



УДК 577.152.321*6.02

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ ЛАМИНАРАНОВ В 1→3;1→6-β-D-ГЛЮКАНЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ

© 1995 г. Т. Н. Звягинцева*, Л. А. Елякова, В. В. Исаков

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159

Поступила в редакцию 21.10.93 г. После доработки 20.06.94 г.

Из продуктов трансформации ламинарана из *Laminaria cichorioides* под действием эндо-1→3-β-D-глюканазы Л0 из *Chlamys albidus* был выделен новый 1→3;1→6-β-D-глюкан – иммуностимулятор, названный трансламом, структура которого отлична от структуры исходного ламинарана. Он имеет более высокую молекулярную массу, содержит в 2.5 раза большее количество 1→6-связанных остатков глюкозы, сосредоточенных преимущественно на невосстанавливаемом конце молекулы. Помимо разветвлений 1→6-связанные остатки D-глюкозы включены также в основную цепь 1→3-β-D-глюкана. Образование транслама можно объяснить обнаруженной у эндо-1→3-β-D-глюканазы Л0 способностью катализировать в процессе трансгликозилирования синтез не только β-1→3-, но и β-1→6-глюкозидных связей.

Ключевые слова: 1→3;1→6-β-D-глюканы, иммуностимуляторы, ферментативный синтез, трансгликозилирование, ламинараны, эндо-1→3-β-D-глюканазы.

Актуальность изучения β-D-глюканаз, а также 1→3-β-D-глюканов (субстратов β-D-глюканаз) связана с непосредственным участием этих веществ в системах иммунитета как животных, так и растений [1 - 7]. Так, клеточные стенки грибов, в том числе и патогенных, содержат 1→3;1→6-β-D-глюканы. При контакте гриба с живым организмом происходит разрушение клеточных стенок гриба 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 [1 - 5]. В качестве примера использования положительных свойств β-D-глюканов можно привести шизофиллан и лентинан – грибные 1→3;1→6-β-D-глюканы, а также 1→3;1→6-β-D-глюкан из пивных дрожжей, которые применяются в клиниках Японии и США как иммуностимуляторы [4, 5].

Биологическая активность β-D-глюканов, очевидно, связана с особенностями их первичной и пространственной структур. Анализ литературных данных показывает, что для 1→3;1→6-β-D-глюканов, обладающих противоопухолевой активностью, характерны относительно высокая молекулярная масса ($M \geq 16$ кДа) [2] и некоторое ко-

личество 1→6-связанных остатков D-глюкозы, содержащихся в виде ответвлений от основной цепи [1, 4, 5]. Часто эти полисахариды (например, лентинан и шизофиллан) имеют регулярную структуру. Сосредоточение β-1→6-связанных остатков D-глюкозы на невосстанавливаемом конце [6] или включение их в цепь 1→3-β-D-глюкана [7] также не препятствует проявлению противоопухолевой активности. Обязательно наличие пространственной структуры в виде одиночной или тройной спирали [8].

Ранее было показано, что эндо-1→3-β-D-глюканазы ЛIV и Л0 из морских моллюсков *Spisula sachalinensis* и *Chlamys albidus* отличаются повышенной в сравнении с другими карбогидразами способностью к реакциям трансгликозилирования [9 - 11]. Так как результатом реакции трансгликозилирования является удлинение углеводной цепи акцептора, при действии эндоглюканаз на ламинараны можно ожидать образования более высокомолекулярных веществ, чем исходные. Цель данной работы – применение ферментов с изученным механизмом действия для направленного преобразования неактивных ламинаранов в более высокомолекулярные биологически активные β-D-глюканы.

Факты образования хитиноподобного полисахарида при действии лизоцима на хитоолигосахариды, а также высокомолекулярного β-D-глюкана в результате действия трансгликозилазы на

* Автор для переписки.

целлопентаозу описаны в литературе [12, 13]. Нужно отметить, что синтезированные этими карбогидразами полисахариды нерастворимы в воде; таким образом, их образование можно наблюдать визуально и выделить их из смеси продуктов нетрудно.

В качестве акцепторов в реакциях трансгликозилирования, естественно, могут выступать продукты, образующиеся в процессе гидролиза ламинарана (глюкоза и глюкоолигосахариды), а также исходный ламинаран. Следовательно, при гидролизе ламинарана эндоглюканазами также можно было ожидать появления β -D-глюканов с молекулярной массой большей, чем у исходного субстрата. Чтобы найти такие высокомолекулярные вещества в продуктах действия эндо-1 \rightarrow 3- β -D-глюканаз ЛІV из *S. sachalinensis* и ЛО из *C. albidus* на ламинаран из *Laminaria cichorioides*, было изучено молекулярно-весовое распределение этих продуктов с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-50. В результате в продуктах трансформации ламинарана под действием ЛО в условиях высокой концентрации субстрата была обнаружена и выделена фракция β -D-глюканов, более высокомолекулярных, чем исходный ламинаран, названный трансламом. Исследование биологической активности транслама показало, что он обладает иммуномодулирующими свойствами в отличие от исходного ламинарана [14]. Выход транслама в оптимальных условиях составляет 20 - 25% от исходного ламинарана (табл. 1).

Ламинаран из бурой водоросли *L. cichorioides* ($M_w = 5$ кДа) является смешанным 1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6- β -D-глюканом, содержащим около 10% β -1 \rightarrow 6-связанных остатков D-глюкозы в виде единичных ответвлений от основной цепи 1 \rightarrow 3- β -D-глюкана. Восстанавливающие концы молекул ламинарана приблизительно на 60 - 80% блокированы маннитом [15]. Структуру и механизм образования нового 1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6- β -D-глюкана, полученного фермен-

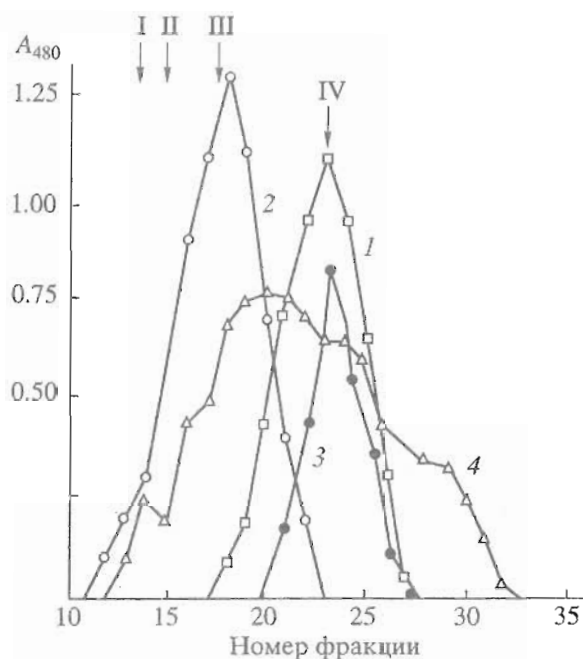


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефадексе G-50 ламинарана из *L. cichorioides* (1), транслама (2) и продуктов деградации по Смитту ламинарана (3) и транслама (4); \downarrow - выход декстранов с M_w 40 (I), 20 (II), 10 кДа (III) и инулина с M_w 5 кДа (IV).

тативной трансформацией ламинарана, устанавливали, анализируя данные гель-фильтрации, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, метилирования, деградации по Смитту и действия на него экзо-1 \rightarrow 3- β -D-глюканазы ЛІІІ из *Eulota maakii* [16].

Молекулярная масса транслама, определенная гель-фильтрацией (M_w), составила приблизительно 8 кДа (n 50) против 5 у исходного ламинарана (рис. 1); определенная концевым анализом степень его полимеризации ($n \sim 50$) и молекулярная масса (M_n) хорошо соответствуют M_w (табл. 1). В молекуле транслама отсутствует маннит (рис. 2,

Таблица 1. Молекулярно-весовое распределение продуктов ферментативной трансформации различных ламинаранов на сефадексе G-50 (% от исходного субстрата) и характеристика фракций*

Интервал M_w (кДа) фракций	<i>L. cichorioides</i> (M_w 5 кДа)			<i>L. gurjanovae</i> (M_w 4.5 кДа)			<i>F. evanescens</i> (M_w 5 кДа)		
	выход, %	1.3 : 1.6	n	выход, %	1.3 : 1.6	n	выход, %	1.3 : 1.6	n
<2	20	90 : 10	н. о.	30	95 : 5	н. о.**	10	н. о.	4
2 - 4	5	85 : 15	н. о.	10	95 : 5	н. о.	30	70 : 30	16
4 - 6	30	80 : 20	н. о.	40	90 : 10	н. о.	60	60 : 40	32
6 - 8	25	80 : 20	н. о.	10	80 : 20	н. о.	—***	—	—
8 - 12	20	75 : 25	50 - 70	10	75 : 25	50 - 70	—	—	—

* Соотношение 1 \rightarrow 3- и 1 \rightarrow 6- β -D-глюкозидных связей определяли из ^{13}C -ЯМР-спектров, степень полимеризации фракций (n) - концевым анализом (из соотношения количеств общих и восстанавливающих сахаров, полученных методами фенол-серникоксидным и Нельсона соответственно).

** Не определяли (н. о.).

*** Фракция отсутствует.

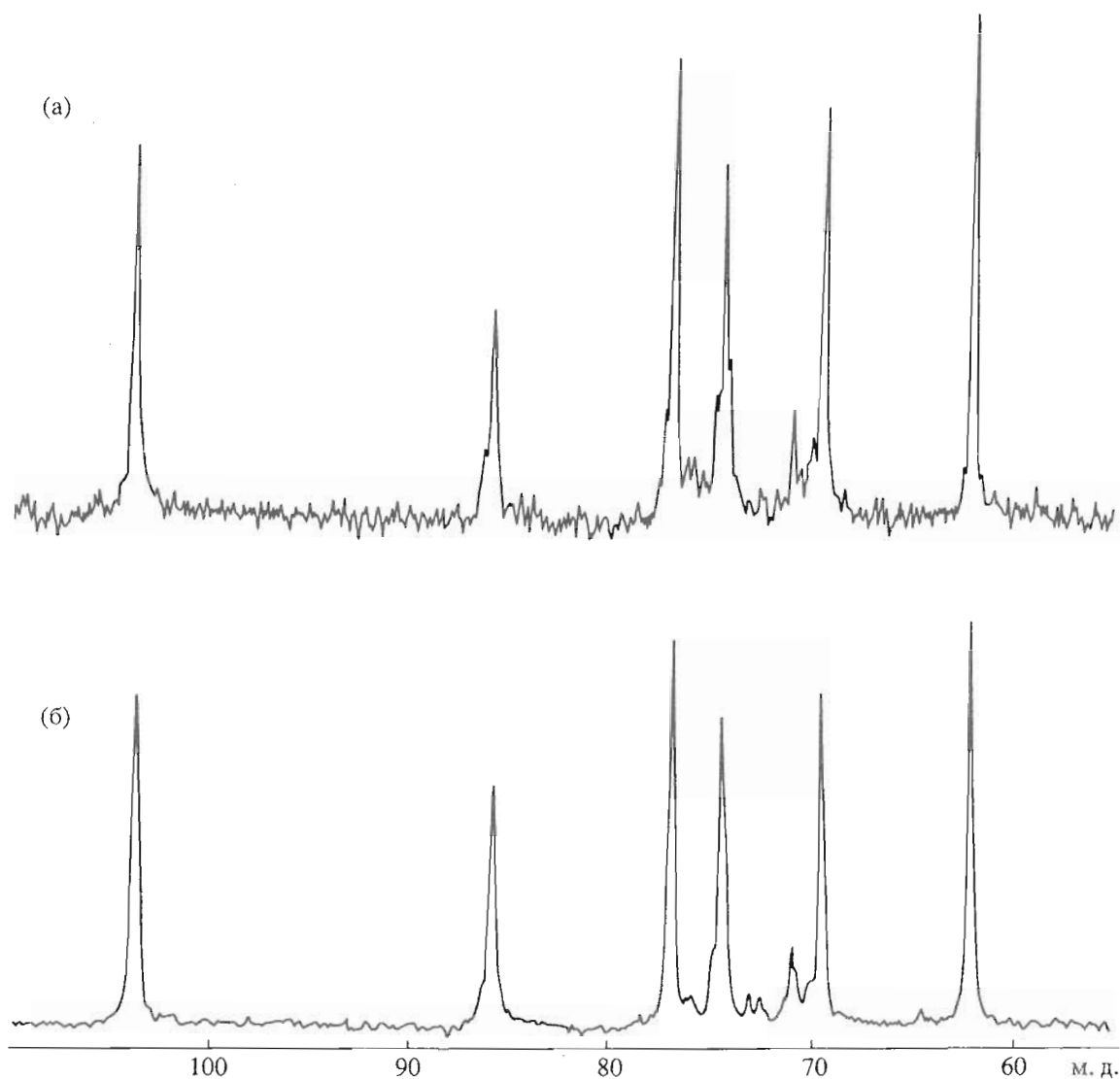


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектры транслама (а) и ламинарана (б).

табл. 2). Содержание β -1 \rightarrow 6-связей в новом глюконе равно 25%, тогда как в ламинаране – 10%. Это следует из анализа ^{13}C -ЯМР-спектров и данных метилирования (рис. 2, табл. 2, 3).

Соотношение количества β -1 \rightarrow 3- и β -1 \rightarrow 6-связанных остатков глюкозы определяли из значений интегральных интенсивностей сигналов с хим. сдвигами 61.9 и 69.9, 70.8 и 68.9 или 103 и 85 - 86 м. д. [17]. Присутствие в молекулах транслама различных типов β -1 \rightarrow 6-связанных остатков *D*-глюкозы следует из наличия в его ^{13}C -ЯМР-спектрах двух сигналов примерно одинаковой интенсивности (75.7 и 76.0 м. д.), принадлежащих С5-атомам β -1 \rightarrow 6-связанных остатков *D*-глюкозы [17] (рис. 2, табл. 2). В спектрах ^{13}C -ЯМР ламинарана имеется практически лишь один сигнал β -1 \rightarrow 6-связанного остатка *D*-глюкозы с химическим сдвигом 75.7 м. д. Этот сигнал,

по всей видимости, принадлежит 3,6-связанным остаткам *D*-глюкозы (точка ветвления), тогда как сигнал с химическим сдвигом 76.0 м. д. – β -1 \rightarrow 6-связанным, включенным в цепь остаткам глюкозы (рис. 2).

Присутствие и количество 1,3,6- и β -1 \rightarrow 6-связанных остатков *D*-глюкозы в молекуле транслама было определено также с помощью метилирования (табл. 3) и составило 12 и 8%, что хорошо соответствует данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии.

Деградация по Смитсу синтезированного β -*D*-глюкана в условиях [15] приводит к распаду его молекул на более мелкие фрагменты (рис. 1). Такая фрагментация может происходить, если в цепь 1 \rightarrow 3- β -*D*-глюкана включены β -1 \rightarrow 6-связи. Аналогичная обработка ламинарана не вызывает фрагментации его молекул: происходит лишь снятие 1 \rightarrow 6-разветвлений без заметного изменения

молекулярной массы. Таким образом, в молекуле транслама помимо 1,3-, 1,3,6-связанных остатков *D*-глюкозы присутствуют β-1→6-связанные внутрицепочечные остатки глюкозы в количестве, сопоставимом с 1,3,6-связанными (рис. 1, 2, табл. 2, 3).

Распределение фрагментов, содержащих 1→6-связанные остатки глюкозы в трансламе, было изучено с помощью экзо-1→3-β-*D*-глюканазы ЛІІІ из *E. taakii* [16]. Специфичность этого фермента такова, что он, начиная гидролиз β-1→3-связей с невозстанавливающего конца молекулы субстрата, обходит 1→6-связанные остатки глюкозы, образуя в качестве продуктов реакции глюкозу и из разветвлений дисахарид – генциобиозу. 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, распределение 1→6-разветвлений по цепи должно быть равномерным; если оно уменьшается в процессе реакции, основная часть разветвлений сосредоточена на невозстанавливаемом конце молекулы; если увеличивается – на восстанавливаемом. При действии экзоглюканазы ЛІІІ на новый глюкан состав образующихся продуктов оказался достаточно сложным: помимо глюкозы и генциобиозы в заметных количествах образовывался трисахарид и небольшие количества тетра-сахарида. Нужно отметить, что из транслама под действием экзоглюканазы ЛІІІ возникает приблизительно в 2 раза большее количество всех продуктов, чем из ламинарана (рис. 3). Из полученных временных зависимостей количества образовавшихся олигомеров, содержащих 1,6-связи, можно сделать вывод, что основная часть фрагментов, дающих ди-, три- и тетрасахариды, в β-*D*-глюкане

Таблица 2. Хим. сдвиги С-атомов в ¹³С-ЯМР-спектрах ламинаранов и β-*D*-глюканов, полученных действием глюканазы ЛІО

Глюкан	Связь		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C6 (маннит)
	тип	содержание, %							
Ламинаран из <i>L. cichorioides</i> *	1 → 3	90	103.6	74.4	85.8 86.1	69.4	76.8	62.0	64.4
	1 → 6	10	103.9	74.4	76.8	70.8	75.7	70.0	
Транслам	1 → 3	75	103.4	74.4	85.6 85.9 86.1	69.4	76.8	62.0	–
	1 → 6	25	103.7	74.4	76.8	70.8	75.7 76.0	70.1	–
Ламинаран из <i>L. gurjanovae</i> (ГЭ)*	1 → 3	97	103.6	74.4	85.6	69.4	76.8	62.0	64.4
	1 → 6	3				70.9	75.7		
β- <i>D</i> -Глюкан G (получен из <i>L. gurjanovae</i>)	1 → 3	75	103.7	74.4	85.7 86.2 87.4	69.4	76.8	61.9	–
	1 → 6	25	103.9	74.4	76.8	70.8	75.6 76.0	69.9	
Ламинаран из <i>F. evanescens</i> *	1 → 3	65	103.6	74.2	85.7 86.1	69.3	76.7	61.9	64.4
	1 → 6	35	103.9	74.2	76.7	70.7	75.8 76.1	69.9	
Транслам-Ф (получен из <i>F. evanescens</i>)	1 → 3	60	103.6	74.2	85.7 86.1 87.3	69.3	76.7	61.9	64.3 71.6
	1 → 6	40	103.9	74.2	76.7	70.7	75.8 76.1	69.9	

* Получен горячей экстракцией.

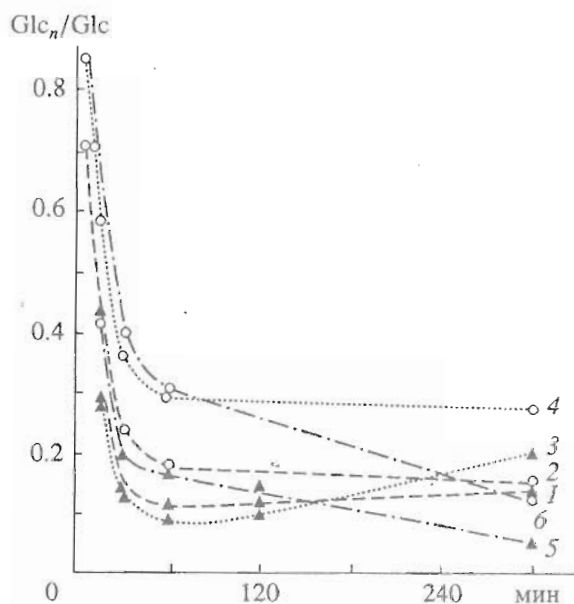


Рис. 3. Распределение фрагментов (Glc_n/Glc), содержащих 1→6-связанные остатки Glc, по цепи ламинарана из *L. cichorioides* (1, 3, 5) и транслама (2, 4, 6), из которых под действием экзоламинариказы ЛП образуются генциобиоза (1, 2), три- (3, 4) и тетрасахариды (5, 6). Glc_n/Glc рассчитано как отношение площадей пиков, соответствующих на хроматограммах олигомерам и глюкозе.

сосредоточена вблизи невосстанавливающего конца молекулы, далее эти фрагменты распределяются по молекуле равномерно (рис. 3). Больше всего в трансламе фрагментов, дающих при действии глюканазы ЛП триозу. Возможно, она образуется из тех участков цепи, где β-1→6-гликозидная связь включена в линейную цепь молекулы. Из разветвлений, как известно [16], под действием этого фермента образуется генциобиоза.

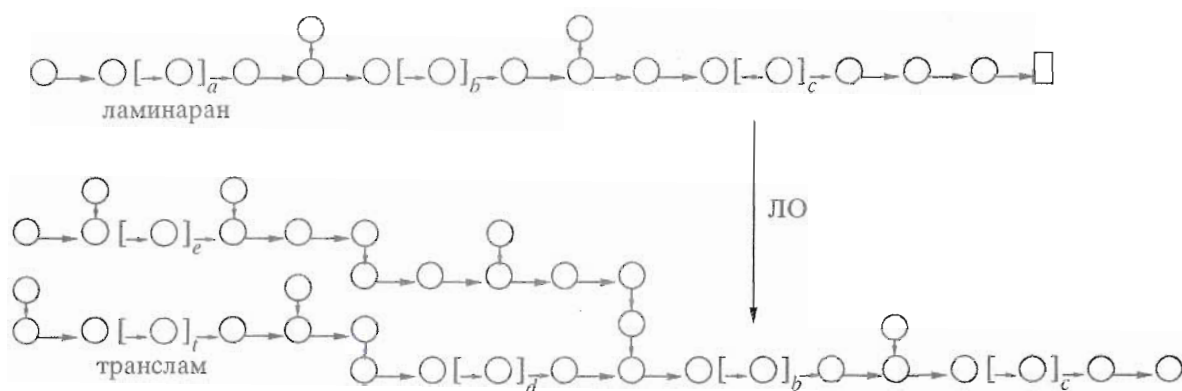
Таблица 3. Ацетаты метилгекситолов, полученные при метилировании ламинарана из *L. cichorioides* и транслама, и характеристики этих глюканов

Ацетаты метилгекситолов (звено)	Содержание в			
	ламинаране		трансламе	
	%	мол. доли	%	мол. доли
1Ac,2,3,4,5,6Me ₅ (маннит)	2.0	0.25	—	0
1,5Ac ₂ ,2,3,4,6Me ₄ (н/в конец)	13.0	1.62	13.0	1.14
1,3,5Ac ₃ ,2,4,6Me ₃ (-3Glc1-)	75.0	9.37	67.6	5.93
1,5,6Ac ₃ ,2,3,4Me ₃ (-6Glc1-)	2.0	0.25	8.0	0.7
1,3,5,6Ac ₄ ,2,4Me ₂ (-3,6Glc1-)	8.0	1.0	11.4	1.0
Степень полимеризации	20		62	
M_n , кДа	3.2		10.4	

Таким образом, транслам от исходного ламинарана отличается: 1) более высокая молекулярная масса, 2) отсутствие маннита на восстанавливаемом конце молекулы, 3) высокое содержание 1→6-связей, 4) наличие внутрицепочечных 1→6-связанных остатков глюкозы, 5) сосредоточение 1→6-связанных остатков у невосстанавливающего конца молекулы глюкана.

Образование такого глюкана при трансформации ламинарана нельзя объяснить, если представить, что в процессе трансгликозилирования происходит только перенос гликоновой части субстрата под действием эндо-1→3-β-D-глюканазы Л0 в положение 3 остатков глюкозы, находящихся в разветвлениях в ламинаране либо в продуктах его гидролиза [16]. Таким образом, β-1→6-связанная D-глюкоза может быть включена в цепь 1→3-β-D-глюкана, но оба глюкозных остатка генциобиозного фрагмента в таком варианте окажутся замещенными в положении C3 и не должны подвергаться деградации по Смитту. По всей видимости, под действием эндо-1→3-β-D-глюканазы Л0 происходит перераспределение и синтез β-1→6-гликозидных связей. Возможность синтеза β-1→6-гликозидных связей под действием этого фермента следует из анализа ¹³C-ЯМР-спектров всех продуктов, образующихся при получении транслама в сравнении с исходным ламинараном (табл. 1): суммарное содержание 1→6-связанных остатков D-глюкозы в продуктах реакции в 1.5 - 2.5 раза выше, чем в исходном ламинаране. Далее, в отдельном эксперименте было показано, что под действием эндо-1→3-β-D-глюканазы Л0 при исчерпывающем превращении субстрата в условиях высокой концентрации ламинарана образуется в 1.5 - 2 раза большее количество 1→3;1→6-β-D-глюкоолигосахаридов, чем при низкой (табл. 4). Лучшим подтверждением синтеза 1→6-связей, катализируемого эндо-1→3-β-D-глюканазой Л0, является факт образования 1→3;1→6-β-D-глюкана со структурой, аналогичной трансламу, из неразветвленного ламинарана из *L. gurjannovae* [18] (β-D-глюкан G, табл. 1, 2).

Интересно, что при действии эндо-1→3-β-D-глюканазы Л0 на сильноразветвленный ламинаран из *Fucus evanescens* (табл. 2) [18] в условиях образования транслама более высокомолекулярный глюкан не возникает: около 60% полученных продуктов элюировалось при гель-фильтрации там же, где и сам исходный ламинаран (табл. 1, 2). Практически не наблюдается здесь и увеличения содержания 1→6-гликозидных связей (табл. 2). Деградация по Смитту не вызвала фрагментации молекул продукта трансформации ламинарана из *F. evanescens* и практически не изменила молекулярной массы деградированного продукта по сравнению с исходным. Однако в ¹³C-ЯМР-спектре этого продукта, названного



Гипотетический механизм образования транслама. ↓ – синтезированные под действием глюкоказы ЛО внутрицелочные β-1→6-связи.

трансламом-Ф, имеется новый сигнал СЗ с химическим сдвигом 87.3 м. д., сопоставимый по интенсивности с обычным сигналом при 85.7 м. д. (табл. 2). По всей видимости, и в этом случае под действием эндо-1→3-β-D-глюкоказы ЛО происходит синтез нового 1→3; 1→6-β-D-глюкана, но не через синтез дополнительных 1→6-связей, а благодаря перераспределению уже имеющихся.

Особенностью поведения молекул ламинарана из *L. cichorioides* в растворе является несовпадение значений молекулярных масс, определенных методом гель-фильтрации при использовании в качестве стандартов декстранов различной молекулярной массы (M_w) и концевым анализом (M_n): $M_w > M_n$ в 1.5 - 2 раза [18]. M_w и M_n транслама, напротив, хорошо совпадали друг с другом (табл. 5). Таким образом, среднечисленная молекулярная масса транслама превосходит среднечисленную молекулярную массу ламинарана практически в 3 раза, средневесовая – в 1.5 - 2 раза (табл. 5).

В твердофазных ¹³C-ЯМР-спектрах (¹³C-ЯМР-спектрах, снятых при перекрестной поляризации и под магическим углом – 53.4°) транслам имеет два сопоставимых по интенсивности сигнала СЗ: 85.0 и 89.8 м. д. Первый соотносят с наличием в 1→3; 1→6-β-D-глюканах трехспиральных структур, второй – односпиральных [19 - 21]. Ламинаран в аналогичных условиях имеет один сигнал (85.0), обусловленный, согласно данным [19 - 21], присутствием в структурах 1→3; 1→6-β-D-глюканов тройной спирали. Возможно, необычное поведение транслама при гель-фильтрации ($M_w = M_n$), большая дискретность сигнала СЗ в его ¹³C-ЯМР-спектрах в растворе (85.6, 85.9 и 86.1 м. д.; табл. 2, рис. 2) и в твердой фазе говорят о том, что ламинаран и транслам находятся в различных конформационных состояниях. Образование транслама и его структура представлены на схеме. Молекулы ламинарана выступают здесь одновременно как доноры и как акцепторы гликозильных остатков.

В продуктах трансформации ламинарана под действием эндо-1→3-β-D-глюкоказы ЛІV (из моллюска *S. sachalinesis*) глюкана, подобного трансламу, не было обнаружено. Глюкоказа ЛІV в отличие от эндо-1→3-β-D-глюкоказы ЛО катализирует образование большего количества глюкозы при высокой концентрации ламинарана,

Таблица 4. Содержание (%) глюкозы и глюкоолигосахаридов в продуктах трансформации глюкоказами ЛО и ЛІV ламинаранов из *L. cichorioides* и *L. gurjanovae* при концентрациях субстрата 10 (I) и 1 мг/мл (II)

Продукты	ЛО				ЛІV	
	<i>L. cichorioides</i>		<i>L. gurjanovae</i>		<i>L. gurjanovae</i>	
	I	II	I	II	I	II
Glc	25.2	33.5	20.0	25.4	38.7	27.8
Glc ₂	13.4	20.2	12.5	20.0	12.8	23.0
Glc ₃ **	12.3	10.5	6.2	3.2	1.9	4.6
Glc ₄ **	15.7	14.2	4.3	3.5	2.2	3.8
Glc ₅	13.8	9.4	3.8	2.8	2.2	1.9
Glc ₆₋₉	19.6	12.2	6.8	3.0	1.8	1.7
Glc ₃₋₉	61.4	46.0	21.0	12.5	8.1	12.0
Glc ₁₋₉	100	100	53.6	58.0	63.9	63.0
Glc _{n>9}			46.4	42.0	36.1	37.0

* Анализ проводили на углеводном анализаторе Jeol-J4C-6АН.

** Структура Glc₃ и Glc₄, как 1→3; 1→6-β-D-глюкотри- и -тетраоз, была установлена нами ранее [17].

Таблица 5. M_w и M_n β-D-глюканов (кДа)*

Глюкан	n	M_n	M_w
Ламинаран из <i>L. cichorioides</i> [18]	17 - 20	3 - 5	5 - 8
Транслам	50 - 70	8 - 12	8 - 12

* Приведены интервалы молекулярных масс, полученных при исследовании нескольких образцов ламинарана и транслама.

чем при низкой (табл. 4). Это может быть связано с тем, что механизм действия глюканазы ЛІV характеризуется высокой степенью множественности атаки [22], которая, по всей видимости, увеличивается с увеличением концентрации субстрата (табл. 4). Значительные различия в механизмах действия ферментов ЛО и ЛІV, выделенных из различных видов морских моллюсков, были отмечены также ранее в работах [10, 11, 17, 22 - 24].

Таким образом, был осуществлен ферментативный синтез биологически активного глюкана из неактивного ламинарана. Можно предполагать, что биологическая активность транслама скорее всего связана с наличием в его молекулах внутрицепочечных β -1 \rightarrow 6-гликозидных связей и с сосредоточением последних у невосстанавливающего конца молекул транслама. Показано, что эндо-1 \rightarrow 3- β -D-глюканаза ЛО может катализировать синтез β -1 \rightarrow 6-гликозидных связей, предложен возможный механизм синтеза транслама.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Основные методы. Определение общего количества нейтральных сахаров проводили фенол-серноокислотным методом [25], восстанавливающих – методом Нельсона [26]. Моно- и олигосахаридный состав продуктов кислотных и ферментативных гидролизатов ламинаранов определяли с помощью углеводных анализаторов Biotronik (Durgum-x4-20; колонка 0.6 \times 30 см; 60°C; бицинхониатный метод; интегрирующая система – Shimadzu C-R2AX) и Jeol-J4C-6АН (биогель P-2; 1 \times 100 см; орцин-серноокислотный метод). 13 C-ЯМР-спектры получали на спектрометре WM-250 Bruker в D₂O при 70°C (внутренний стандарт – метанол, 50.15 м. д. от (CH₃)₄Si). Спектры в твердой фазе получены на спектрометре MSL-300 Bruker.

Ламинараны из водорослей *L. gurjanovae* (Охотское море, бухта Академия, Шантарские о-ва), *F. evanescens* (бухта Кратерная, Курильские о-ва), *L. cichorioides* (Японское море, бухта Троица) выделяли по методу [15]. Используемые в работе ламинараны из *F. evanescens* (M_w 5.0 кДа, β -1.3 : β -1.6 = 65 : 35) и *L. gurjanovae* (M_w 4.5 кДа, β -1.3 : β -1.6 = 98 : 2), полученные экстракцией водорослей при 50 - 60°C (горячая экстракция, ГЭ) (табл. 1, 2), дополнительно хроматографировали на сефадексе G-50. Подробные структурные характеристики ламинаранов приведены в работах [15, 18].

Энзиматические реакции. К раствору полисахаридов (1 или 10 мг/мл в 0.05 М ацетатном буфере, pH 5.5) добавляли эндоглюканазы ЛО из *Ch. albidus*, ЛІV из *S. sachalinensis* или экзоламинариназу ЛІІІ из *E. maakii* (2×10^{-2} ед. акт/мл; 1 ед. акт. фермента равна такому его количеству, которое катализирует образование 1 мкмоль глюкозы в

1 мин), смесь инкубировали различные промежуточные времени и продукты ферментативного гидролиза анализировали с помощью углеводных анализаторов Biotronik и/или Jeol-J4C-6АН или разделением продуктов на сефадексе G-50 (1 \times 100 см). Ферменты были получены по методам [16, 27].

Деградация по Смитсу [15]. К 10 мл 0.4% водного раствора полисахарида добавляли 10 мл 0.1 М йодной кислоты в 0.15 М двууглекислом натрии (pH 7). Смесь выдерживали 25 ч в темноте при 4°C. Избыток йодной кислоты разрушали 1 М этиленгликолем (2 мл), полиальдегид диализовали против воды и восстанавливали NaBH₄ (40 мг) в течение 24 ч. Затем pH раствора доводили до 7 и в течение 48 ч гидролизовали полиспирт 0.25 М H₂SO₄. Гидролизат нейтрализовали. Полисахариды и продукты их деградации по Смитсу фракционировали на колонке (1 \times 100 см) с сефадексом G-50 (элюент – вода). Фракции на присутствие углеводов анализировали фенол-серноокислотным методом [25].

Метилирование. Полисахарид (10 мг) высушивали над пятиокисью фосфора, растворяли в сухом диметилсульфоксиде (1 мл) и метилировали по методу Хакомори [28]. Метилирование повторяли до исчезновения в ИК-спектре продукта полосы гидроксильных групп. Сполна метилированный полисахарид гидролизовали при 110°C 2 М трифторуксусной кислотой. Метилированные моносахариды восстанавливали NaBH₄ и ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине. Ацетаты метилированных полиолов анализировали хроматомасс-спектрометрией (прибор LKB-9000S, колонка 1 м с 3% SE-30). Масс-спектры записывали при ионизационном потенциале 70 эВ.

Средневесовую молекулярную массу (M_w) β -D-глюканов, а также молекулярно-весовое распределение полисахаридов определяли с помощью гель-фильтрации на G-50 (1 \times 100 см), используя в качестве маркеров инулин (5 кДа) и декстраны (10, 20, 40 кДа) и воду в качестве элюента (12 мл/ч; объем фракций 2 мл); выход углеводов регистрировали фенол-серноокислотным методом [25].

Среднечисловую молекулярную массу (M_n) β -D-глюканов определяли метилированием, 13 C-ЯМР-спектроскопией. Степень полимеризации (n) и соответственно M_n транслама определяли как частное от деления количества общих сахаров, полученного фенол-серноокислотным методом [25], и количества восстанавливающих сахаров, полученного методом Нельсона [26]; n и M_n ламинаранов рассчитывали с учетом маннита, определяемого в образцах модифицированным методом Нэша [29].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aoki T. // Immune Modulation Agents and their Mechanisms. N.Y.; Basel, 1982. P. 63 - 77.
2. Sasaki T., Takasuka N., Chichara G., Maeda V.V. // Gann. 1976. V. 67. P. 191 - 195.
3. Элберсгейм П., Дарвил А.Г. // В мире науки. 1985. № 11. С. 16 - 23.
4. Судзуки Е. // Искра-информация. 1987. № 34. С. 10 - 16.
5. Reagents for Immunology // Nature. 1990. V. 346. P. 591.
6. Yanaki T., Iton W., Tabata K. // Agric. Biol. Chem. 1986. V. 50. P. 2415 - 2416.
7. Канаяма Н., Adachi N., Fukai Y., Takeuchi J., Togami M. // Yakugaku Zasshi. 1986. V. 106. P. 206 - 211.
8. Hamuro J., Hadding U., Butter-Suermann D. // Immunology. 1978. V. 34. P. 675 - 680.
9. Назарова Н.И., Елякова Л.А. // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1189 - 1196.
10. Звягинцева Т.Н., Назарова Н.И., Елякова Л.А. // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 10. С. 1342 - 1346.
11. Звягинцева Т.Н., Евтушенко Е.В., Елякова Л.А. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1206 - 1214.
12. Максимов В.И., Каверзнева Е.Д., Кравченко Н.А. // Биохимия. 1965. Т. 30. Вып. 5. С. 1007 - 1014.
13. Tanaka T., Oi S. // Agric. Biol. Chem. 1984. V. 48. № 9. P. 2265 - 2269.
14. Запорожец Т.С., Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н. // Тез. докл. IV Всесоюз. конф. "Химия, фармакология и механизм действия противолучевых средств". М., 1990. С. 91.
15. Elyakova L.A., Zvyagintseva T.N. // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. P. 241 - 248.
16. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л., Леонтьева Г.В., Чаленко Г.И., Елякова Л.А., Звягинцева Т.Н., Широкова Н.И. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 825 - 832.
17. Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Elyakova L.A. // Carbohydr. Res. 1986. V. 148. P. 57 - 62.
18. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А., Широкова Н.И. // Биооргани. химия. 1994. Т. 20. № 12. С. 1349 - 1358.
19. Tanaka S., Aketagawa I., Shibata J., Tsumuraya Y., Hashimoto Y. // Carbohydr. Res. 1991. V. 218. P. 167 - 174.
20. Saito K., Nishijima M., Ohno N., Yadomae T., Miyazaki T. // Chem. Pharm. Bull. 1992. V. 40. P. 261 - 263.
21. Saito H., Yoshioka Y., Uchara N. // Carbohydr. Res. 1991. V. 217. P. 181 - 190.
22. Безукладников П.В. Особенности катализа, осуществляемого эндо- β -1 \rightarrow 3-глюканазами из морских моллюсков. Дис. ... канд. хим. наук. Владивосток, 1989. 179 с.
23. Елякова Л.А., Звягинцева Т.Н., Привалова Н.М. // Биооргани. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1553 - 1559.
24. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А. // Биооргани. химия. 1981. Т. 7. № 5. С. 680 - 685.
25. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.R., Roberts P.A., Smith F. // Analyt. Chem. 1956. V. 28. P. 350 - 356.
26. Nelson N.J. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. № 1. P. 375 - 381.
27. Sova V.V., Elyakova L.A. // Biochim. et biophys. acta. 1972. V. 258. P. 219 - 227.
28. Nakomori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 1. P. 205 - 208.
29. Vaskovsky V.E., Isay S.V. // Anal. Biochem. 1969. V. 30. P. 25 - 28.

The Enzymic Transformations of Laminarans in 1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6- β -D-Glucans with Immunostimulating Activity

T. N. Zvyagintseva*, L. A. Elyakova, and V. V. Isakov

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences,
pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

Abstract — A new 1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6- β -D-glucan (translam) with immunostimulating activity was isolated from products of the laminaran (*L. cichorioides*) transformation with endo-1 \rightarrow 3- β -D-glucanase L0 (*Chlamys albidus*). As compared with laminaran, translam has a higher molecular weight, contains a 2.5-fold number of 1 \rightarrow 6-bound glucose residues mainly about the nonreducing end of the molecule, but no mannitol. Some of the 1 \rightarrow 6-linked glucose residues are included, in contrast to laminaran in the main chain of 1 \rightarrow 3- β -D-glucan. It was shown that the translam formation is due to the ability of endo-1 \rightarrow 3- β -D-glucanase L0 to catalyze the synthesis not only of 1 \rightarrow 3-but also of 1 \rightarrow 6-glucosidic linkages.

Key words: 1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6- β -D-glucans, immunostimulators, laminarans, transglycosylation, endo-1 \rightarrow 3- β -D-glucanase.

* To whom correspondence should be addressed.