



УДК 577.154.26.02

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ 1,3-β-ГЛЮКАНАЗ  
ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н.

Тихооксанский институт биоорганической химии Дальневосточного научного центра  
Академии наук СССР, Владивосток

Изучены кинетические особенности образования глюкозы и восстанавливающих сахаров из ламинарина ( $n$  30) и ламинариолигосахаридов ( $n$  13) под действием трех различных 1,3-β-глюканаз из моллюсков: экзофермента из *Eulota maakii* (ЛII) и эндоферментов из *Spisula sachalinensis* (ЛIV) и *Chlamys abbidus* (Л<sub>0</sub>). Для всех трех ферментов получены кривые накопления глюкозы, отличающиеся друг от друга. В случае фермента ЛII скорость образования глюкозы падает с уменьшением  $n$ . Для ЛIV скорость остается постоянной в интервале изменения  $n$  от 30 до 7. Образование глюкозы из ламинарина под действием фермента Л<sub>0</sub> характеризуется на первой стадии реакции появлением лаг-периода, исчезающего при гидролизе олигосахаридов ( $n$  13).

Изучение связи между кинетическими параметрами ферментативной реакции и структурой субстратов — один из наиболее плодотворных подходов для исследования механизма действия ферментов. В частности, этот подход широко используется при исследовании гликаназ. Так, изучение их поведения по отношению к субстратам с различной степенью полимеризации ( $n$ ) позволяет оценить размеры активных центров ферментов. Эти заключения делаются на основе того, что скорость гидролиза олигосахаридов гликаназами остается постоянной, пока степень полимеризации субстрата не станет меньше числа участков связывания в активном центре фермента, после чего скорость реакции начинает уменьшаться с уменьшением  $n$  [1].

Гидролиз различных субстратов выделенными гомогенными [2–4] 1,3-β-глюканазами эндо- и экзотипов действия был изучен нами ранее [5]. В результате этого была проведена сравнительная оценка размеров активных центров исследованных ферментов и сделаны выводы о том, что 1,3-β-глюканаза из *Spisula sachalinensis* (ЛIV) осуществляет механизм множественной атаки субстрата и что глюкоза не оказывает ингибирующего действия на ферментативный гидролиз ламинарина, катализируемый ферментом ЛIV.

В настоящей работе проведено изучение зависимости накопления глюкозы и восстанавливающих сахаров от степени полимеризации субстрата, уменьшающейся в процессе гидролиза ламинарина ( $n$  30) и ламинариолигосахаридов ( $n$  13) различными 1,3-β-глюканазами: эндоферментами из *Spisula sachalinensis* (ЛIV) и *Chlamys abbidus* (Л<sub>0</sub>) и экзоферментом из *Eulota maakii* (ЛII). Регистрацию продуктов, образующихся в процессе ферментативных реакций, проводили двумя независимыми методами: вос-

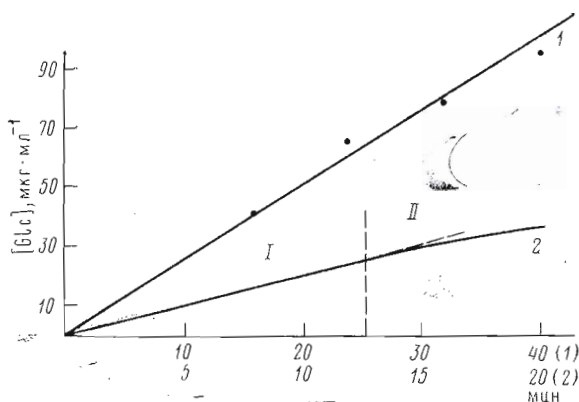


Рис. 1. Зависимость концентрации продуктов от времени для реакции фермента ЛIIIV с ламинарином (500 мкг/мл,  $n$  30), определенная методами Нельсона (1) и гексокиназным (2)

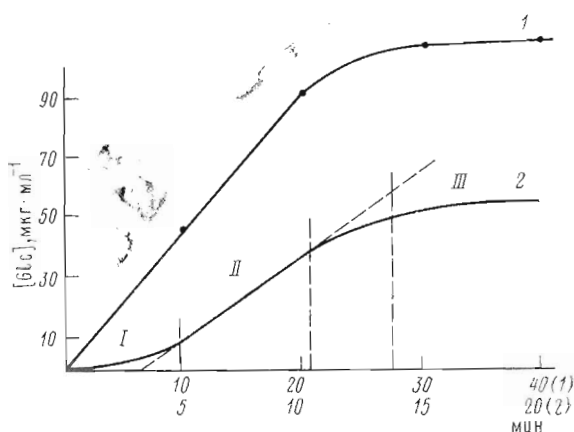


Рис. 2. Зависимость концентрации продуктов от времени для реакции фермента LIc с ламинарином (500 мкг/мл), определенная методами Нельсона (1) и гексокиназным (2)

становливающие сахара фиксировали методом Нельсона [6], глюкозу — гексокиназным методом [7].

Накопление восстанавливающих сахаров в процессе ферментативного гидролиза должно подчиняться прямо пропорциональной зависимости от времени реакции до того момента, когда скорость замедляется в силу исчезновения субстрата. Накопление глюкозы теоретически может происходить по одному из трех вариантов: а) скорость образования глюкозы ( $v_{Glc}$ ) не зависит от изменения степени полимеризации субстрата в течение ферментативной реакции; б) скорость образования глюкозы закономерно падает с уменьшением  $n$ ; в) скорость образования глюкозы увеличивается с уменьшением  $n$ . Графически в первом случае накопление глюкозы от времени имеет вид прямой, выходящей из начала координат, во втором — наблюдается уменьшение скорости во времени, в третьем — кривая имеет сигмоидный вид.

Для указанных трех ферментов при гидролизе ламинарина были получены кривые накопления глюкозы, отличающиеся друг от друга. Так, для экзофермента ЛIII наблюдается уменьшение скорости накопления глюкозы от времени, т. е. с падением  $n$  в ходе гидролиза. Фермент ЛIIIV дает кривую накопления глюкозы, которая распадается на два участка (рис. 1): до определенной степени полимеризации субстрата  $v_{Glc}$  не зависит от изменения  $n$  (участок I), затем  $v_{Glc}$  начинает равномерно убывать с паде-

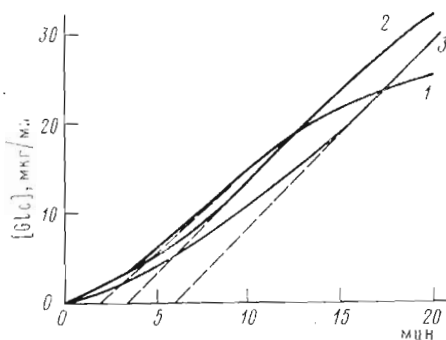


Рис. 3

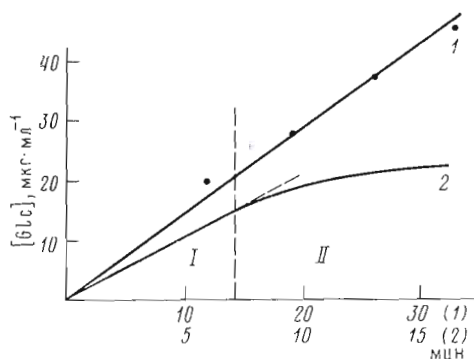


Рис. 4

Рис. 3. Влияние концентрации субстрата на процесс образования глюкозы из ламинарина под действием фермента  $L_0$ : 1 — 340; 2 — 500; 3 — 800 мкг/мл

Рис. 4. Зависимость концентрации продуктов от времени для реакции фермента  $L_0$  с олигосахаридами (500 мкг/мл), определенная методами Нельсона (1) и гексокиназы (2)

нием  $n$  (участок II). Переход участка I в II происходит при  $n$  7. Процесс образования глюкозы в случае гидролиза ламинарина эндоферментом  $L_{IV}$  кажется закономерным: отношение восстанавливающих сахаров к количеству глюкозы в них с течением времени реакции почти не меняется и равно приблизительно 2,5 (рис. 1). Возможно, что механизм взаимодействия фермента  $L_{IV}$  с субстратами характеризуется определенной степенью множественности атаки, продуктом которой является глюкоза.

Для эндофермента  $L_0$  была получена сигмоидная кривая зависимости накопления глюкозы от времени реакции (рис. 2). Кривая имеет отчетливо выраженный лаг-период по глюкозе (участок I) далее идет участок II, где  $v_{Glc}$  не меняется с изменением  $n$  и, наконец, участок III, общий для всех исследованных реакций, где с уменьшением  $n$  уменьшается и скорость накопления глюкозы. С увеличением концентрации субстрата лаг-период увеличивается (рис. 3).

Наличие участка II на кривой образования глюкозы из ламинарина под действием фермента  $L_0$  говорит о том, что процесс гидролиза олигосахаридов в определенном интервале  $n$  не должен иметь лаг-периода по глюкозе. Для проверки этого предположения была проведена деградация олигосахаридов со средней степенью полимеризации 13 ферментами  $L_{IV}$  и  $L_0$ . Для фермента  $L_{IV}$  была получена картина, аналогичная изображенной на рис. 1, тогда как в случае глюканазы  $L_0$  лаг-период, характерный для гидролиза ламинарина, при гидролизе олигосахаридов ( $n$  13) полностью исчез (рис. 4). Доля глюкозы в продуктах реакции возрастает при этом почти в 2 раза как для глюканазы  $L_0$ , так и для глюканазы  $L_{IV}$ .

Причина исчезновения лаг-периода точно не установлена, можно высказать лишь некоторые соображения по этому вопросу. Одной из причин исчезновения лаг-периода может быть процесс трансгликозилирования, присущий в разной степени эндоферментам [8]. Но отсутствие трансгликозилирования в нашем случае предопределялось условиями реакции: использованием короткого времени инкубации и низких концентраций субстратов, не превышающих 500–800 мкг/мл ( $K_m$  фермента  $L_{IV}$  по ламинарину 250, а фермента  $L_0$  — 700 мкг/мл [5]). Вклад реакций трансгликозилирования становится заметным при концентрациях субстратов 5–10 мг/мл и значительно большем времени инкубации. Альтернативное объяснение — непосредственное образование глюкозы в результате действия эндоламинараз на малые олигосахариды — также отпадает, так как этот процесс затруднен (см. участок II, рис. 1, и участок III, рис. 2, на кривых накопления глюкозы). Например, скорость гидролиза фермен-

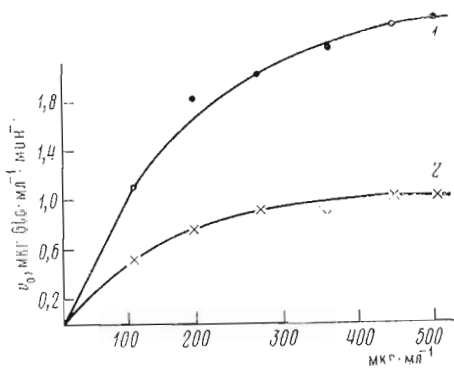


Рис. 5

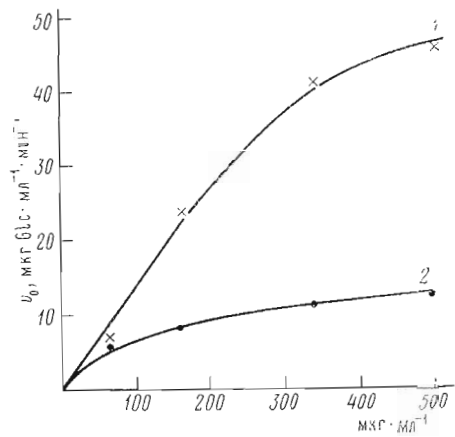


Рис. 7

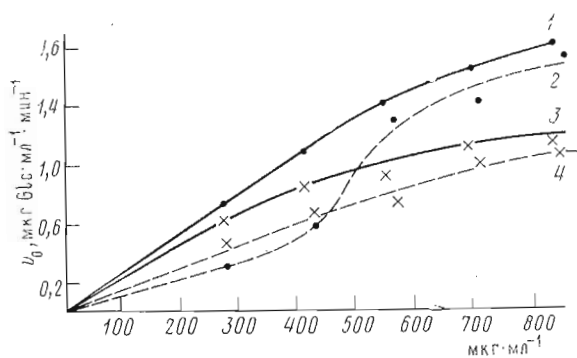


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость начальной скорости реакции фермента ЛIIIV с ламинарином от концентрации субстрата, определенная методами Нельсона (1) и гексокиназным (2)

Рис. 6. Зависимость начальной скорости реакции ферментативного гидролиза олигосахаридов ферментом ЛIIIV (сплошные) и  $V_0$  (пунктирные линии) от концентраций субстрата, определенная методами Нельсона (1, 2) и гексокиназным (3, 4)

Рис. 7. Зависимость начальной скорости реакции фермента  $L_0$  с ламинарином от концентрации субстрата, определенная методами Нельсона (1) и гексокиназным (2)

тами ЛIIIV и  $L_0$  ламинарибозы и ламинаритриозы в 5–10 и более раз меньше, чем ламинарина [5]. По исключению этих двух причин остается предполагать, что здесь большую роль может играть изменение степени множественности атаки или, например, переход от множественной атаки на длинный субстрат к предпочтительной атаке субстратов, длина которых сопоставима с длиной активного центра фермента, т. е. с количеством его сорбционных участков [9].

Гидролиз ламинарина и ламинариполисахаридов эндо-1,3- $\beta$ -глюкоказой ЛIIIV соответствует уравнению Михаэлиса — Ментен с параметрами  $K_m$  и  $V$  (по методу Нельсона), равными 250 мкг/мл и 40 мкг·мл<sup>-1</sup>·мин<sup>-1</sup> (для ламинарина, рис. 5) и соответственно 250 и 35 (для олигосахаридов, рис. 6). Взаимодействие фермента  $L_0$  как с ламинарином, так и с олигосахаридами характеризуется отклонениями от традиционной кинетики Михаэлиса — Ментен (рис. 3, 6, 7). Так, определить кинетические параметры для образования глюкозы из ламинарина для этого фермента оказывается невозможным (рис. 2, 3); за начальную скорость образования глюкозы условно была принята  $v_{GlC}$  на линейных участках кривых накопления ее от времени (рис. 3, 6, пунктирные линии, и рис. 7). Кинетиче-

ские параметры образования восстанавливающих сахаров из ламинарина под действием  $J_0$  можно определить также из рис. 7. Они совпадают с приведенными в работе [5]. Для олигосахаридов, наоборот, оказалось затруднительно определить  $K_m$  и  $V$ , характеризующие образование восстанавливающих сахаров, так как в данном случае наблюдается сигмоидная зависимость  $v_0$  от концентрации олигосахаридов (рис. 6, пунктирная линия).

Вероятно, выявленная в данном исследовании разница в действии двух эндоферментов на субстраты с различной степенью полимеризации отражает различия в строении активных центров и механизмов действия этих ферментов.

### Экспериментальная часть

Ламинариназа ЛII была выделена из желудка улитки *E. maakii* по методу [4]. Ферменты  $J_0$  и ЛIV получены из кристаллических стебельков морских моллюсков *Ch. abbidus* [3] и *S. sachalinensis* [2] соответственно.

Ламинарин получали из бурой водоросли *Laminaria cycharioides* по методике [10]. Ламинариолигосахариды самопроизвольно осаждались из охлажденного водного раствора ферментативного гидролизата ламинарина. Средняя степень полимеризации ( $n$  13) была определена как отношение общего количества сахара (фенолсернокислотный метод [11]) к количеству восстанавливающих групп в аликвоте (метод Нельсона [6]). Примесь глюкозы в ламинариолигосахаридах была удалена (после окисления ее в глюконовую кислоту глюкозооксидазой) обработкой растворов бифункциональной смолой MB-1.

Ферментативный гидролиз проводили при 37° С (ферменты ЛII и ЛIV) и 30° С (фермент  $J_0$ ) в натрий-фосфатном буфере, рН 6,8. Концентрации глюкогеназ  $J_0$ , ЛIV и ЛII при использовании гексокиназного метода составляли 5,2 и 3 мкг/мл соответственно, а при использовании метода Нельсона — 2,5; 1 и 1,5 соответственно (кроме опытов, отраженных на рис. 3, где фермент  $J_0$  был разбавлен в 2 раза). Ламинарин использовали в концентрации 100–500 мкг/мл, а олигосахариды — в концентрации 250–800 мкг/мл. Концентрации субстратов определяли фенолсернокислотным методом [11].

Количество восстанавливающих сахаров, образующихся в процессе ферментативной реакции, определяли с помощью метода Нельсона [6]. Глюкозу регистрировали гексокиназным методом [7]; использовали реактивы для гексокиназного метода, выпускаемые фирмой «Boehringer», реакцию проводили в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, рН 6,8. Автоматическую запись реакции осуществляли на спектрофотометре «Specord UV VIS» при  $\lambda$  340 нм.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Hiromi K. Subsite affinities and action pattern of amylases.— In: Proteins: Structure and function. Tokyo: Kodansha Ltd, 1972, v. 2, p. 1–45.
2. Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. E. Purification and some properties of  $\beta$ -1,3-glucan glucanohydrolase from crystalline style of bivalve *Spisula sachalinensis*.— Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 212, p. 111–115.
3. Privalova N. M., Elyakova L. A. Purification and some properties of endo- $\beta$ -1, 3-glucanase from the marine bivalve *Chlamys abbidus*.— Comp. Biochem. and Physiol., 1978, v. 60B, p. 225–228.
4. Елякова Л. А., Широкова Н. И. Экзо- $\beta$ -1, 3-глюканаза из улитки *Eulota maakii*.— Биоорг. химия, 1977, т. 3, с. 1656–1662.
5. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Привалова Н. М. Сравнительная характеристика и изучение сорбционных свойств активных центров эндо- $\beta$ -1,3-глюканаза из морских беспозвоночных.— Биоорг. химия, 1978, т. 4, с. 1553–1559.
6. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.— J. Biol. Chem., 1944, v. 153, p. 375–381.
7. Асагуани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М.: Наука, 1965, с. 258–263.

8. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N. Transferase activity of  $\beta$ -1,3-glucanases from *Spisula sachalinensis*.— Abstracts 9th FEBS meeting, 1974, s2p2.
9. Banks W., Greenwood C. T. Mathematical models for the action of  $\alpha$ -amylase on amylose.— Carbohydr. Res., 1977, v. 57, p. 301–315.
10. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N. A study of the laminarins of some far-eastern brown seaweeds.— Carbohydr. Res., 1974, v. 34, p. 241–248.
11. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. R., Roberts P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances.— Analyt. Chem., 1956, v. 28, p. 350–356.

Поступила в редакцию  
26.VI.1980

После доработки  
1.X.1980

## KINETIC PECULIARITIES IN THE ACTION OF 1,3- $\beta$ -GLUCANASES FROM DIFFERENT SOURCES

ELYAKOVA L. A., ZVYAGINTSEVA T. N.

*Pacific Institute of Biorganic Chemistry, Far East Science Center,  
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

The kinetic peculiarities were studied for glucose and reducing sugars formation from laminarin ( $n$  30) and laminarioligosaccharides ( $n$  13) under the action of three different 1,3- $\beta$ -glucanases: exoenzyme from *Eulota maakii* (LII) and endoenzymes from *Spisula sachalinensis* (LIV) and from *Chlamys abbidus* ( $L_0$ ). Three different curves of glucose accumulation were obtained with these enzymes. The rate of glucose formation decreased with reducing the polymerization degree  $n$  in the case of LII, whereas it was not affected upon varying  $n$  from 30 to 7 with LIV. Glucose formation from laminarin catalyzed by  $L_0$  showed a lag period, which was not observed in the hydrolysis of oligosaccharides ( $n$  13).