



УДК 577.152.321*6.02

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ
ЭНДО- β -1,3-ГЛЮКАНАЗII. КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ ГИДРОЛИЗА
И ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ЭНДО- β -
1,3-ГЛЮКАНАЗАМИ МОРСКИХ МОЛЛЮСКОВ

Звягинцева Т. Н., Назарова Н. И., Елякова Л. А.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток

Изучены закономерности совместного протекания реакций гидролиза и трансгликозилирования под действием эндо- β -1,3-глюканаз ЛЮ и ЛІV из морских моллюсков в зависимости от рН среды, концентраций ламинарина и *n*-нитрофенилглюкозида, а также от глубины превращения субстрата. Показано, что изучаемые ферменты, различаясь между собой в механизме катализа, обладают повышенной способностью к реакции трансгликозилирования.

Способность карбогидраз, а именно эндогликаназ и гликозидаз, катализировать одновременно реакции гидролиза и трансгликозилирования известна давно.

Ранее нами было показано [1], что эндо- β -1,3-глюканазы (КФ 3.2.1.6) морских моллюсков ЛІІІ и ЛІV из *Spisula sachalinensis* [2] и ЛЮ из *Chlamys abbidus* [3] способны осуществлять реакцию трансгликозилирования при использовании ламинарина и ламинариолигосахаридов в качестве доноров и различных арил- β -D-глюкозидов в качестве акценторов.

В настоящей работе изучены закономерности совместного протекания реакций гидролиза и трансгликозилирования под действием ЛЮ и ЛІV в зависимости от рН среды, концентраций ламинарина и *n*-нитрофенилглюкозида (Np-глюкозид), а также от времени реакции или глубины превращения субстрата.

Количество продуктов трансгликозилирования и гидролиза в процессе трансформации субстрата под действием ЛЮ и ЛІV определяли соответственно по поглощению при 300 нм и методом Нельсона [4] после отделения на сефадексе G-15 Np-глюкозида, который мешает определениям. Одновременно для сравнения проводили гидролиз ламинарина под действием ферментов в отсутствие Np-глюкозида (контрольный гидролиз).

Максимальное действие ЛЮ проявляется в интервале рН 4,0–5,5, а ЛІV — в области рН 4,5–5,5. Оптимумы рН реакций гидролиза и трансгликозилирования, определенные с помощью вышеизложенного подхода, хорошо совпадают между собой. Можно предполагать, что в процессе как гидролиза, так и трансгликозилирования участвуют одни и те же каталитические группировки активных центров изучаемых ферментов.

Интервалы концентраций субстрата и акцентора были выбраны на основании ранее полученных данных с регистрацией процесса трансгликозилирования по выделению *n*-нитрофенола [1]. Но, как предполагалось ранее [1] и будет показано ниже, выделение *n*-нитрофенола происходит на конечных стадиях реакции и характеризует вторичный процесс — расщепление продуктов трансгликозилирования. К начальным стадиям реакции выделение *n*-нитрофенола отношения не имеет, и закономерности образования продуктов трансгликозилирования совершенно иные, чем их разрушения.

* Сообщение I см. [1].

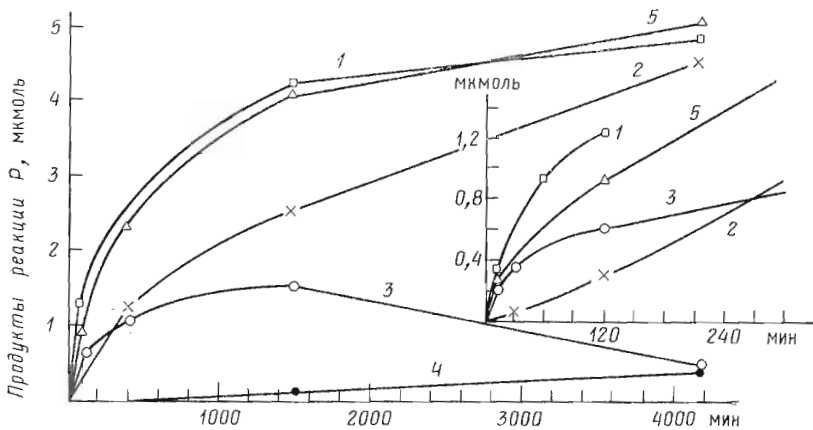


Рис. 1

Рис. 1. Кинетика катализируемого лампнариной ЛПВ образования из ламинарина (0,26 мкмоль) продуктов гидролиза в отсутствие Np-глюкозида (1), а также продуктов гидролиза (2), трансгликозилирования (3) и *n*-нитрофенола (4) в присутствии Np-глюкозида (16,7 мкмоль). 5 - $P_T + P_G$. На врезке начальные участки кинетических данных

Рис. 2. а - кинетика катализируемого лампнариной ЛО образования из ламинарина (0,2 мкмоль) продуктов гидролиза в отсутствие Np-глюкозида (1), а также продуктов гидролиза (2), трансгликозилирования (3) и *n*-нитрофенола (4) в присутствии Np-глюкозида (16,7 мкмоль). 5 - $P_T + P_G$; б - начальные участки кинетических кривых

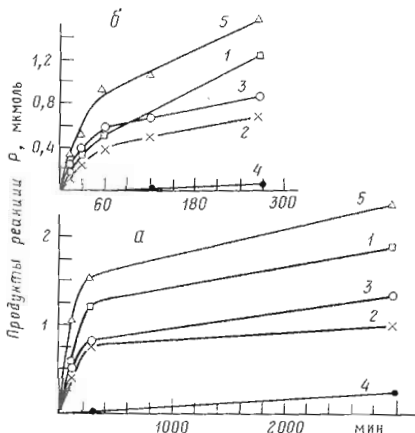


Рис. 2

При изучении трансформации ламинарина во времени в присутствии Np-глюкозида и в его отсутствие между действием ЛО и ЛПВ были обнаружены существенные различия (рис. 1 и 2). Так, для ЛПВ кривые накопления продуктов гидролиза и трансгликозилирования пересекаются в точке, соответствующей деградации $\sim 20\%$ связей в ламинарине (степень полимеризации ламинарина $n=30$), что соответствует средней степени полимеризации продуктов реакций 6. До этой точки скорость реакции трансгликозилирования преобладает над скоростью реакции гидролиза, после $n=6$ процесс гидролиза начинает преобладать над трансгликозилированием. После деградации 40% связей в субстрате накопление продуктов трансгликозилирования сменяется интенсивным исчезновением их. Таким образом, кривая накопления продуктов трансгликозилирования под действием ЛПВ имеет две ветви: накопления и расхода. Расход продуктов на поздних стадиях реакции может происходить за счет отщепления Np-глюкозида [5] и *n*-нитрофенола, значительные количества которого появляются лишь на последних стадиях реакции (рис. 1, 2).

Кривые накопления продуктов трансгликозилирования (P_T) и гидролиза (P_G) для ЛО развиваются совершенно по иным законам. Процесс трансгликозилирования преобладает над гидролизом практически до конца разрушения субстрата: отношение P_T/P_G с увеличением глубины превращения субстрата для ЛО меняется незначительно (рис. 3, $P_T/P_G=2$ для 5% превращения субстрата и $P_T/P_G=1,5$ для 27%), тогда как для ЛПВ оно сильно изменяется с течением реакции (рис. 3, $P_T/P_G=3,5$ для 5% и $P_T/P_G=0,7$ для 27% превращения субстрата). Таким образом, для

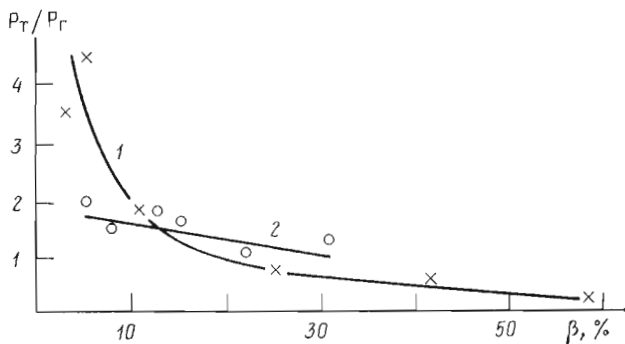


Рис. 3. Зависимость отношения P_T/P_G от глубины превращения субстрата (β , %) под действием ЛІV (1) и ЛО (2)

ЛО в отличие от ЛІV процесс трансгликозилирования преобладает над процессом гидролиза независимо от степени полимеризации субстрата.

Интересно, что общее число разрывов связей в ламинарине (P_T+P_G) для ЛІV одинаково как в присутствии Np-глюкозида, так и без него, а при добавлении Np-глюкозида число разрывов связей под действием ЛО увеличивается приблизительно в 1,5–2 раза (рис. 1, 2).

Объяснений этому факту можно дать несколько. Например, для ЛІV скоростьюопределяющей стадией может быть образование фермент-субстратного комплекса, а для ЛО — присоединение молекулы акцептора. Возможно, причина таких различий кроется в способности ЛІV осуществлять механизм множественной атаки [6]; также вполне вероятно, что для ЛО Np-глюкозид более подходящий акцептор, чем для ЛІV.

Реакция трансгликозилирования под действием ЛІV и ЛО протекает успешно и преобладает над реакцией гидролиза (рис. 1, таблица) даже при наименьших из исследованных концентрациях донора (0,2 мкмоль) и акцептора (3,33 мкмоль). Для обоих ферментов было определено отношение

$$\alpha = \frac{K_T}{K_G} = \frac{(V_T/V_G)[H_2O]}{[A]}, \quad [7]$$

где $[A]$ и $[H_2O]$ — концентрации Np-глюкозида и воды, K_T и K_G , V_T и V_G — константы и начальные скорости реакций трансгликозилирования и гидролиза. Для ЛІV $\alpha=2,3 \cdot 10^4$, для ЛО $\alpha=2,2 \cdot 10^4$.

Истинные значения α должны быть больше полученных, так как величины V_T занижены, поскольку метод, используемый для определения продуктов трансгликозилирования, не позволяет учитывать количество Np-глюкозида, образующегося в качестве продукта реакции [5].

Нужно отметить, что у изучаемых ферментов отношение констант трансгликозилирования и гидролиза сопоставимо с известными [8, 9]. Для лизоцима это отношение в одном случае составляет 10^3 [8], в другом — 133 [9]. Намного меньше для глюканиаз ЛО и ЛІV по сравнению с известными [10, 11] так называемая пороговая концентрация, т. е. концентрация, ниже которой преобладает реакция гидролиза, выше — трансгликозилирования. Так, для амилазы из *Bacillus subtilis* при использовании в качестве субстрата мальтозы «пороговая концентрация» была равна 38,2 мМ [10]. В некоторых случаях с изменением степени полимеризации субстрата величина «пороговой концентрации» может изменяться. В частности, для ЛІV, чем больше степень полимеризации субстрата, тем меньше должна быть «пороговая концентрация». В случае ЛО «пороговая концентрация» практически не меняется с изменением длины субстрата (рис. 3).

Таким образом, изучаемые ферменты, различаясь между собой по механизму действия, обладают повышенной способностью к реакции трансгликозилирования.

Трансформация ламинарина под действием ЛО

Время, мин	Ламинарин, мкмоль/ /Glu (m)	Нр-глюкозид, мкмоль	P _Г	P _Т	Нр-ОН	P _Г + P _Т	P _Г /P _Г	β	
15	61,7	33,3	0,17	0,38	0,00	0,55	2,2	0,89	
		16,6	0,10	0,29	0,00	0,39	2,9	0,63	
		3,33	0,13	0,17	0,00	0,30	1,3	0,48	
	30,9	16,6	0,12	0,24	0,00	0,36	2,0	1,15	
		6,17	16,6	0,11	0,21	0,00	0,32	2,0	4,9
30	61,7	0	0,17					2,7	
		33,3	0,22	0,61	0,00	0,83	2,8	1,3	
		16,6	—	0,44	0,00	—	—	—	
	30,90	3,33	0,30	0,26	0,00	0,56	0,87	0,90	
		16,6	0,17	0,33	0,00	0,50	2,0	1,6	
60	61,7	33,3	0,20	0,46	0,03	0,66	2,3	9,95	
		16,6	0,20	0,30	0,01	0,50	1,5	7,7	
		0	0,32						5,2
	30,9	33,3	0,36	0,91	0,00	1,27	2,5	2,0	
		3,33	0,32	0,52	0,00	0,84	1,6	1,35	
120	61,7	33,3	0,27	0,80	0,025	1,07	3,0	3,69	
		16,6	0,27	0,59	0,01	0,86	2,2	2,7	
		6,17	16,6	0,31	0,56	0,01	0,87	1,8	13,0
	30,9	0	0,50						8,0
		33,3	0,45	1,37	0,00	1,82	3,0	2,9	
270	61,7	33,3	0,67	1,37	0,04	2,04	2,0	6,32	
		16,6	0,78	1,01	0,02	1,79	1,3	5,6	
		6,17	33,3	0,51	0,71	0,06	1,22	1,4	17,73
	30,9	16,6	0,40	0,63	0,03	1,03	1,6	15,2	
		33,3	0,80	2,19	0,00	2,99	2,7	4,7	
2880	61,7	16,6	1,37	1,53	0,03	2,90	1,2	4,59	
		33,3	0,84	1,98	0,05	2,82	2,3	8,58	
		6,17	16,6	1,06	1,38	0,03	2,44	1,3	7,5
	30,9	33,3	0,94	1,14	0,09	2,08	1,2	28,45	
		0	1,2	0,77	0,06	1,53	1,0	22,0	
2880	61,7	0	1,2					19,4	
		33,3	1,34	4,01	0,15	5,35	3,0	8,14	
		16,6	2,46	2,45	0,14	5,05	1,0	7,87	
	30,9	33,3	2,13	3,31	0,16	5,44	1,6	15,90	
		6,17	16,6	1,33	1,72	0,12	3,05	1,3	9,3
2880	61,7	16,6	1,03	1,31	0,23	2,34	1,3	31,3	
		0	1,85						30
		33,3	1,34	4,01	0,15	5,35	3,0	8,14	
	30,9	16,6	2,46	2,45	0,14	5,05	1,0	7,87	
		6,17	16,6	1,03	1,31	0,23	2,34	1,3	31,3

Экспериментальная часть

Эндо-β-1,3-глюканазу ЛІV выделяли из *S. sachalinensis* по методу [2], ЛО — из *Ch. abbidus* [3].

Ламинарин получали из *Laminaria sycharioides* по методу [12]. *n*-Нитрофенил-β-*D*-глюкопиранозид — препарат фирмы Chemapol (Чехословакия).

Кинетические эксперименты и определение количества продуктов реакции

Реакционные смеси содержали 0,2–2 мкмоль ламинарина, 0–33,3 мкмоль Нр-глюкозида и 0,01–0,02 ед. ЛО и ЛІV в 1 мл 0,1 М ацетатного буфера (рН 5,2) и 0,1 М NaCl. Через определенные интервалы времени отбирали пробы и останавливали реакцию в них кипячением.

Пробы анализировали на содержание *n*-нитрофенола [1]. Для определения содержания в пробах продуктов трансгликозилирования и гидролиза реакционную смесь (1–0,5 мл) наносили на колонку (1×100 см) с сефадексом G-15 и элюировали водой, регистрируя выходы продуктов трансгликозилирования и Нр-глюкозида на спектрофотометре Uvicord при 280 нм. Картина разделения Нр-глюкозида и меченных им ламинариполисахаридов в общих чертах совпадала с хроматографией на сефа-

дексе G-15 продуктов реакции, полученных при действии целлюлаз на смесь Np-глюкозида и целлодекстрина в работе [13].

Выход глюкозы регистрировали глюкозооксидазным методом [14]. Область выхода глюкозы совпадала с областью выхода Np-ламинариотетраозидов, что соответствует картине разделения замещенных *n*-нитрофенолом и свободных ламинариполисахаридов на биогеле P-2 [1].

Фракции, содержащие продукты реакции, исключая Np-глюкозид, объединяли, упаривали до 2,5 мл и определяли в пробах содержание продуктов гидролиза методом Нельсона [4] и продуктов трансгликозилирования по поглощению при 300 нм, используя в качестве стандартов соответственно глюкозу и Np-глюкозид.

pH-Оптимумы действия ферментов определяли, используя ламинарин (0,4 мкмоль) в качестве донора и Np-глюкозид (16,7 мкмоль) в качестве акцептора аналогично [15]. Количество продуктов реакции, полученных при различных pH, измеряли после отделения Np-глюкозида на сефадексе G-15.

Глубину превращения субстрата (β) определяли, учитывая включение Np-глюкозида в продукты реакции по формуле

$$\beta = \frac{P_T + P_r}{m + P_r} \cdot 100 \%$$

β — глубина превращения субстрата, т. е. отношение количества расщепленных под действием фермента связей ($P_T + P_r$) к общему количеству связей в растворе ($m + P_r$), где m — количество глюкозы, которая может образоваться при исчерпывающем гидролизе взятого в реакцию ламинарина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Назарова Н. И., Елякова Л. А. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 9, с. 1189–1196.
2. Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. E. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 212, № 1, p. 111–115.
3. Privalova N. M., Elyakova L. A. Comp. Biochem. and Physiol., 1978, v. 60B, № 1, p. 225–228.
4. Nelson N. J. Biol. Chem., 1944, v. 153, № 1, p. 375–381.
5. Назарова Н. И., Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Членов М. А. I Всес. конф. по хроматографии в биологии и медицине. Тез. докл. М., 1983, с. 14.
6. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Привалова Н. М. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1553–1559.
7. Antonov V. K., Rumsh L. D., Tikhodeeva A. G. FEBS Lett., 1974, v. 46, № 1, p. 29–33.
8. Chipman D. M. Biochemistry, 1971, v. 10, № 9, p. 1714–1722.
9. Masaki A., Fukumiso T., Otakara A., Toricata T., Hayashi K., Imoto T. J. Biochem., 1981, v. 90, № 4, p. 1167–1175.
10. Matsuno R., Nakanashi K., Ohnishi M., Hiromi K., Komikubo T. J. Biochem., 1978, v. 3, p. 859–862.
11. Максимов В. И., Каверзнева Е. Д., Кравченко Н. А. Биохимия, 1965, т. 30, вып. 6, с. 1007–1014.
12. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н. Carbohydr. Res., 1974, v. 34, № 2, p. 241–248.
13. Максимов В. И. Прикл. биохимия и микробиол., 1981, т. XVII, вып. 4, с. 563–568.
14. Keston A. Abstr. Paper 129 Meeting Amer. Chem. Soc., 1956, 31 с.
15. Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н. Биоорг. химия, 1975, т. 1, № 11, с. 1470–1473.

Поступила в редакцию
16.III.1984

A STUDY ON TRANSFER ACTIVITY OF ENDO- β -1,3-GLUCANASES.

II. KINETIC FEATURES OF THE HYDROLYSIS AND TRANSGLYCOSYLATION REACTIONS CATALYZED BY ENDO- β -1,3-GLUCANASES FROM MOLLUSCS

ZVYAGINTSEVA T. N., NAZAROVA N. I., ELYAKOVA L. A.

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

A study of hydrolysis and transglycosylation processes catalyzed by endo- β -1,3-glucanases LIV from *Spisula sachalinensis* and L0 from *Chlamys abbidus* depending on pH, concentrations of laminarin and *p*-nitrophenylglucoside, as well as on the depth of substrate transformation has been performed. These enzymes have been shown to differ in their catalytic mechanisms but to have more pronounced capacity for catalyzing the transglycosylation reactions.