



УДК 577.152.321'6.14

© 1994 Л. А. Елякова, И. Ю. Бакунина, В. В. Исаков,
С. И. Стехова

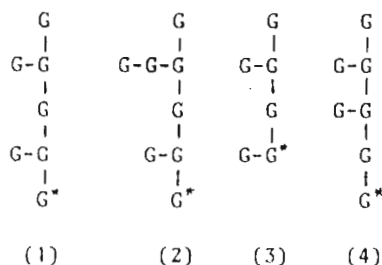
ОПТИМИЗАЦИЯ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА β-1,6;1,3-ГЛЮКООЛИГОСАХАРИДОВ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

Ключевые слова: эндо-β-1,3-глюканаза, β-1,6;1,3-глюкоолигосахариды.

Продолжено исследование реакции энзиматического синтеза β-1,6;1,3-глюкоолигосахаридов, осуществляемого эндо-β-1,3-глюканазами из морских моллюсков путем переноса β-1,3-связанных остатков глюкозы от донора — ламинарина на акцептор — генциотетраозу. Подобран удобный способ контроля за протеканием реакции — измерение показателя удельного оптического вращения реакционной смеси (постепенное уменьшение отрицательной абсолютной величины $[\alpha]_D$). При проверке в опытах по стимуляции иммунитета сои биологическая активность обнаружена у продуктов с $[\alpha]_D - 40^\circ$ и более. Показано, что для увеличения выхода таких соединений предпочтительно останавливать реакцию при величине $[\alpha]_D$ реакционной смеси, равной -10° . Предложена структура биологически активных веществ, подтвержденная данными ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и метилирования, отличающихся значительным количеством 1 → 3,6-глюкозных остатков.

Ранее нами был предложен способ катализируемого эндо-β-1,3-глюканазами из морских моллюсков синтеза β-1,6; 1,3-глюкоолигосахаридов [1] — аналогов «олигосахаринов», проявляющих элиситорную активность в стимуляции иммунитета сои [2]. Теоретической предпосылкой послужила синтетическая работа [3], где было показано сохранение биологической активности, проявляемой гептамером (1) для его аналогов, образующихся при удлинении β-1,3-связанной цепи (октасахарид (2)) или укорачивании β-1,6-цепи на одну мономерную глюкозную единицу (гексасахарид (3)), тогда как перестановка β-1,3-разветвлений в молекуле (1) приводила к падению биологической активности на три порядка, например у соединения (4).



G — остаток глюкозы; G* — восстанавливающий конец; горизонтальные и вертикальные черточки — β-1,3- и β-1,6-связи соответственно.

Величина I_{340} некоторых глюканов и глюкоолигосахаридов* (5 мг сахара)

Декстраны, α -1,6, коммерческие препараты		Ламинариолигосахариды, β -1,3, получены из пахимана		Генциоолигосахариды, β -1,6, получены из пустулана	
Марка	I_{340}	d. p.	I_{340}	d. p.	I_{340}
T-20	1 100	2	100	2 **	460
T-40	2 000	4	345	3	600
T-80	2 400	5	420	6	1200
T-110	4 200	6	460	14	4200
T-500	22 700	7	500		
		25	1000		

* Получены гидролизом соответствующих полисахаридов с последующим разделением фракций на биогеле Р-2 [5].

** Коммерческий препарат.

Таблица 2

Удельное вращение некоторых β -1,3; 1,6-глюкоолиго- и полисахаридов

Соединение, тип связи	d.p.	$[\alpha]_D$
Ламинариолигосахариды, β -1,3-	2	+20,4
	3	+2,4
	4	-5,9
	5	-10,5
Ламинарин	25—30	-12,0
Генциоолигосахариды, β -1,6-	2	-3,0
	3	-6,5
	4	-14,5
Пустулан	120	-46,0
6 ¹ - β -D-Глюкопиранозилламинарибиоза $\begin{matrix} \text{G} \\ \\ \text{G}-\text{G} \end{matrix}$	3	-6,0
6 ² - β -D-Глюкопиранозилламинарибиоза $\begin{matrix} \text{G} \\ \\ \text{G}-\text{G} \end{matrix}$	3	-4,2
6 ³ - β -Глюкопиранозилламинитриоза $\begin{matrix} \text{G} \\ \\ \text{G}-\text{G}-\text{G} \end{matrix}$	4	-0,3
α -D-Глюкоза	1	+106,0
β -D-Глюкоза	1	+22,0

Мы продолжили исследование реакции ферментативного синтеза, имея в виду оптимизацию условий реакции для увеличения выхода биологически активных продуктов. Для облегчения сравнения везде в качестве акцептора использовали те же генциоолигосахариды со степенью полимеризации (d.p.) ~ 4, которые мы использовали в работе [1], а в качестве донора брали ламинарин, полученный из *Laminaria cichorioides* горячей и холодной экстракцией. (Избранные нами в работе [1] в качестве доноров короткие ламинариолигосахариды были необходимы для первого доказательства прохождения процесса ферментативного синтеза с получением более высокомолекулярных продуктов, чем исходные.)

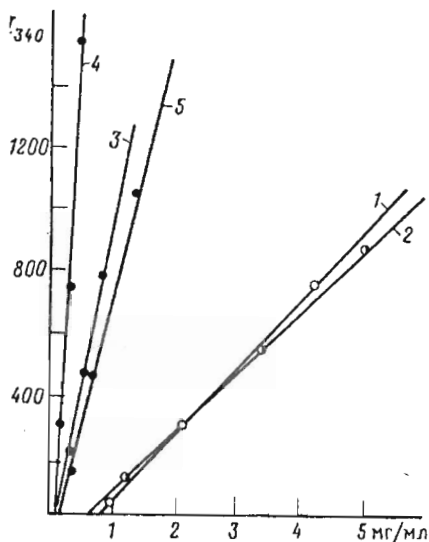


Рис. 1. Величины I_{340} для исходных веществ — донора (1) и акцептора (2) — и полученных продуктов реакции — мелких (d. p. 6—7) (3), средних (d. p. 8—10) (4) и крупных (5) (опыт А табл. 3)

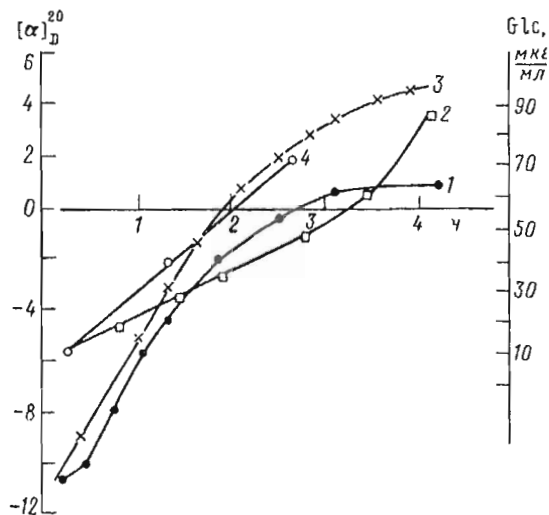


Рис. 2. Анализ хода реакций — энзиматической (1, 2) и контрольной (3, 4) — по измерению $[\alpha]_D$ (1, 3) и количества глюкозы (2, 4) (условия см. опыт 3, табл. 3; контроль — среда без генциотетразола — гидролиз ламинарина)

В поисках удобного и простого метода контроля за протеканием реакции мы обнаружили, что такой контроль может быть осуществлен по измерению интенсивности светорассеяния смеси с помощью спектрофлуориметра, причем измеряемым параметром является интенсивность линии рэлеевского рассеяния ртутной лампы при 340 нм (I_{340}).

Ранее для ряда декстранов (α -1,6-глюканов) японскими авторами [4], а для β -1,3- и β -1,6-глюканов нами [5] была установлена прямая корреляция между величиной I_{340} и молекулярной массой сахаров (табл. 1). Величины I_{340} новых олигосахаридов смешанного строения, полученных энзиматическим синтезом [1], значительно превосходили значения, указанные в табл. 1 для олигомеров такой же молекулярной массы, и составляли $> 10\ 000$ (при концентрации ≤ 5 мг/мл) (рис. 1).

Еще более простым способом характеристики полученных продуктов энзиматической реакции явился коэффициент удельного оптического вращения $[\alpha]_D$, причем наибольшей величине светорассеяния I_{340} соответствовала наибольшая абсолютная величина отрицательного удельного вращения (ср. данные табл. 1 и 2). Полученные нами для некоторых продуктов энзиматического синтеза коэффициенты удельного вращения (табл. 3) значительно превышали таковые для исходных олигосахаридов.

При наблюдении за ходом энзиматической реакции в кювете поляриметра (аликвота 1 мл, отобранная из реакционной смеси) обнаружили, что по сравнению с контролем (рис. 2, кривая 3, гидролиз ламинарина эндо- β -1,3-глюканазой) изменение $[\alpha]_D$ для той же смеси, но в присутствии генциоолигосахаридного акцептора идет замедленно (рис. 2, кривая 1). Приблизительно такой же эффект был отмечен и при наблюдении за ходом реакции глюкозооксидазным методом: количества выделяющейся глюкозы в реакции снижено на 25% по сравнению с контролем (рис. 2, кривые 2 и 4), как это и должно быть при введении дополнительного акцептора [6]. Мы провели ряд опытов, следя за энзиматическим процессом по изменению показателя удельного вращения реакционной смеси и останавливая реакцию на разных стадиях (табл. 3). После разделения (гель-фильтрацией на биогеле Р-2 [1]) продуктов на мелкие (d. p. 6—7), средние (d. p. 8—10)

Таблица 3

Условия энзиматических реакций и характеристика полученных продуктов

Условия реакции *	Опыт А	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3
Донор, мг	50	529	600	600
Акцептор, мг	70	623	600	600
Концентрация в реакционной смеси:				
углеводов, мг/мл	24	40	50	66
ферментов, ОЕ ₂₈₀	0,067	0,025	0,060	0,066
Время реакции, ч	2,5	6	4	6
Удельное вращение смеси ***	н.о.	-11	-12,9	-4,8
мелких продуктов	-34	-28	н.о.	-15
средних »	-48 **	-40 **	-29	-42 **
крупных »	-19	-29	-48 **	-20

* Акцептор — генциотетраоза, донор — в опытах А и З — ламинарин горячей экстракции; в опытах 1 и 2 — ламинарин холодной экстракции.

** Фракции с биологической активностью; н.о. — не определяли.

*** Измеряется в момент остановки реакции.

Таблица 4

Устойчивость проростков сои к поражению фитопатогенным грибом *P. ultimum*, индуцированная продуктами энзиматического синтеза

Опыт, продукты	Концентрация вещества, мкг/мл	Число растений в опыте	Погибло растений	Длина основного корня, мм (категория)		
				5—50 (I)	50—100 (II)	> 100 (III)
Опыт А, средние	500	15	—	6	4	5
	100	15	—	7	3	5
	10	15	—	10	3	2
Опыт 1, средние	100	10	4	1	—	5
	10	11	1	3	1	6
	1	11	3	2	1	6
Опыт 1, крупные	100	11	1	10	1	—
	10	11	1	1	1	—
Опыт 3, средние	10	11	2	5	—	4

Таблица 5

Выход продуктов реакции (по весу)

Номер опыта	Продукты, мг			Выход продуктов, %	
	мелкие	средние	крупные	суммарный	биологически активных
1	76	102	85	22,7	10
2	67	79	203	29,8	20

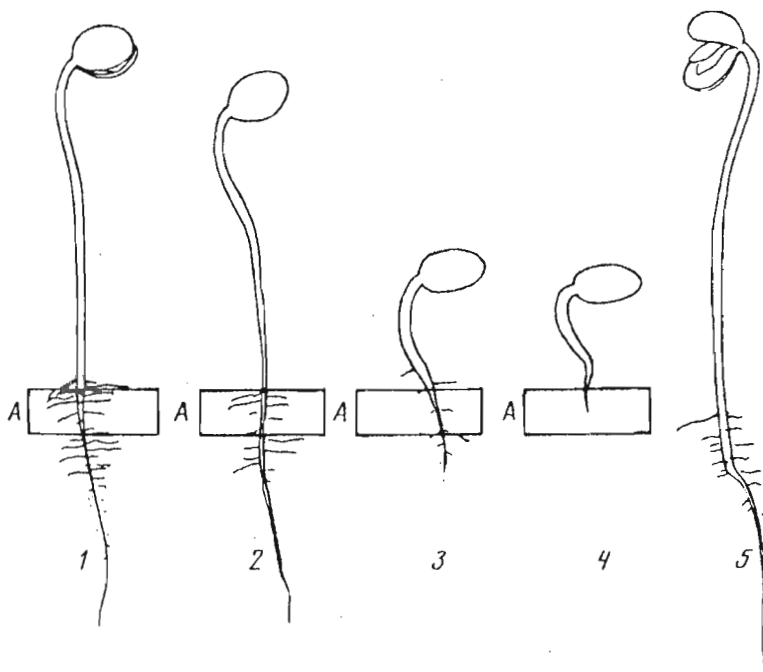


Рис. 3. Схема опытов по стимуляции иммунитета проростков сои. Действие биологически активного синтетического олигосахарида: сильная (1), средняя (2) и слабая (3) резистентность; контрольные проростки: семена инфицированы, но не обработаны олигосахаридом (4); здоровый проросток, семена не были инфицированы (5). А — агаровая пластинка с фитопатогеном

и крупные (выходят со свободным объемом) были определены их показатели удельного вращения (табл. 3).

Биологически активными в опытах по стимуляции иммунитета сои оказались фракции с наибольшей отрицательной абсолютной величиной $[\alpha]_D$ (табл. 3, 4). При заражении сои подбиралась такая концентрация фитопатогена *Pythium ultimum* на агаровой пластинке, при которой контрольные проростки погибали или развивались по 1-й категории, тогда как растения, обработанные нашими элиситорами, в разной степени (на 20—70%) противостояли заражению (рис. 3, табл. 4) при действующих концентрациях от 1 до 100 мкг/мл. Прочие фракции, с меньшими величинами $[\alpha]_D$, такого эффекта не давали.

Наилучший выход продуктов достигал 30%, из них биологически активных — 20% (табл. 5). При большей глубине реакции (опыты 1 и 3) больше получается продуктов средней величины, а в опыте 2, с более ранней остановкой реакции при $[\alpha]_D - 13^\circ$, — больше крупных продуктов. Из табл. 3 и 4 также видно, что при более глубоком прохождении реакции (оп. 1 и 3) биологически активными оказывались средние фракции, а в опыте 2 — крупные. Судя по этим данным, для оптимизации получения биологически активных продуктов кажется предпочтительным останавливать реакцию при небольших степенях превращения субстратов, по достижении в реакционной смеси $\sim [\alpha]_D - 10^\circ$.

Специальным опытом энзиматического синтеза с поэтапным отбором проб (при $[\alpha]_D - 12, -8, -4, 0^\circ$) было подтверждено, что первоначально в смеси содержится больше крупных продуктов, а в конце реакции — больше мелких продуктов. Таким образом подтвержден установленный нами ранее путь реакции с переносом вначале на акцептор достаточно длинных β -1,3-связанных цепей с последующим их укорачиванием в результате вторичного гидролиза [7].

Характеристика всех полученных фракций ^1H -спектроскопией [1] позволяет сделать вывод об увеличении количества β -1,3-связанных глюкозных остатков

Состав гликозидных связей продуктов энзиматического гидролиза

Фракция, опыт	Остатки глюкозы				Соотношение β -связанных остатков			d.p. **	Предполагаемая структура
	t		3,6		1,3/1,6		3,6/1,6 (%)		
	I*	II	6	3,6	1,3/1,6	1,3/3,6			
Средние продукты, опыт 1 (БА)	I* 22,9 II	49,4	13,5	13,2	2,3 2,5	49	3,7	11,4 9,0	G G-G-G-G G ; G-G-G G G-G-G-G
Крупные продукты, опыт 2 (БА)	I 15,7 II	63,4	7,6	12,6	3,7 4,7	62	5,03	16,5 19	G-G-G-G-G-G-G-G G ; G-G-G-G-G-G-G-G G-G-G-G-G-G-G-G G-G-G-G-G-G-G-G G
Мелкие продукты, опыт 1	I 18,7 II	30,9	36,6	13,1	0,88 1	26	2,35	6,4 7	G G-G-G-G G ; G-G-G-G G-G-G-G G
Исходный ламинин	I 9,8 II	83	—	7,0		100	11,8 9,4		G G-G-G-G G ; G-G-G-G G

* Данные метилирования (I) и ¹H-ЯМР-спектроскопии (II); БА — биологически активные.

** Степень полимеризации продукта, рассчитанная из соотношения 1,3- и 1,6-связей на исходную генциотетразу.

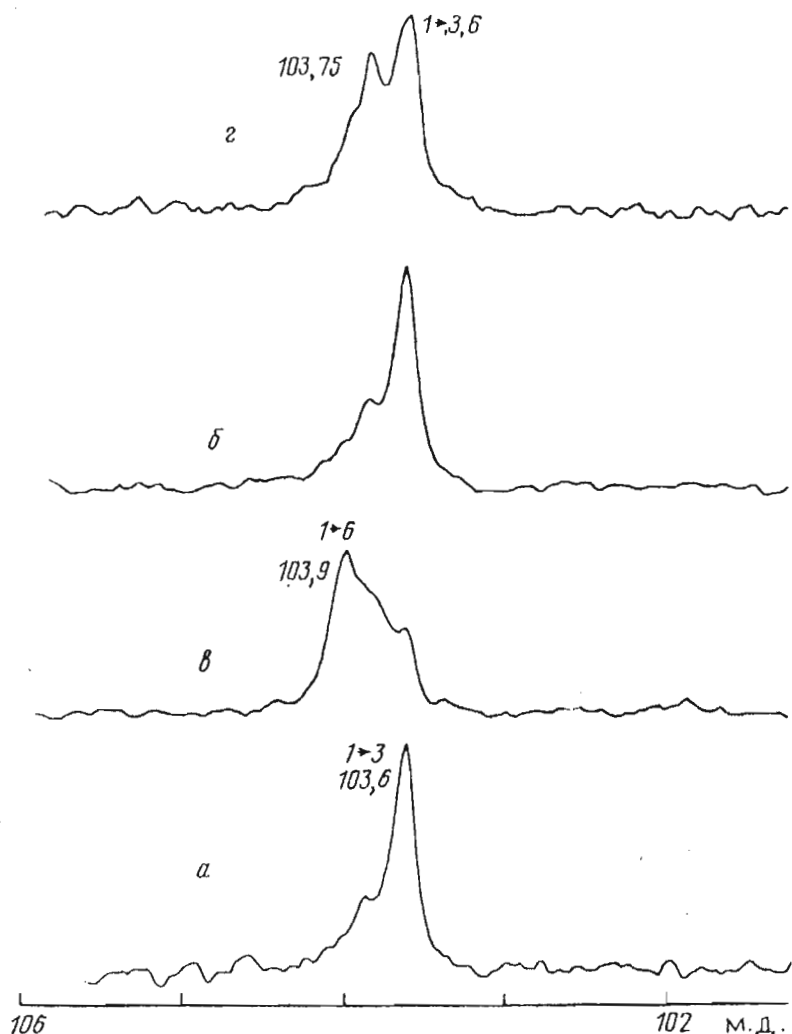


Рис. 5. Область резонанса С1-атомов в ^{13}C -ЯМР-спектрах: а, б, г — обозначения как на рис. 4; в — мелкие продукты, опыт 2

относительно генциоолигомеров (от 1:1 для мелких до 2:1 для средних и 3—5:1 для крупных продуктов, табл. 6).

Детальный анализ ^{13}C -ЯМР-спектров выявил характеристические сигналы С5-атомов остатков глюкозы, соединенных 1 → 6- или 1 → 3,6-связями, при 76,0 и 75,7 м. д. Их соотношение менялось в пользу вклада 3,6-связанных остатков глюкозы у биологически активных продуктов (рис. 4). Дополнительно при рассмотрении области резонанса аномерных С1-атомов в ^{13}C -ЯМР-спектрах продуктов наблюдали различные сигналы для 1 → 3-, 1 → 3,6- и 1 → 6-связанных (103,6; 103,75; 103,9 м. д. соответственно) остатков глюкозы (рис. 5). Таким образом, по вкладу 1 → 3,6-связанных остатков глюкозы (так же как и по сильному отрицательному вращению) можно отобрать фракции с биологической активностью.

Данные метилирования и ЯМР для фракций совпадают (табл. 6) и позволяют представить предполагаемые структуры новых β-1,6; 1,3-гликоолигосахаридов. Можно только предполагать, что наиболее сильное отрицательное удельное вра-

щение и биологическую активность имеют продукты, содержащие два раздвинутых по генциоолигосахаридной цепи β -1,3-разветвления (как в структуре (1)), так как именно такое строение «кодирует» биологическую активность [2, 3].

Экспериментальная часть

Фермент. Эндо- β -1,3-глюканазу L_0 , гомогенную по данным диск-электрофореза, выделяли из кристаллического стебелька моллюска *Chlamys albidus* [8].

Донор. Ламинарин (1,3- β -D-глюкан) из морской водоросли *Laminaria cichorioides* получен по методу [9].

Акцептор. Генциоолигосахариды с $d.p. \sim 4$ (см. [1]) получены гидролизом β -1,6-глюкана — пустилуна из лишайника *Umbilicaria rossica* эндо- β -1,6-глюканазой из морского моллюска [10].

Реакцию ферментативного синтеза проводили как описано в работе [1], варьируя время ее протекания и разделяя полученные продукты гель-фильтрацией на биогеле Р-2 [1].

Интенсивность линии рэлеевского рассеяния ртутной лампы измеряли для образцов глюкоолигосахаридов в концентрации 5 мг/мл на спектрофлуориметре Hitachi (Япония). Длины волн возбуждения и эмиссии были фиксированы при 340 нм.

Удельное вращение определяли на автоматическом поляриметре Perkin—Elmer M141 в воде.

Метилирование выполняли по методу [11] и анализировали продукты с помощью ГЖХ на капиллярной колонке Supelcowax 10 (0,25 мм \times 25 м) при 200° С в виде ацетатов полиолов, проводя идентификацию веществ хромато-масс-спектрометрией [12] на приборе LKB 9000-S (фаза 3% SE-30).

^{13}C -ЯМР-спектры продуктов реакции сняты на приборе НХ-90Е Bruker в D_2O ; внутренним стандартом служит CH_3OH (49,6 м. д. относительно тетраметилсилана).

Исследование биологической активности проводили на сое сорта ВНИИС-1. Семена дезинфицировали промывкой этанолом, отмывали водой и замачивали (15 мин) в растворах испытываемых веществ разной концентрации. Для инфицирования использовали культуру патогенного гриба *Pythium ultimum* Fr., выращенную на картофельно-глюкозной агаризованной среде. Для проращивания применяли рулоны из фильтровальной бумаги, в которой размещали семена и полоски агаризованной культуры фитопатогена. Контролем служили семена, не подвергшиеся заражению, а также инфицированные семена без обработки β -глюкоолигосахаридами. Устойчивость к патогену была оценена на 6-е сут по длине основного корня: I — слабая (5—50 мм); II — средняя (50—100 мм); III — сильная (100—200 мм и больше). Дополнительно как положительный эффект визуально отмечали здоровый (непятнистый) вид семядолей и более раннее отхождение оболочки семян.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Елякова Л. А., Исаков В. В. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 6. С. 860—863.
2. Sharp I. K., McNeil M., Albersheim P. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 18. P. 11321—11336.
3. Hahn M. G., Cheong J. J., Birberg W., Fudeli P., Pilotti A., Garegg P., Hong N., Nakahara Y., Ogawa T. // Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interaction/Ed. B. I. I. Lugtenberg, NATO ASI Series, V. H36. Berlin — Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. P. 91—97.
4. Kobayashi M., Utsugi H., Matsuda K. // Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. № 8. P. 2073—2079.
5. Бакунин И. Ю., Широкова Н. И., Ким Н. Ю., Елякова Л. А. // VII конф. по спектроскопии биополимеров, Харьков. Тез. докл. 1991. С. 21, 22.
6. Безукладников П. В., Елякова Л. А., Миргородская О. А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1318—1325.
7. Назарова Н. И., Елякова Л. А. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1189—1196.

8. *Privalova N. M., Elyakova L. A.*//Comp. Biochem. and Physiol. 1978. V. 60B. № 1. P. 225—228.
9. *Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N.*//Carbohydr. Res. 1974. V. 34. № 2. P. 241—248.
10. *Rudakova V. Ya., Shevchenko N. M., Elyakova L. A.*//Comp. Biochem. and Physiol. 1985. V. 81B. P. 677—682.
11. *Hakomori S.*//J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. № 1. P. 205—208.
12. *Bjorndal H., Hellerquist C. G., Lindberg B., Svensson S.*//Angew. Chem. 1970. B. 9. № 5. S. 610—619.

Поступила в редакцию
4.VI.1993

L. A. Elyakova, I. Yu. Bakunina, V. V. Isakov, S. I. Stekhova

THE OPTIMIZATION OF THE ENZYMIC SYNTHESIS
OF β -1,3;1,6-GLUCOOLIGOSACCHARIDES AND THEIR
BIOLOGICAL ACTIVITY

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

A study of the enzymic synthesis of β -1,3; 1,6-glucooligosaccharides by means of transfer of β -1,3-linked glucose residues from a donor, laminarine, to an acceptor, gentiotetraose, carried out by endo- β -1,3-glucanase from sea molluscs was continued. Measuring optical rotation of the reaction mixture was selected as a convenient method for monitoring the reaction. The biological activity (stimulation of soybean immunity) was found in the fractions with $[\alpha]_D$ value below -40° . It was shown that to increase the yield of these active substances, the reaction should be stopped at the $[\alpha]_D$ value about -10° . NMR spectroscopy and methylation analysis were used to corroborate the chemical structure of the biologically active substances. Both methods have shown an increase of the amount of 1 \rightarrow 3,6-glucose residues with regard to gentiooligomers.