

Трансгликозилирующая активность эндо- β -1,3-глюканаз
 Приведено поглощение выделившегося *n*-нитрофенола через 3–72 ч *

Донор	ЛО **				ЛIV				ЛIII		
	3	26	48	72	3	26	48	72	26	48	72
(Glc) ₂	0,005	0,005	0,025	0,050	0,005		0,007		0,015	0,020	0,034
(Glc) ₂₋₄	0,115		2,08	2,72			0,800		0,770	1,32	2,00
(Glc) ₁₃	0,120	1,26	2,16	3,00	0,055	0,405	0,710	0,980	1,04	2,10	3,32
Ламинарин	0,22 (0,02)	1,10 (0,03)	2,16 (0,03)		0,055	0,310	0,570	0,860	1,07	2,04	3,60

* Объем инкубационной смеси 3,1 мл, концентрации доноров 6,6 мг/мл, *n*-нитрофенил-глюкозида 7,2 мг/мл; гидролазная активность всех ферментов в аликвотах одинакова.

** В скобках приведены данные для β -1,3-эндоглюканазы из *Actinomyces cellulosaе*.

Таблица 2

¹³C-химические сдвиги в спектрах ламинарина и суммы
n-нитрофенилолигозидов (пики I–IV)

Исследуемые вещества	Химические сдвиги					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Ламинарин в D ₂ O	103,28	74,13	85,32	69,30	76,60	61,90
Сумма <i>n</i> -нитрофенил- олигозидов (пики I–IV) в D ₂ O	104,13	74,13	85,32	69,33	76,20	61,20

фенола. С использованием этой системы была изучена трансферазная активность эндоламинариаз из морских моллюсков — ЛО, ЛIII и ЛIV (табл. 1). Для реакции были подобраны аликвоты ферментов, обладающие одинаковой гидролазной активностью. Как видно из табл. 1, ферменты ЛО, ЛIII и ЛIV обладают различной трансгликозилирующей способностью. Выявляется также (табл. 1), что трансферазная активность эндоферментов по отношению к различным донорам (ламинарину и ламинариолигосахаридам) меняется. Так, ламинарибиоза очень плохой донор для всех ферментов. Трансгликозилирование, видимо, начинается с того минимального по длине субстрата, который может подвергаться ферментативному гидролизу (например, см. данные с субстратом $n=2-4$, табл. 1).

Полученные продукты реакции трансгликозилрования анализировали на колонке с биогеом Р-2 в отработанных условиях разделения (см. «Экспериментальную часть»). Были обнаружены вновь образованные вещества (II), (III) и (IV) (рис. 1), выходящие с колонки после глюкозы. Из сравнения с литературными данными по аналогичному разделению продуктов действия α -амилазы на амилодекстрины в присутствии Np -глюкозида [8] вещества (II)–(IV) можно было предположительно считать *n*-нитрофенильными производными ламинариолигозидов. Для подтверждения этого была проведена идентификация продуктов (II)–(IV) несколькими методами.

а) Препаративно выделенные продукты (сумма пиков II–IV, рис. 1) подвергли ферментативному гидролизу β -глюкозидазой из сладкого миндаля (скорость расщепления коротких субстратов наивысшая для этого фермента) с последующей хроматографией продуктов (рис. 2). Отсутствие на хроматограмме пика II (*n*-нитрофенилбиоза), уменьшение пика III (*n*-нитрофенилтриоза), появление значительного количества свободной глюкозы, а также наличие в продуктах ферментативного гидролиза *n*-нитрофенола подтверждает, что продукты (II)–(IV) содержат *n*-нитрофенильный радикал, соединенный β -связью с глюкозными единицами, т. е. все эти вещества являются β -глюкозидами.

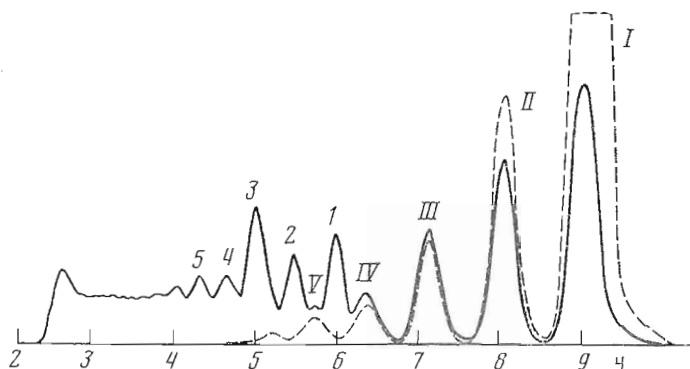


Рис. 1. Хроматография продуктов реакции трансгликозилирования в присутствии эндоглюканазы ЛІV, ламинарина и Np-глюкозида (время реакции 24 ч). Пики I, II, III, IV и т. д. — Np-глюкозид, Np-ламинарибиозид, -триозид, -тетраозид и т. д., пики 1, 2, 3, 4... — глюкоза, ламинарибиоза, -триоза, -тетраоза и т. д. Сплошная линия — показания орци — H₂SO₄-метода, пунктир — контроль при 280 нм. Условия разделения см. в «Экспериментальной части»

б) Инкубация смеси продуктов реакции (II) — (IV) с экзоламинаринойзой ЛІІІ (экзо-β-1,3-глюканаза, выделенная из *Eulota taakii*, специфичность которой установлена [9]: гидролиз β-1,3-связи в β-1,3-глюканах и β-1,3-глюкоолигосахаридах с последовательным отделением остатков глюкозы с невозстанавливающихся концов молекул субстрата; наилучшему расщеплению подвергаются более длинные субстраты) подтверждает наличие β-1,3-связанных глюкозных единиц, т. е. содержание в составе полученных веществ *n*-нитрофенилламинарибиозида, -триозида и -тетраозида (рис. 3). Действительно, содержание веществ (IV) и (III) после действия глюканазы ЛІІІ уменьшилось, а глюкозы, соединений (I) и (II) увеличилось.

в) Совпадение сигналов повторяющегося глюкозного звена в ¹³C-ЯМР-спектре ламинарина [10] и смеси материала пиков (I) — (IV) (рис. 1, табл. 2) подтвердило наличие β-1,3-связи между остатками глюкозы и отсутствие других типов гликозидных связей в данных веществах.

г) Для веществ пиков I, II, III по отношению показаний орцин-серно-кислотного метода к поглощению при 280 нм, фиксирующему продукты, содержащие *n*-нитрофенильный радикал, было измерено соотношение глюкоза — *n*-нитрофенол. Для стандартного образца Np-глюкозида это соотношение равнялось 1 : 3, для вещества пика II — 2 : 3, пика III — 3 : 3. Отсюда следует, что отношение глюкоза — *n*-нитрофенол в веществах (II) и (III) равно 2 : 1 и 3 : 1 соответственно.

Из вышеприведенного ясно, что вещества (II) — (IV) являются *n*-нитрофенилламинарибиозидом, -триозидом и -тетраозидом соответственно. Таким образом, для изучаемых ферментов реакция трансгликозилирования протекает с сохранением конфигурации у аномерного центра гликоновой части субстрата.

Картина разделения продуктов трансгликозилирования при жидкостной хроматографии по сравнению с картиной для обычного гидролиза в присутствии эндоглюканаз, характеризующейся хорошим разделением глюкозы и ее ди-, три-, тетра- и пентаолигомеров, значительно усложняется за счет появления пиков новых веществ, частично перекрывающих пики продуктов гидролиза. Эти новые вещества, вероятно, являются Np-гликозидами ламинарипентаозы, гексаозы и т. д., судя по наличию у этих продуктов поглощения при 280 нм, по времени их элюции с колонки и исчезновению этих пиков при увеличении времени гидролиза (рис. 4). Следовательно, накопление Np-гликозидов олигомеров происходит соответственно обычному правилу действия эндоферментов, т. е. первоначальному получению более крупных *n*-нитрофенилламинариполигозидов с дальнейшим их превращением в более короткие олигомеры. Так, постепенное исчезновение Np-гликозида тетраозы происходит при инкубации свыше

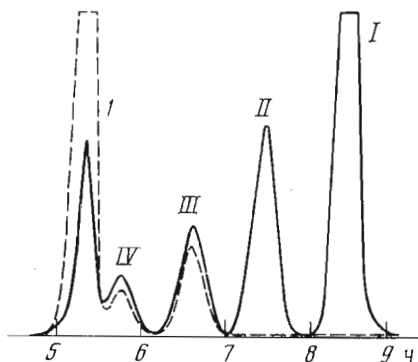


Рис. 2

Рис. 2. Хроматография *n*-нитрофенилолигозидов до (смесь продуктов пиков I–IV рис. 1; сплошная линия) и после (пунктир) действия β -глюкозидазы из сладкого миндаля (орцин — H_2SO_4 -метод). Обозначения пиков как на рис. 1

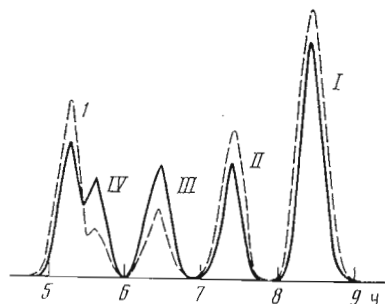


Рис. 3

Рис. 3. Хроматография смеси *n*-нитрофенилолигозидов (I)–(IV) до (сплошная линия) и после (пунктир) действия экзо- β -1,3-глюканазы ЛПІ из *E. maakii* (орцин — H_2SO_4 -метод). Обозначения пиков как на рис. 1

24 ч (ср. пики IV рис. 1, 4). Накопление гликозида димера и тримера происходит, по-видимому, потому, что их дальнейший гидролиз ламинариназами затруднен. Следует учесть, что скорости гидролиза арилди- и триламинариозидов, вероятно, равны скоростям гидролиза ламинарибозы и ламинаритриозы (как это было экспериментально определено для одной из β -1,3-глюканаз [11]), а последние 3–10 раз меньше скорости гидролиза ламинарина нашими ферментами [12]. Повышенное содержание Np -ламинарибозида может быть объяснено самой меньшей скоростью его вторичного распада.

Была установлена зависимость скорости трансгликозилирования от концентраций донора и акцептора. При постоянной концентрации ламинарина (10 мг/мл, 2 мМ) зависимость скорости выделения свободного *n*-нитрофенола от концентрации Np -гликозида согласуется с уравнением Михаэлиса — Ментен (рис. 5): кажущаяся K_m равна 13 мМ. При фиксированной концентрации Np -гликозида скорость была максимальной при концентрации ламинарина около 25 мг/мл.

Направленность процесса и степень трансгликозилирования можно было регулировать временем реакции, концентрациями фермента, донора и акцептора. Оптимальными условиями для образования Np -гликозидов ди-, три- и тетрамеров под действием эндоламинариназы ЛПІV, например, была концентрация акцептора 25 мг/мл, донора 15 мг/мл при времени инкубации от 4 до 24 ч. Суммарный выход *n*-нитрофенилламинариололигозидов при этом достигал 35% (в пересчете на исходный ламинарин).

Интенсивность процесса трансгликозилирования, осуществляемого эндогликаназами из морских моллюсков, кажется значительно большей соответствующих величин для эндоферментов из других источников (ср., например, [5, 11]). Эндо- β -1,3-глюканаза из *A. cellulosaе* в аналогичных условиях также проявила слабую способность к трансгликозилированию (табл. 1 и 3). Вероятно, большая интенсивность трансгликозилирования — результат как большей трансферазной активности, так и меньшей способности изучаемых ламинариаз к вторичному гидролизу получающихся коротких продуктов. Например, по литературным данным о действии осаживающей α -амилазы из *Bacillus subtilis* [13] на смесь мальтозы и Np -гликозида, накопление Np -гликозида мальтозы в процессе реакции неощущимо, так как он очень быстро подвергается гидролизу до *n*-нитрофенола и мальтозы.

Результаты, полученные при изучении трансгликозилирования под действием эндогликаназ в присутствии *n*-нитрофенил- β -D-глюкозида, повторяются при использовании в качестве акцепторов других арил- β -D-глюко-

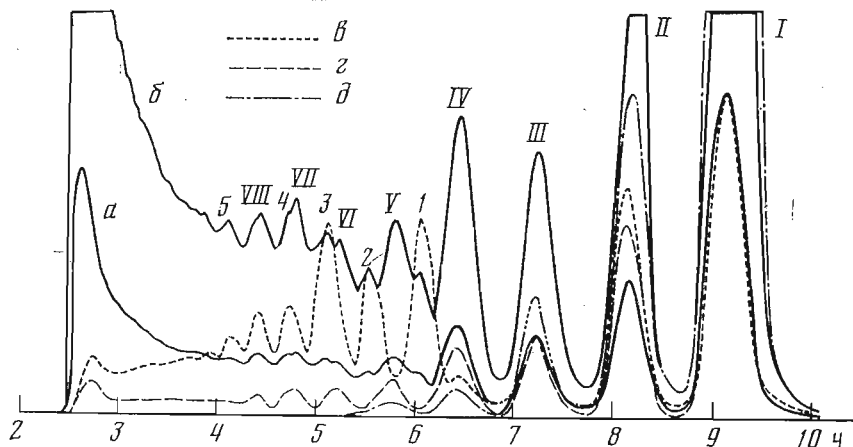


Рис. 4. Хроматография продуктов трансгликозилирования ламинариной ЛІV (донор — ламинарин, акцептор — Np-глюкозид) после 4 (а, б, в) и 48 ч (в, д) инкубации. Кривые а, б, в — показания орцин — H₂SO₄-метода (б — чувствительность ×3), кривые г, д — поглощение при 280 мμ. Обозначения пиков как на рис. 1

пиранозидов с сохранением на постоянном уровне (около 30%) суммарного выхода продуктов трансгликозилирования (табл. 3). Только с 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкозидом в качестве акцептора даже при увеличении времени реакции выход продуктов был меньшим, возможно, из-за плохой растворимости этого гликозида.

По-видимому, на общем выходе продуктов трансгликозилирования влияние структуры агликона резко не сказывается. Однако следует учесть отразившиеся в табл. 3 особенности разделения при жидкостной хроматографии различных арилламинариологосидов. Так, в случае с фенильными производными хорошо разделяются только соответствующие ди- и тример, тогда как у нафтильных глюкозидов вслед за глюкозой можно проследить за выходом димерного, тримерного, тетрамерного и пентамерного производных. Количественное соотношение продуктов трансгликозилирования с $n=2, 3$ и 4 для различных арил-β-D-глюкозидов меняется. Особенно показателен в этом отношении опыт с 1-нафтилглюкозидом, где выходы всех вновь образованных продуктов приблизительно одинаковы в отличие от других, где выход Np-гликозидов олигомеров составляет ряд димер > тример > тетрамер.

Была проверена также возможность участия в реакции других доноров и акцепторов. Использование в качестве возможных доноров мальтозы, генциобиозы или целлобиозы с тем же акцептором (Np-глюкозидом) не

Таблица 3

Результаты реакции трансгликозилирования в присутствии эндо-β-1,3-глюканазы ЛІV, ламинарина (6 мг/мл) и арил-β-D-глюкопиранозидов (10 мг/мл) *

Аг-	Время реакции, ч	Выход (% от ламинарина) (Glc) _n -Аг с n, равным			
		2	3	4	5
o-Нитрофенил-	3	16,6	8,0	4,5	—
1-Нафтил-	3	9,1	6,6	8,9	5,3
Фенил-	3	21,6	6,7	—	—
4-Метилумбеллиферил-	24	11,1	2,4	2,2	—
n-Нитрофенил-	3	19,3	11,3	5,0	—
n-Нитрофенил- **	48	1,2	2,7	—	—

* Данные жидкостной хроматографии (орцин-серноукислотный метод). Тире означает невозможность определения соответствующего продукта, обусловленную особенностями разделения олигомеров с данным арилагликоном.

** Данные для β-1,3-глюканазы из *A. cellulosa*.

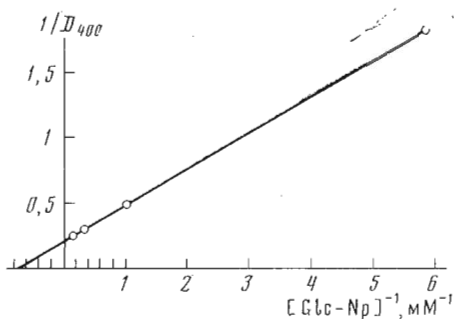


Рис. 5

Рис. 5. График зависимости скорости трансгликозилирования от концентрации акцептора (Np-глюкозида). Концентрация ламинарина 2 мМ

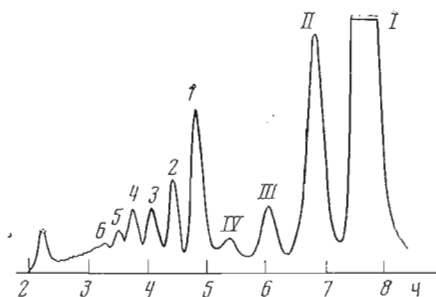


Рис. 6

Рис. 6. Хроматография продуктов реакции трансгликозилирования в присутствии ламинариназы ЛІV, β Np-ксилопиранозида и ламинарина. Пик I — β Np-ксилопиранозид, II, III, IV — продукты трансгликозилирования на β Np-ксилопиранозид. Пики 1–4 и т. д. как на рис. 1

дало положительных результатов — не было зафиксировано выделение *n*-нитрофенола и появление новых продуктов на хроматограммах.

При использовании в качестве акцепторов других *n*-нитрофенил- β -D-гликопиранозидов (галактозида, ксилозида и N-ацетилглюкозаминида) выделение *n*-нитрофенола было отмечено только в последних двух случаях. Этот факт кажется вполне закономерным, так как ксилоза и N-ацетилглюкозамин обладают конфигурацией глюкозы. Для *n*-нитрофенил- β -D-ксилозида с помощью жидкостной хроматографии было показано образование новых соединений (рис. 6). Появление свободной ксилозы методом хроматографии на бумаге не было обнаружено.

Таким образом, фермент обладает способностью осуществлять трансгликозилирование не только на остатки глюкозы, но и на остатки ксилозы и N-ацетилглюкозаминида, не реагируя на отсутствие заместителя в 6-м положении (Xyl) и на наличие заместителя во втором (GlcNAc), но не на остаток галактозы, проявляя чувствительность к изменению конфигурации в 4-м положении моносахарида.

В заключение можно отметить, что изучение реакции трансгликозилирования дает подход к характеристике активных центров карбогидраз [4]. Кроме того, продемонстрированный здесь способ получения различных арилламплиариолигозидов может быть перспективным для препаративной наработки этих соединений, в большинстве своем не описанных, но могущих найти применение в качестве модельных соединений и субстратов для β -1,3-глюкопаз. Процесс, вероятно, небезынтересен и для направленного гликозилирования веществ с целью уменьшения их токсичности, увеличения проницаемости через биологические мембраны, перевода лекарственных веществ в водорастворимое состояние и т. п.

Экспериментальная часть

Ферменты. Эндо- β -1,3-глюкоказы ЛІІІ и ЛІV получали из кристаллического стебелька морского моллюска *Spisula sachalinensis*, эндо- β -1,3-глюкопазу ЛО — из *Chlamys abbidus* как описано в работах [6, 7]. Экзо- β -1,3-глюкопазу ЛІІ выделяли из *E. maakii* [9]. Ферменты ЛО, ЛІІ и ЛІV гомогенны по данным диск-электрофореза. Эндо- β -1,3-глюкопаза из *A. cellulosa* была любезно предоставлена Н. А. Тнуовой (Институт биохимии АН СССР им. А. Н. Баха). β -Глюкозидаза из сладкого миндаля — коммерческий препарат фирмы «Serva» (ФРГ).

Доноры. Ламинарин (β -1,3-глюкан) из морской водоросли *Laminaria sutchioides* получен по методике [14]. Ламиариолигосахариды с $n=2-4$ и 13 получены гидролизом ламинарина [12].

Мальтоза, генциобиоза, целлобиоза — коммерческие препараты фирмы «Chemapol» (Чехословакия). Остальные препараты производства «Союз-реактив».

Акценторы. *n*-Нитрофенил- β -*D*-глюко- и -галактопиранозиды; *o*-нитрофенил-, 1-нафтил-, фенил- и 4-метилумбеллиферил- β -*D*-глюкопиранозиды; *n*-нитрофенил-*N*-ацетил- β -*D*-глюкозаминид — коммерческие препараты фирмы «Chemapol» (Чехословакия). *n*-Нитрофенил- β -*D*-ксилопиранозид синтезирован по методу [15].

Гидролизную активность ферментов определяли по возрастанию количества восстанавливающих сахаров методом Нельсона [16], используя ламинарин (0,04%) в качестве субстрата.

Удельная гидролазная активность для всех исследуемых препаратов глюкопаз, вводимых в реакцию трансгликозилирования, была одинакова — 1,5 моль Glc/г белка · ч при 25° С.

Трансгликозилирующую активность определяли по увеличению количества выделившегося в реакции *n*-нитрофенола. Через определенные интервалы времени из инкубационной смеси отбирали аликвоты (0,2 мл), добавляли 1 мл 1 М Na₂CO₃ и измеряли поглощение при 400 нм на спектрофотометре «Spekol». Состав инкубационной смеси и условия ферментализа см. работы [6, 7, 9].

Концентрации акценторов и доноров в инкубационной смеси были не менее 6 мг/мл.

Анализ продуктов реакции трансгликозилирования проводили с помощью автоматического жидкостного хроматографа «Jeol» (модель JLC-6АН, Япония) на биогеле Р-2 [17] (колонка 98×0,9 см); элюция 0,05 М натрий-ацетатным буфером (рН 5,2–5,5) в 0,2 М NaCl со скоростью 7–9 мл/ч. Сахара определяли колориметрически (440 нм) реакцией с 0,15% раствором орцина в 70%-ной H₂SO₄ при 95° С. Одновременно арилгликозиды тестировали по поглощению при 280 нм в рабочем режиме прибора при заданной чувствительности самописца. Показания для образца *n*-нитрофенил- β -*D*-глюкопиранозиды при орцин-серниокислотном методе определения отнесли к показаниям при 280 нм как 1 : 3. Для анализа требовалось не менее 1 мг продуктов.

Обсчет хроматограмм проводили вручную, по площади соответствующих пиков.

Хроматографию на бумаге проводили в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3) с обнаружением кислым анилинфталатом или азотнокислым серебром.

Спектры ¹³С-ЯМР сняты на приборе НХ-90Е «Bruker» в D₂O. В качестве внутреннего стандарта использовали СН₃ОН (δ 49,6 м.д. относительно тетраметилсилана).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hehre E. J., Okada G., Genghof D. S.* In: Carbohydrates in Solution (Advances in Chemistry Series) / Eds Gould R. F., Washington D. C.: Amer. Chem. Soc., 1973, p. 309–333.
2. *Ladisch M. R., Gong G.-S., Tsao G. T.* Biotechnol. and bioeng., 1980, v. 22, № 6, p. 1107–1126.
3. *Coulombel C., Clermont S., Foglietti M.-J., Percheron F.* Biochem. J., 1981, v. 195, № 1, p. 333–335.
4. *Imoto T., Johnson L. N., North A. C. T., Phillips P. C., Rupley J. A.* In: The Enzymes, v. 7, 3-rd ed. / Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1972, p. 822–825, 843–846.
5. *Hehre E. J., Genghof D. S., Okada G.* Arch. Biochem. and Biophys., 1971, v. 142, № 1, p. 382–393.
6. *Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. E.* Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 212, № 1, p. 111–115.
7. *Privalova N. M., Elyakova L. A.* Comp. Biochem. and Physiol., 1978, v. 60B, № 3, p. 225–228.
8. *Wallenfels K., Földi P., Niermann H., Bender H., Linder D.* Carbohydr. Res., 1978, v. 61, № 2, p. 359–368.
9. *Елякова Л. А., Широкова Н. И.* Биооргани. химия, 1977, т. 3, № 12, с. 1656–1662.
10. *Usui T., Yamaoka N., Matsuda K., Tuzimura K.* J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 1973, № 20, p. 2425–2432.

11. Nelson T. E., Johnson J., Jantzen Ir. E., Kirkwood S. J. *Biol. Chem.*, 1969, v. 244, № 21, p. 572-580.
12. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Привалова Н. М. *Биооргани. химия*, 1978, т. 4, № 11, с. 1553-1559.
13. Yoshida H., Hiromi K., Ono S. J. *Biochem.*, 1969, v. 66, № 2, p. 183-190.
14. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N. *Carbohydr. Res.*, 1974, v. 34, № 2, p. 241-248.
15. Helferich B. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1944, B. 77, № 3-4, S. 194-197.
16. Nelson N. J. *Biol. Chem.*, 1944, v. 153, № 2, p. 375-381.
17. Елякова Л. А., Денисенко Н. М., Звягинцева Т. Н. *Химия природн. соединений*, 1977, № 5, с. 697-699.

Поступила в редакцию

14.I.1982

После доработки

15.III.1982

A STUDY ON TRANSFER ACTIVITY OF ENDO- β -1,3-GLUCANASES. I. LAMINARIN AND ITS OLIGOSACCHARIDES AS DONORS AND ARYL- β -D-GLYCOSIDES AS ACCEPTORS

NAZAROVA N. I., ELYAKOVA L. A.

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

The transglycosylation reactions catalyzed by endo-1,3- β -glucanases (endo-1,3- β -glucan glucanohydrolases, EC 3.2.1.6) from marine molluscs were studied. The liquid chromatography of the reaction mixture (with *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as acceptor) revealed the formation of *p*-nitrophenyllaminaribioside, -trioside, and -tetraoside in overall yield of about 35%, calculated for starting laminarin. The dependence of the transfer rate upon the acceptor concentration was found ($K_m=13$ mM). Some other aryl- β -D-glucosides may be used as acceptors. The endo-glucanases catalyzed also a transfer of laminarioligosyl residues onto xylose and N-acetylglycosamine residues, but not to galactose ones in the reactions with respective glycosides.