тетра- и -пентаозидами. Второй ряд (прямая 2) соответствует Np-1,3;1,6-β-D-глюкоолигозидам, образующимся из точек ветвления в ламинаране. Начинается этот ряд, вероятно, с Np-1,3;1,6-β-D-глюкопентаозидом. Установлено [13], что введение β-1,6-глюкозидных связей в молекулу ламинариолигозида значительно увеличивает время удерживания по сравнению с соответствующим 1,3-изомером. Времена удерживания первых членов ряда 2 и последующих членов ряда 1 с СП > 5, отсутствующих в продуктах реакции, легко определяются при продолжении прямых, соответствующих этим рядам (рисунок, б).

При низких концентрациях ламинарана (I) под действием глюканазы ЛІV в присутствии Np-глюкозида образуются Np-ламинарибиозид и -триозид, а далее – только смешанные Np-1,3;1,6-β-D-глюкоолигозиды. Np-Ламинариолигозиды со сте-

Таблица 1. ВЭЖХ продуктов трансгликозилирования, полученных действием ЛІV (2×10^{-2} ед. акт./мл) на ламинаран (10 мг/мл) из *L. cichorioides* в присутствии акцептора – Np-глюкозида (5 мг/мл)

Продукт	τ , мин	Выход Glc _n -Np (% от Glc-Np) за время реакции (ч)							
		0.5	1	2	5	17	24	40	48
Glc-Np	4.04	95.0	92.2	87.7	84.3	67.6	68.0	69.4	75.3
Glc ₂ -Np	4.88	3.78	5.4	6.1	10.8	18.7	21.7	22.6	19.7
Glc ₃ -Np	6.00	0.39	1.7	2.46	3.33	7.9	7.14	7.1	4.2
Glc ₄ -Np	7.6	0.2	0.5	1.2	2.04	3.9	2.64	0.42	0.09
Glc ₅ -Np	9.65	0.05	0.1	0.2	0.4	1.0	0.3	0.05	0
iGlc ₅ -Np*	13.2	0	0	0	0	0.6	0	0	0
iGlc ₆ -Np	17.8	0	0	0	0	0.2	0	0	0
iGlc ₇ -Np	24.1	0	0	0	0	0.1	0	0	0

* iGlc_n-Np – Np-1,3; 1,6-β-D-глюкоолигозиды.**Таблица 2.** ВЭЖХ продуктов трансгликозилирования, полученных действием ЛІV на ламинараны (1 мг/мл) из *L. cichorioides* (I), *L. guryanovae* (II), *F. evanescens* (III) и транслама (IV) в присутствии Np-глюкозида (1 мг/мл) через 1 и 2 ч реакции.

Продукт	τ , мин	Выход Np-олигозидов (% от Glc-Np)							
		(I)		(II)		(III)		(IV)	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Glc-Np	4.01	96.1	94.7	97.0	95	99.3	98.8	98.6	98.0
Glc ₂ -Np	4.86	1.7	2.0	1.3	2.54	0	0	0	0
Glc ₃ -Np	6.12	1.5	1.5	0.86	1.4	0.21	0.55	0.36	0.6
iGlc ₃ -Np*	8.07	0.83	1.1	0.43	0.55	0.06	0.38	0.32	0.7
iGlc ₄ -Np	11.2	0.05	0.2	0.05	0.02	0.005	0.12	0.03	0.05
iGlc ₅ -Np	15.87	0	0.05	0	0	0	0	0.01	0.01

* iGlc_n-Np – Np-1,3; 1,6-β-D-глюкоолигозиды.

пенью полимеризации более 3 отсутствуют (данные не приведены).

Следовательно, состав продуктов трансгликозилирования для глюканазы ЛІV зависит от концентрации субстрата: при высоких концентрациях донора наряду с Np-ламинариобиозидом и -триозидом образуются Np-ламинариолигозиды с более высокой степенью полимеризации, в то время как при низких концентрациях субстрата этот ряд заканчивается Np-ламинаритриозидом.

При сравнительном изучении способности глюканазы ЛІV катализировать реакцию переноса гликозидных остатков с использованием в качестве доноров 1,3;1,6-β-D-глюканов (I)–(IV) было обнаружено, что выход и скорость образования Np-глюкоолигозидов, и Np-ламинариобиозида в частности, зависят от количества β-1,6-связанных остатков глюкозы в субстрате (табл. 2). О скорости реакции трансгликозилирования судили по расходу Np-глюкозида на линейном участке кривой (%/мин) или по накоплению отдельных Np-олигозидов. Так, начальная скорость в случае высоких концентраций доноров была для ламинарана (III) (35% β-1,6-связей) в 5 раз меньше, чем для ламинарана (I) (10% β-1,6-связей). При использовании

субстратов в концентрации 1 мг/мл эти различия оказались еще более существенными и отношение скоростей $v_I : v_{II} : v_{IV} : v_{III} = 12 : 6 : 2.5 : 1$ (табл. 2).

От структуры субстрата зависит также и качественный состав продуктов реакции. Так, было обнаружено, что при использовании в качестве доноров транслама (IV) и ламинарана из *F. evanescens* (III) в низких концентрациях в продуктах трансгликозилирования при любом времени реакции отсутствует Np-ламинариобиозид (табл. 2). В случае высоких концентраций этих субстратов (10 мг/мл) доля Np-ламинариобиозида в продуктах также невелика. Так, максимальный выход продуктов трансгликозилирования (по отношению к введенному в реакцию Glc-Np (1 мг/мл)) для субстратов (I), (II), (III) и (IV) составлял в этих условиях 50, 40, 7 и 16 (в том числе доля Np-ламинариобиозида – 26, 24, 1.5 и 7%) соответственно.

Это, возможно, связано с тем, что Np-ламинариобиозид появляется в результате осуществления ферментом механизма множественной атаки [14]. Ранее, в процессе изучения специфичности глюканазы ЛІV, было обнаружено [15], что наличие замещения по C6 в остатке глюкозы запрещает атаку β-1,3-связи со стороны восстанавлива-

Таблица 3. ^{13}C -ЯМР-спектры гликозидной части молекул Np-гликоолигозидов

Соединение	Элемент структуры	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Np-Ламинарибиозид	→ 3GlcNp	100.2	73.1	85.9	68.7	76.3	61.3
	Glcβ1 →	103.1	74.2	76.6	70.3	76.6	62.5
Np-Ламинаритриозид	→ 3GlcNp	100.4	73.5	85.4	69.1	76.8	61.8
	→ 3Glcβ1 →	103.8	73.7	85.4	69.1	76.8	61.9
	Glcβ1 →	103.8	74.6	77.1	70.8	77.1	62.0

ющего конца замещенного остатка и затрудняет атаку следующей. С учетом этого факта для осуществления множественной атаки и, как следствие, возникновения Np-ламинарибиозида необходимо наличие в субстрате участков с последовательностями из трех, а лучше – из четырех и более β-1,3-связанных незамещенных остатков глюкозы. При содержании β-1,6-связанных остатков глюкозы в 1,3-β-D-глюкране выше 10–15% количество участков, из которых могут возникнуть Np-ламиариолигозиды, и Np-ламиарибиозид в том числе, резко уменьшается. Как результат – отсутствие Np-ламиарибиозида в продуктах трансгликозилирования при использовании высокоразветвленных доноров (III) и (IV).

В итоге можно сделать вывод, что максимальный выход продуктов трансгликозилирования, и Np-ламиарибиозида в частности (табл. 1), наблюдается при использовании в качестве донора ламинарана из *L. cichorioides* в высокой концентрации. Кроме того, среди исследованных субстратов этот ламинаран наиболее доступен: содержание его в водоросли, которая поддается культивированию, достигает 10–12% [11]. Поэтому наиболее целесообразно для получения Np-ламиариолигозидов в препаративных масштабах использовать именно его.

При изучении зависимости суммарного выхода продуктов трансгликозилирования от концентрации акцептора (субстрат – ламинаран из *L. cichorioides* (10 мг/мл)) при прочих равных условиях оказалось, что при использовании 1, 2, 5 и 10 мг/мл Np-гликозида в продукты включалось 50, 35, 33 и 1.5% акцептора соответственно, что от его исходного количества составляет 0.5, 0.7, 1.7 и 0.15 мг. Из этих данных видно, что в синтезе предпочтительнее использовать акцептор в концентрации 5 мг/мл.

В этих условиях была прослежена кинетика накопления Np-ламиариолигозидов (табл. 1). Как видно из табл. 1, накопление Glc₂-Np в этих условиях практически выходит на плато через 17 ч. Примерно в это же время наблюдается максимум в накоплении Glc₃-Np и Glc₄-Np, которые начинают далее расходоваться, Glc₄-Np – наиболее интенсивно. В оптимальных условиях выход Np-ламиариби-, три-, тетра- и пентаолигозидов составляет 19, 8, 4 и 1% соответственно. Глубокие стадии реакции характеризуются уменьшением

содержания Np-олигозидов, в том числе и изомерных, появлением значительного количества *n*-нитрофенола (τ 3.37, рисунок).

Продукты ферментативной реакции, остановленной в точке, соответствующей максимуму их накоплению (время 17 ч), были разделены на колонке с силикагелем. В результате был получен Np-ламиарибиозид, который легко кристаллизовался прямо из системы в виде красивых белых пластин, и Np-ламиариитриозид, содержащий, по данным ВЭЖХ, около 10% Np-биозида. В табл. 3 приведены хим. сдвиги C-атомов в ^{13}C -ЯМР-спектрах полученных в индивидуальном состоянии Np-ламиариби- и триозида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эндо-1,3-β-D-глюканазу из морского моллюска *S. sachalinensis* (LIV) выделяли по методу [4]. Ламиараны из *L. cichorioides*, *L. gurjanovae*, *F. evanescentis* и транслам получены согласно [11, 12]. *n*-Нитрофенил-β-D-гликозид – коммерческий препарат фирмы Chemapol. Сахара определяли фенол-сернокислотным методом [16], восстанавливающие сахара – методом Нельсона [17]. ТСХ проводили на силикагеле L 5/40 мкм (Chemapol) в системе хлороформ–метанол–вода, 650 : 150 : 20. Для обнаружения веществ использовали 30% H₂SO₄ в метаноле с последующим прогреванием до 120°C. ^{13}C -ЯМР-спектры снимали на спектрометре НХ-90Е Bruker в D₂O.

Кинетические эксперименты. Реакционные смеси содержали в 1 мл 0.05 М ацетатного буфера (рН 5.5) от 1 до 10 мг субстратов и от 1 до 10 мг Np-гликозида. Для инициации ферментативного процесса добавляли на 1 мл смеси от 0.5 до 2 × 10⁻² ед. акт. глюканазы LIV (1 ед. акт. – количество фермента, катализирующее образование в стандартных условиях [4] из ламинарана 1 мкмоль восстанавливающих сахаров в 1 мин). Реакцию проводили при 25°C. ВЭЖХ продуктов трансгликозилирования осуществляли при рН 4.0 в системе ацетонитрил – 0.05 М ацетат Na (80 : 20) на жидкостном хроматографе DuPont серии 8800 (колонка Ultrasil-NH₂, 10 × 250 мм; Beckman). Скорость элюции 4 мл/мин. Продукты регистрировали по поглощению при 300 нм, что соответствует λ_{max} для Glc-Np.

Для препаративного получения Np-гликоолигозидов в 100 мл ацетатного буфера (pH 5.5) растворяли 1 г ламинарана из *L. cichorioides* (10 мг/мл), 0.5 г Glc-Np (5 мг/мл), добавляли глюконазу LIV (2 ед. акт., 2×10^{-2} ед./мл) и проводили ферментативную реакцию при 25°C в течение 17 ч, анализируя состав продуктов методом ВЭЖХ.

Продукты ферментативной реакции, остановленной прогреванием смеси при 100°C в течение 15 мин, разделяли на силикагеле L (40–100 меш) в системе хлороформ–метанол–вода, 650 : 150 : 20, используя для количественного определения интегрирующую систему LKB 2220 (Recording integrator, Bromma, Швеция). Судя по хроматограмме, полученной с помощью ВЭЖХ (табл. 1), в общей смеси должно находиться около 300 мг Glc₂-Np и 150 мг Glc₃-Np. В результате разделения смеси на силикагеле было получено 100 мг индивидуального Glc₂-Np, который легко кристаллизовался прямо из системы в виде красивых белых пластин, и 50 мг Glc₃-Np, содержащего, по данным ВЭЖХ, около 10% Glc₂-Np. Индивидуальный препарат Np-ламинаритриозида был получен после отделения Np-ламинарибиозида с помощью ВЭЖХ. Np-Ламинарибиозид: $[\alpha]_D -65^\circ$ (с 0.2; этанол); т. пл. 232–233°C (из этанола). Np-Ламинартриозид: $[\alpha]_D -50^\circ$ (с 0.02; этанол). В остальных фракциях Glc₂-Np и Glc₃-Np находились в смеси либо друг с другом, либо соответственно с Glc-Np или высшими олигозидами, откуда легко могут быть получены в индивидуальном состоянии либо рехроматографией на силикагеле, либо ВЭЖХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sinnott M.J. // Chem. Rev. 1990. V. 90. P. 1171–1202.
2. Ichikawa Y., Look G.C., Wong Ch.-H. // Anal. Biochem. 1992. V. 202. P. 215–238.
3. Legler G. // Carbohydr. Res. 1993. V. 250. P. vii–xx.
4. Sova V.V., Elyakova L.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 258. P. 219–227.
5. Привалова Н.М., Елякова Л.А. Способ получения эндо- β -1,3-глюканазы: А. с. № 574469 СССР // Б. И. 1977. № 36.
6. Звягинцева Т.Н., Назарова Н.И., Елякова Л.А. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. С. 1342–1346.
7. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 453–474.
8. Aso Y., Yamamoto H., Torikata K. // Abstr. II Intern. Symp. of Bioorganic Chem. Fukuoka, Japan, 1993. P. 189.
9. Звягинцева Т.Н., Евтушенко Е.В., Елякова Л.А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. С. 1206–1213.
10. Назарова Н.И., Елякова Л.А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. С. 1215–1222.
11. Звягинцева Т.Н., Широкова Н.И., Елякова Л.А. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 1349–1358.
12. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А., Исаков В.В. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 218–225.
13. Елякова Л.А., Назарова Н.И. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 55–60.
14. Безукладников П.В., Елякова Л.А., Мазур А.К. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 1141–1163.
15. Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Elyakova L.A. // Carbohydr. Res. 1986. V. 148. P. 57–62.
16. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
17. Nelson N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. P. 375–381.

The Production of *p*-Nitrophenyl Laminarioligosides through the Transglycosylation Reaction Catalyzed by Endo-1,3- β -D-Glucanase from a Marine Mollusk

T. N. Zvyagintseva, T. N. Makar'eva, S. P. Ermakova, and L. A. Elyakova

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

The transglycosylation reaction catalyzed by endo-1,3- β -D-glucanase LIV from the marine mollusk *Spisula sachalinensis* was studied with the goal of preparing *p*-nitrophenyl (Np) 1,3- and 1,3;1,6-*D*-glucooigosides. As donors we used the 1,3;1,6- β -*D*-glucans with various content of β -1,6-glucoside bonds: laminarians [from *Laminaria cichorioides* (10%), *L. gurjanovae* (2%), and *Fucus evanescens* (35%)] and translam (25%); as acceptor we used the *p*-nitrophenyl β -*D*-glucoside (GNp). The maximal yield of the transglycosylation products was found when using laminaran from *Laminaria cichorioides*; donors with a lower or higher content of β -1,6-glucoside bonds were less efficient. The laminaran from *F. evanescens* and translam gave no Np-laminariobioside. At optimal conditions (10 mg/ml of laminaran from *L. cichorioides* and 5 mg/ml of GNp), maximal yields of Np-laminariobioside, Np-trioside, Np-tetraoside, and Np-pentaoside were 19, 8, 3, and 1%, respectively. The first two compounds were isolated by chromatography on silica gel, their physicochemical characteristics were obtained, and their structures were established by ¹³C NMR spectroscopy.

Key words: endo-1,3- β -D-glucanases, transglycosylation, substrate specificity, 1,3;1,6- β -D-glucans, laminarians, Np-laminarioligosides, marine mollusks, brown algae