



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.152.321 \* 6.02

© 1994 Т. Н. Звягинцева, Л. А. Елякова

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ  
ЭНДО-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-ГЛЮКАНАЗ МОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток*

Ключевые слова: О-гликозидгидролазы; эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканазы; специфичность; механизм действия; трансгликозилирование; ламинаран; бурые водоросли; морские моллюски.

Обобщены результаты сравнительного изучения механизмов гидролитического и трансгликозилирующего действия и специфичности эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз морских моллюсков. Обсуждается способность этих гидролаз эффективно катализировать реакции трансгликозилирования, одновременно производя основным продуктом реакции глюкозу, а также устройство и энергетика их активных центров. Проведен анализ обнаруженных различий и сходства между исследуемыми ферментами и другими группами карбогидраз. Показаны многообразие структур ламинаранов — 1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6- $\beta$ -D-глюканов бурых водорослей и особенности структуры  $\beta$ -D-глюканов, полученных из ламинаранов ферментативным синтезом и обладающих биологической активностью.

## 1. Карбогидразы. Общие представления о механизме действия

1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-Глюканазы (КФ 3.2.1.6 — эндо- и КФ 3.2.1.58 — экзо-О-гликозидгидролазы) принадлежат к ферментам карбогидразам (КФ 3.2.1), которые ответственны за превращения олиго- и полисахаридов, а также углеводсодержащих биополимеров [1—8].

Обычно  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-связанная глюкоза в природе входит в состав смешанных  $\beta$ -D-глюканов — 1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6- либо 1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 4, которые являются субстратами 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз. Источники  $\beta$ -D-глюканов — водоросли, дрожжи, грибы, микроорганизмы (1 $\rightarrow$ 3- либо 1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6- $\beta$ -D-глюканы), лишайники, высшие растения (1 $\rightarrow$ 3- либо 1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 4- $\beta$ -D-глюканы). Очевидно, что запасы  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-связанной глюкозы достаточно велики и сопоставимы с запасами ее в виде целлюлозы [2]. Тем не менее 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканазы являются малоизученной группой ферментов. Дефицит изученности 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз особенно заметен в сравнении с амилазами [3], целлюлазами [4], лизоцимами [5] — ферментами, деградирующими столь же широко распространенные в природе 1 $\rightarrow$ 4- $\alpha$ -; 1 $\rightarrow$ 4- $\beta$ -D-глюканы и хитин. Возможно, это связано с тем, что источники 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканов более экзотичны. В последние годы число публикаций, относящихся к изучению 1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6- $\beta$ -D-глюканов и 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз, резко возросло [8—19].

Актуальность изучения 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз, а также их субстратов, 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканов, связана с непосредственным участием этих веществ в системах иммунитета как животных, так и растений [9—20]. Обнаружены рецепторы  $\beta$ -D-

глюкоанов на клетках крови животных и человека, а также клетках растений [12, 13]. Прослеживаются и другие общие черты животного и растительного иммунитета, проявляющиеся в механизме его регуляции 1→3; 1→6-β-D-глюканами [14]. Роль этих полисахаридов обусловлена тем, что клеточные стенки микроорганизмов, дрожжей, грибов, грибков, в том числе и патогенных, содержат 1→3; 1→6-β-D-глюканы. При контакте с живым организмом может происходить разрушение, например за счет литических ферментов хозяина, клеточных стенок микроорганизмов, и освобождение фрагментов, содержащих 1→3; 1→6-β-D-глюкоолиго- и полисахариды, которые служат сигнальными молекулами, оповещающими организм хозяина о внедрении патогена. В ответ на этот сигнал происходит развитие иммунных реакций в живых организмах. Так, веществами, индуцирующими защитные реакции картофеля, являются низкомолекулярные 1→3-β-D-глюканы из *Phytophthora* sp. [20], сои — 1→6; 1→3-β-D-глюкогептасахарид [9]. В дальнейшем на основе обнаруженных иммуномодулирующих свойств этих веществ предполагается создание экологически чистых средств защиты растений от патогенов [9]. В качестве положительного примера использования свойств β-D-глюкоанов можно привести шизофиллан и лентинан — грибные 1→3; 1→6-β-D-глюканы [10], а также 1→3; 1→6-β-D-глюкан из пивных дрожжей [11], которые применяются в клиниках Японии и США как иммуностимуляторы.

Естественно, что в образовании как низко-, так и высокомолекулярных биологически активных β-D-глюкоолиго- и полисахаридов должны принимать участие β-D-глюканазы. Ферменты с изученным механизмом действия могут применяться для направленного преобразования неактивных β-D-глюкоолиго- и полисахаридов в биологически активные. Проявление биологической активности должно быть тесно связано с особенностями первичной и пространственной структур β-D-глюкоанов. Анализ литературных данных показывает, что, например, проявление противоопухолевой активности 1→3; 1→6-β-D-глюкоанов связано со следующими чертами их строения. Это довольно высокомолекулярные вещества [10, 11, 17]. 1→3-β-D-Глюканы должны содержать некоторое количество 1→6-связанных остатков D-глюкозы в виде разветвлений от основной цепи. Часто эти разветвления регулярны, как, например, в лентинане и шизофиллане. Концентрация 1→6-связанных остатков D-глюкозы на невозстанавливаемом конце или включение их в цепь 1→3-β-D-глюкана также не препятствует проявлению противоопухолевой активности [10, 11, 19]. Обязательно наличие пространственной структуры в виде спиральных форм молекул или тройной спирали [18]. Все эти структурные элементы можно создать с помощью ферментов с изученным механизмом действия.

К настоящему времени изучение 1→3-β-D-глюканаз ограничивается исследованием их распространенности, способов их выделения, физико-химических свойств и специфичности [2, 7, 8, 15, 16, 20—24]. Работ по изучению механизмов действия этих ферментов, в частности эндо-1→3-β-D-глюканаз из морских моллюсков, немного [15, 16, 20—24]. Это не отражает отсутствия интереса к проблеме, а обусловлено разнообразием структур субстратов и необходимостью изучения в связи с этим прежде всего специфичности ферментов, их классификации.

Цель обзора — в основном обобщение результатов изучения механизмов действия 1→3-β-D-глюканаз кристаллических стебельков морских моллюсков — LIII, LIV из *Spisula sachalinensis*, LO из *Chlamys albidus*, LIV из *Patinopecten yessoensis*, которые являются типичными эндогликаназами и для которых в этой области к настоящему времени получено наибольшее количество данных [21—24].

Основные общие представления о механизмах действия эндогликаназ, полученные при изучении амилаз, лизоцимов, вполне применимы к β-D-глюканазам и изложены ниже. Карбогидразы относят к классу гидролаз — ферментов, переносящих отщепляемую группу на молекулу воды [1—7]. Процессы гидролиза

олиго- и полисахаридов под действием карбогидраз изучали с помощью методов, позволяющих регистрировать появление низкомолекулярных продуктов (например, обнаружение восстанавливающих сахаров, глюкозы, падения вязкости субстрата и т. д.).

Уже на этой стадии изучения карбогидразы были поделены на гликозидазы (ферменты, которые с большей скоростью гидролизуют олиго-, а не полисахариды) и гликаназы (ферменты, предпочтительно катализирующие гидролиз полисахаридов). Гликаназы в свою очередь были поделены на эндогликаназы (ферменты, атакующие молекулы полисахарида изнутри и расщепляющие их до смеси моно- и олигосахаридов с сохранением конфигурации атакуемого гликозидного гидроксила) и экзогликаназы, которые катализируют гидролиз молекул полисахарида с невозстанавливающего конца цепи, при этом в точке гидролиза происходит оптическая инверсия [1—7].

В 1964 г. было показано, что эндогликазаны подобно протеиназам способны катализировать не только гидролиз полисахаридов, но также трансгликозилирование [25, 26]. Если сообщения о синтезирующей активности эндогликаназ достаточно редки [27], то явление трансгликозилирования — переноса гликоновой части субстрата на гидроксилсодержащие вещества, способные быть акцепторами, изучается очень широко [25—30]. Более того, гидролиз можно представить как частный случай реакции трансгликозилирования, где акцептором является вода. Способность веществ служить субстратами или акцепторами в реакциях гидролиза или трансгликозилирования, катализируемых гликаназами, определяется структурой активного центра фермента.

Активные центры гликаназ в настоящее время представляют как часть молекулы фермента (E), комплементарную к мономерным остаткам субстрата, где происходит ряд последовательных превращений: связывание мономерных остатков, из которых состоит полисахарид (S), гидролиз гликозидной связи, оказывающейся в районе действия каталитических аминокислот. При этом образуется гликозил-фермент, происходит десорбция агликоновой части субстрата и перенос гликонового фрагмента на молекулу воды или другие акцепторы.

В качестве акцепторов в реакциях трансгликозилирования, естественно, могут выступать моно- и олигосахариды, т. е. продукты, образующиеся в процессе гидролиза, а также исходный полисахарид. Следовательно, можно ожидать появления продуктов реакции с большей молекулярной массой, чем исходный субстрат.

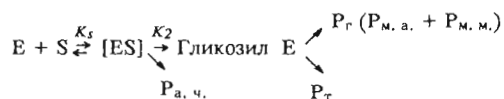
Нетрудно представить, что на начальных стадиях реакции основными продуктами гидролиза, а тем более трансгликозилирования, для типичных эндоферментов (которые гидролизуют внутренние связи в высокомолекулярных субстратах) должны быть высшие олиго- или полисахариды. Низкомолекулярные моно- и олигосахариды (продукты вторичных атак) должны появляться с задержкой во времени, т. е. с лаг-периодом. Было отмечено, что некоторые эндогликаназы дают уже на начальных стадиях реакции при гидролизе полисахаридов большое количество низкомолекулярных продуктов реакции [22, 31, 32], нехарактерное для этой группы гликаназ. Например, панкреатическая  $\alpha$ -амилаза свиньи (РРА), типичный по всем критериям эндофермент, гидролизует амилозу с большим выходом мальтозы и мальтотриозы уже на начальных стадиях реакции [31, 32].

В связи с такими фактами возникли понятия гидролиза полисахаридов гликаназами по одноцепочечному механизму, когда за время существования фермент-субстратного комплекса (ES) происходит разрыв всех связей в молекуле субстрата и образуется в основном один продукт, например глюкоза из глюканов (этот механизм характерен для экзоглюканаз); многоцепочечному механизму, когда за время существования комплекса ES разрывается одна связь; механизму множественной атаки, промежуточному между первыми двумя, при котором фермент за время существования одного комплекса ES может катализировать гидролиз нескольких связей. Число гидролизуемых связей определяет степень

множественности атаки [6, 31, 32]. Таким образом, при встрече фермента с субстратом могут происходить следующие микропроцессы:

Схема 1

Трансформация субстрата под действием фермента



В результате картина превращения субстрата заметно усложняется и схема изучения механизма действия эндогликаназ должна включать возможность возникновения и регистрации в процессе трансформации полисахарида продуктов различных реакций: гидролиза по механизмам множественной атаки ( $P_{m.a.}$ ), многоцепочечному ( $P_{m.m.}$ ), трансгликозилирования ( $P_r$ ), а также продуктов, возникающих при отщеплении агликоновой части субстрата ( $P_{a.ч.}$ ). Поэтому при изучении механизма действия эндогликаназ возникает проблема разделения всех этих продуктов и определения их количества в реакционных смесях.

Установление структуры продуктов трансформации субстратов под действием эндогликаназ как в присутствии, так и в отсутствие акцепторов также представляет интерес в связи с исследованием специфичности изучаемых ферментов. Так, известно, что лизоцим в процессе реакции трансгликозилирования катализирует образование не только  $1 \rightarrow 4$ -, но также  $1 \rightarrow 3$ - и  $1 \rightarrow 2$ -гликозидных связей [33], амилазы (эндо- $1 \rightarrow 4$ - $\alpha$ -*D*-глюканазы) — не только  $\alpha$ - $1 \rightarrow 4$ -, но и  $\alpha$ - $1 \rightarrow 6$ -гликозидных связей [34].

Изучение такого свойства фермента, как его специфичность, связано с необходимостью иметь максимально разнообразный ассортимент субстратов, ингибиторов, а также акцепторов. Большие возможности для исследования механизмов действия ферментов на примере  $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -*D*-глюканаз связаны с разнообразием структур и соответственно физико-химических свойств природных субстратов этих ферментов — дрожжевых, грибных, микробиальных  $\beta$ -*D*-глюканов, а также ламинаранов —  $1 \rightarrow 3$ ;  $1 \rightarrow 6$ - $\beta$ -*D*-глюканов водорослей. Поэтому в обзоре будут приведены данные по распространению и установлению структуры  $\beta$ -*D*-глюканов в различных водорослях и грибах.

## 2. $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -*D*-Глюканы

Чаще всего  $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -*D*-связанная глюкоза входит в состав смешанных  $\beta$ -*D*-глюканов:  $1 \rightarrow 3$ ;  $1 \rightarrow 6$ - либо  $1 \rightarrow 3$ ;  $1 \rightarrow 4$ -.  $\beta$ -*D*-Глюканы в зависимости от структуры сильно различаются по физико-химическим свойствам. Курдлан и парамилон, резервные полисахариды простейших, представляют собой практически линейные  $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -*D*-глюканы, обладающие высокой степенью кристалличности, что приближает их к целлюлозам [35]. Большинство известных  $\beta$ -*D*-глюканов:  $1 \rightarrow 3$ ;  $1 \rightarrow 6$ - $\beta$ -*D*-глюканы клеточных стенок дрожжей [36] и грибов [37, 38], а также  $1 \rightarrow 3$ ;  $1 \rightarrow 4$ - $\beta$ -*D*-глюканы (из лишайника *Cetraria islandica* [39], глюканы овса [40], ячменя [41]) — нерастворимы в воде либо образуют гели или вязкие растворы. Примером хорошо растворимых в воде  $1 \rightarrow 3$ ;  $1 \rightarrow 6$ - $\beta$ -*D*-глюканов могут служить ламинараны — резервные полисахариды водорослей [42—45]. Естественно, что они — наиболее удобные субстраты для изучения механизма действия  $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -*D*-глюканаз (называемых иначе ламинариназами).

Известно, что ламинараны из различных видов водорослей, будучи низкомолекулярными  $1 \rightarrow 3$ ;  $1 \rightarrow 6$ - $\beta$ -*D*-глюканами, значительно различаются как соотношением, так и способом включения  $1 \rightarrow 3$ - и  $1 \rightarrow 6$ -связей в цепь  $\beta$ -*D*-глюкана. Так, ламинаран из *Laminaria hyperborea* является практически линейным  $1 \rightarrow 3$ -

Структура некоторых 1→3; 1→6-β-D-глюкоанов

Глюканы	Тип экстракции	Выход, %	M, кДа	Содержание β-1,6-связей, % <sup>2*</sup>		Распределение β-1,6-связей <sup>3*</sup>	Включение β-1,6-Glc в цепь <sup>4*</sup>
				А	Б		
Ламинарин из <i>L. cichorioides</i>	Холодная	5,0	5,0	13,0	10—12	н/в	—
	Горячая	5,0	6,0	9,0	8—10		
<i>L. gurjanovi</i>	Холодная	2,0	4,0	4,5	3	Равн.	—
	Горячая	2,5	4,5	2,0	3		
<i>L. japonica</i>	Холодная	1,5	5,5	н. о.	5	н. о.	н. о.
<i>Punctaria latifolia</i>	»	1,5	4,5	10	н. о.	Равн.	»
<i>Fucus evanescens</i>	»	1,5	5,0	30,0	35—40	»	—
	Горячая	2,5	6,0	27,0	30—35		
Синтетический β-D-глюкан		20,0	8,0	20,0	20—25	н/в	—
<i>Sargassum sp.</i> (Seysshelles)	Холодная	1,6	5,0	25	25	н. о.	н. о.
	Горячая	1,0	5,0	20	н. о.		

\* Сефадекс G-50.

<sup>2\*</sup> А — на основании анализа продуктов, полученных из ламинаринов, действием ЛП и ЛПV; Б — данные <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии.

<sup>3\*</sup> На основании анализа кинетики образования продуктов при действии экзоламинариназы ЛП; н/в — сконцентрированы на невозстанавливающем конце молекулы; равн. — распределены равномерно; н. о. — не определяли.

<sup>4\*</sup> На основании деградации по Смиту.

β-D-глюкоаном, ламинаран из *L. sacharina* содержит около двух β-1→6-глюкозидных связей на молекулу (1→3: 1→6 = 10:1) в виде единичных ответвлений от основной цепи 1→3-β-D-глюкана [46, 47]. Но β-1→6-связанная глюкоза может находиться в ламинаранах не только в виде разветвлений. Так, ламинаран из *Eisenia bicyclis* имеет блочную структуру: β-1→6-связанные остатки D-глюкозы включены в цепь 1→3-β-D-глюкана (1→3: 1→6 = 3:1) [48]. Ламиарины из *Ishige okamura* и *Chorda filum* имеют блочную структуру с разветвлениями по C6 [49, 50]. И наконец, полисахарид из известковой водоросли *Emiliania huxleyi* имеет цепь из β-1→6-связанных остатков D-глюкозы и разветвления в виде гевциобиозы по C3 (1→3: 1→6 = 2:3) [51]. Таким образом, в β-D-глюканах водорослей представлены в полной мере все возможные варианты сочетания β-1→3- и β-1→6-глюкозидных связей.

С целью создания коллекции различных β-D-глюкоанов было изучено распространение этого типа полисахаридов в бурых водорослях тропической зоны Индийского океана, Охотского и Японского морей, разрабатывались методы их выделения и установления структуры, особенно ферментативные, а также исследовалась тонкая структура различных образцов ламинаранов [45, 52, 53]. Водоросли заготавливались в рейсах НИС «Академик Огарин» и на морской экспериментальной станции (Приморский край, Хасанский район). Данные по содержанию и структурам некоторых изученных ламинаранов приведены в табл. 1.

Наиболее полно представлены в исследованиях бурые водоросли Охотского и

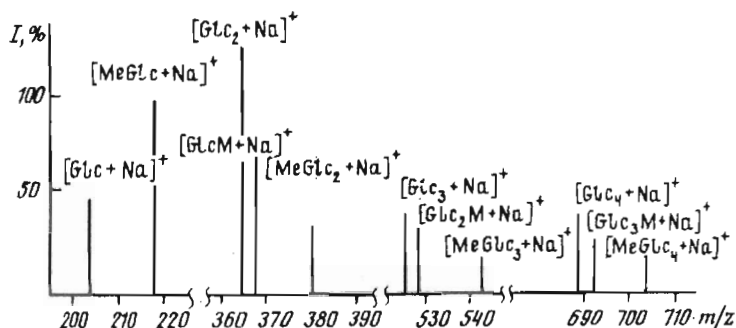


Рис. 1. Масс-спектры продуктов трансформации ламинарина под действием ЛПВ в присутствии метанола (40%). Glc<sub>2</sub>, Glc<sub>3</sub>, Glc<sub>4</sub> — ламинариби-, три- и тетраоза; Me и M — метил и маннит

Японского моря (15 видов, из которых 6 принадлежат к семейству ламинариевых). Нейтральные полисахариды практически полностью отсутствовали или содержались в небольших количествах в *L. angustata*, *L. yessoensis*, *L. japonica*, *Costaria costata*, *Alaria fistulosa*, *Coccophora langsdorfii*, *Pelvetia wrightii*, *Desmarestia viridis*, *Sphaerotrichia sp.*, *Chordaria magellanica* и *Chorda filum*. Содержание ламинарана в *L. cichorioides* является наибольшим и достигает 10—12% от сухой массы водорослей. Удивительны различия в содержании ламинарана в пределах одного семейства — ламинариевых. Так, *L. angustata*, *L. yessoensis*, *C. costata*, *L. japonica* содержат ламинараны в небольших количествах, тогда как в *L. cichorioides* и *L. gurjanovae* содержание их значительно (табл. 1). Колебания в содержании ламинаранов были отмечены в зависимости от года сбора. Так, в *L. cichorioides* колебания от года к году составляли от 4 до 12%, в *L. japonica* — от следовых количеств до 1%, в *Chorda filum* — от практически полного отсутствия [45] до 0,8% [50].

Все исследованные нейтральные полисахариды бурых водорослей оказались 1→3; 1→6-β-D-глюканами с молекулярными массами от 2,5 до 6 кДа (табл. 1). Различные образцы ламинаранов содержали от 30 до 80% молекул, на восстанавливающих концах которых присутствует остаток маннита. Считается, что таким образом происходит фиксирование конца цепи при биосинтезе ламинарана.

Процедуры обнаружения маннита в образцах и определения его количества трудоемки [45, 46, 50]. Поэтому очень перспективным для этой цели кажется метод электрораспылительной масс-спектрометрии, с помощью которого можно количественно регистрировать маннит и маннитсодержащие олигосахариды в продуктах кислотного или ферментативного гидролиза ламинаранов в виде квазимолекулярных ионов [53] (рис. 1).

При действии эндо- и экзо-1→3-β-D-глюконаз на ламинараны образсывались глюкоза, ламинари- либо гендиобиоза и различные количества фракций смешанных 1→3; 1→6-β-D-глюкотри- и тетраоз. Из количества этих фракций было рассчитано содержание в различных ламинаранах β-1→6-связанных остатков глюкозы (табл. 1). Данные, полученные с помощью ферментов, хорошо согласовывались с данными по содержанию 1→6-связей, полученными с помощью <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии и метилирования (табл. 1) [45, 52].

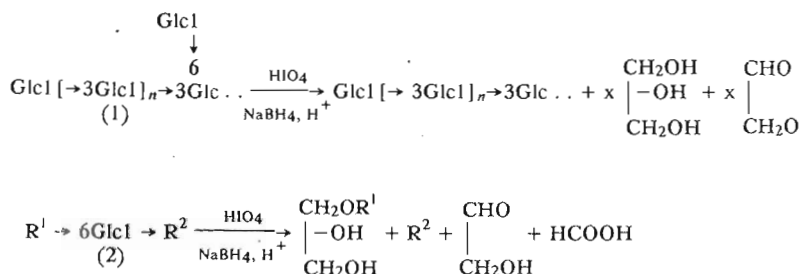
Значительные различия были отмечены для изучаемых ламинаранов в содержании β-1→6-связанных остатков D-глюкозы (табл. 1). Так, ламинаран из *Fucus evanesceus* содержит до 40% 1→6-связей, тогда как в ламинаране из *L. gurjanovae* они практически отсутствуют (2—3%). Последний должен быть похожим на известный из литературы ламинаран из *L. hyperborea*, отсутствие 1→6-связей в котором приводит к нерастворимости его в холодной воде. Он

хорошо растворяется только при 37° С [46]. Полученный же нами неразветвленный ламинаран из *L. gurjanovae* в небольших концентрациях (до 2—3 мг/мл) растворялся при 25° С. Дальнейшее фракционирование этого ламинарана позволило обнаружить в нем небольшие количества (до 20%) высокомолекулярной гетерогенной разветвленной фракции 1→3; 1→6-β-D-глюкана (молекулярная масса от 3 до 50 кДа; 1→3 : 1→6 = 85:15). Остальной ламинаран из *L. gurjanovae* (90%) практически не содержал 1→6-связанной глюкозы в своем составе и после отделения высокомолекулярной фракции перестал растворяться на холоду.

Деградация по Смиуту исследуемых ламинаранов не вызывает фрагментации их молекул [45]; следовательно, 1→6-β-связанные остатки глюкозы находятся главным образом в виде ответвлений от основной цепи 1→3-β-D-глюкана, что соответствует структуре (1) на схеме 2.

Схема 2

Деградация по Смиуту образцов ламинарана, содержащих β-1,6-связи в виде разветвлений (1) и внутри основной цепи (2)



R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> — фрагменты молекул ламинарана.

В ламинаране из *F. evanescens* около половины β-1→6-связанной глюкозы находится в виде ответвлений остатков генциобиозы от основной цепи 1→3-β-D-глюкана, а оставшаяся часть — в виде ответвлений из остатков глюкозы.

В спектрах <sup>13</sup>С-ЯМР различных ламинаранов остатки β-1→6-связанной глюкозы имели разные величины химических сдвигов для C-5: 75,8; 75,8 и 76,0; 76,3 м. д. для ламинаранов из *L. cichorioides*, *F. evanescens* и *Sargassum sp.* (Сейшелы) соответственно. Согласно полученным структурам ламинаранов, эти сигналы можно соотнести с C-5 1, 3, 6-связанных остатков (75,8 м. д.), 1, 6-связанных остатков глюкозы в виде генциобиозных фрагментов в разветвлениях (76,0 м. д.) и 1,6-связанных остатков глюкозы, присутствующих в цепи β-D-глюкана в виде блоков (76,3 м. д.), аналогично ламинаранам из *Chorda filum* и *Eisenia bicyclis* [48, 50].

С помощью экзо-1→3-β-D-глюканазы ЛIII из наземного моллюска *Eulota maakii* [54] было изучено распределение 1→6-связанных остатков D-глюкозы по цепи ламинаранов. Специфичность этого фермента такова, что он, начиная гидролиз β-1→3-связей с невосстанавливающего конца молекулы субстрата, обходит 1→6-связанные остатки глюкозы, образуя в качестве продуктов реакции глюкозу и дисахарид — генциобиозу из разветвлений. Отношение количества генциобиозы к глюкозе в процессе гидролиза 1→3; 1→6-β-D-глюканов экзоферментом должно отражать распределение 1→6-связей по цепи глюкана. Если это отношение постоянно, то распределение 1→6-разветвлений по цепи должно быть равномерным; если оно уменьшается в процессе реакции, то основная часть разветвлений сосредоточена на невосстанавливающем конце молекулы; если увеличивается — то на восстанавливающем. В процессе гидролиза исследуемых ламинаранов экзоферментом ЛIII образуется более богатый набор сахаров: помимо глюкозы и генциобиозы присутствуют трисахариды и небольшие количества тетрасахаридов. Отношение Glc<sub>n</sub>/Glc отражает распределение 1→6-связанных остатков вдоль цепи

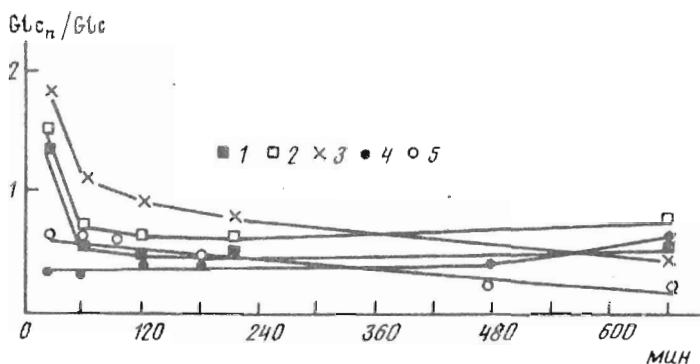


Рис. 2. Распределение 1-6-связанных остатков Glc по цепи ламинаринов из *L. cichorioides* (1—Glc<sub>2</sub>, 2—Glc<sub>3</sub>, 3—Glc<sub>4</sub>) и *F. evanescens* (4—Glc<sub>2</sub>, 5—Glc<sub>3</sub>; кривые, соответствующие Glc<sub>3</sub> и Glc<sub>4</sub>, расположены между Glc<sub>2</sub> и Glc<sub>5</sub>)

$\beta$ -D-глюкана (рис. 2). Видно, что в ламинаране из *L. cichorioides* часть фрагментов, содержащих 1-6-связанные остатки глюкозы, сосредоточена вблизи невосстанавливающего конца молекул, в остальных ламинаранах они распределены равномерно по цепи 1-3- $\beta$ -D-глюкана (табл. 1).

Данные о распределении включений иных связей вдоль цепи гомополисахарида получить с помощью традиционных методов углеводной химии невозможно. В химии углеводов бытовало мнение, что разветвления в молекулах полисахаридов распределяются статистически. Работы, касающиеся изучения распределения включений по цепи полисахаридов, достаточно редки, хотя в настоящее время все больше фактов свидетельствует о том, что именно в этом может быть зашифрована информация, лежащая в основе биологической активности олиго- и полисахаридов [8, 38, 39]. Применение ферментов с разной специфичностью в анализе полисахаридов позволяет получить уникальные данные об их структуре, а также ускорить процесс ее изучения.

В результате проведенных исследований можно сделать заключение, что бурые водоросли, собранные приблизительно в одно и то же время, содержат различные количества 1-3; 1-6- $\beta$ -D-глюканов, значительно отличающихся друг от друга деталями структуры.

### 3. Особенности реакций гидролиза, осуществляемых эндо-1-3- $\beta$ -D-глюканазами морских моллюсков

1-3- $\beta$ -D-Глюканазы найдены в бактериях, грибах, беспозвоночных, водорослях и в высших растениях. В литературе имеется ряд обзоров, касающихся изучения этих ферментов и их субстратов [2, 7, 8, 42—45]. Сложная структура смешанных  $\beta$ -D-глюканов, значительные различия в молекулярных массах и пространственных структурах их молекул порождают многообразие ферментов, их расщепляющих. Именно это обстоятельство привело объективно к тому, что большинство работ по изучению 1-3- $\beta$ -D-глюканаз посвящено в основном исследованию их специфичности: отношению ферментов к присутствию в 1-3- $\beta$ -D-глюканах других типов связей ( $\beta$ -1-4- либо  $\beta$ -1-6-), к размерам субстрата, его физическому состоянию и т. д. [15, 16, 55—67]. В связи с этим и классификация 1-3- $\beta$ -D-глюканаз сложнее, чем, например, для амилаз или целлюлаз.

Исследование специфичности применительно к 1-3- $\beta$ -D-глюканазам предполагает возможно более полный анализ способности фермента гидролизовать не только «истинные» субстраты, но также гомо-, гетероолиго- и полисахариды или углеводсодержащие полимеры со смешанным типом связей. Наиболее подробно в этом плане была изучена эндо-1-3- $\beta$ -D-глюканаза из *Rhizopus arrhizus* QM 1032 [15]. С помощью большого набора смешанных 1-3; 1-4- и 1-3; 1-6- $\beta$ -



D-глюкоолиго- и полисахаридов было показано, что фермент помимо  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-связи способен катализировать гидролиз  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-, но не  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-связей между остатками глюкозы.

Изучение специфичности показало, что среди эндо- $\beta$ -D-глюканаз имеются высокоспецифичные эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканазы (КФ 3. 2. 1. 39), катализирующие гидролиз  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-глюкозидных связей только в 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканах [16, 57]. Более обычные эндоферменты способны гидролизовать  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-глюкозидные связи и в смешанных  $\beta$ -D-глюканах [55, 56, 59, 60, 64—67]. Более того, в литературе имеется ряд примеров, где показано, что гомогенные препараты 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз способны на одном активном центре катализировать гидролиз не только  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-, но и  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4- или  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-связей [15, 58] или даже всех трех типов связей [61].  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3(4)-Глюканазы, катализирующие гидролиз этих типов связей в смешанных глюканах, но неспособные к гидролизу целлюлозы и ламинарана, выделены в отдельную группу — лихенаназы (КФ 3. 2. 1. 73) [62, 63].

Так как большинство природных субстратов 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз нерастворимо в воде, закономерно, что в природе существуют «литические» 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканазы — ферменты, разрушающие с большей скоростью более высокополимерные субстраты, чем ламинаран [36, 55]. Наряду с литическими ферментами в ферментативных комплексах имеются и обычные нелитические эндо- и экзоферменты, которые практически не гидролизуют высокополимерные субстраты, но обладают значительной ламинариназой активностью [54, 56]. Очевидно, в отличие от нелитических литические 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканазы подобно некоторым эндоцеллюлазам или амилазам [3, 4] способны адсорбироваться поверхностью нерастворимых субстратов. Наличие в природе смешанных 1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6- $\beta$ -D-глюканов, способных давать гели или вязкие растворы подобно 1 $\rightarrow$ 4; 1 $\rightarrow$ 6- $\alpha$ -D-глюканам (амилопектину, например), предполагает существование у эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз свойств, характерных для  $\alpha$ -амилаз, например гидролиз по механизму множественной атаки, который катализирует панкреатическая  $\alpha$ -амилаза свиньи [31, 32]. У лизоцимов гидролиза по механизму множественной атаки не отмечали. Таким образом, 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканазы сочетают в себе все многообразие свойств, присущее карбогидразам, что делает эту группу ферментов исключительно интересной для изучения механизмов действия карбогидраз. Изучение механизма взаимодействия фермента с субстратом, по которому осуществляется трансформация последнего, позволяет получить информацию о взаимосвязи между структурами субстрата, фермента и функцией фермента. Подобная информация, в свою очередь, позволяет вести направленный синтез веществ, проявляющих биологическую активность.

В этой главе проведено сравнение механизмов гидролитического действия четырех эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз из кристаллических стебельков морских моллюсков, которые к настоящему времени наиболее изучены среди этой группы ферментов: двух эндоферментов из *Spisula sachalinensis* (ЛIII, ЛIV), Л0 из *Chlamys albidus*, ЛV из *Patinopecten yessoensis* [21, 22, 68]. Вышеперечисленные три источника — распространенные (два последних — промысловые) виды моллюсков Японского моря, обладающие наиболее высокой ламинариназой активностью среди морских беспозвоночных этой акватории [22]. Конкретно по поводу ламинариназ морских беспозвоночных из других источников в литературе имеются лишь отдельные данные [59, 60, 64, 65]. В частности, из кристаллических стебельков морских моллюсков *Spisula solidissima* и *Telescopium telescopium* выделены ламинариназы эндотипа действия [59, 60].

Известно, что большинство изученных 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз (выделенных в основном из грибов и микроорганизмов) подобно амилазам и целлюлазам функционируют в организмах, образуя ламинариназные комплексы, полный состав которых включает эндо-, экзоферменты и гликозидазы. Так, например, подробно изучен ламинариназный комплекс наземной улитки *Eulota maakii*, в состав которого входят два эндофермента, экзоламинариназа ЛIII и гликозидазы [54].

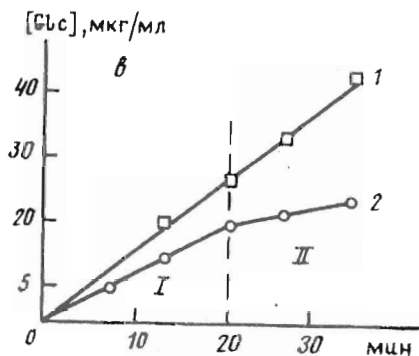
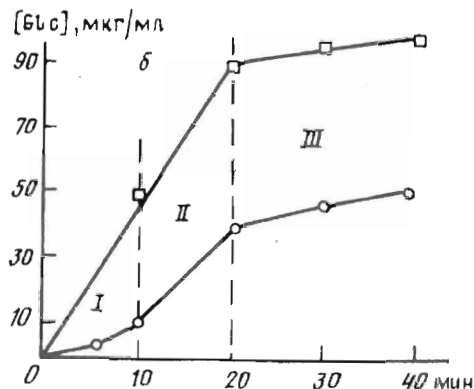
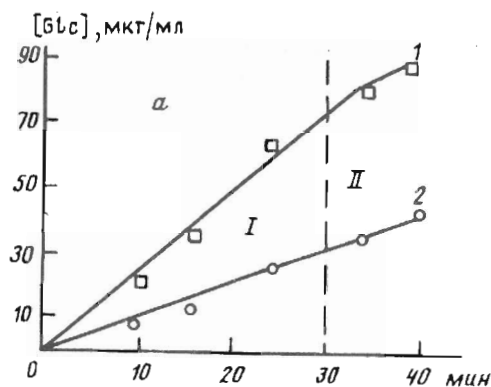


Рис. 3. Накопление восстанавливающих сахаров (1) и глюкозы (2) из ламинарина под действием Л1V (а), Л0 (б) и из олигосахаридов (н 13) под действием Л0 (в)

Интересно, что источники изучаемых 1→3-β-D-глюканаз — кристаллические стебельки морских моллюсков — образуют неполные ламинариназные комплексы: в них отсутствуют экзоламинариказы. Последнее было показано дополнительно еще в 12 видах двустворчатых моллюсков [23]. Отсутствие экзоламинариказ компенсируется особенностями действия эндо-1→3-β-D-глюканаз кристаллических стебельков: в продуктах гидролиза ими ламинарана содержится много глюкозы (40, 50 и 60% для Л0, Л1V и ЛП1 соответственно) [21, 52, 69—71].

Влияние глюкозы на процесс гидролиза субстратов и образование олигосахаридов наиболее подробно было изучено для Л1V и Л0 [69—72]. Оказалось, что глюкоза не ингибирует процесс гидролиза субстрата изучаемыми ферментами. Гидролиз ими окрашенного лишайника или карбоксиметилпахимана в среде, содержащей 30% глюкозы, протекал с такой же скоростью, что и в ее отсутствие [69]. Однако при этом было продемонстрировано образование достаточно прочных комплексов глюкозы с Л0 и Л1V. Разностной УФ-спектроскопией показано, что Л1V связывает одну молекулу глюкозы с константой диссоциации ( $K_d$ ), равной  $10^{-6}$  М, и еще четыре молекулы с  $K_d \cdot 10^{-5}$  М, Л0 связывает две молекулы глюкозы с  $K_d \cdot 10^{-5}$  М [70]. При этом величины  $K_m$  ( $K_d$  фермент-субстратного комплекса) составляют  $5 \cdot 10^{-5}$  М для Л1V и  $15 \cdot 10^{-5}$  М для Л0 [69]. Следовательно, субстрат и глюкоза связываются Л0 и Л1V одинаково хорошо, не конкурируя при этом друг с другом. Известно, что глюкоза — хороший акцептор для исследованных ферментов в реакциях трансгликозилирования [72]. По всей видимости, деградация субстрата успешно протекает в присутствии глюкозы потому, что глюкоза связывается акцепторным участком активного центра.

Факт отсутствия ингибирования процесса гидролиза продуктами реакции, в данном случае глюкозой, необычен. Так, для некоторых амилаз величины  $K_d$ , определенные методами белковой химии, обычно совпадают с величинами  $K_i$  (константа ингибирования соответствует  $K_i$  фермент-ингибиторного комплекса),

определенными в каталитическом процессе [70]. Более того, имеются примеры, когда на уровне чувствительности белковых методов отмечается отсутствие связывания глюкозы с ферментом, хотя ингибирование гидролиза происходит [70]. Отсутствие ингибирования глюкозой, характерное для эндо-1→3-β-D-глюканаз из морских моллюсков, резко отличает их от целлюлаз и амилаз.

Для ЛІV и ЛО были обнаружены интересные различия в кинетике образования глюкозы и восстанавливающих сахаров из ламинарана ( $n$  25) и ламинариолигосахаридов ( $n$  13) (рис. 3). Отношение количества образующихся из этих субстратов под действием ЛІV олигосахаридов к глюкозе с течением времени (линейный участок кривой) остается постоянным (~2,5) [71]. Этот факт отражает действие ЛІV по механизму множественной атаки [71, 72]. Напротив, для ЛО была получена сигмоидная кривая накопления глюкозы из ламинарана, т. е. кривая имеет отчетливо выраженный лаг-период до степени полимеризации продуктов, равной 7—10. Наличие линейного участка (II, на рис. 3 б) на кривой накопления глюкозы из ламинарана указывает на то, что олигосахариды с  $n \leq 10$  должны гидролизироваться под действием ЛО без лаг-периода. Это было показано с использованием в качестве субстрата олигосахаридов с  $n \sim 13$  (рис. 3). Очевидно, ЛО — в большей степени эндофермент, чем ЛІV [71]. Образование большого количества глюкозы в случае ЛО связано с предпочтительной атакой субстрата ферментом вблизи восстанавливающего конца [73].

Изучение влияния рН на кинетические параметры ( $K_m$  и  $V_{max}$ ) реакций, катализируемых ЛІІІ и ЛІV, выявило по две каталитически активные группы в их активных центрах (с рК 7,2 и 4,0 для ЛІІІ и 6,8 и 4,0 для ЛІV). Колоколообразный характер рН-зависимостей для ЛО также указывает на участие двух групп в гидролизе гликозидных связей [74]. Первая из них может быть имидазольной группой гистидина или карбоксильной группой дикарбоновой кислоты, вторая — карбоксильной группой дикарбоновой кислоты [24]. Интересным кажется необычное поведение группы с рК 4,0 для ЛІІІ. В отличие от аналогичной группы у ЛІV она не участвует в связывании субстрата [74].

Были предприняты попытки изучить влияние β-1→4- и β-1→6-связанных остатков глюкозы на процесс трансформации β-D-глюканов под действием эндо-1→3-β-D-глюканаз из морских моллюсков. Нужно отметить особое отношение ЛІІІ к смешанным 1→3; 1→4-β-D-глюканам: скорость гидролиза их под действием ЛІІІ приближается к скорости гидролиза ламинарана (для ЛІV и ЛО она в 10 раз меньше), глубже и степень гидролиза в присутствии ЛІІІ этих субстратов в сравнении с реакциями, катализируемыми ЛІV и ЛО [69]. В этом плане интересен факт отсутствия ингибирования целлобиозой образования глюкозы из ламинарана под действием ЛІІІ. Для ЛІV, напротив, ингибирование целлобиозой наблюдается, и  $K_i$  этой реакции равна  $1,5 \cdot 10^{-2}$  М [22];  $K_d$  комплекса целлобиозы с ЛІV, определенная флуоресцентным методом, равна  $10^{-2}$  М [70] и хорошо совпадает с  $K_i$ .

Отношение к олигосахаридам, имеющим в своем составе β-1→6-связанную глюкозу, примерно одинаково для всех исследуемых ферментов. Так, величины  $K_i$  для процесса образования глюкозы из ламинарана в присутствии генциобиозы (D-Glc-1→6-β-D-Glc) равна  $2 \cdot 10^{-2}$  М и для ЛІІІ, и для ЛІV [22].  $K_m$  ламинарибиозы и ламинаритриозы для ЛІV, ЛІІІ, ЛО приблизительно одинаковы и находятся в пределах  $2 \cdot 10^{-4}$ — $6 \cdot 10^{-4}$  М [69]. Смешанный тетрасахарид (Glcβ1→6Glcβ1→3Glcβ1→3Glc) ингибирует реакцию гидролиза ламинарана как ЛО, так и ЛІV с  $K_i$   $1,5 \cdot 10^{-3}$  М [52]. Если сделать допущение, что  $K_m$  и  $K_i$  приблизительно равны  $K_d$  фермент-субстратных или фермент-ингибиторных комплексов, то видно, что введение β-1→6-связанной глюкозы в ламинаритриозу уменьшает на порядок связывание олигосахаридов ферментами. Для эндо-1→3-β-D-глюканазы из *Rhizopus arrhizus* показано, что β-1→4-связанная глюкоза в 1→3-β-D-глюканах меньше влияет на гидролиз субстрата, чем β-1→6-связанная [15].

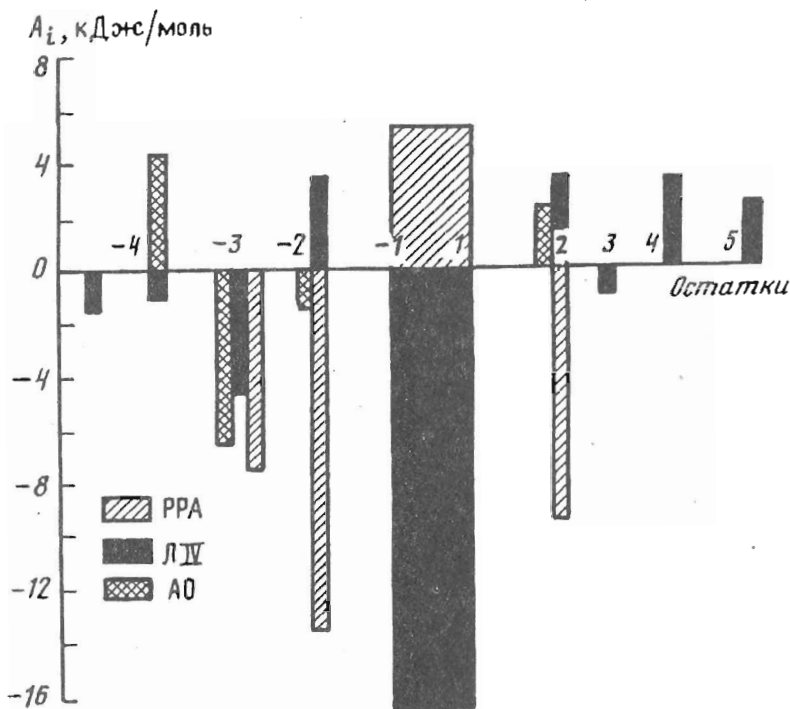
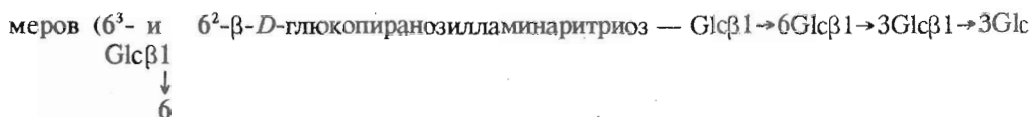


Рис. 4. Энергии связывания ( $A_i$ ) моносахаридных остатков субстрата участками активных центров PPA, LIV, ЛО. (Связывание происходит на участках, имеющих отрицательную энергию,  $A_1 + A_2$  для ЛО не определена)

Методом картирования выяснено, что эндоамилиназы ЛО, ЛПІ и LIV различаются величинами активных центров. Изучение действия ферментов на ламинариолигосахариды, ламинараны и смешанные 1→3; 1→4-β-D-глюканы (из лишайника, овса, ячменя) показало, что по количеству участков связывания в активных центрах ферменты можно расположить в ряд: ЛО>LIV>ЛПІ [69]. Составлены карты активных центров LIV и ЛО [75]. Для примера на рис. 4 приведены активные центры LIV, ЛО и α-амилазы из печени свиньи (PPA), последний типичен для α-амилаз. Этот фермент наиболее близок к ферментам из морских моллюсков по типу действия, включая высокую степень множественности атаки [19, 20, 76].

Активные центры исследуемых ферментов отличаются от активных центров α-амилаз и лизоцимов (рис. 4) невысоким сродством отдельных участков связывания к мономерным остаткам субстрата (кроме первого агликонового участка), а также наличием в них так называемых барьерных участков, в которых остаток глюкозы не связывается; за барьерными следуют нормальные участки. Барьерные участки в агликоновой части были обнаружены еще у нескольких ферментов, например у така-амилазы А и α-амилазы из *B. amyloliquefaciens* [76].

Существование барьерных участков № 2 в агликоновой части активных центров ЛО и LIV обеспечивает повышенную вероятность отщепления глюкозы с восстанавливающего конца субстрата. Различия в гликоновой части активных центров между ЛО и LIV находят отражение в различном составе продуктов ферментативного превращения ламинарана из *L. cichorioides* [52]. У ЛО происходит преимущественное накопление тримеров (ламинаритриозы и 6<sup>2</sup>-β-D-глюкопиранозилламинарибозы — Glcβ1→6Glcβ1→3Glc) и тетра-



и  $\text{Glc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Glc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Glc}$ ), а в случае ЛІV — только тримеров.

Таким образом, проведенные кинетические исследования позволили уловить существенные различия в механизмах действия на субстраты между тремя эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -*D*-глюканазами. ЛО — наиболее типичный эндофермент, в то время как действие ЛІV и ЛІІІ, обладающих всеми признаками эндоферментов, внешне напоминает действие экзоферментов. Так, например, доля глюкозы в продуктах гидролиза ими ламинарана с самого начала реакции велика и соответственно высока степень множественности атаки и т. д. Помимо этого ЛІІІ отличается способностью гидролизовать смешанные 1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 4- $\beta$ -*D*-глюканы. Возможно, потому, что этот фермент имеет самый маленький активный центр и не обладает сродством к целлобиозе (активный центр его настроен только на связывание ламинарибиозных фрагментов), его протондонорная группа участвует лишь в гидролизе  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-связи, не принимая участия в связывании субстрата. Из всех трех ферментов активный центр ЛІІІ обладает самым простым устройством, что расширяет границы специфичности этого фермента.

#### 4. Трансгликозилирование, осуществляемое эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -*D*-глюканазами из морских моллюсков

Отличительной чертой эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -*D*-глюканаз из морских моллюсков является повышенная способность по сравнению с другими карбогидразами (лизоцимами,  $\alpha$ -амилазами, целлюлазами и т. д.) катализировать реакцию трансгликозилирования [28, 29, 71, 77—80], т. е. перенос гликозильных остатков субстрата не только на воду (реакция гидролиза), но и на любое вещество, способное быть акцептором в реакции трансгликозилирования.

Нужно отметить особенность изучения трансгликозилирования, катализируемого исследуемыми ферментами. В основном оно изучалось с применением ламинарана — высокомолекулярного донора гликозильных остатков. В литературе же практически все данные по трансгликозилированию получены с применением олигосахаридов в качестве доноров [7, 8, 25, 26, 30]. Сведения о способности эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -*D*-глюканаз из других источников катализировать реакцию трансгликозилирования имеются лишь на уровне ее присутствия [57, 67] или отсутствия [16] у них.

В табл. 2 приведены вещества, которые были испытаны в качестве акцепторов гликозильных остатков субстрата. Видно, что наилучший акцептор среди моносахаридных остатков — глюкоза: до 25% радиоактивно меченой глюкозы включается в продукты трансгликозилирования. Модификации глюкозы по С-5 (ксилоза) или С-2 (*N*-ацетилглюкозамин) снижают эффективность реакции трансгликозилирования, модификации по С-4 (галактозид, 4-*O*-*Me*-глюкозид) вообще прекращают ее. Повышение гидрофобности заместителей при С-2 (2-*O*-*Me*-ксилозид) или С-5 (хинозид—*b*-дезоксид-*D*-глюкозид) улучшает акцепторные свойства моносахаридов в реакции трансгликозилирования [78].

Требования к агликоновой части акцептора изучены менее подробно. Метилирование гликозидного гидроксила несколько ухудшает связывание акцептора в агликоновой части активного центра [78]. Переход от глюкозы к *n*-нитрофенилгликозиду (*Np*-гликозиду) увеличивает количество включаемой в продукты трансгликозилирования метки приблизительно в 1,5 раза [79]. Под действием ферментов происходит гликозилирование гликозидов, содержащих и более сложные агликоны. Например, проведено гликозилирование гитоксигенин- $\beta$ -*D*-глюкозида — сердечного глюкозида наперстянки, гликозидов гидроксинафтохинонов, которые обладают выраженным противоопухолевым действием. Ферментативный

Акцепторная способность\* метилгликозидов в реакциях трансгликозилирования, катализируемых ЛШ, ЛІV и ЛО

Метилгликозиды	Трансгликозилирование		
	ЛШ	ЛІV	ЛО
Glc $\alpha$	++	++	++
Glc $\beta$	++	++	++
2MeGlc $\alpha$	+++	+++	+++
Qui $\alpha$	+++	+++	+++
GlcNAc $\alpha$	++	++	++
6MeGlcNAc $\alpha$	++	++	++
Xyl $\alpha$	++	++	++
Xyl $\beta$	++	++	++
2MeXyl $\beta$	++	++	++
3MeGlc $\alpha$	—	—	—
Gal $\alpha$	—	—	—
Fuc $\alpha$	—	—	—
Man $\alpha$	—	—	—
Lyx $\alpha$	—	—	—
4MeXyl $\beta$	—	—	—
Rha $\alpha$	—	—	—
Rha $\beta$	—	—	—
Ara $\alpha$	+	—	—
Ara $\beta$	—	—	—

\* Оценка с помощью ТСХ (предел чувствительности метода 3—5%). Включение метки до 50 (+++), 20—30 (++) , 5—10% (+). Конфигурация сахарных остатков — природная.

метод удлинения углеводной цепи часто лабильных биологически активных веществ позволяет в мягких условиях получить менее токсичные, более растворимые лекарственные препараты. В данном случае необходимо, чтобы соответствующий акцептор содержал остаток моносахарида, способный гликозилироваться (ксилозу, глюкозу, хиновозу или N-ацетилглюкозамин).

Эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканазы из морских моллюсков способны гликозилировать спирты: метанол, этанол или глицерин [73, 80]. Гликозилирование метанола протекает менее эффективно, чем глюкозы. В результате образуются как  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -метилгликозиды, а не только метил- $\beta$ -D-гликозид, как можно было бы ожидать для эндо- $\beta$ -D-глюканаза, т. е. ферменты не обладают в данном случае специфичностью. Глицерин [80] гликозилируется подобно метанолу так же неспецифично как по первичным, так и по вторичному гидроксилам.

Нужно отметить, что наряду с образованием продуктов трансгликозилирования происходит их гидролиз. Под действием исследуемых ферментов из продуктов трансгликозилирования может также отщепляться агликон акцептора. Гидролиз с выделением агликона в отсутствие субстрата — донора гликозильных остатков не происходит, как это и должно быть для эндоферментов: гидролизовать гликозиды с выделением агликона могут только гликозиды [54]. Однако не всегда агликоны способны отщепляться под действием эндоамириназа. В случае *n*-нитрофенил- $\alpha$ -D-глюкозида агликон от продуктов трансгликозилирования (выделения *n*-нитрофенола) в процессе реакции не отщепляется [79], в то время как *n*-нитрофенол из *Nr*- $\beta$ -D-глюкозида выделяется достаточно интенсивно [28, 29, 79]. Высво-

бождение *n*-нитрофенола происходит с лаг-периодом [29], что характерно для вторичного процесса.

Интересно, что под действием одного из ферментов (ЛО из *Ch. albidus*) в зависимости от структуры гликоновой или агликоновой части акцептора могут синтезироваться не только  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-гликозидная связь, но и другие типы гликозидных связей. Так, замещение гидроксила при С-2 привело к синтезу метил-2-О-метилцеллобиозида [78]. При использовании *Np*- $\beta$ -*D*-гликозида в качестве акцептора как  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-, так и  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-гликозидные связи синтезировались приблизительно в равных количествах [79].

Так как в результате реакции трансгликозилирования удлиняется углеводная цепь акцептора, под действием эндогликаназ можно ожидать образования более высокомолекулярного вещества, чем исходное. Факты получения высокомолекулярного  $\beta$ -*D*-глюкана в результате действия трансгликозилазы, а также хитиноподобного полисахарида при действии лизоцима на хитоолигосахариды описаны в литературе [81, 82]. Нужно отметить, что синтезированные этими карбогидразами полисахариды нерастворимы и выделение их из смеси продуктов не представляет труда.

При гидролизе ламинарана эндогликаназами также можно быть ожидать появления  $\beta$ -*D*-глюканов с молекулярной массой большей, чем у исходного субстрата. В поисках таких высокомолекулярных веществ из продуктов действия ЛО на ламинаран из *L. cichorioides* был выделен глюкан, названный трансламом, с молекулярной массой большей, чем у ламинарана. Выход продукта в оптимальных условиях составляет 20—25% от исходного ламинарана. Молекулярная масса глюкана оказалась равной 8000 ( $\bar{n}$  50) против 5000 у исходного ламинарана (см. табл. 1). Содержание  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-связей в новом глюкане составляет 25%, тогда как в исходном ламинаране — лишь 10%. В молекуле транслама отсутствует маннит. Дегградация по Смуту синтезированного  $\beta$ -*D*-глюкана приводит к распаду его молекул на более мелкие фрагменты. Такая фрагментация может происходить, если в цепь 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -*D*-глюкана включены  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-связи. Аналогичная обработка ламинарана не вызывает фрагментации его молекул (схема 2).

Распределение фрагментов, содержащих 1 $\rightarrow$ 6-связанные глюкозные остатки в трансламе, было изучено с помощью экзо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -*D*-глюканазы ЛIII из *Eulota maakii*. При действии ЛIII на новый глюкан картина образующихся продуктов оказалась достаточно сложной: помимо глюкозы и гентиобиозы в заметных количествах образовывался трисахарид и небольшие количества тетрасахарида. Нужно отметить, что из транслама под действием ЛIII возникает приблизительно в 2 раза большее количество всех этих продуктов, чем из исходного ламинарана. Было изучено распределение фрагментов, из которых они образуются, по цепи глюкана. Основная часть фрагментов, дающих ди-, три- и тетрасахариды в  $\beta$ -*D*-глюкане сосредоточена вблизи невосстанавливающего конца молекулы, далее эти фрагменты распределяются по молекуле равномерно. Больше всего в трансламе фрагментов, дающих при действии ЛIII триозу. Возможно, она образуется из тех участков цепи, где  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-гликозидная связь включена в линейную цепь молекулы. Из разветвлений, как известно [54], под действием ЛIII образуется генциобиоза (рис. 2).

Таким образом, транслам от исходного ламинарана отличают следующие свойства: 1) более высокая молекулярная масса, 2) отсутствие маннита на восстанавливающем конце молекулы, 3) высокое содержание 1 $\rightarrow$ 6-связей, 4) наличие внутрипочечных  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-связанных остатков глюкозы, 5) концентрирование  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-связанных остатков у невосстанавливающего конца молекулы глюкана (табл. 1). По всей видимости, под действием ЛО происходит перераспределение и, возможно, синтез  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-гликозидных связей. Возможность синтеза  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-гликозидных связей под действием ЛО следует также из факта образования  $\beta$ -*D*-глюкана со структурой, аналогичной трансламу, из практически чистого 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -*D*-глюкана из *L. gurfjanovae* (табл. 1).

## 5. Совместное протекание реакций гидролиза и трансгликозилирования под действием эндо-1→3-β-D-глюканаз из морских моллюсков

Обычно [3—7, 26—28, 77, 79] реакции гидролиза и трансгликозилирования изучались отдельно друг от друга, и к настоящему времени совершенно неясен вопрос: каким образом протекают реакции гидролиза и трансгликозилирования, одновременно катализируемые эндоглюканазами? На этот счет существуют лишь теории, которые в основе своей рассматривают два возможных варианта: либо реакции эти протекают параллельно, либо гидролиз происходит через трансгликозилирование (т. е. гидролиз возможен только при условии возникновения соединения с более высоким молекулярным весом, чем у исходного субстрата) [30, 83, 84]. Выбор между этими возможностями связан с экспериментальными трудностями, и самое большее, что удалось установить, — это выяснение удельного веса обеих реакций в определенных условиях. Так,  $k_T/k_G$  для лизоцима равно  $10^3$  [30], а для амилаз —  $10^2$  [7, 27] ( $k_T$  и  $k_G$  — константы скорости трансгликозилирования и гидролиза).

В работе [29] была предпринята попытка изучить детали совместного протекания реакций гидролиза и трансгликозилирования, катализируемых двумя эндоферментами, Л0 и ЛIV, с применением в качестве акцептора Np-β-D-глюкозида. Были определены удельные веса реакций гидролиза и трансгликозилирования, катализируемых этими ферментами. Оказалось, что величина  $\alpha$  ( $k_T/k_G$ ) составляет  $2 \cdot 10^4$  для обоих ферментов, т. е. для них трансгликозилирование в 20 000 раз предпочтительнее гидролиза (табл. 3). Показано, что удельный вес реакции трансгликозилирования уменьшается с уменьшением степени полимеризации субстрата для Л0, тогда как для ЛIV существует завидное постоянство в соотношении этих двух реакций при любой глубине деструкции субстрата [29]. При этом для Л0 отмечалось увеличение числа оборотов фермента в присутствии акцептора, тогда как для ЛIV число оборотов не менялось. Можно дать несколько объяснений такому различию. Например, можно предполагать, что для ЛIV стадией, определяющей скорость, является образование фермент-субстратного комплекса, тогда как для Л0 — присоединение молекулы акцептора. Были отмечены и другие различия между Л0 и ЛIV [29].

Дальнейшее изучение совместного протекания реакций гидролиза и трансгликозилирования под действием ЛIV было проведено с помощью ВЭЖХ с использованием рефрактометра, что позволило регистрировать все вещества, входящие в состав реакционной смеси. Этот метод позволил определить качественный и количественный состав низкомолекулярных фракций [78] продуктов гидролиза и трансгликозилирования. Для этой работы были выбраны три акцептора: метил-β-D-глюкопиранозид, вещество, наиболее близкое естественному акцептору — глюкозе, метил-α-D-хиновозид, один из лучших акцепторов, выбранный с помощью быстрого качественного метода тестирования — ТСХ (см. табл. 2), и дисахарид — 2-О-метилцеллобиозид. Дисахарид был взят для того, чтобы оценить участие второго глюкопиранозного остатка в сорбции вещества на акцепторном участке фермента. Так, для лизоцима было показано, что дисахариды являются лучшими акцепторами, чем моносахариды [33]. Эти данные хорошо согласуются с тем, что величина агликоновой части активного центра лизоцима оценивается в два участка связывания глюкопиранозных остатков (схема 1).

В результате были получены константы связывания ( $1/K_d$ ) метилгликозидов в процессе изучения реакции трансгликозилирования, катализируемой ЛIV, константы ингибирования ими реакции гидролиза ( $K_i$ ), а также  $\alpha = k_T/k_G$  ( $k_T$  и  $k_G$  — константы скорости реакций гидролиза и трансгликозилирования) (табл. 3) [78]. Видно, что выбранные вещества — на 3—4 порядка более эффективные акцепторы гликозильных остатков, чем вода. Можно отметить следующую закономерность: чем выше сродство фермента к акцептору (меньше  $K_d$ ), тем выше и способность вещества вступать в реакцию трансгликозилирования. Сродство



Кинетические параметры реакций трансгликозилирования и гидролиза, катализируемых ЛІV и ЛО [17, 48, 51]

Акцептор	Мол. масса акцептора	$K_d$ , мМ		$K_i$ , мМ		$\alpha \cdot 10^3$ *	
		ЛІV	ЛО	ЛІV	ЛО	ЛІV	ЛО
[ <sup>14</sup> C]Glc	180	—	—	—	—	10	
Glc $\beta$ 1-OMe	194	30		2		4	
Glc( $\beta$ 1-4)2MeGlc $\alpha$ 1-OMe	370	7				3	
Qui $\alpha$ 1-OMe	182	3		3,2		20	
Glc $\beta$ 1-ONp	301	5	5			23	22,0
Глицерин	92						0,05
Метанол	31					0,003	0,005

\*  $\alpha = k_T/k_r$ , где  $k_T$  и  $k_r$  — константа скорости реакций трансгликозилирования и гидролиза.

метил- $\alpha$ -D-хиновозида к акцепторному участку на порядок выше, чем метил- $\beta$ -D-глюкозида, что соответствует увеличению энергии связывания на 1,4 ккал/моль.

По современным представлениям в образовании продуктивных комплексов амилаз с субстратами значительную роль играют гидрофобные взаимодействия. Особенностью  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4-глюкозидной связи считается образование на поверхности амилозы непрерывной гидрофобной области [85]. Показано существование гидрофобной полосы на поверхности активного центра амилаз [86]. Возможно, увеличение энергии связывания акцептора с возрастанием его гидрофобных свойств [78], а также ингибирование наших ферментов амфифильными веществами типа халистанолсульфата [87] указывают на существование подобной полосы в активных центрах эндоамилиназы и соответственно предполагают существование гидрофобных областей на поверхности 1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6- $\beta$ -D-глюкоолиго- и полисахаридов. Это косвенно подтверждается их способностью связываться подобно малтоолигосахаридам с гидрофобными сорбентами [78] и амфифильными красителями.

Сильно различается действие исследованных веществ на образование низкомолекулярных продуктов гидролиза, протекающего совместно с трансгликозилированием. Дисахарид совершенно не влияет на такой процесс. Метилхиновозид и метилглюкозид ингибируют образование низкомолекулярных продуктов реакции гидролиза, и, хотя достигаемая этими веществами степень торможения примерно одинакова (около 70%), механизмы ингибирования совершенно различны. Метилхиновозид на начальных стадиях реакции трансформации ламинарана под действием ЛІV практически полностью подавляет образование глюкозы и ламинарибиозы. Ингибирующее действие метилглюкозида выражается в равномерном уменьшении скорости накопления всех регистрируемых низкомолекулярных продуктов гидролиза по сравнению с исходной реакцией [78].

Интересно сопоставить величины  $K_d$  и  $K_i$ , отражающие влияние акцепторов на совершенно разные процессы (трансгликозилирование и гидролиз соответственно), катализируемые ЛІV. Так, величина  $K_d$  метил- $\beta$ -D-глюкозида на порядок больше, чем величина  $K_i$  (табл. 3). Вероятнее всего, метил- $\beta$ -D-глюкозид связывается не только акцепторным участком активного центра фермента с  $K_d$   $3 \cdot 10^{-2}$  М. На ферменте есть еще один участок связывания этого моносахарида с большим сродством к нему ( $K_i$   $2 \cdot 10^{-3}$  М). Эти данные находятся в соответствии с результатами по связыванию глюкозы ЛІV [70], из которых следует, что глюкоза также имеет два участка связывания на ферменте.  $K_d$  и  $K_i$  метил- $\alpha$ -D-хиновозида практически сопоставимы. По всей видимости, этот моносахарид связывается с одним участком активного центра, имеющим к нему большое сродство. Отсюда,

возможно, и возникает такое различие в составе образующихся продуктов ферментативной реакции при использовании этих метилгликозидов в качестве акцепторов [78].

Изучение совместного протекания реакций гидролиза и трансгликозилирования было проведено для Л0 с использованием глицерина в качестве акцептора [80]. Для этой реакции величина  $\alpha$  оказалась равной 50, т. е. акцепторные свойства глицерина немного лучше, чем у воды, но намного хуже, чем у глюкозы, Np- и метилгликозидов (табл. 3). Тем не менее глицерин подобно Np- $\beta$ -D-глюкозиду увеличивает число оборотов Л0 и подобно метилхинозиду в случае с ЛIV изменяет картину распределения продуктов гидролиза, подавляя образование глюкозы и ламинарибиозы.

В настоящее время практически нет простых и удобных методов или сочетания методов, позволяющих изучать закономерности совместного протекания реакций гидролиза и трансгликозилирования. В какой-то мере универсальным в этом плане и перспективным является использование метода электрораспылительной масс-спектрометрии, в одной и той же пробе позволяющего одновременно регистрировать продукты, возникающие в процессе превращения субстрата, при условии, что они различаются молекулярными массами. Как было показано [53], в процессе масс-спектрометрического анализа не происходит фрагментации сахаров, которые регистрируются в виде аддуктов с ионами металлов. В первом приближении этот вид масс-спектрометрии можно рассматривать как углеводный анализатор, позволяющий разделять и регистрировать олигосахариды, различающиеся по молекулярным массам даже на 1 а. е. [53, 80, 73, 88]. Так, с его помощью были зарегистрированы продукты ферментативного переноса на метанол (рис. 1), этанол, глицерин, метилгентриобиозид, метилцеллобиозид и т. д. Получены кинетические параметры (см. табл. 3) этих процессов. Перенос на метанол был параллельно подтвержден ГЖХ ацетатов продуктов ферментативной реакции, а на глицерин — совокупностью различных методов углеводной химии [80]. Результаты разных методов хорошо совпадали друг с другом (табл. 3), но электрораспылительная масс-спектрометрия несомненно более предпочтительна, так как позволяет без всяких предварительных операций анализировать качественно и количественно пробы, содержащие смесь олигосахаридов, в течение 10—15 мин. Если вернуться к схеме 2, которая отражает микропроцессы, протекающие в активном центре при трансформации субстрата, то нетрудно при анализе масс-спектра продуктов гидролиза ламинарана, имеющего на восстанавливаемом конце природную метку — маннит (М), под действием ЛIV в присутствии метанола (Me) (рис. 1) соотнести все образовавшиеся олигосахариды с теми стадиями, в результате которых они получаются. Так, маннитсодержащие олигосахариды соответствуют  $P_{a.ч.}$  (продукту, возникающему из агликоновой части субстрата), метилгликозиды —  $P_T$ , ламинариолигосахариды —  $P_r$ .

Экспрессность метода, небольшие количества веществ для анализа, простота подготовки пробы, высокая разрешающая способность, универсальность регистрации веществ, возможность получения количественной информации делают его привлекательным для применения при изучении структуры углеводов и механизма действия карбогидраз.

### Заключение

Проведенное исследование эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз ЛIII, ЛIV и Л0 из морских моллюсков выявило ряд уникальных свойств и особенностей этих ферментов, которых не наблюдали у  $\alpha$ -амилаз, лизоцимов, целлюлаз.

Показано, что морские моллюски — источники исследуемых эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз продуцируют неполноценные ламинариназные комплексы: в них отсутствуют экзоламинариназы. Их отсутствие компенсируется особенностями механизма действия эндо-1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканаз из морских моллюсков: в продуктах

гидролиза субстратов под действием этих ферментов содержится большое количество глюкозы. Глюкоза не ингибирует процесс трансформации субстратов, хотя и эффективно связывается с ферментами. Изучение кинетики накопления глюкозы показало, что процесс ее образования различен для разных эндо-1→3-β-D-глюканаз: для ЛІV характерны все признаки образования глюкозы по механизму множественной атаки, для ЛО — вследствие предпочтительной атаки вблизи восстанавливающего конца молекул субстрата.

Для эндо-1→3-β-D-глюканаз из морских моллюсков характерна повышенная способность (от 10 до 100 раз) по сравнению с другими карбогидразами к реакциям трансгликозилирования. При этом закономерности совместного протекания реакций гидролиза и трансгликозилирования для различных эндо-1→3-β-D-глюканаз различаются, что должно быть связано с различиями в энергетике, количестве и последовательности переходных состояний, приводящих к образованию тех или иных продуктов. Эндоглюканаза ЛО способна катализировать синтез не только β-1→3-, но β-1→4- и β-1→6-глюкозидных связей, а также осуществлять ферментативный синтез 1→3-β-D-глюканов, обладающих биологической активностью, из биологически неактивных ламинанов. Возможно, особенности действия эндо-1→3-β-D-глюканаз объясняются необычным строением их активных центров, имеющих кроме соседнего с каталитическим участком участки с низкой энергией связывания и даже барьерные участки.

Такой спектр различий в механизмах действия эндо-1→3-β-D-глюканаз из морских моллюсков объективно может быть связан с многообразием структур и физико-химическим свойств их субстратов. Это многообразие продемонстрировано в обзоре на примере 1→3; 1→6-β-D-глюканов бурых водорослей.

Таким образом, проведенное обобщение результатов сравнительного изучения механизмов действия эндо-1→3-β-D-глюканаз из морских моллюсков позволило выделить как общие с другими карбогидразами черты, так и особенности, характерные только для этой группы ферментов или определяющие индивидуальность каждого фермента.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. 3-е изд. М.: Мир, 1982.
2. Reese E. T., Maquire A. H., Parrish F. V. // Can. J. Biochem. 1968. V. 46. P. 25—34.
3. Handbook of Amylases and Related Enzymes: their Sources, Isolation Methods, Properties and Application/Eds Yamamoto T. et al. Tokyo: Pergamon Press, 1988. 274P.
4. Рабинович М. Л., Черноглазов В. М., Клесов А. А. // Итоги науки и техники. Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1988. Т. 2. 215 с.
5. Chipman D. M., Sharon N. // Science. 1969. V. 165. P. 454—465.
6. Хорлин А. Я. Активные центры карбогидраз. Структура и функции активных центров ферментов. М.: Наука, 1974. С. 39—69.
7. Sinnott M. L. // Chem. Rev. 1990. V. 90. P. 1171—1202.
8. Barras D. M., Moore A. E., Stone B. A. // Cellulases and their Application/Ed. Gould R. F. Washington: Amer. Chem. Soc. 1969. Ser. 95. P. 105—118.
9. Элберсгейм П., Дарвил А. Г. // В мире науки. 1985. № 11. С. 16—23.
10. Судзуки Е. // Искра информации. 1987. № 34. С. 10—16.
11. Reagents for immunology // Nature. 1990. V. 346. P. 591.
12. Janusz M. I., Austen K. F., Czop J. K. // J. Immunology. 1986. V. 137. P. 3270—3276.
13. Cosio E. G., Frey T., Ebel J. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. P. 1115—1123.
14. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н. // Тез. докл. IV Всесоюз. симпоз. «Инженерная энзимология». Вильнюс, 1988. С. 13.
15. Clark D. R., Johnson J., Chung K. H., Kirkwood S. // Carbohydr. Res. 1978. V. 61. P. 457—477.
16. Moore A. E., Stone B. A. // Biochim. et biophys. acta. 1972. V. 258. P. 238—264.
17. Adachi Y., Ohno N., Oikawa S., Ohsawa M., Yadomae T. // Chem. Pharm. Bull. 1990. V. 38. P. 988—992.
18. Saito H., Yoshioka Y., Uchara N. // Carbohydr. Res. 1991. V. 217. P. 181—190.

19. Saito K., Nishijima M., Ohno N., Yadomae T., Miyazaki T.//Chem. Pharm. Bull. 1992. V. 40. P. 261—263.
20. Васюкова Н. И., Озерецковская О. Л., Леонтьева Г. В., Чаленко Г. И., Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Широкова Н. И.//Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 825—832.
21. Sova V.V., Elyakova L. A.//Biochim. et biophys. acta. 1972. V. 258. P. 219—227.
22. Елякова Л. А. Исследование карбогидраз морских беспозвоночных: Дис. ... д-ра хим. наук. Владивосток, 1978. 317 с.
23. Elyakova L. A., Shilova T. G.//Comp. Biochem. and Physiol. 1979. V. 64. № 3. P. 245—248.
24. Елякова Л. А., Сова В. В.//Вестн. ДВО РАН. 1992. № 3—4. С. 98—107.
25. Кравченко Н. А., Максимов В. И.//Изв. АН СССР. Сер. хим. 1964. № 3. С. 584.
26. Sharon N., Seifter S.//J. Biol. Chem. 1964. V. 239. P. 2398, 2399.
27. Matsuno R., Suganuma T., Fujimori H., Kondo H., Hiromi K.//J. Biochem. 1978. V. 83. P. 385—394.
28. Назарова Н. И., Елякова Л. А.//Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1189—1196.
29. Звягинцева Т. Н., Назарова Н. И., Елякова Л. А.//Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 10. С. 1342—1346.
30. Chipman D. M.//Biochemistry. 1971. V. 10. P. 1714—1722.
31. Robyt J. F., French D.//Arch. Biochem. and Biophys. 1967. V. 122. P. 8—16.
32. Robyt J. F., French D.//Arch. Biochem. and Biophys. 1970. V. 138. P. 662—670.
33. Pollock J. J., Sharon N.//Biochemistry. 1970. V. 9. № 20.
34. Borovsky D., Smith E. E., Whelan W. J.//Eur. J. Biochem. 1976. V. 62. № 2. P. 307—312.
35. Ryley J. F.//Chemical Zoology. Protozoa. N. Y.-L.: Acad. Press, 1967. V. 1. P. 55—92.
36. Шкляр Б. Х. Ферментативный лизис дрожжей. Минск: Наука и техника, 1977. 147 с.
37. Tanaka S., Aketagawa J., Takahashi S., Shibata Y.//Carbohydr. Res. 1991. V. 218. P. 167—174.
38. Оводов Ю. С., Оводова Р. Г., Лоенко Ю. Н.//Химия природн. соединений. 1983. № 6. С. 675—694.
39. Fukuoka F., Nakanishi M., Shibata S., Nishikawa Y., Takeda T., Tanaka M.//Gann. 1968. V. 59. P. 421—427.
40. Ballance G. M., Manners D. J.//Carbohydr. Res. 1978. V. 61. № 1. P. 107—118.
41. Bull A. T., Chester C. G. C.//Adv. Enzymol. 1966. V. 28. P. 325—364.
42. Percival E., McDowell R. H. Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. N. Y.-L.: Acad. Press, 1967. P. 53—71.
43. Percival E.//Algal Polysaccharides. The Carbohydrates. (Chemistry and Biochemistry). V. ПБ/Eds Pigman W., Horton D. N. Y.: Acad. Press, 1970. P. 541—544.
44. Painter T. J.//Pure and Appl. Chem. 1983. V. 55. № 4. P. 677—694.
45. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N.//Carbohydr. Res. 1974. V. 34. P. 241—248.
46. Nelson T. E., Lewis B. A.//Carbohydr. Res. 1974. V. 33. № 1. P. 64—74.
47. Звягинцева Т. Н. Изучение механизма действия  $\beta$ -1,3-глюканаза из *Spisula sachalinensis*: Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 1976. 139 с.
48. Usui T., Toriyama T., Mizuno T.//Agric. Biol. Chem. 1979. V. 43. № 3. P. 603—611.
49. Maeda M., Nisizawa K.//Carbohydr. Res. 1970. V. 7. P. 97—99.
50. Усов А. И., Чижов А. О.//Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 208—216.
51. Varum K. M., Kvan B. J., Myklestad S., Paulsen B. S.//Carbohydr. Res. 1986. V. 152. P. 243—248.
52. Shevchenko N. M., Zvyagintseva T. N., Elyakova L. A.//Carbohydr. Res. 1986. V. 148. P. 57—62.
53. Александров М. Л., Безукладников П. В., Грачев М. А., Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Кондратьев В. М., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Фридлянский Г. В.//Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1689—1692.
54. Широкова Н. И. Полиферментная система  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-глюканаза из моллюска *Eulota taakii*: свойства, специфичность и механизм действия отдельных компонентов: Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 1985. 206 с.
55. Yamamoto S., Kabayashi R., Nagasaki S.//Agric. Biol. Chem. 1974. V. 38. P. 1563—1573.
56. Marshall J. J.//Carbohydr. Res. 1973. V. 26. P. 274—287.
57. Manners D. J., Marshall J. J.//Phytochemistry. 1973. V. 12. P. 547—562.
58. Marshall J. J.//Carbohydr. Res. 1974. V. 34. P. 289—297.
59. Shallenberger R. S., Searles S., Lewis B. A.//Experientia. 1974. V. 30. P. 597—605.
60. Citter R. L., Yellowlees D.//Carbohydr. Res. 1979. V. 75. P. 221—229.
61. Cline K., Albersheim P.//Plant. Physiol. 1981. V. 68. P. 207—229.
62. Woodward J. R., Fincher G. B.//Eur. J. Biochem. 1982. V. 121. P. 661—669.

63. Woodward J. R., Fincher G. B.//Carbohydr. Res. 1982. V. 106. P. 111, 112.
64. Muchmore A. V., Epel D., Schimke R. T.//Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 26. P. 274—287.
65. Suzuki M., Takashi H., Kukuchi R., Ohnichi T.//Nippon Suisan Gakkaichi. 1987. V. 53. P. 311—317.
66. Сова В. В., Широкова Н. И., Назарова Н. И., Елякова Л. А.//Тез. докл. Всесоюз. совещ. «БАВ гидробионтов — новые лекарственные и технические препараты». Владивосток, 1991. С. 6.
67. Wong Y.-S., Cordon A.//Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 571. P. 244—269.
68. Сундукова Е. В., Елякова Л. А.//Тез. докл. Всесоюз. симпоз. «Химия белков». Тбилиси, 1990. С. 154.
69. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Привалова Н. М.//Биоорганич. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1553—1559.
70. Лакизова И. Ю. Сравнительное изучение эндо- $\beta$ -1,3-глюконаз морских моллюсков спектральными методами: Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 1986. 220 с.
71. Звягинцева Т. Н., Елякова Л. А.//Биоорганич. химия. 1981. Т. 7. № 5. С. 680—685.
72. Bezukladnikov P. W., Elyakova L. A.//Carbohydr. Res. 1990. V. 203. P. 119—127.
73. Безукладников П. В. Особенности катализа, осуществляемого эндо- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-глюконазами из морских моллюсков: Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 1989. 179 с.
74. Звягинцева Т. Н., Елякова Л. А.//Биоорганич. химия. 1975. Т. 1. № 10. С. 1470—1473.
75. Назарова Н. И., Мазур А. К., Елякова Л. А.//Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1478—1483.
76. Thoma J. A., Brother Ch., Spradlin J.//Biochemistry. 1970. V. 9. P. 1768—1775.
77. Bezukladnikov P. V., Elyakova L. A.//Carbohydr. Res. 1988. V. 184. P. 268—270.
78. Звягинцева Т. Н., Евтушенко Е. В., Елякова Л. А.//Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1206—1214.
79. Назарова Н. И., Елякова Л. А.//Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1215—1221.
80. Безукладников П. В., Елякова Л. А., Миргородская О. А.//Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1318—1325.
81. Максимов В. И., Каверзнева Е. Д., Кравченко Н. А.//Биохимия. 1965. Т. 30. Вып. 5. С. 1007—1014.
82. Tanaka T., Oi S.//Agric. Biol. Chem. 1984. V. 48. № 9. P. 2265—2269.
83. Максимов В. И.//Успехи соврем. биологии. 1980. Т. 89. № 1. С. 41—57.
84. Yochida H., Hiromi K., Ono S.//Biochemistry. 1969. V. 66. № 2. P. 183—189.
85. Tran V., Vuleon A., Imberty A., Perez S.//Biopolymers. 1989. V. 28. P. 679—690.
86. Петухов М. Г., Мазур А. К.//Молекулярн. биология. 1991. Т. 26. № 2. С. 292—299.
87. Звягинцева Т. Н., Макарьева Т. Н., Стоник В. А., Елякова Л. А.//Химия природ. соединений. 1986. № 1. С. 71—78.
88. Безукладников П. В., Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Миргородская О. А.//Химия природ. соединений. 1989. № 1. С. 54—59.

Поступила в редакцию  
2.II.1993

После доработки  
11.X.1993

*T. N. Zvyagintseva, L. A. Elyakova*

**MECHANISM OF ACTION AND SPECIFICITY OF  
ENDO-1→3-β-D-GLUCANASES FROM MARINE MOLLUSCS**

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

Comparative studies of the transferase and hydrolase action of endo-1→3-β-D-glucanases are reviewed. Ability of the enzymes to catalyze the transglucosylation reaction and, at the same time, to give glucose as the main product was discussed. Differences and similarities between the enzymes under study and other groups of carbohydrases were analysed. A variety of laminaran structures and structural features of biologically active β-D-glucans obtained from laminarans by enzymic synthesis are presented.