



УДК 577.152.321\*6.02

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ  
ЭНДО-1,3-β-ГЛЮКАНАЗ  
III\*. АКЦЕПТОРНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭНДО-1,3-β-ГЛЮКАНАЗ  
ИЗ МОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ В РЕАКЦИЯХ  
ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ПО ОТНОШЕНИЮ  
К РАЗЛИЧНЫМ МЕТИЛГЛЮКОЗИДАМ

Звягинцева Т. Н., Евтушенко Е. В., Елякова Л. А.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО  
Академии наук СССР, Владивосток

Исследованы сорбционные свойства акцепторных участков трех эндо-1,3-β-глюканаз: III, IV из *Spisula sachalinensis* и IO из *Chlamys albidus* — в реакциях переноса глюкозильных остатков ламинарина на метилированные производные различных метилгликозидов с помощью методов ТСХ (22 вещества) и ВЭЖХ (три акцептора, IV).

Показано, что трансгликозилирование для всех ферментов успешно протекает при использовании в качестве акцепторов α- и β-метилгликозидов глюкозы и ксилозы, их 2-О-метилпроизводных, 6-О-метил-N-ацетилглюкозамина, а также метил-α-D-хинозозида. Увеличение гидрофобности заместителей при С-5 и С-2 глюкопираноз положительно влияет на акцепторную способность веществ, обращение в них конфигурации гидроксильных групп при С-2 (Man) или С-4 (Gal), а также замещение водорода ОН-группы при С-4 на СН<sub>3</sub> (4MeXyl) приводит к полной потере веществами акцепторных свойств.

Методами <sup>13</sup>С-ЯМР-спектроскопии и БХ показано, что в катализируемых IO реакциях переноса на глюкозу, возникающую в процессе трансформации ламинарина, образуется β-1 → 3-глюкозидная связь. В отличие от этого при переносе на метил-2-О-метил-α-D-глюкозид образуется β-1 → 4-глюкозидная связь, т. е. наблюдается изменение специфичности фермента, вызванное замещением в акцепторе гидроксила при С-2.

Показано, что эффективность переноса на метилгликозиды на 3—4 порядка выше, чем на воду. Для глюканазы IV обнаружено, что метилхинозид изменяет процесс гидролиза ламинарина, подавляя образование глюкозы и ламинарибозы.

Все гидролазы (протеиназы, карбогидразы и т. д.) способны катализировать наряду с реакциями гидролиза реакции переноса остатков субстратов на различные вещества [1—4].

Изучение закономерностей протекания реакций гидролиза и трансгликозилирования, катализируемых эндо-1,3-β-глюканазами морских моллюсков (КФ 3.2.1.6), показало, что эти ферменты способны активно осуществлять перенос гликоновой части субстрата как на воду (реакция гидролиза), так и на некоторые *n*-нитрофенил-β-D-гликозиды (реакция трансгликозилирования), за исключением *n*-нитрофенил-β-D-галактопиранозида [1, 4]. Нами были изучены также кинетические особенности совместного протекания процессов гидролиза и трансгликозилирования под действием различных эндо-1,3-β-глюканаз в зависимости от pH среды, концентрации доноров и акцепторов. Оказалось, что эндо-1,3-β-глюканазы из моллюсков, различающиеся механизмом катализа, обладают повышенной способностью по сравнению с другими гликозидазами (лизоцимом, α-амилазой, целлюлазами) к реакциям трансгликозилирования [1]. В настоящей работе исследовано влияние заместителей и конфигурации гидроксильных групп при различных углеродных атомах моносахаридов на их способность быть акцепторами в реакциях трансгликозилирования, катализируемых эндо-1,3-β-глюканазами.

При изучении акцепторной специфичности эндо-1,3-β-глюканаз из кристаллических стебельков морских моллюсков (III, IV из *Spisula*

\* Сообщение II см. [1].

*sachalinensis* и ЛЮ из *Chlamys albidus*) в качестве акцепторов использовали метилгликозиды различных моносахаридов и их метилированные в разных положениях производные; донором гликозильных остатков во всех экспериментах служил ламинарин из *Laminaria cichorioides* [5]. Продукты гидролиза и трансгликозилирования в присутствии либо в отсутствие акцепторов регистрировали с помощью ТСХ или (количественно) ВЭЖХ.

При оценке методом ТСХ возможности веществ служить в качестве акцепторов использовали мольное соотношение акцептор — донор, равное 50 : 1. Реакцию трансформации ламинарина проводили продолжительное время, в течение которого накапливалось достаточное количество низкомолекулярных продуктов как гидролиза, так и трансгликозилирования, которые легко регистрировались с помощью ТСХ (рис. 1). Оценку акцепторной способности проводили визуально по интенсивности зон, появляющихся между продуктами гидролиза ламинарина  $\text{Glc}_n$  и акцепторами (табл. 1).

Хорошими акцепторами в реакции трансгликозилирования выступают как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -D-метилгликозиды глюкозы и ксилозы (табл. 1). Замена гидроксила при С-2 на NAc-группу для исследуемых нами ферментов также практически не меняет акцепторные свойства глюкопиранозида. Однако замена  $\text{CH}_2\text{OH}$ -группы в глюкозе на  $\text{CH}_3$  (хиновоза) заметно увеличивает акцепторную способность моносахарида: среди исследованных метилгликозидов  $\alpha$ -метилхиновозид (4, табл. 1) оказался одним из лучших акцепторов. Замещение гидроксила при С-2 глюкозы на метоксильную группу также увеличивает выход продуктов трансгликозилирования (табл. 1, соединение 3). Акцепторные же свойства метил-2-О-метил- $\beta$ -D-ксилопиранозида (9) сопоставимы со свойствами глюко- и ксилопиранозидов. Таким образом, увеличение гидрофобности заместителя в положениях С-5 и С-2 глюкозы улучшает акцепторную способность вещества. Конфигурация гликозидного гидроксила, а также отсутствие первичноспиртовой группировки в глюкопиранозном цикле существенно не влияют на акцепторные свойства вещества, хотя можно отметить положительную роль слабого взаимодействия с ферментами, обусловленного первичноспиртовой группой (сравните метилгликозиды (3) и (9)). Напомним, что лизоцим чувствителен к конфигурации ОН-группы при С-1: из двух метилгликозидов N-ацетил-D-глюкозамина только  $\beta$ -аномер является акцептором в реакции трансгликозилирования, катализируемой лизоцимом [6].

Перенос гликозильных остатков на  $\alpha$ -D-галакто- (11), ликсо- (14) и маннопиранозид (13) также практически отсутствует (табл. 1). Следовательно, в отличие от С-1 изменение конфигурации гидроксильных глюкопиранозного цикла при С-4 и С-2 делает вещество неспособным к сорбции на акцепторном участке ферментов и к участию в реакциях трансгликозилирования. Глюкопиранозид неспособен быть акцептором и в случае, если ОН-группа при С-4 ксилозида замещена на метоксил (сравните гликозиды (8), (15)), в отличие от аналогичной замены при С-2, которая несколько улучшает акцепторные свойства моносахарида (гликозиды (1), (3)). При введении метоксила в два положения (С-2, С-4, ксилозид (16)) акцепторные свойства у вещества исчезают.

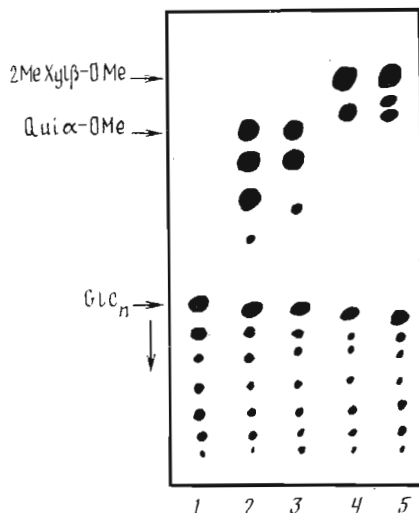


Рис. 1. ТСХ продуктов трансформации ламинарина в присутствии глюкоканаз ЛІV (1, 3, 4) и ЛЮ (2, 5), образующихся в условиях гидролиза (1) и при использовании в качестве акцепторов метил- $\alpha$ -D-хиновозида (2, 3) и метил-2-О-метил- $\beta$ -D-ксилозида (4, 5)

Акцепторная способность \* метилгликозидов в реакциях  
трансгликозилирования, катализируемых ЛIII, ЛIV и ЛО

Номер	Метилгликозиды **	Выход продуктов трансгликозилирования		
		ЛIII	ЛIV	ЛО
1	Glc $\alpha$	++	++	++
2	Glc $\beta$	++	++	++
3	2MeGlc $\alpha$	+++	+++	+++
4	Qui $\alpha$	+++	+++	+++
5	GlcNAc $\alpha$	++	++	++
6	6MeGlcNAc $\alpha$	++	++	++
7	Xyl $\alpha$	++	++	++
8	Xyl $\beta$	++	++	++
9	2MeXyl $\beta$	++	++	++
10	3MeGlc $\alpha$	—	—	—
11	Gal $\alpha$	—	—	—
12	Fuc $\alpha$	—	—	—
13	Man $\alpha$	—	⊥	—
14	Lux $\alpha$	—	⊥	—
15	4MeXyl $\beta$	—	—	—
16	2,4Me <sub>2</sub> Xyl $\alpha$	—	—	—
17	3MeXyl $\beta$	—	—	—
18	Rha $\alpha$	—	—	—
19	Rha $\beta$	—	—	—
20	Ara $\alpha$	+	—	—
21	Ara $\beta$	—	—	—
22	Ara $\alpha$	—	—	—

\* Оценка с помощью ТСХ (предел чувствительности метода ~3—5%): +++ ~50%, ++ ~20—30%, + ~5—10%, —, ⊥ — следовые количества.

\*\* Конфигурация сахарных остатков природная: D — для Glc, Gal, GlcNAc, Xyl, Qui (6-дезоксиглюкозы), Man, Lux и L — для Fuc (6-дезоксигалактозы), Rha, Ara.

Таблица 2

Химические сдвиги в спектре <sup>13</sup>C-ЯМР-фракции дисахаридов,  
полученных из ламинарина в присутствии ЛО

Идентифицированная структура	Остаток Glc *	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	Содержание **, %
Ламинарибиоза	R $\alpha$	92,6	71,6	84,0	68,9	72,3	61,3	85
	R $\beta$	96,2	73,8	85,2	69,7	76,2	61,3	
	N	103,3	73,8	76,2	70,2	76,2	61,3	
Генциобиоза	R $\alpha$	92,6	71,6	73,8	70,2	71,2	69,1	15
	R $\beta$	96,2	73,8	76,2	70,2	75,5	69,5	
	N	103,5	74,0	76,3	70,4	76,7	61,3	

\* R и N — восстанавливающие и невосстанавливающие остатки соответственно.

\*\* Содержание дисахаридов определено из значения интегральных интенсивностей сигналов с хим. сдвигами ~103 и 84—85 м. д., а также 61,3 и 69,5 м. д.

Следует еще раз подчеркнуть, что и обращение конфигурации, и замещение гидроксила при C-4 глюко-пиранозного цикла приводят к прекращению переноса, тогда как при C-2 недопустимо лишь обращение конфигурации OH-группы. Отсюда можно предположить, что в связывании глюкозы с акцепторным участком фермента важны водород гидроксильной группы при C-4 и кислород OH-группы при C-2. Нужно отметить также, что обращение в глюко-пиранозном цикле конфигурации гидроксильных групп при C-3 и C-4 (рамнопиранозиды), и C-4 (арабинопиранозиды), C-3 и C-2 (фукопиранозиды), как и следовало ожидать, вызывает потерю моносахаридами акцепторных свойств. Таким образом, остатки глюкопиранозы соединяются с акцепторными участками ферментов благодаря OH-группам при C-4 и C-2, т. е. группам, окружающим гидроксил при C-3, который участвует в образовании новой связи. Аналогичным образом для лизо-

Химические сдвиги в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР дисахарида, полученного реакцией трансгликозилирования, осуществляемого глюканазой Л0 в присутствии ламинарина и метил-2-О-метил- $\alpha$ -D-глюкозида

Элементы структуры дисахарида	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	OMe C-1	OMe C-2
$\rightarrow 4)2\text{MeGlc}\rho\alpha\text{-OMe}$	97,1	80,9	71,9	80,9	71,9	61,3	55,4	58,5
$\text{Glc}\rho\beta(1\rightarrow)$	103,3	73,4	76,5	70,3	76,5	61,3		

дима наиболее важным моментом является сохранение конфигурации гидроксильной группы при C-3, который непосредственно примыкает к OH-группе при C-4, на которую осуществляется перенос [6].

Выясненные в процессе исследования требования к структуре акцептора являются общими для всех трех изучаемых ферментов. Из исключений можно отметить следующие. Под действием ЛIII или Л0 при переносе гликозильных остатков ламинарина на метилхинозид образуются три продукта, под действием ЛIV — два (рис. 1). Отмечено образование следовых количеств продуктов переноса на метил- $\alpha$ -D-маннозид под действием ЛIV и на метил- $\alpha$ -L-арабинофуранозид под действием ЛIII.

Ранее нами было показано, что под действием глюканазы ЛIV при переносе на *n*-нитрофенилглюкозид происходило образование  $\beta$ -1  $\rightarrow$  3-глюкозидной связи с получением меченных *n*-нитрофенолом ламинариолигосахаридов [4]. Сейчас с удивлением было отмечено отсутствие трансгликозилирования, когда точка переноса (гидроксил при C-3) была метилирована (см. табл. 1, акцептор (10)).

В настоящем исследовании структура продуктов ферментативных реакций была установлена в двух случаях. Из продуктов исчерпывающего превращения ламинарина под действием Л0 и ЛIV (катализирующих одновременно как реакции гидролиза, так и реакции трансгликозилирования) были выделены на биогеле Р-2 фракции дисахаридов. ВХ обнаруживала два вещества с подвижностями, соответствующими ламинарибиозе ( $\text{Glc}\rho 1 \rightarrow 3 \text{Glc}$ , основное пятно) и генциобиозе ( $\text{Glc}\rho 1 \rightarrow 6 \text{Glc}$ ). Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР фракций дисахаридов подтверждают присутствие в них только  $\beta$ -1  $\rightarrow$  3- и  $\beta$ -1  $\rightarrow$  6-связанных остатков Glc (табл. 2). Генциобиоза (~15%) возникает, вероятно, из точек ветвления, присутствующих в ламинарине [5]. Образование других типов связи между остатками глюкозы в процессе реакций отмечено не было.

В другом случае результаты были нетривиальны. Наименьший из гомологов — продуктов переноса гликозильных остатков ламинарина на метил-2-О-метил- $\alpha$ -D-глюкозид, полученных действием глюканазы Л0, — был выделен с помощью препаративной ТСХ.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектру выделенного продукта вполне соответствует структура метил-2-О-метилцеллобиозида (табл. 3). Пики, принадлежащие  $\beta$ -1  $\rightarrow$  3- (85,5 м. д.) либо  $\beta$ -1  $\rightarrow$  6- (69,5 м. д.) связанным остаткам глюкозы, отсутствовали. Таким образом, замещение OH-группы при C-2 на метоксил полностью изменило специфичность фермента: вместо  $\beta$ -1  $\rightarrow$  3-связи под действием Л0 синтезировалась  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-связь. Ранее было показано, что при гидролизе ламинарина, катализируемом глюканазами Л0 или ЛIV, в присутствии D-[ $^{14}\text{C}$ ]глюкозы до 25% метки переходит в более высокомолекулярные продукты, т. е. в продукты трансгликозилирования. Образование целлобиозы здесь также не было отмечено [7]. Возможно, появление двойных по сравнению с глюканазой ЛIV пятен при действии Л0 на  $\alpha$ -метилхинозид и метил-2-О-метил- $\beta$ -D-ксилозид вызвано образованием при трансгликозилировании наряду с  $\beta$ -1  $\rightarrow$  3-глюкозидной связью связи другого типа (рис. 1).

Более детальное изучение поведения акцепторов, их влияния на реакцию гидролиза и степени участия в реакциях трансгликозилирования было осуществлено с помощью ВЭЖХ только для реакций, катализируемых ЛIV. Продукты гидролиза и трансгликозилирования разделяли на обращенно-фазном сорбенте С-18. Продукты, выходящие с колонки, рефрактометрировали, что позволило регистрировать все вещества, входящие

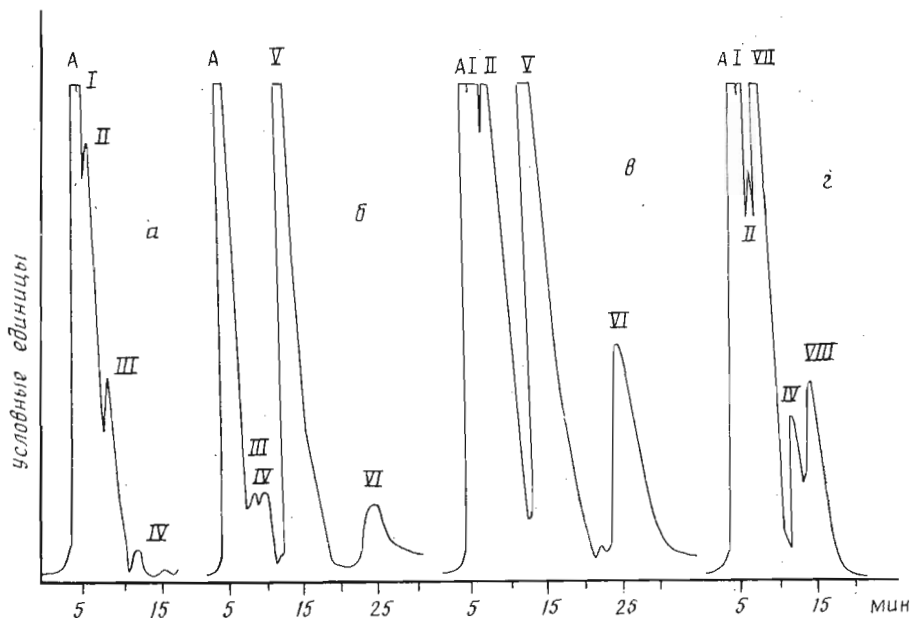


Рис. 2. ВЭЖХ продуктов трансформации ламинарина в присутствии глюканазы ЛIIV, образующихся в условиях гидролиза (а, время реакции 40 мин) и при использовании в качестве акцептора метил- $\alpha$ -D-хинозозида (время реакции 1 (б) и 15 ч (в)) и метил- $\beta$ -D-глюкозида (г, 97 мин). I–IV — продукты гидролиза: глюкоза, ди, три, тетрасахариды соответственно, V —  $\alpha$ -метилхинозозид, VII —  $\beta$ -метилглюкозид, А — соли, входящие в состав буферных смесей, VI–VIII — продукты трансгликозилирования

в инкубационные смеси. Количественную обработку хроматограмм проводили с помощью интегрирующей системы Shimadzu C-R2AX. Этот способ позволил разделить продукты реакции: глюкозу, ди, три и тетрасахариды, т. е. низкомолекулярные продукты реакции гидролиза, а также трансгликозилирования (рис. 2). Для этой работы были выбраны следующие акцепторы: метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид, вещество, наиболее близкое естественному акцептору — глюкозе, метил- $\alpha$ -D-хинозозид, один из лучших акцепторов, и дисахарид 2-O-метил-целлобиозид, полученный (см. выше) в реакции трансгликозилирования. Предварительными экспериментами было показано, что одним и тем же количествам метил- $\beta$ -D-глюкозида, метил- $\alpha$ -D-хинозозида и глюкозы соответствуют одинаковые площади пиков на хроматограммах. Дисахарид был взят для того, чтобы оценить участие второго глюкопиранозного остатка в сорбции вещества на акцепторном участке фермента. Так, для лизоцима показано, что дисахариды являются лучшими акцепторами, чем моносахариды [6]. Эти данные хорошо согласуются с тем, что величина агликонового участка лизоцима оценивается в два участка связывания глюкопиранозных остатков.

Константы связывания ( $1/K_s$ ) метилгликозидов, константы ингибирования ими реакции гидролиза ( $K_i$ ), а также отношение  $\alpha = k_t/k_h = v_t [H_2O]/v_h [A]$  были получены в условиях насыщения глюканазы ЛIIV

Таблица 4

Кинетические параметры реакций трансгликозилирования и гидролиза, катализируемых ЛIIV

Акцептор — метилгликозид	[Акцептор], М	$K_s$		$K_i$		$\alpha \cdot 10^3$
		мг/мл	мМ	мг/мл	мМ	
Glc $\beta$	194	6	30	0,4	—	4
Glc( $\beta$ 1-4)2MeGlc $\alpha$	370	2,5	6,8	—	—	3
Qui $\alpha$	182	0,5	2,7	0,60	3,2	20

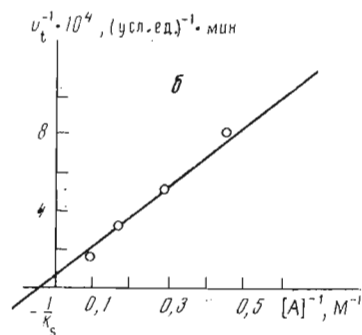
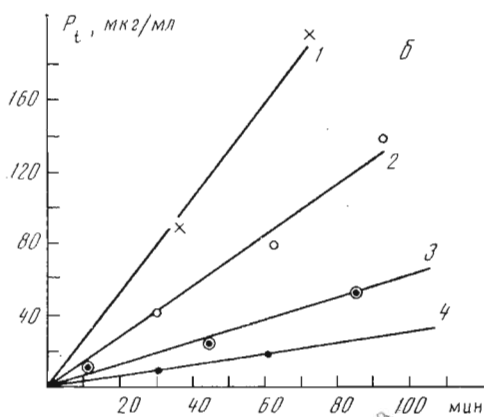
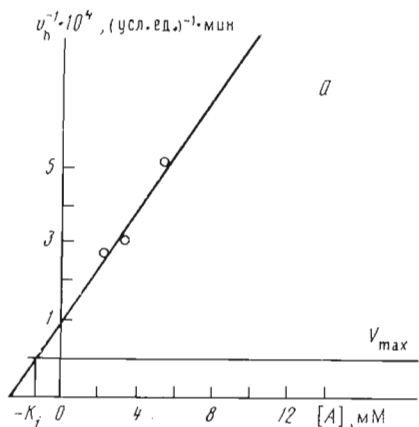
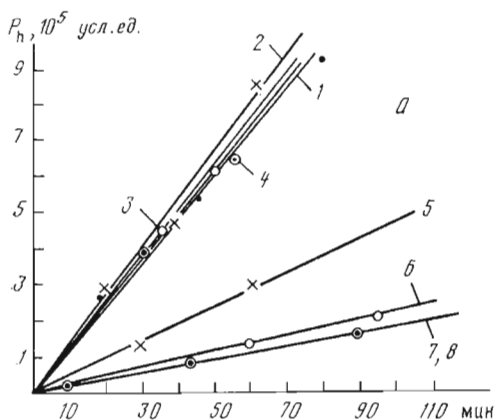


Рис. 3

Рис. 4

Рис. 3. Накопление из ламинарина под действием ЛПВ продуктов: *a* — гидролиза ( $P_h$ ) в отсутствие акцепторов (1) и в присутствии метил-2-О-метилцеллобиоза в количестве 0,5 (2), 1 (3) и 1,5 мг/мл (4) или  $\alpha$ -метилхинозоза в количестве 0,25 (5), 0,45 (6), 0,7 (7) и 0,9 мг/мл (8); *б* — трансгликозилирования ( $P_t$ ); акцептор —  $\alpha$ -метилхинозозид в количестве 0,25 (1), 0,45 (2), 0,7 (3) и 0,9 мг/мл (4)

Рис. 4. Определение кинетических параметров  $K_i$  и  $K_s$ ; акцептор — метил- $\beta$ -D-глюкозид;  $v_h, v_t$  — количество образовавшихся за 1 мин продуктов гидролиза и трансгликозилирования

субстратом-ламинарином ( $K_m = 5 \cdot 10^{-5}$  M) ( $[A]$  и  $[H_2O]$  — концентрации акцепторов и воды,  $k_t$  и  $k_h, v_t$  и  $v_h$  — константы и начальные скорости реакций трансгликозилирования и гидролиза). Интервалы концентраций различных акцепторов для определения  $K_s, K_i$  и  $\alpha$  были подобраны индивидуально при изучении трансформации ламинарина во времени в присутствии и в отсутствие акцепторов. Кривые накопления продуктов трансгликозилирования ( $P_t$ ) и гидролиза ( $P_h$ ) для различных акцепторов приведены на рис. 3, величины  $K_s, K_i$  и  $\alpha$  — в табл. 4.  $K_s$  определяли методом двойных обратных величин из зависимости выхода продуктов трансгликозилирования от концентрации акцепторов (рис. 4) [8],  $K_i$  — методом Диксона, используя зависимость  $1/v_h$  от концентрации акцепторов [9]. Из табл. 4 видно, что выбранные вещества являются на 3–4 порядка более эффективными акцепторами гликозильных остатков, чем вода. Можно отметить следующую закономерность: чем выше сродство фермента к акцептору (меньше  $K_s$ ), тем выше и способность вещества вступать в реакцию трансгликозилирования. Сродство метил- $\alpha$ -D-хинозоза к акцепторному участку на порядок выше, чем метил- $\beta$ -D-глюкозида. Из расчета следует, что введение метильной группы при C-5 глюко-

зы увеличивает энергию связывания моносахарида на 1,4 ккал/моль.

$$\left( \Delta G = -RT \left( \ln \frac{1}{K_{s(Q)}} - \ln \frac{1}{K_{s(G)}} \right) \right)^*.$$

Сильно различается действие исследованных веществ на образование низкомолекулярных продуктов гидролиза, протекающего совместно с трансгликозилированием (рис. 3). Наиболее эффективно уменьшает появление этих продуктов метилхинозид ( $K_i = 1,6$  мМ). Дисахарид метил-2-О-метил- $\alpha$ -D-целлобиозид совершенно не влияет на такой процесс. Хотя достигаемая степень торможения образования низкомолекулярных продуктов реакции гидролиза как метилхинозидом, так и метилглюкозидом одинакова (~70%), механизмы ингибирования этими веществами различны. Если действие метилглюкозида выражается в равномерном уменьшении скорости накопления всех регистрируемых низкомолекулярных продуктов гидролиза по сравнению с исходной реакцией (рис. 2а, з), то метилхинозид на начальных стадиях реакции трансформации ламинарина под действием ЛІV практически полностью подавляет образование глюкозы и дисахарида (рис. 2б). Впоследствии же реакция гидролиза в его присутствии развивается как обычно (рис. 2в).

Интересно сопоставить величины  $K_s$  и  $K_i$ , характеризующие влияние веществ на совершенно разные процессы (гидролиз и трансгликозилирование), катализируемые ЛІV. Так,  $K_s$  метил- $\beta$ -D-глюкозида на порядок больше  $K_i$ . Вероятнее всего, метил- $\beta$ -D-глюкозид связывается не только акцепторным участком активного центра фермента с  $K_s = 3 \cdot 10^{-2}$  М. В активном центре фермента есть еще один участок связывания этого моносахарида с очень большим сродством к нему ( $K_i = 2 \cdot 10^{-3}$  М).  $K_s$  и  $K_i$  метил- $\alpha$ -D-хинозида практически сопоставимы. По всей видимости, этот моносахарид связывается в одном участке активного центра, имеющем к нему большое сродство. Отсюда, возможно, и такое различие в составе образующихся продуктов ферментативной реакции при использовании этих гликозидов в качестве акцепторов (рис. 2б, з).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о достаточно высокой специфичности акцепторных участков изучаемых ферментов к структуре акцептора.

### Экспериментальная часть

Эндо-1,3- $\beta$ -глюканазы ЛІІІ и ЛІV из *S. sachalinensis* выделяли по методу [10], ЛО из *Ch. albidus* — по методу [11]. Ламинарин получали из бурой водоросли *L. cichorioides* [5]. Метилгликозиды или их метилированные производные синтезировали согласно методам [12—15]. Сахара определяли фенол-серниокислотным методом [16], восстанавливающие сахара — методом Нельсона [17]. ВХ проводили на бумаге FN-15, используя систему: пиридин — *n*-бутанол — H<sub>2</sub>O, 4 : 6 : 3, сахара обнаруживали с помощью нитрата серебра [18]. <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры снимали на спектрометре НХ-90Е Bruker в D<sub>2</sub>O (внутренний стандарт — метанол). ТСХ выполняли на импрегнированном силикагеле L5-40 мкм (Сhemarol). Для импрегнирования использовали 0,2 М раствор дигидрофосфата натрия [19]. Разделение проводили в системе: *n*-бутанол — ацетон — вода, 4 : 5 : 1. Для обнаружения использовали 30% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в метаноле с последующим нагреванием до 120° С.

Дисахариды из ферментативных гидролизатов ламинарина выделяли после исчерпывающего гидролиза \*\* ламинарина (100 мг в 10 мл ацетатного буфера, рН 5,2; 0,4 ед. акт. \*\*\* ЛО (ЛІV); 25° С) с помощью гель-

\*  $K_{s(Q)}$  и  $K_{s(G)}$  — субстратные константы для хинозида и глюкозида.

\*\* Реакцию трансформации ламинарина считали законченной (исчерпывающий гидролиз), когда прекращалось нарастание восстанавливающих сахаров, регистрируемых методом Нельсона.

\*\*\* 1 ед. акт. фермента — количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль глюкозы в 1 мин.



фильтрации на биогеле Р-2 (200—400 меш,  $1,6 \times 120$  см), элюент — дис-тиллированная вода, скорость элюции 12 мл/ч,  $50^\circ\text{C}$ . Детекцию сахаров проводили с помощью УФ-детектора Uvicord S (ЛКВ Bromma, Sweden) при 206 нм. Процедуру выделения повторили 5 раз. Выделенные фракции рехроматографировали.

*Продукт трансгликозилирования* (при использовании метил-2-О-метил- $\alpha$ -D-глюкокопиранозида в качестве акцептора) выделяли методом жидкостной хроматографии на силикагеле L (400—100 мкм). 200 мг смеси, полученной действием 0,1 ед. акт. глюканызы ЛО на 100 мг ламинарина и 100 мг акцептора в 10 мл 0,05 М ацетатного буфера, рН 5,2, в течение 24 ч, наносили на колонку ( $1 \times 20$  см). Элюирование проводили в градиенте концентрации метанола в хлороформе. Выход дисахарида 20 мг.

*Кинетические эксперименты.* Реакционные смеси содержали 4 мг ламинарина и 0—7,5 мкмоль метил- $\beta$ -D-глюкозида (серия I), либо 0—5,5 мкмоль метил-2-О-метилцеллобиозида (серия II), либо 0—5,5 мкмоль метил- $\alpha$ -D-хиновозида (серия III) и  $10^{-2}$  ед. акт. глюканызы ЛІV в 1 мл 0,05 М ацетатного буфера, рН 5,2. Смеси инкубировали при  $25^\circ\text{C}$ . Через определенные интервалы времени отбирали аликвоты (0,1 мл) и вводили их в термостагированную колонку ( $50^\circ\text{C}$ ,  $4 \times 250$  мм, ЛКВ, Ultracac column Lichrosorb RP 18,5, ЛКВ-producter АВ, Bromma, Швеция) для ВЭЖХ. Для разделения смесей серии II использовали колонку  $4,6 \times 250$  мм, Altex, Ultrasphere TM-ODS (США). ВЭЖХ проводили, используя прибор Beckman 114М (США), рефрактометр Altex 156 Berkley, CA (США) и интегрирующую систему Shimadzu C-R2Ах. В качестве элюента использовали воду. Скорость элюции 1 мл/мин. Часть хроматограмм представлена на рис. 2. Условные единицы отражают площади пиков веществ, элюируемых с колонки. Площади полученные преобразованием показаний рефрактометра с помощью интегрирующей системы Shimadzu C-R2Ах. В условиях съемки 10 мкг Glc в пробе дают площадь величиной в  $10^4$  усл. ед.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Звягинцева Т. Н., Назарова Н. И., Елякова Л. А. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 10. С. 1342—1346.
2. Максимов В. И. // Прикл. биохимия и микробиол. 1988. Т. XXIV. Вып. 3. С. 291—304.
3. Антонов В. К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1983.
4. Назарова Н. И., Елякова Л. А. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1189—1196.
5. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N. // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. № 2. P. 241—248.
6. Pollock J. J., Sharon N. // Biochemistry. 1970. V. 9. № 20. P. 3913—3925.
7. Безукладников Ш. В., Елякова Л. А. Способ получения радиоактивных соединений  $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -D-глюкоолигосахаридов: А. с. 1311257 СССР. // Б. И. 1987. № 18.
8. Lineweaver H., Burk D. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1934. V. 56. P. 658—664.
9. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты / Ред. А. М. Опарин. М.: ИЛ, 1961. С. 30—31.
10. Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. E. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 212. № 1. P. 111—115.
11. Privalova N. M., Elyakova L. A. // Comp. Biochem. and Biophys. 1978. V. 60B. № 1. P. 225—228.
12. Методы химии углеводов / Ред. Н. К. Кочетков. М.: Мпр, 1967, С. 162—163.
13. Емтушенко Е. В., Оводов Ю. С. // Химия природ. соед. 1982. № 1. С. 21—23.
14. Evtushenko E. V., Ovodov Yu. S. // J. Chromatog. 1974. V. 97. № 1. P. 99—102.
15. Емтушенко Е. В., Плисова Е. Ю., Оводов Ю. С. // Химия природ. соед. 1987. № 6. С. 787—790.
16. Dubois M., Giller K. A., Hamilton J. R., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1965. V. 28. P. 350—355.
17. Nelson N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. № 1. P. 375—381.
18. Robyt I., French D. // Arch. Biochem. and Biophys. 1963. V. 100. P. 451—454.
19. Ovodov Yu. S., Evtushenko E. V., Vaskovsky V. E., Ovodova R. G., Solov'eva T. F. // J. Chromatogr. 1967. V. 26. № 1. P. 111—115.

Поступила в редакцию  
24.X.1988.

После доработки  
9.II.1989



A STUDY ON TRANSGLYCOSYLATION ABILITY  
OF ENDO-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-GLUCANASES.  
III. ACCEPTOR SPECIFICITY  
OF ENDO-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-GLUCANASES FROM MARINE MOLLUSCS  
IN THE TRANSGLYCOSYLATION REACTION WITH DIFFERENT  
METHYLGLYCOSIDES

ZVYAGINTSEVA T. N., EVTUSHENKO E. V., ELYAKOVA L. A.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern  
Division, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

The affinity of the acceptor subsites of three endo-1  $\rightarrow$  3- $\beta$ -D-glucanases; LIII, LIV from *Spisula sachalinensis* and L0 from *Chlamys albidus*, in reactions of the laminarin glucosyl residues transfer to methylated derivatives of various monosaccharides has been studied using TLC (22 substances) and HPLC (three acceptors, LIV). It was found that change of the 4-OH-group configuration (Gal) as well as O-methylation of this group result in total loss of the acceptor activity. Change of configuration at C-2 of glucose (Man, Lyx) also inhibited the transglycosylation reaction. However, in contrast to the events at C-4 (methylation or epimerization), methylation of OH-group at C-2 leads to an increased yield of transglycosylation products.

L0-catalysed reactions of the transfer onto glucose resulted from laminaran transformation are shown to yield 1 $\rightarrow$  3- $\beta$ -D-glucosidic bond, whereas the transfer on to methyl-2-OMe- $\alpha$ -D-glucoside gives rise to 1 $\rightarrow$  4- $\beta$ -D-glucosidic bond. A change in specificity of the enzyme is observed, caused by substitution of OH-group at C-2. Efficiency of the transfer to methylglycosides is by 3-4 orders higher than to water. As to glucanase LIV, methyl- $\alpha$ -D-quinovoside altered hydrolysis of laminaran, inhibiting the glucose and laminaribiose production.