



УДК 577.152.321 : 547.458.22

© 1992 г.

Е. В. Евтушенко, Л. А. Елякова

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НЕКОТОРЫХ β-1,3-D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛГЛИКОЗ

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
Владивосток*

Методом ¹³C-ЯМР-спектроскопии показано, что при катализируемом эндо-1,3-β-глюканазой ЛІV из *Spisula sachalinensis* переносе остатков ламинаринолигосахаридов на акцепторы во всех исследованных случаях образуется β-1,3-глюкозидная связь. В качестве акцепторов использовались сахара, гомоморфные D-глюкозе. Предложен удобный ферментативный синтез ряда дисахаридов с β-1,3-связью, содержащих D-глюкозу на невозстанавливаемом конце.

Известно, что эндоглюканазы обладают трансглюкозилирующей активностью [1]. Ранее [2] мы изучили акцепторную специфичность эндо-1,3-β-глюканаз ІО, ІІІ, ІІV из морских моллюсков и показали, что сродством к акцепторному участку фермента обладают сахара, гомоморфные D-глюкозе, т. е. имеющие одинаковые конфигурации атомов, составляющих пиранозный цикл, а также имеющие свободные гидроксильные группы при С-3 и С-4. Однако для выяснения тонкого механизма трансглюкозилирующей реакции необходимо знать конформацию, в которой реагирует молекула, сорбируемая на акцепторном участке фермента, и тип связи в олигосахаридах, образующихся при использовании различных акцепторов. Это может стать основой для создания специфических ингибиторов глюканаз, а также ферментативного подхода к синтезу олигосахаридов.

Ранее [2] было показано, что в реакцию трансглюкозилирования с эндо-1,3-β-глюканазой ЛІV из *Spisula sachalinensis* вступают 2-О-метилвые эфиры метилгликозидов α-D-глюкозы и β-D-ксилозы. На основании этих фактов можно допустить, что в сорбции на акцепторном участке активного центра фермента гидроксил при С-2 моносахарида не играет существенной роли. Для проверки этого предположения мы провели реакцию трансглюкозилирования с использованием метил-2-дезоксид-α-

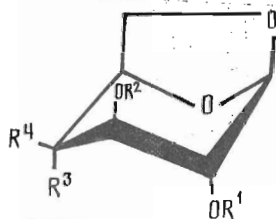
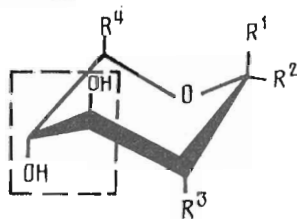
Таблица I

Интенсивность реакции трансглюкозилирования катализируемой ЛІV

Акцептор	Образование продуктов трансглюкозилирования*
Метил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид (IV)	++
Метил(метил-α-D-глюкопиранозид)уронат (V)	++
1,6-Ангидро-β-D-глюкопираноза (VI)	++
1,6-Ангидро-2-О-метил-β-D-глюкопираноза (VII)	+
1,6-Ангидро-3-О-метил-β-D-глюкопираноза (VIII)	-
1,6-Ангидро-4-О-метил-β-D-глюкопираноза (IX)	-
1,6-Ангидро-β-D-галактопираноза (X)	-
1,6-Ангидро-β-D-галактопираноза (XI)	-

* Оценка методом ТСХ (предел чувствительности метода ~ 3-5%); ~ 20-30% (++)
~ 5-10% (+).

D-арабино-гексопиранозида (IV) в качестве акцептора (табл. 1). Результатом реакции был перенос глюкозильного донора (ламинаринолигосахаридов) и накопление (вследствие вторичного гидролиза) дисахарида с 2-дезоксид-*D*-глюкозой на восстанавливающем конце (регистрация ТСХ). Тот факт, что в реакцию трансгликозилирования в качестве акцептора не вступает метил- α -*D*-маннопиранозид [2], можно объяснить, предположив, что молекула сахара сорбируется на энзиме не в предпочтительной конформации 1C_4 , а в альтернативной 1C_4 -конформации, в которой экваториальное положение гидроксильной группы маннозы при С-2 создаст препятствие для ее сорбции в активном центре фермента.



- (I) $R^1=H, R^2=OCH_3, R^3=OH, R^4=CH_2OH$
 (II) $R^1=OCH_3, R^2=R^4=H, R^3=OH$
 (III) $R^1=H, R^2=OCH_3, R^3=OH, R^4=CH_3$
 (IV) $R^1=H, R^2=OCH_3, R^3=H, R^4=CH_2OH$
 (V) $R^1=H, R^2=OCH_3, R^3=OH, R^4=COOCH_3$
 (VI) $R^1=H, R^2=R^3=OCH_3, R^4=CH_2OH$

- (VII) $R^1=R^2=R^4=H, R^3=OH$
 (VIII) $R^1=CH_3, R^2=R^4=H, R^3=OH$
 (IX) $R^1=R^4=H, R^2=CH_3, R^3=OH$
 (X) $R^1=R^2=R^4=H, R^3=OCH_3$
 (XI) $R^1=R^2=R^3=H, R^4=OH$

Штриховой линией обозначен участок моносахарида, существенный для взаимодействия с ферментом

Из множества возможных конформеров акцептора, вероятно, только один обладает способностью к связыванию ферментом. Вследствие существования конформационного равновесия и невозможности использовать моносахариды с закрепленными конформациями в принципе трудно определить конформацию реагирующей молекулы. Однако есть один пример, где конформация моносахарида строго закреплена. Это 1C_4 -конформация в 1,6-ангидро- β -гексозах. Для проверки вышеприведенного предположения о необходимости 1C_4 -конформации для реагирующей с ферментом молекулы сахара мы использовали в качестве акцепторов 1,6-ангидро- β -*D*-глюкозу (VII) и 1,6-ангидро- β -*D*-галактозу (XI). В результате было показано (табл. 1), что реакция трансгликозилирования идет с ангидроглюкозой (VII), но с ангидрогалактозой (XI) не наблюдается. Этот факт подтверждает, что для реакции акцептора с ферментом атомы С-4 и С-3 пиранозного кольца сахара должны иметь *D*- и *L*-конфигурации соответственно. В 1,6-ангидро- β -*D*-галактозе (XI) в отличие от *D*-глюкозы и гомоморфных ей сахаров эти атомы имеют *L,L*-конфигурации и вследствие этого реакция с ферментом не происходит.

Для установления в молекуле 1,6-ангидро- β -*D*-глюкозы (VII) участков, ответственных за связывание с ферментом, использовались ее метилэфиры. Было показано, что 3- (IX) и 4-О-метилэфир (X) эфиры в реакцию не вступают, в то время как 2-О-метилэфир (VIII)

Выход и свойства дисахаридов (XII)–(XVIII) – продуктов реакции трансгликозилирования *

Соединение	Выход		R_f	т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20}$, град
	мг	% **			
XII	60	16,3	0,27	99–101	+81,6 (с 0,8)
XIII	35	8,8	0,51	121–123	–48,5 (с 0,8)
XIV	40	10,5	0,48	195–196	+100,3 (с 0,4)
XV	42	11,0	0,43	97–99	+64,1 (с 1,4)
XVI	17	4,9	0,48	Сироп	+100,2 (с 0,4)
XVII	32	9,0	0,41	132–133	+73,2 (с 1,4)
XVIII	30	7,5	0,27	79–81	–57,3 (с 0,5)

* (XII) – метил-О-(β-D-глюкопиранозил)-(1→3)-α-D-глюкопиранозид, (XIII) – метил-О-(β-D-глюкопиранозил)-(1→3)-β-D-ксилопиранозид, (XIV) – метил-О-(β-D-глюкопиранозил)-(1→3)-6-дезоксид-α-D-глюкопиранозид, (XV) – метил-О-(β-D-глюкопиранозил)-(1→3)-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозид, (XVI) – метил-О-(β-D-глюкопиранозил)-(1→3)-метил(α-D-глюкопиранозид)уронат, (XVII) – метил-О-(β-D-глюкопиранозил)-(1→3)-2-О-метил(α-D-глюкопиранозид), (XVIII) – β-D-глюкопиранозил-(1→3)-1,6-ангидро-β-D-глюкопираноза.

** В расчете на акцептор.

вступает в реакцию, но с эффективностью образования дисахаридов (ТСХ) меньшей, чем для андриоглюкозы (VII) (табл. 1).

Таким образом, определен участок в молекуле акцептора и предложена вероятная конформация, в которой акцептор вступает в реакцию трансгликозилирования. Для выяснения типа связи образующихся дисахаридов мы провели реакцию в препаративном варианте, используя в качестве акцепторов ряд соединений (I–VII). Образующиеся дисахариды (XII)–(XVIII) были выделены жидкостной колоночной хроматографией на силикагеле. Полученные результаты представлены в табл. 2. Интерпретация ¹³C-ЯМР-спектров дисахаридов (XII)–(XVIII) (табл. 3) не представляет сложности, так как в этих спектрах легко выделить сигналы атомов углерода β-глюкопиранозидного звена, а отнесение сигналов в звеньях акцепторов сделано с учетом известных эффектов метилирования и гликозилирования.

На обсуждении ¹³C-ЯМР-спектра дисахаридов (XVIII) остановимся подробнее. Незначительные сдвиги в сильное поле сигналов атомов С-1 и С-5 (на 0,5 и 0,4 м.д. соответственно, табл. 3) по сравнению с 1,6-ангидро-β-D-глюкозой (VII) [3] указывают на отсутствие связи с участием гидроксильных групп при С-2 и С-4 и косвенно свидетельствуют об образовании β-1,3-связи. Однако α-эффект для С-3 в этом случае составляет +7,0 м.д., а β-эффекты для С-2 и С-4 – соответственно –1,0 и –2,5 м.д., что существенно меньше по абсолютной величине, чем соответствующие эффекты метилирования для левоглюкозана [3]. Поэтому для доказательства типа связи в дисахариде (XVIII) мы использовали ¹H-ЯМР-спектроскопию ацетатов дисахаридов (XVIII) и модельных соединений (табл. 4). В этом случае химический сдвиг протона при С-3 в ацетате дисахаридов (XVIII) в сильное поле свидетельствует об образовании гликозидной связи с участием гидроксильной группы при С-3.

Как видно из этих данных, во всех изученных случаях имел место перенос гликозильного донора на гидроксильную группу при С-3 акцепторной молекулы с образованием β-глюкозидной связи с последующим гидролизом до накопления олигосахаридов. Таким образом, учитывая сложность и многоступенчатость олигосахаридных синтезов, связанных с временными защитами, данную реакцию можно предложить в качестве ферментативного подхода для удобных синтезов дисахаридов с β-1,3-связью, содержащих D-глюкозу на невозстанавливаемом конце.

¹³C-ЯМР-спектры дисахаридов (XII)–(XVIII) – продуктов трансгликозилирования соответствующих акцепторов (I)–(VII) и 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы (VII) [3]

Углерод	Дисахарид							VII (3)
	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	
C-1	99,8	104,2	99,7	98,9	100,3	97,2	101,7	102,2
C-2	71,5	72,9	71,6	34,8	71,1	80,9	70,0	71,0
C-3	83,5	85,1	83,0	77,3	82,1	81,2	80,3	73,3
C-4	68,8	68,5	74,2	69,8	70,5	68,8	69,1	71,6
C-5	72,1	65,2	68,0	72,7	71,3	72,0	76,6	77,0
C-6	61,3		17,5	61,5	172,3	61,3	65,5	65,9
C-1'	103,6	103,3	103,4	100,9	103,4	103,3	103,6	
C-2'	74,2	74,1	74,2	73,6	74,1	74,1	73,8	
C-3'	76,7	76,6	76,7	76,6	76,7	76,5	76,6	
C-4'	70,3	70,3	70,3	70,4	70,3	70,4	70,4	
C-5'	76,4	76,2	76,3	76,4	76,3	76,3	76,2	
C-6'	61,4	61,4	61,4	61,5	61,4	61,4	61,5	
MeO-1	55,7	57,5	55,7	55,1	56,2	55,5		
MeO-2						58,6		
MeO-6					53,7			

Таблица 4

¹H-ЯМР-спектры ацетатов метил-β-D-глюкопиранозида, 1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы и β-D-глюкопиранозил(1→3)-1,6-ангидро-β-D-глюкопиранозы

Атом	Ацетаты		
	Glcβ-OAc	A ₆ ¹ Glcβ	Glcβ1-3A ₆ ¹ Glcβ
H-1	4,45	5,47	4,48 5,44
H-2	5,00	4,61	5,02 4,45
H-3	5,21	4,87	5,25 3,72
H-4	5,12	4,65	5,13 4,83
H-5	3,72	4,63	3,75 4,62
H-6	4,30	4,10	4,27 4,05
H'-6	4,18	3,82	4,15 3,71
MeO-1	3,53		
Ac	2,00	2,12	2,01
»	2,03	2,15	2,02
»	2,05	2,18	2,08
»	2,10		2,09
»			2,15 [2]

Экспериментальная часть

Температуры плавления измеряли на приборе Boethius. Удельное вращение определяли на автоматическом поляриметре Perkin – Elmer M 141 в метаноле. ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектры записаны на спектрометре Bruker WM-250. ¹³C-ЯМР-спектры снимали в D₂O; внутренний стандарт – метанол (δ_{СН₃}, 49,6 м.д.). ¹H-ЯМР-спектры снимали в CDCl₃; внутренний стандарт – Me₄Si. ТСХ выполняли на импрегнированном силикагеле L 5–40 мкм (Chemapol). Для импрегнирования использовали 0,2 М раствор дигидрофосфата натрия [4]. Разделение проводили в системе: *n*-бутанол – ацетон – вода, 4 : 5 : 1. Для обнаружения использовали 30% H₂SO₄ в метаноле с последующим нагреванием до 120° С.

Эндо-1,3-β-глюканазу LIV из *S. sachalinensis* выделяли по методу [5]. Ламинарин получали из бурой водоросли *Laminaria cichorioides* [6]. Ме-

тил- α -*D*-глюкопиранозид — коммерческий препарат (Sigma). Метилгликозиды β -*D*-ксилопиранозы, 2-дезоксид- α -*D*-арабино-гексопиранозы, α -*D*-хинозозы, 2-*O*-метил- α -*D*-глюкопиранозы и метил(метил- α -*D*-глюкопиранозид)уронат синтезированы согласно методам [7—11]. Синтез 1,6-ангидро- β -*D*-глюкопиранозы (VII) и ее монометилловых эфиров (VIII) — (X) описан ранее [3].

Синтез 1,6-ангидро- β -*D*-галактопиранозы (XI) проведен аналогично [3] из *D*-галактозы. В колбу емкостью 0,5 л помещали 20 г сухой *D*-галактозы (Союзреактив, ч.) и перегоняли при 300° С в вакууме (14 мм рт. ст.) в приемник без охлаждения. Полученную жидкость (6 мл) упаривали в вакууме и хроматографировали на колонке с силикагелем градиентом метанола в хлороформе. Выход 0,8 г (4,4%). Т. пл. 220—222° С, $[\alpha]_D^{20}$ —22,7° (с 2,0). R_f 0,14 (хлороформ — метанол, 9:1). ¹³С-ЯМР: 101,4 (С-1), 75,0 (С-5), 72,0 (С-2), 70,9 (С-3), 64,9 (С-4), 64,1 (С-6). [12]: т. пл. 220—221° С, $[\alpha]_D^{21}$ —21,9° (вода). Отнесение сигналов совпадает с приведенным ранее [13].

Стандартная методика трансгликозилирования: ламинарин (2 мг), акцептор (2 мг) растворяли в 0,1 мл ацетатного буфера (рН 5,2), добавляли фермент ЛІV (3·10⁻² ед. акт. *) и оставляли на 6 ч.

Препаративный синтез дисахаридов. Реакционную смесь — ламинарин (200 мг), акцептор (200 мг), фермент ЛІV (1 ед. акт.) в 10 мл 0,05 М ацетатного буфера (рН 5,2) — выдерживали 1 сут при 20° С. Упаривали, наносили на колонку (1×20 см) с силикагелем L 40—60 мкм (Chemapol) и хроматографировали градиентом метанола в хлороформе.

Авторы выражают благодарность А. И. Калиновскому за съемку и интерпретацию ¹H-ЯМР-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Назарова Н. И., Елякова Л. А. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 9. С. 1189—1196.
2. Звягинцева Т. Н., Евтушенко Е. В., Елякова Л. А. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1206—1213.
3. Евтушенко Е. В., Оводов Ю. С. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1116—1122.
4. Ovodov Yu. S., Evtushenko E. V., Vaskovsky V. E., Ovodova R. G., Solov'eva T. F. // J. Chromatogr. 1967. V. 26. № 1. P. 111—115.
5. Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. E. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 212. № 1. P. 382—393.
6. Elyakova L. A., Zvyaginiseva T. N. // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. № 2. P. 241—248.
7. Hudson C. S. // J. Chem. Soc. 1925. V. 47. P. 265—268.
8. Hughes I. W., Overend W. G., Stacey M. // J. Chem. Soc. 1949. P. 2846—2849.
9. Hanessian S., Ponpipom M. M., Lavalley P. // Carbohydr. Res. 1972. V. 24. № 1. P. 45—56.
10. Евтушенко Е. В., Оводов Ю. С. // Химия природных соединений. 1982. № 1. С. 21—23.
11. Евтушенко Е. В., Оводов Ю. С. // Химия природных соединений. 1987. № 1. С. 35—37.
12. Michel F. // Ber. 1929. B. 62. № 2—3. S. 687—693.
13. Ritchie R. G. S., Cyr N., Perlin A. S. // Can. J. Chem. 1976. V. 54. № 14. P. 2301—2309.

Поступила в редакцию
29.X.1990

После доработки
25.IX.1991

* 1 ед. акт. фермента — количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль глюкозы в 1 мин. Восстанавливающие сахара определяли методом Нельсона.

E. V. EVTUSHENKO, L. A. ELYAKOVA

ENZYMIC SYNTHESIS OF SOME β -1,3-*D*-GLUCOPYRANOSYLGLYCOSES

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

As shown by ^{13}C NMR spectroscopy, the transfer of laminarioligosaccharides residues to the acceptor catalyzed by endo-1,3-glucanase L IV from *Spisula sachalinensis* leads to formation of the β -1,3-glucosidic bond in all cases studied. *D*-Glucose homomorphous monosaccharides were used as acceptors. A convenient enzymic synthesis of a series of disaccharides with β -1,3-bond, containing *D*-glucose at the non-reducing end, is suggested.