



УДК 577.152.321\*6'14

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ  
ЭНДО-1,3- $\beta$ -ГЛЮКАНАЗ  
IV \*. АКЦЕПТОРНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ  
ФЕРМЕНТОВ ИЗ МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ  
(В РЕАКЦИЯХ С АРИЛГЛИКОЗИДАМИ)

Назарова Н. И., Елякова Л. А.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО Академии наук  
СССР, Владивосток

Проведено сравнительное изучение продуктов реакций трансгликозилирования, осуществляемых эндо-1,3- $\beta$ -глюканазами ЛІV и ЛЮ (КФ 3.2.1.6), при использовании в качестве акцепторов  $\alpha$ - и  $\beta$ -*n*-нитрофенил(Np)-гликозидов *D*-Glc, *D*-Xyl, *D*-GlcN, *D*-GlcNAc. Методом ВЭЖХ показано, что ЛІV *Spisula sachalinensis* катализирует реакцию трансгликозилирования на  $\beta$ -Np-гликозид с образованием индивидуальных арил- $\beta$ -1  $\rightarrow$  3-ди-, три-, тетра-, пентаолигозидов, тогда как ЛЮ *Chlamys albidus* — образование двух продуктов каждой олигомерной фракции независимо от структуры доноров — 1,3- $\beta$ -глюканов, выделенных из разных источников. Соотношение основных и дополнительных продуктов изменяется в ходе реакции в пользу последних. С помощью методов <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии, метилирования, действия специфических ферментов на выделенные препаративно фракции Np-гликозидов ди- (ФІІ) и трисахаридов (ФІІІ) установлено, что ЛЮ в отличие от ЛІV катализирует реакцию трансгликозилирования с образованием не только  $\beta$ -1  $\rightarrow$  3-, но и  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-арилолигозидов. Установлено, что глюканазы ЛІV и ЛЮ катализируют трансгликозилирование на  $\alpha$ - и  $\beta$ -Np-гликозиды, но свободный *n*-нитрофенол образуется только при участии в реакции  $\beta$ -Np-гликозида в качестве акцептора. Найденные величины *K<sub>m</sub>* для  $\alpha$ - и  $\beta$ -Np-гликозидов Glc и Xyl указывают на идентичность акцепторного сродства и отсутствие заметного влияния конфигурации гликозидной связи на процесс трансгликозилирования. Рассчитанные свободные энергии связывания этих соединений в агликоновых подцентрах активных центров ферментов имеют близкие значения. Показана зависимость акцепторной активности ферментов от расположения отдельных групп заместителей в сахарном кольце Np-гликозидов.

Проведенное нами ранее исследование трансгликозилирующей активности эндо-1,3- $\beta$ -глюканаз ЛІV *Spisula sachalinensis* и ЛЮ *Chlamys albidus* выявило наличие общих свойств у ферментов: способность в присутствии соответствующих акцепторов — арилгликозидов катализировать образование гомологических серий арилолигозидов со степенью полимеризации 2—10 и выше [2, 3]. Донором гликозильных остатков могут служить ламинарин и его короткие аналоги [2]. Агликоновые акцепторные участки активных центров ферментов способны размещать не только  $\alpha$ - и  $\beta$ -Np-гликозиды Glc, Xyl, GlcN, GlcNAc, но и гликозиды с другими агликонами, такими, как нафтил, *o*-нитрофенил-4-метилумбеллиферил [2].

Использование ВЭЖХ для анализа продуктов реакции, содержащих Np-остаток (поглощение при 300 нм), позволило обнаружить некоторые различия в механизме трансгликозилирования исследуемыми ферментами. Хроматограммы продуктов реакции, катализируемой ЛЮ, регистрировали наличие сдвоенных пиков соответствующих соединений со степенью полимеризации 2, 3, 4, 5 (рис. 1), независимо от используемых доноров — 1,3- $\beta$ -глюканов из различных источников (линейный ламинарин *Laminaria hyperborea*, ламинарины *Laminaria cychorioides* холодной и горячей экстракций, пахиман), различающихся молекулярными массами, степенью разветвленности и растворимостью. Подобное явление обна-

\* Сообщение ІІІ см. [1].

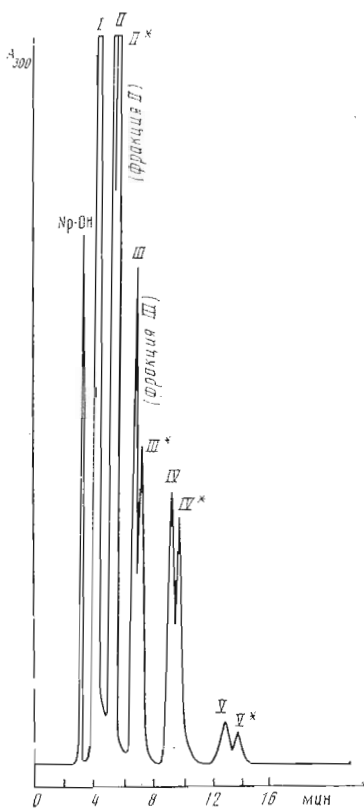


Рис. 1

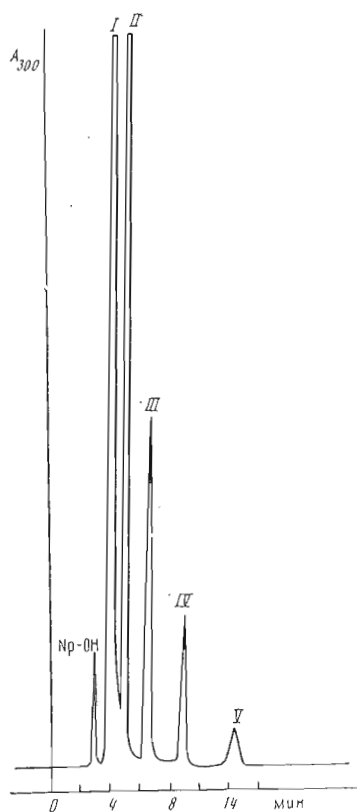


Рис. 3

Рис. 1. ВЭЖХ продуктов реакции трансгликозилирования ламинарина из *L. sychorioides*, катализируемой глюкоказой ЛЮ в присутствии  $\beta$ -Nr-глюкозида. Римскими цифрами обозначены фракции олигозидов со степенью полимеризации, равной номеру пика. Звездочкой отмечены дополнительные по сравнению с соответствующими данными для глюкоказы ЛІV (рис. 2а) продукты. Условия реакции и ВЭЖХ см. в «Экспер. части». Время реакции 30 мин

Рис. 3. ВЭЖХ продуктов реакции трансгликозилирования ламинарина из *L. sychorioides* в присутствии глюкоказы ЛІV и  $\beta$ -Nr-глюкозида. Время реакции 30 мин. Обозначения как на рис. 1

ружено и для эндо-1,3- $\beta$ -глюкоказы ЛІІІ *Spisula sachalinensis* (рис. 2б). Хроматограммы продуктов реакции трансгликозилирования, катализируемой глюкоказой ЛІV (рис. 2а, 3), в подобных условиях всегда содержали одинарные пики соответствующих веществ (табл. 1), идентифицированные со свидетелями как Nr- $\beta$ -1  $\rightarrow$  3-олигозиды, совпадающие по времени выхода с колонки ВЭЖХ с первыми из двоянных пиков в хроматографической картине продуктов реакции с ЛЮ. Следует отметить, что соотношение двоянных пиков изменяется в течение реакции (табл. 2) в пользу дополнительных соединений. Попытка идентифицировать дополнительные пики с серией Nr-генциоолигосахаридов [4] была безуспешной — по времени выхода с колонки ВЭЖХ вещества не совпадали.

Выделенные препаративной колоночной хроматографией (см. «Экспериментальную часть») продукты трансгликозилирования  $\beta$ -Nr-глюкозида ламинариной ЛЮ в присутствии ламинарина, содержащие суммарные препараты Nr-гликозидов ди- и трисахаридов (фракция II (ФІІ) и фракция III (ФІІІ)) (рис. 1) с соотношением двоянных пиков (в порядке выхода с колонки ВЭЖХ) 1,6 : 1,0 и 1,5 : 1,0, соответственно, были в дальнейшем нами изучены. Результаты ГЖХ-анализа этих суммарных препаратов, метилированных по методу [5] (табл. 3), показывают присутствие глюкозных остатков, соединенных 1  $\rightarrow$  3- и 1  $\rightarrow$  4-глюкозидными связями. Если принять во внимание отношение в составе ФІІ двух возможных ве-

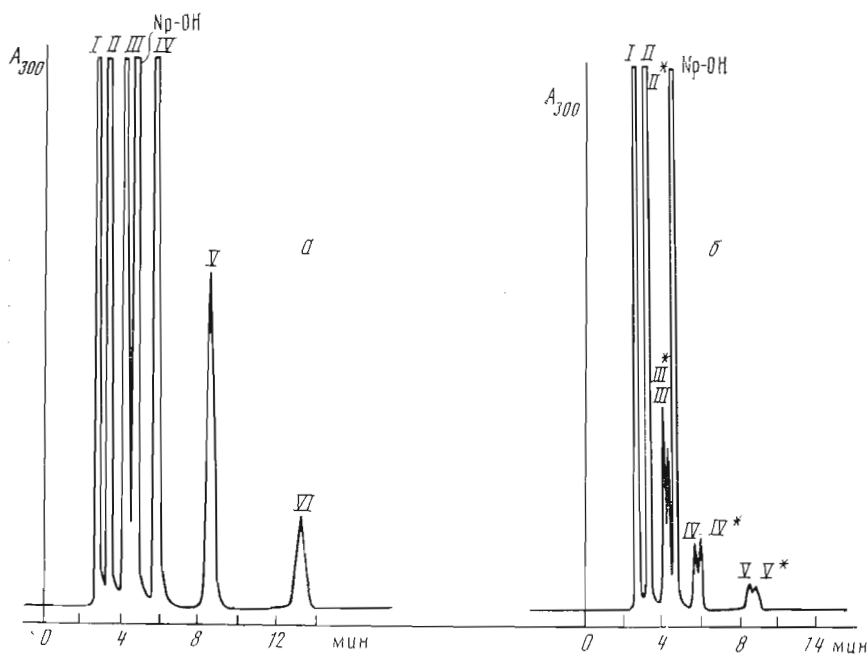


Рис. 2. ВЭЖХ продуктов реакции трансгликозилирования пахмана, катализируемой эндо-1,3-β-глюкоаназой L1V (а) и L1II (б) в присутствии β-Np-глюкозида. Условия реакции и ВЭЖХ см. в «Экспер. части»; элюция смесью ацетонитрил — вода, 8 : 2. Обозначения как на рис. 1. Наличие пика VI (Np-гексаолгозида) объясняется меньшей степенью реакции трансгликозилирования в данном примере (рис. 2а)

ществ,  $\text{Glc1} \rightarrow 3\text{Glc}\beta\text{-ONp}$  и  $\text{Glc1} \rightarrow 4\text{Glc}\beta\text{-ONp}$ , определенное ВЭЖХ как 1,6 : 1,0, то расчет по результатам метилирования (табл. 3) дает полностью совпадающие с этим составом данные. Из аналогичного расчета следует, что ФIII в своем составе имеет два Np-трисахарида в соотношении, близко совпадающем с данными ВЭЖХ: трисахарид, присутствующий в большем количестве, содержит только 1 → 3-глюкозидные, другой — 1 → 3 и 1 → 4-глюкозидные связи, скорее всего  $\text{Glc1} \rightarrow 3\text{Glc1} \rightarrow 4\text{Glc}\beta\text{-ONp}$  (1), так как образуется в результате вторичной реакции гидролиза более высокомолекулярных продуктов — 1 → 4-переноса на Np-глюкозид фрагментов ламинарина [2]. Трисахарид с другим располо-

Таблица 1

Сравнительные результаты трансгликозилирования, катализируемого L1V, при использовании в качестве акцепторов различных Np-гликозидов \*

Акцептор — Np-гликозид ** (А)	Остаточное количество акцептора А, %	Продукты трансгликозилирования, %			Степень реакции, %
		G <sub>1</sub> -А	G <sub>2</sub> -А	G <sub>3</sub> -А	
Glcβ ***	84,22	10,37	4,43	—	15,78
Glcα	82,14	14,21	3,65	—	17,86
Xylβ	88,86	7,54	3,49	—	11,14
Xylα	85,42	11,90	2,58	0,10	14,58
GlcNβ	98,70	0,88	0,42	—	1,30
GlcNAcβ	98,20	1,45	0,35	—	1,90
Fucα	95,68	2,93	0,88	0,51	4,32
Manα	99,05	0,64	0,31	—	0,95

\* Реакции трансгликозилирования проведены при постоянной концентрации донора, ламинарина из *L. sychorioides*, равной 2 мМ; концентрация акцепторов 25 мМ. Условия реакции см. в «Экспериментальной части». Время реакции 30 мин.

\*\* Фукоза — L-ряда, остальные сахара D-ряда.

\*\*\* В качестве продукта трансгликозилирования был обнаружен также Np-OH (1,24%).

**Сравнительные результаты трансгликозирования, катализируемого ЛО  
при использовании в качестве акцепторов различных Np-гликозидов \***

Акцептор — Np-глико- зид ** (A)	Остаточное количество акцептора A, %	Продукты трансгликозирования ***, %				Степень реакции, %
		Np-OH	G <sub>1</sub> -A	G <sub>2</sub> -A	G <sub>3</sub> -A	
Glcβ	85,15	1,52	5,44 3,96	1,46 1,17	0,63 0,67	14,85
Glcβ	74,18	3,64	10,32 8,28	1,14 1,95	— 0,49	25,82
Glcβ	69,89	5,52	10,99 9,63	1,55 2,12	— 0,30	30,11
Glcα	71,60	Нет	14,82 7,13	3,88 2,00	— 0,57	28,40
Xylβ	78,48	»	14,18 4,39	2,54 0,41	—	21,52
Xylα	74,98	»	17,94 2,98	3,18 0,26	— 0,66	25,02
GlcNβ	97,96	»	0,67 0,84	0,15 0,20	0,10 0,08	2,04
GlcNAcβ	97,76	»	0,74 0,98	0,22 0,29	—	2,23
Fucα	93,00	»	5,00	1,01	0,99	7,00
Manα	94,69	»	2,05 2,00	0,49 0,33	0,36 0,08	5,31

\* См. примечание к табл. 1.

\*\* Для Glcβ приведены данные для 15, 30 и 60 мин реакции (строки 1—3 соответственно).

\*\*\* Верхняя и нижняя строки соответствуют содержанию продуктов основных и дополнительных пиков (см. текст).

Таблица 3

**Результаты ГЖХ-анализа ацетатов метилгликозидов, полученных  
при гидролизе метилированных продуктов фракций ФII и ФIII**

Ацетаты метилгликозидов	Содержание в продуктах фракции *					
	ФII			ФIII		
	%	моль/моль		%	моль/моль	
		экспер.	теорет.		экспер.	теорет.
2,4,6Me <sub>3</sub> Glc	30,7	1,62	1,6	58,7	4,8	4,0
2,3,6Me <sub>4</sub> Glc	18,9	1,00	1,0	12,2	1,0	1,0
2,3,4,6Me <sub>4</sub> Glc	50,4	2,66	2,6	29,1	2,4	2,5

\* Относительное содержание рассчитано на 1 моль 1 → 4-связанного остатка (2,3,6Me<sub>3</sub>Glc); данные теоретического расчета в случае трисахарида приведены для Glc1-3Glc1-4Glc.

жением связей Glc1 → 4Glc1 → 3Glcβ1-ONp (2) может появиться в случае, когда в качестве акцептора будет выступать уже синтезированный дисахарид Glc1 → 3Glcβ1-ONp. Но так как акцепторные свойства его, близкие к таковым для Np-гликозида (наши неопубликованные данные), будут зависеть только от концентрации Np-ламинарибиозида, которая в реакции значительно ниже концентрации исходного Np-гликозида, образование изомера (2) менее вероятно. По этой причине еще менее вероятно образование Glc1 → 4Glc1 → 4Glcβ1-ONp (3), так как акцептором в этой реакции

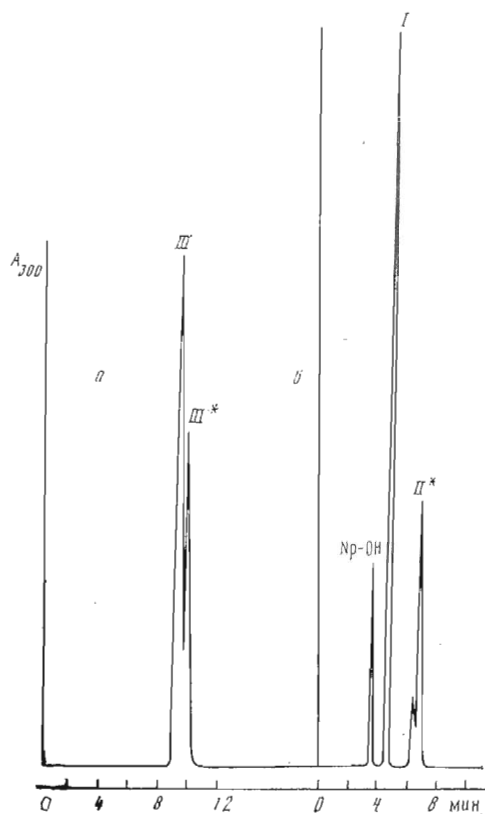


Рис. 4. ВЭЖХ-анализ выделенной препаративно фракции ФIII (а) и продуктов ее гидролиза (2 ч) в присутствии глюкоказы ЛIIV (б). Обозначения пиков как на рис. 1

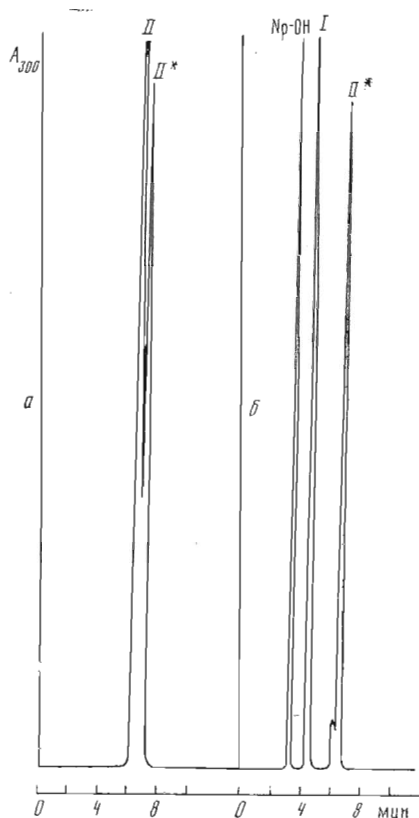


Рис. 5. ВЭЖХ-анализ выделенной препаративно фракции FI (а) и продуктов ее гидролиза (24 ч) в присутствии глюкоказы ЛIIV (б). Обозначение пиков как на рис. 1

должен быть  $\text{Glc1} \rightarrow 4\text{Glc}\beta\text{1-ONp}$ , который образуется в еще меньших количествах. Это подтверждает и теоретический расчет состава продуктов метилирования ФIII: при наличии  $1 \rightarrow 4$ -связанного трисахарида (3) соотношение метилированных сахаров было бы  $1,5 : 1,25 : 1,0$ , что не соответствует данным табл. 3. Кроме того, образование пика, идентичного по времени удерживания с  $\text{Glc}\beta\text{1} \rightarrow 4\text{Glc}\beta\text{1-ONp}$ , при гидролизе Np-триозидов (ФIII) действием  $1,3\text{-}\beta$ -глюкоказы ЛIIV (рис. 4) также определяет преимущественное расположение  $\beta\text{-1} \rightarrow 4$ -связи, показанное в соединении (1).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры (табл. 4) препаратов ФII и ФIII при отсутствии сигналов  $\alpha$ -аномера регистрируют сигналы с химическими сдвигами 85,9 и 79,1 м. д., что определяет наличие  $\beta\text{-1} \rightarrow 3$ - и  $\beta\text{-1} \rightarrow 4$ -связанных остатков глюкозы [6—8]. Соотношения 60 : 40 (ФII) и 80 : 20 (ФIII) вытекают из величин интегральных интенсивностей этих сигналов.

Отсутствие  $\alpha$ -гликозидных связей подтверждается также тем, что  $\alpha$ -глюкозидаза из дрожжей не действует на продукты ФII и ФIII. О наличии  $\beta\text{-1} \rightarrow 3$ -связанных продуктов во фракциях ФII и ФIII свидетельствует их исчезновение при длительном гидролизе ламинариной ЛIIV; при этом сохраняются продукты с  $\beta\text{-1} \rightarrow 4$ -гликозидными связями (рис. 4, 5).

Таким образом, установлено, что в результате реакции трансгликозилирования, катализируемой глюкоказой ЛЮ, образуются Np-гликозиды олигосахаридов следующего состава:  $\text{Glc}\beta\text{1} \rightarrow 3\text{Glc}\beta\text{1-ONp}$  и  $\text{Glc}\beta\text{1} \rightarrow 4\text{Glc}\beta\text{1-ONp}$  (ФII),  $\text{Glc}\beta\text{1} \rightarrow 3\text{Glc}\beta\text{1} \rightarrow 3\text{Glc}\beta\text{1-ONp}$  и  $\text{Glc}\beta\text{1} \rightarrow 3\text{Glc}\beta\text{1} \rightarrow 4\text{Glc}\beta\text{1-ONp}$  (ФIII). Появление при трансгликозилировании связи иной, чем гидролизуемая, показано, например, для лизоцима [9] (синтез не только  $\beta\text{-1} \rightarrow 4$ -, но и  $\beta\text{-1} \rightarrow 3$ -, и  $\beta\text{-1} \rightarrow 2$ -гликозидной связи)

Данные  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии ( $\delta$ , м. д.) препаративно выделенных фракций ФII и ФIII (рис. 1)

Фракция	Нр-гликозид	Остаток *	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
ФII	Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Glc $\beta$	A	100,2	73,1	85,9	63,7	76,6	61,5
		Б	103,1	74,2	76,3	70,3	76,6	61,3
	Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc $\beta$	A	100,1	74,8	76,3	79,1	75,8	61,0
		Б	103,4	73,9	76,6	70,3	76,6	61,3
ФIII	Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Glc $\beta$	A	100,2	73,4	85,1	68,8	76,8	61,5
		Б	103,4	73,9	85,6	69,0	76,5	61,5
		В	103,3	73,3	76,5	70,4	76,9	61,5
	Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc $\beta$	A	100,0	74,8	76,3	79,3	76,8	60,7
		Б	103,6	74,1	85,3	68,5	75,6	61,4
		В	103,1	73,1	76,8	70,3	76,8	61,5
	Glc $\beta$ 1-ONp **		100,2	73,5	77,0	70,0	76,2	61,2

\* А, Б, В — глюкозные единицы, начиная с восстанавливающего конца.

\*\* Стандартный образец.

Таблица 5

Свободная энергия связывания различных Нр-гликозидов с акцепторными подцентрами активных центров эндо-1,3- $\beta$ -глюконаз ЛIV и ЛЮ

Акцептор — Нр-гликозид	ЛЮ				ЛIV			
	$K_m$ , мМ	$K_a$	$\ln K_a$	$\Delta F$ , кДж/моль	$K_m$ , мМ	$K_a$	$\ln K_a$	$\Delta F$ , кДж/моль
Glc $\beta$	14,3	69,9	4,3	20,5	20,8	48,1	3,9	19,6
Glc $\alpha$	15,4	64,9	4,2	20,3	23,3	42,9	3,8	19,3
Xyl $\beta$	19,2	52,1	4,0	19,8	30,0	33,3	3,5	18,7
Xyl $\alpha$	20,4	49,0	3,9	19,6	25,0	40,0	3,7	19,1

Примечание. Значения  $K_m$  получены по методу Лайнуивера — Берка [13] в координатах двойных обратных величин; скорости образования продуктов реакции трансгликозилирования определены при различных концентрациях Нр-гликозидов (16,6; 33,2; 49,8; 66,4 мМ). Донором служил неразветвленный ламинарин при постоянной концентрации 2 мМ. Условия реакции приведены в «Экспериментальной части».  $\Delta F = RT \ln K_a + 10,06$  [14], где  $K_a = 1/K_m$ ; 10,06 кДж/моль — энергия сольватации.

и эндо- $\beta$ -1,4-ксилаказы *Cryptococcus albidus* [10] (синтез не только  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-, но и  $\beta$ -1  $\rightarrow$  3-связи). Последний случай особенно близок к нашему:  $\beta$ -1,4-ксилаза имеет способность к расщеплению  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-,  $\beta$ -1  $\rightarrow$  3-связанных ксиланов, хотя не гидролизует 1  $\rightarrow$  3- $\beta$ -ксилаз. Эндо-1,3- $\beta$ -глюконаза ЛЮ также обладает аналогичным свойством и в слабой степени (до 5% от гидролиза ламинарина) гидролизует лишайники или глюканы овса и ячменя (1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  4- $\beta$ -глюканы), хотя не гидролизует целлюлозу [11].

Ранее [12] методом картирования активных центров глюконаз ЛIV и ЛЮ нами были определены энергии взаимодействия подцентров с глюкозными единицами линейных Нр-ламинариолигозидов. Использование различных акцепторов в реакции трансгликозилирования дает дополнительную информацию о специфичности и энергетических взаимодействиях подцентров, расположенных рядом с каталитическим участком в агликоновой части активного центра ферментов.

Исследование в качестве акцепторов реакции трансгликозилирования различных  $\alpha$ - и  $\beta$ -Нр-гликозидов (табл. 1, 2, 5) позволило сделать вывод о достаточно высокой специфичности агликонового (акцепторного) подцентра +1 активных центров глюконаз ЛIV и ЛЮ к конформации D-глюкозы и о роли заместителей в сахарном кольце при создании новой гликозидной связи. Отсутствие трансгликозилирования на галактозу, очень низкая скорость гликозил-переноса на маннозу, значительное (в 8—10 раз по сравнению с Glc, табл. 1, 2) снижение акцепторных свойств GlcN

и GlcNAc (замещение OH-группы при C-2 на NH<sub>2</sub> и NAc) дают основание предполагать, что при образовании 1 → 3-гликозидной связи (как для ЛІV, так и для ЛЮ) для осуществления контакта акцептора с ферментом необходимо расположение OH-групп при C-2 и C-4 только такое, как в *D*-глюкозе. В случае образования 1 → 4-гликозидной связи (которое, как показано выше, имеет место в катализе глюканазой ЛЮ), очевидно, вместо OH-группы при C-4 в связывании участвует группа OH при C-3. Относительно близкие значения  $K_m$  и соответственно энергии связывания  $\alpha$ - и  $\beta$ -Np-гликозидов Glc и Xyl (табл. 5) в агликоновых подцентрах указывают на то, что при образовании продуктов трансгликозилирования влияние первичной спиртовой группы незначительно.

Неожиданным было проявление акцепторных свойств Np- $\alpha$ -*L*-фукопиранозидом (табл. 1, 2): при отсутствии переноса на Np- $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозиды глюканазы ЛІV и ЛЮ катализируют трансгликозилирование на 6-дезоксигалактозу в *L*-форме (Fuc) с образованием продуктов в виде гомологической серии одинарных пиков. Возможно, введение в сахарное кольцо CH<sub>3</sub>-группы при C-5 усиливает акцепторную способность соединения. Подобный эффект обнаружен в результате замещения HO-CH<sub>2</sub> на CH<sub>3</sub>-группу при исследовании в качестве акцепторов 6-дезоксиглюкозы и глюкозы в случае лизоцима [9]. Повышение акцепторной способности на порядок по сравнению с метил- $\alpha$ -глюкопиранозидом наблюдали для метилхинозида в реакции с глюканазой ЛІV [1]. Альтернативным может быть предположение о возможном влиянии соответствующей пространственной ориентации групп заместителей в сахарном кольце гликозида *L*-ряда на связывание его с активным центром ферментов.

Следует также отметить, что глюканазы ЛІV и ЛЮ в отличие от лизоцима (для которого установлено отсутствие гликозилпереноса на метил- $\alpha$ -глюкозид, а мальтоза — плохой акцептор [9]) осуществляют трансгликозилирование и на  $\alpha$ -, и на  $\beta$ -Np-гликозиды, но освобождение *n*-нитрофенола (Np-OH) происходит только при участии  $\beta$ -Np-глюкозида в качестве акцептора (по этой причине наблюдается некоторое снижение выхода продуктов трансгликозилирования, табл. 1, 2), что свидетельствует о высокой специфичности подцентра —1, расположенного рядом с каталитическим участком в гликоновой части активного центра ферментов. Свободный Np-OH появляется с некоторым lag-периодом. Это связано с процессом вторичного гидролиза продуктов трансгликозилирования, Np-олигозидов с определенной длиной цепочки, расположение которых в гликоновой части активного центра глюканаз ЛІV и ЛЮ энергетически более выгодно для преимущественного отщепления Np-OH. Нами установлено, что в случае с ЛЮ, например, такой преимущественный разрыв происходит при гидролизе Glc<sub>3</sub>-ONp, где выделяется до 20% Np-OH, в то время как расщепление тетра- и пентаозидов дает только 3% Np-OH.

### Экспериментальная часть

**Ферменты.** Эндо-1,3- $\beta$ -глюканазы ЛІІІ, ЛІV, ЛЮ выделены из кристаллического стебелька моллюсков *S. sachalinensis* и *Ch. albidus* [15, 16], по данным диск-электрофореза, в гомогенном состоянии.  $\alpha$ -Глюкозидаза из дрожжей — коммерческий препарат (Serva, ФРГ).

**Субстраты.** Ламинарин (1,3- $\beta$ -глюкан) из морской водоросли *L. sychorioides* получен по методу [17], пахиман и ламинарин *L. hyperborea* — коммерческие препараты.

**Акцепторы.**  $\alpha$ - и  $\beta$ -Np-глюкозиды и ксилозиды — коммерческие препараты фирмы Chemapol (ЧССР), Np- $\alpha$ -*L*-фукозид — производства Koch-Light Lab. (Англия).

**Условия реакции трансгликозилирования.** Реакционные смеси содержали 2 мМ ламинарин, 25 мМ соответствующий акцептор; 0,01—0,02 ед. акт. ЛІІІ, ЛІV и ЛЮ в 0,05 М Na-ацетатном буферном растворе, pH 5,2, температура реакции 22° С.

**ВЭЖХ-анализ реакции трансгликозилирования** выполнили на жидкостном хроматографе Du Pont серии 8800, колонка Ultrasil-NH<sub>2</sub>, 10 ×

× 250 мм (Вескман). Скорость элюирования 4 мл/мин. Элюирующая система: ацетонитрил — 5,0 мМ Na-ацетатный буфер, pH 4,0—4,3 (80 : 20). УФ-регистрацию проводили при 300 нм.

*Препаративная хроматография* проведена на колонке 1,5 × 130 см, заполненной Toyopearl HW-40, скорость элюирования дистиллированной водой — 16—18 мл/ч. Детектор Uvicord (LKB) регистрирует профиль элюции Np-олигозидов при 280 нм.

*Метилирование продуктов трансгликозилирования* ФII и ФIII выполнили по методу [5]. Отсутствие полос поглощения в области 3400—3600 см<sup>-1</sup> на ИК-спектрах служило признаком завершения процесса метилирования. Сполна метилированные олигосахариды гидролизовали 4 ч 1,5 н. HCl в абсолютном CH<sub>3</sub>OH при 90° С. Продукты гидролиза ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине (1 : 1, 1 ч, 100° С).

*Ацетаты метилгликозидов* анализировали с помощью ГЖХ «Цвет-106» на стеклянной колонке 0,4 × 150 см с сорбентом QF-1 в режиме повышения температуры в интервале 125—225° С со скоростью 5° С/мин. Идентификация проведена с использованием стандартных образцов, любезно предоставленных Е. В. Евтушенко, согласно методу [18].

<sup>13</sup>C-ЯМР-спектры продуктов трансгликозилирования ФII и ФIII сняты на приборе НХ-90 Е Bruker в D<sub>2</sub>O; внутренним стандартом служил CH<sub>3</sub>OH (49,6 м. д. относительно тетраметилсилана).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заягинцева Т. Н., Евтушенко Е. В., Елякова Л. А. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1206—1214.
2. Назарова Н. И., Елякова Л. А. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1189—1196.
3. Mazur A. K., Nazarova N. I., Elyakova L. A. // FEBS Letters. 1985. V. 192. № 1. P. 43—46.
4. Елякова Л. А., Рудакова В. Я., Сундукова Е. В., Исаков В. В. // Химия природ. соедин. 1986. № 4. С. 469—471.
5. Nakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. № 1. P. 205—208.
6. Nanjo F., Usui T., Suzuki T. // Agric. Biol. Chem. 1984. V. 48. № 6. P. 1523—1532.
7. Yamashita H., Hayase F., Kato H. // Agric. Biol. Chem. 1985. V. 49. № 5. P. 1313—1320.
8. Yamashita H., Hirono T., Hayase F., Kato H. // Agric. Biol. Chem. 1986. V. 50. № 3. P. 733—740.
9. Pollock J. J., Sharon N. // Biochemistry. 1970. V. 9. № 20. P. 3913—3925.
10. Biely P., Vrsanska M. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 129. P. 645—651.
11. Елякова Л. А., Заягинцева Т. Н., Привалова Н. М. // Биоорг. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1553—1559.
12. Назарова Н. И., Мазур А. К., Елякова Л. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1478—1483.
13. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты / Ред. А. И. Опарина. М., 1961. С. 30—31.
14. Prodanov E., Seigneur C., Marchis-Mouren G. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 122. № 1. P. 75—81.
15. Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovskiy V. E. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 212. № 1. P. 382—393.
16. Privalova N. M., Elyakova L. A. // Comp. Biochem. and Physiol. 1978. V. 60B. № 3. P. 225—228.
17. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N. // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. № 2. P. 241—248.
18. Евтушенко Е. В., Оводов Ю. С. // Химия природ. соедин. 1982. № 1. С. 21—23.

Поступила в редакцию  
3.XI.1988  
После доработки  
15.II.1989



A STUDY ON THE TRANSGLYCOSYLATION ABILITY  
OF ENDO-1,3- $\beta$ -D-GLUCANASES.  
IV. ACCEPTOR SPECIFICITY  
OF THE ENZYMIC ACTIVE SITES FROM MARINE INVERTEBRATES  
(IN THE REACTIONS WITH ARYLGLYCOSIDES)

NAZAROVA N. I., ELYAKOVA L. A.

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

Comparative investigations of products of transglycosylation reactions catalyzed by endo-1, 3- $\beta$ -D-glucanases, L-IV and L-0 (EC 3.2.1.6), by using  $\alpha$  and  $\beta$ -para-nitrophenyl (Np)-glycosides of D-Glc, D-Xyl, D-GlcN, D-GlcNAc as acceptors have been carried out. L-IV from *Spisula sachalinensis* catalyzes the transglycosylation reaction on  $\beta$ -Np-glucoside to form individual aryl 1,3- $\beta$ -di-, tri-, tetra-, penta-osides, whereas L-0 from *Chlamys albidus* yields two products of each oligomer fraction independently of structure of donors, viz. 1,3- $\beta$ -glucans from different sources. By  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, methylation, digestion with specific enzymes on disaccharide (FII) and trisaccharide (FIII) fractions isolated preparatively it was shown that L-0 catalyzes transglycosylation reaction to form not only 1,3- $\beta$ -but also 1,4- $\beta$ -aryl oligosaccharides.

Glucanase L-IV and L-0 catalyze transglycosylation onto  $\alpha$ - and  $\beta$ -Np-glycosides-but free para-nitrophenol (Np-OH) was found to form only with  $\beta$ -Np-D-Glc as an acceptor.

$K_m$  values found for  $\alpha$ - and  $\beta$ -Np-D-Glc and -Xyl indicate similarity of acceptor properties and absence of effect of glycosidic bond configuration on transglycosylation.

Calculated free energies of binding of these compounds in aglycone subsites of the enzymes' active centres are similar. Acceptor activity of the enzymes is affected by location of substituents in the sugar cycle of Np-glycosides.