



УДК 577.152.321*6.14

© 1991 г.

Л. Е. Елякова, В. В. Исаков

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ β -1,6;
1,3-ГЛЮКООЛИГОСАХАРИДОВ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРУЮЩИМ
ДЕЙСТВИЕМ ЭНДО- β -1,3-ГЛЮКАНАЗ
НА ГЕНЦИОЛИГОСАХАРИДЫ КАК АКЦЕПТОРЫ

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО АН СССР, Владивосток

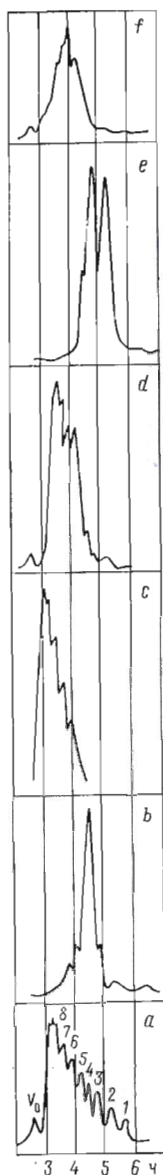
Недавно из продуктов гидролиза клеточной стенки *Phytophthora megasperma* были выделены в небольших количествах изомерные β -1,6;1,3-глюкогептаозы. Один из изомеров, симметричного строения, содержащий β -1,3-разветвления из одной глюкозной единицы при 2-м и 4-м остатках глюкозы в генциопентаозе, проявил себя как активный индуктор продукции соей фитоалексина [1, 2]. Показано, что это биологически активный олигомер минимальной длины. Такой же биологической активностью обладал синтетический глюкогептаозид указанной структуры [2]. Синтез этого разветвленного олигосахарида со степенью полимеризации (d. p.) 7 многостадийен и достаточно сложен [3].

Мы применили для получения олигосахаридов подобного строения энзиматический синтез, осуществляемый эндо- β -1,3-глюканазами из морских моллюсков. Ферменты, как было показано нами [4—7], обладают значительной трансгликозилирующей способностью, перенося к акцепторам (глюкозе и гомоморфным ей моносахаридам) β -1,3-связанные глюкозные остатки (от доноров — ламинарина или ламинариолигосахаридов) в С3-положение. В настоящей работе в качестве доноров использовали ламинариолигосахариды (d. p. \sim 10, рис. 1с, и более мелкие, рис. 1е), полученные формолизом пахимана — β -1,3-глюкана из *Poria cocos*, а в качестве акцептора — генциолигосахариды с d. p. \sim 4 (рис. 1б), полученные гидролизом β -1,6-глюкана из лишайника *Umbilicaria rossica* эндо- β -1,6-глюканазой из морского моллюска [8].

К раствору, содержащему по 65 мг указанных ламинариолиго- (d. p. \sim 10) и генциолигосахаридов в 8 мл воды, добавляли эндо- β -1,3-глюканазу (300 мкл, ед. акт. [4]) и инкубировали при 37° С (смесь 1). Одновременно ставили контрольную пробу, содержащую только ламинариолигосахариды с d. p. \sim 10 и фермент в тех же соотношениях (смесь 2). За ходом реакции следили, отбирая в определенные промежутки времени из смесей 1 и 2 аликвоты и определяя в них содержание глюкозы глюкозооксидазным методом. После достижения 15 или 20% степени гидролиза реакции были остановлены прогреванием на кипящей водяной бане в течение 1 мин.

Реакционная смесь 1 в пять приемов подвергнута эксклюзионной хроматографии на колонке с биогелем Р-2 (2 \times 100 см) при 55° С. Фракции (d. p. \sim 7—8), промежуточные по молекулярной массе между двумя исходными олигомерами (с и б), были собраны, объединены и высушены лиофильно (выход 15%, рис. 1д). При проведении реакции аналогичным образом, но с использованием в качестве акцептора тех же генциолигосахаридов (d. p. \sim 4), а в качестве доноров — смеси ламинаритриозы и биозы (в соотношении акцептор — донор 13 : 1 по весу) были получены продукты меньшей степени полимеризации; d. p. 6—5 (рис. 1ф).

Рис. 1. Хроматография на колонке с биоге-
 лем Р-2 (0,6 × 100 см,
 400 меш, 55° С), анали-
 затор Jeol-JLC-6АН.
 Скорость элюции 5 мл/ч.
 Обнаружение сахаров
 орцин-серноокислотным
 методом: *a* — контроль-
 ная смесь, ламинариоли-
 госахариды из пахимана.
 1, 2, 3...7 — глюкоза,
 биоза, триоза и ... геп-
 таоза и т. д.; *b* — исход-
 ные генциоолигосахариды,
 д. р. ~4; *c*, *e* — ис-
 ходные ламинариолиго-
 сахараиды, д. р. 10 и 2—3
 соответственно; *d* — про-
 дукт, полученный из
 реакционной смеси (*b* +
 + *c*), при глубине пре-
 вращения 15%; *f* — про-
 дукт, полученный из ре-
 акционной смеси (*b* + *e*)



Для исходных веществ и выделенных продуктов были получены спектры ЯМР: ^1H и ^{13}C *. Анализ области 4,2—5,5 м. д. резонанса аномерных протонов показал (рис. 2А), что в отличие от исходных олигосахаридов (*b* и *c*), состоящих либо из ~1,6-, либо из 1,3-замещенных глюкозных единиц, в продуктах *d*, *d'* и *f* отмечено появление остатков глюкозы, замещенных в положениях как 3, так и 6. На это указывает сдвиг сигналов аномерных протонов при С-атомах, участвующих в образовании 1,6-гликозидной связи, в спектрах ^1H -ЯМР продуктов *d*, *d'* и *f*, относительно их положения в спектре исходного β -1,6-олигосахарида (*b*). Так, в спектре вещества *d* наблюдается сигнал с химическим сдвигом δ 4,43 м. д., отсутствующий в спектре β -1,6-олигосахарида (*b*), который характеризуется сигналами δ 4,38 м. д. (2H), 4,36, 4,385, 4,39 (аномерных протонов невосстанавливающих моносахаридных остатков) и δ 4,61 и 5,10 м. д. (восстанавливающего моносахаридного остатка). В случае продуктов *d'* и *f* в рассматриваемой области кроме сигнала, наблюдаемого для образца *d* (δ 4,43 м. д.), имеется

* Спектры получены на приборе M-250 «Bruker» в D_2O при 80° С для ^1H -ЯМР и 34° С — для ^{13}C -ЯМР. В качестве внутреннего стандарта использовали DMSO (δ 2,6 м. д. для протонов и 39,6 м. д. для ^{13}C). Химические сдвиги пересчитаны относительно тетраметилсилана.

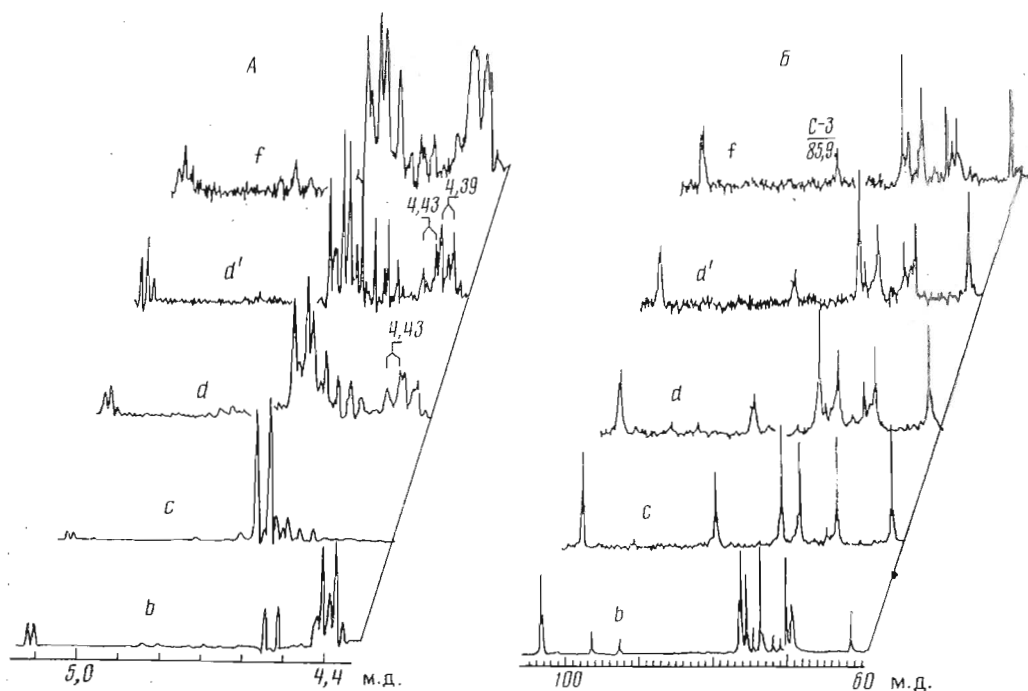
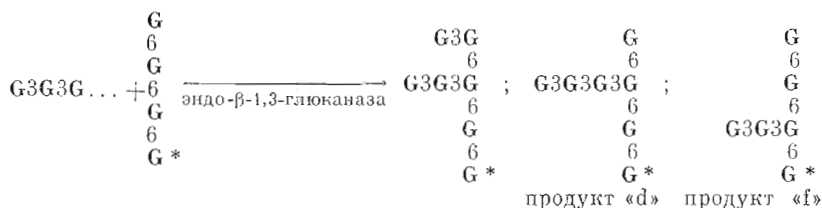


Рис. 2. ЯМР-спектры ^1H (А) и ^{13}C (Б) исходных веществ (b, c) и продуктов реакции d, d' и f (обозначения — как в подписи к рис. 1; d' — продукты, полученные из реакционной смеси (b + c) при достижении 20%-вой глубины гидролиза)

интенсивный сигнал с δ 4,39 м. д. Указанные величины химических сдвигов протонов при С-1-атомах, участвующих в образовании β -1,6-гликозидной связи, согласно работе [1], свидетельствуют, что для образца d гликозилирование по С-3-атому остатков β -1,6-олигосахаридов в основном произошло либо по невосстанавливающему, либо / и по соседнему к невосстанавливающему звену, а для образцов d' и f — в основном по остатку, соседнему с восстанавливающим моносахаридным звеном. Приведенные данные позволяют утверждать, что прошла следующая ферментативная реакция (схема).



* Восстанавливающий конец генциотетраозы; G — глюкоза.

Для обсуждения и расшифровки полученных ЯМР-спектров продуктов нами были привлечены ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры гептамеров из глюкана клеточной стенки *P. megasperma* [1], синтетического образца [3], а также β -1,6; 1,3-глюкана из морской водоросли *Emiliania huxlii* [9]. Из ^1H -ЯМР-спектров продуктов видно, что соотношение количеств β -1,3- и 1,6-связанных глюкозных остатков не совсем соответствует приведенной выше структуре ($\sim 1:1$): β -1,3-связанные глюкозные единицы преобладают. Для объяснения этого обстоятельства были сняты ^1H -ЯМР-спектры веществ, полученных гель-фильтрацией контрольной смеси 2. В этом случае ни в спектре продуктов с д. р. 7—8, ни в спектре возможных продуктов внутреннего трансгликозилирования с большей молекулярной массой, выходящих со свободным объемом колонки Р-2 (д. р. >13), нет сигналов, соответствующих 1,6- или 1,3,6-связанным глюкозным остаткам. Но возможная примесь β -1,3-связанных олигосахаридов — продуктов внутренних

превращений ламинариозидов в составе продуктов реакции (рис. 2А, *d*, *d'*, *f*) увеличивает соотношение β -1,3- и 1,6-связанных глюкозных остатков в пользу β -1,3-ряда и не позволяет однозначно оценить из ^1H -ЯМР-спектров длину цепи β -1,3-олигосахарида, присоединенного к β -1,6-цепи.

Сравнение спектров ^{13}C -ЯМР (рис. 2Б) исходных олигосахаридов (*b*, *c*) и продуктов реакции *d*, *d'*, *f* подтверждает вывод о гликозилпривании остатков генциотетраозы по С-3. Кроме сигнала, относящегося к С-3-атому β -1,3-олигосахаридов (δ 85,5 м. д.), присутствует характерный сигнал С-3-атома δ 85,9 м. д., соответствующий β -1,3,6-замещенным моносахаридным звеньям [9].

Варьируя исходные ламинари- и генциоолигосахариды и глубину реакции, с помощью данного способа можно получать смеси изомеров, аналогичных структурам *d*, *d'*, *f*.

Предлагаемый путь получения β -1,6; 1,3-глюкоолигосахаридов быстр, одностадийн и, несмотря на относительно небольшие выходы конечных продуктов, может быть использован для препаративных наработок. Полученные таким образом продукты опробуются в моделях фитоиимунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sharp J. K., McNeil M., Albersheim P. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 18. P. 11321—11336.
2. Sharp J. K., Albersheim P., Pilotti P., Garegg P., Ossowski P., Lindberg B. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 18. P. 11341—11345.
3. Fugedi P., Birberg W., Garegg P., Pilotti A. // Carbohydr. Res. 1987. V. 164. P. 297—312.
4. Назарова Н. И., Елякова Л. А. // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1189—1196.
5. Зягунцева Т. Н., Назарова Н. И., Елякова Л. А. // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 10. С. 1342—1346.
6. Bezukladnikov P. W., Elyakova L. A. // Carbohydr. Res. 1988. V. 184. P. 268—270.
7. Зягунцева Т. Н., Ештушенко Е. В., Елякова Л. А. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1209—1214.
8. Rudakova V. Ya., Shevchenko N. M., Elyakova L. A. // Compar. Biochem. and Physiol. 1985. V. 81B. P. 677—682.
9. Vårum K. M., Kvam B. J., Myklestad S., Paulsen B. S. // Carbohydr. Res. 1986. V. 152. P. 243—248.

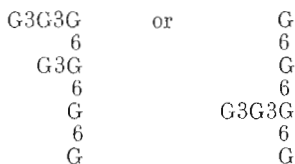
Поступило в редакцию
18.X.1990

L. A. ELYAKOVA, V. V. ISAKOV

ENZYMATIC SYNTHESIS OF β -1,6;1,3-GLUCOOLIGOSACCHARIDES BY MEANS OF ENDO- β -1,3-GLUCANASE TRANSGLYCOSILATION OF GENTIOOLIGOSACCHARIDES

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

Mixed β -1,6;1,3-glucooligosaccharides] (d.p. 7—8 or 5—6) were obtained with 15% yield by enzymatic transglycosylation of endo- β -1,3-gluconases from marine mollusks, which transfer β -1,3-bound] glucose residues from donors (laminarioligosaccharides) to β -1,6-gentiotetraose as an acceptor. The structures of the formed compounds such as:



were proved by ^1H and ^{13}C -NMR] spectroscopy by the appearance of 1,3,6-bound glucose units in the reaction products. This method is suggested as a new, prompt and one-stage way of synthesis of β -1,6;1,3-glucooligosaccharides, possible inductors of phytoimmunity.

Технический редактор Н. Н. Белая

Сдано в набор 20.03.91	Подписано к печати 22.04.91	Формат бумаги 70×108 $\frac{1}{16}$
Высокая печать	Усл. печ. л. 12,6	Усл. кр.-отг. 9,5 тыс.
Тираж 741 экз.	Зак. 1232	Уч.-изд. л. 14,3
		Бум. л. 4,5
		Цена 2 р. 60 к.

Адрес редакции: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, корп. 32, комн. 306
Телефон: 330-60-38

2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6