



УДК 577.154.26.02

КАРТИРОВАНИЕ АКТИВНОГО ЦЕНТРА  
N-АЦЕТИЛ- $\beta$ -D-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗЫ  
ИЗ ЭПИДИДИМИСА ХРЯКА

*Колесников В. Б., Хорлин А. Я., Шульман М. Л.*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Проведено картирование активного центра высокоочищенной N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы  $V_1$  из эпидидимиса хряка. Для этой цели были использованы следующие субстраты и ингибиторы: фенол- или *n*-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминиды и соответствующие им дезоксианалоги, 1,5-ангидро-N-ацетилглюкозаминит и олигосахариды хитина. Определены вклады каталитического (гликонового) участка A и «агликоновых» участков B и C в изменение свободной энергии реакций образования фермент-субстратных и фермент-ингибиторных комплексов, а также вклады отдельных функциональных групп отщепляемого остатка N-ацетилглюкозамина при его сорбции на каталитическом участке A активного центра. Обсуждается взаимосвязь между специфичностью фермента и сорбционными свойствами его активного центра. На основании полученных и литературных данных предполагается, что различная субстратная специфичность гликозидаз, в том числе и глюкозаминидаз, скорее всего объясняется различием сорбционных свойств агликоновых участков их активных центров.

N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы (КФ 3.2.1.30) из разных источников, катализирующие гидролитическое отщепление остатков 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкопиранозы от олигосахаридов, гликопептидов, гликолипидов и гликопротеинов, находят широкое применение в структурной химии углеводов. Глюкозаминидазы обладают рядом общих свойств, характерных для гликозидаз [1—3]. Вместе с тем они различаются по субстратной специфичности.

Очевидно, что общие особенности механизма действия, так же как и различия в специфичности ферментов, должны в первую очередь определяться общностью и различиями строения и свойств их активных центров. Поэтому сравнительное изучение активных центров N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидаз различного происхождения — необходимый этап в исследовании их механизма действия и специфичности, важный для понимания биологической функции и для характеристики ферментов как инструментов структурного анализа углеводов.

В такого рода исследованиях многообещающие возможности открывает метод картирования активных центров [4—7]. Он позволяет определить их размеры, выраженные числом сорбционных участков, на которых в фермент-субстратном комплексе локализуются моносахаридные звенья субстрата, и оценить вклады этих участков, так же как и вклады отдельных функциональных групп субстрата, в суммарную величину изменения свободной энергии реакции образования фермент-субстратного комплекса. Метод оказался информативным при изучении активных центров ли-

Физические константы субстратов и ингибиторов

Соединение *		Т. пл., °С	$[\alpha]_D^{20-23}$ , град.	Ссылка на метод получения **
GlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub>	(I)	211—212	—22	[11]
6-deGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub>	(II)	214—215 (разл.)	—13	
4-deGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub>	(III)	179—180 (разл.)	—11	
3-deGlcNAc $\beta$ 1-OPh	(IV)	176—177	—32	
GlcNAc $\beta$ 1-OPh	(V)	239—240	—10	[12]
4-OMeGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub>	(VI)	211—212	—14	
6-OMeGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub>	(VII)	182—183	—36	
GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc	(VIII)	256—258	15	[13]
GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc	(IX)	305—308	2	[13]
GlcNAc $\beta$ 1-6GlcNAc	(X)	196—198	—4,5	[14]
2-Ацетамидо-2-дезоксиглюкопиранозид	(XI)	206—207	2,4	[15]
GlcNAc ***	(XII)	194—196	40	
Glc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> ***	(XIII)	164—165	—95	

\* Сокращения производных сахаров даны в соответствии с рекомендациями IUPAC (Biochem. J. (1966), 101, 1), например, 6-deGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO<sub>2</sub> — *n*-нитрофенил-2-ацетамидо-2,6-дидезокси- $\beta$ -D-глюкопиранозид.

\*\* Для соединений, где ссылки нет, метод получения будет опубликован в отдельном сообщении.

\*\*\* Препарат фирмы «Chemapol» (ЧССР) дважды перекристаллизовывали из спирта.

зоцима [4],  $\alpha$ -амилазы [5], глюкоамилазы [6], N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы из *Asp. oryzae* [7]. К сожалению, до настоящего времени этот метод не использовался для сравнительного изучения сорбционных свойств одноклассовых гликозидаз из различных источников.

Ранее нами были опубликованы предварительные результаты картирования активного центра N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы из эпидидимуса хряка [8]. В настоящей работе описывается подробная характеристика сорбционных свойств активного центра этого фермента, полученная методом картирования. Набор субстратов и ингибиторов, выбранный для этой цели, практически не отличался от использованного при картировании активного центра глюкозаминидазы из *Asp. oryzae* [7]. Это позволило выявить определенную корреляцию между специфичностью обеих глюкозаминидаз и сорбционными свойствами их активных центров.

Глюкозаминидаза  $V_1$ , описанная ранее [9], была разделена хроматографией на СМ-целлюлозе (см. рисунок) на два компонента, которые мы обозначили глюкозаминидазами  $V_1'$  и  $V_1''$ . Соотношение удельных активностей этих гликозидаз составляло 1 : 1,5 (ср. [10]); в настоящей работе использовали глюкозаминидазу  $V_1''$ .

Синтез некоторых субстратов и ингибиторов был осуществлен по видоизмененным нами методикам, которые оказались удобнее, чем описанные в литературе. Сведения о субстратах и ингибиторах, использованных в работе, суммированы в табл. 1.

Величины  $K_m$  и  $V$  энзиматического гидролиза субстратов (I) — (VII) глюкозаминидазой  $V_1''$  определяли в стандартных условиях, значения  $K_i$  для ингибиторов (VIII) — (XIII) измеряли в реакции ферментативного гидролиза *n*-нитрофенил-2-ацетамидо-2-дезоксиглюкопиранозид (I). Поскольку гидролиз олигосахаридов (VIII) — (X) глюкозаминидазой  $V_1''$  протекал с низкой скоростью, сродство этих субстратов к активному центру определено по их величинам  $K_i$  в ферментативном гидролизе суб-

Величины  $K_m$ ,  $K_i$ ,  $V$  и  $-\Delta G$  субстратов и ингибиторов

Субстрат или ингибитор	$K_m$ или $K_i$ , мМ	$V$ , мкмоль/мин·мг	$-\Delta G$ , ккал/моль
GlcNAc $\beta$ 1-4-OPhNO <sub>2</sub> (I)	1,1	1870	6,7
6-deGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> (II)	1,7	200	6,4
4-deGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> (III)	12,5	360	5,2
3-deGlcNAc $\beta$ 1-OPh (IV)	11,0	45	5,3
GlcNAc $\beta$ 1-OPh (V)	2,1	390	6,2
Glc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> (XIII)	400 *	Не гидролизуется	3,1
1,5-Ангидро-N-ацетилглюкозаминит (XI)	1,6 *		6,5
4-OMeGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> (VI)	8,7		222
6-OMeGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> (VII)	2,6	62	6,2
GlcNAc (XII)	4,9 *		5,8
GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc (VIII)	13,9 *		5,1
GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc (IX)	27,8 *		4,7
GlcNAc $\beta$ 1-6GlcNAc (X)	5,9 *		5,7

\* Значение  $K_i$ .

страта (I). Ингибирование ферментативной активности олигосахаридами (VII) — (X) и ингибиторами (XI) — (XIII) имело выраженный конкурентный характер. Найденные значения  $K_m$  и  $K_i$  приведены в табл. 2. Изменение свободной энергии реакций образования фермент-субстратных или фермент-ингибиторных комплексов ( $-\Delta G$ ) рассчитывали по уравнению

$$-\Delta G = -(RT \ln K + T\Delta S),$$

где  $K$  —  $K_m$  или  $K_i$ ,  $\Delta S$  — энтропия смешения, равная  $-8$  э.е. [4]; тогда значение  $T\Delta S$  в условиях ферментативного гидролиза (37°) составляет  $-2,5$  ккал/моль. Полагали, что значения  $K_m$  близки по значению константам диссоциации соответствующих фермент-субстратных комплексов ( $K_s$ ).

Расчитанные таким образом величины изменений свободной энергии комплексообразования приведены в табл. 2. Вклады каждой из функциональных группы 2-ацетиамидо-2-дезоксиглюкопиранозильного остатка (гликоновая, отщепляемая часть субстрата) определяли как разность изменений свободных энергий сорбции субстрата и соответствующего модифицированного субстрата, не имеющего этой функциональной группировки. Полученные результаты суммированы в табл. 3, в которой для сравнения приведены также величины вкладов функциональных групп гликоновой части субстрата, определенные в реакциях комплексообразования для глюкозаминидазы из *Asp. oryzae* [7].

Полученные суммарные вклады гликоновой части субстрата в изменение свободной энергии комплексообразования оказались близкими изменению свободной энергии сорбции в активных центрах 1,5-ангидро-2-ацетиамидо-2-дезоксиглюциита (XI): 6,5 ккал/моль для глюкозаминидазы  $V_1''$  и 5,6 ккал/моль — для глюкозаминидазы из *Asp. oryzae*.

Вклады моносахаридных остатков олигосахаридов хитина (VIII) и (IX) в суммарное изменение свободной энергии при сорбции их в активном центре глюкозаминидазы  $V_1''$  рассчитывали следующим образом: вклад первого «агликонового» участка (B) определяли из разности свободных энергий сорбции олигосахарида (VIII) и 1,5-ангидро-N-ацетилглюкозаминита (XI), вклад второго «агликонового» участка (C) — из разности свободных энергий сорбции олигосахаридов (IX) и (VIII). Ниже сопоставля-

Таблица 3

Вклады функциональных групп ( $-\Delta g_i$ , ккал/моль) остатка 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкопиранозы в изменение свободной энергии сорбции на каталитическом участке активных центров глюкозаминидазы из эпидидимиса хряка и *Asp. oryzae* [7]

Расчет $-\Delta g_i$	Функциональные группы	Для глюкозаминидазы $B_1''$	Для глюкозаминидазы <i>Asp. oryzae</i>
$-\Delta g_2 = -(\Delta G^I - \Delta G^{XIII})$	$C_{(2)} - \text{NHCOCH}_3$	3,6	3,4
$-\Delta g_3 = -(\Delta G^V - \Delta G^{IV})$	$C_{(3)} - \text{OH}$	0,9	1,1
$-\Delta g_4 = -(\Delta G^I - \Delta G^{III})$	$C_{(4)} - \text{OH}$	1,5	1,1
$-\Delta g_6 = -(\Delta G^I - \Delta G^{II})$	$C_{(6)} - \text{OH}$	0,3	0,35
		Сумма 6,3	5,95

ются полученные таким образом значения вкладов сорбционных участков с результатами картирования активного центра глюкозаминидазы из *Asp. oryzae* [7]:

	A	B	C
Глюкозаминидаза $B_1''$	-6,5	+1,4	+0,4
Глюкозаминидаза из <i>Asp. oryzae</i>	-5,6 (-5,9)	-2,6	-0,6

При сравнении сорбционных свойств активных центров глюкозаминидазы  $B_1''$  и глюкозаминидазы из *Asp. oryzae* обращает на себя внимание близость сорбционной способности каталитических (гликоновых) участков активных центров, на которых сорбция энергетически наиболее выгодна. Вклады отдельных функциональных групп остатка N-ацетилглюкозамина в суммарное изменение свободной энергии его сорбции на этих участках также близки (табл. 3), что, по-видимому, свидетельствует об их сходной роли в образовании продуктивных фермент-субстратных комплексов. Наибольший вклад вносит ацетамидная группировка:  $-3,6$  ккал/моль в случае глюкозаминидазы  $B_1''$  и  $-3,4$  ккал/моль — в случае глюкозаминидазы из *Asp. oryzae*. Замена этой группировки на гидроксильную полностью лишает субстрат способности гидролизываться глюкозаминидазой  $B_1''$  (табл. 2) и ферментом из *Asp. oryzae* [7]. Это указывает на то, что в обоих случаях ацетамидная группировка отщепляемого остатка N-ацетилглюкозамина играет решающую роль в образовании продуктивных фермент-субстратных комплексов. По данным работы [7], изменение свободной энергии сорбции ацетамида в активном центре глюкозаминидазы из *Asp. oryzae*, который является конкурентным ингибитором фермента, составляет  $-3,7$  ккал/моль. Вклад ацетамидной группы в изменение свободной энергии связывания остатка N-ацетилглюкозамина на участке C активного центра лизоцима равен  $-3$  ккал/моль [4]. Близость энергий связывания ацетамидной группы разных субстратов, по-видимому, указывает на однотипный характер взаимодействия ее с группировками активных центров глюкозаминидаз и лизоцима. В последнем случае оно сводится к образованию двух водородных связей, а также гидрофобных контактов. Следует, однако, отметить, что при сорбции моносахаридного остатка на каталитическом участке D активного центра лизоцима ацетамидная группа не является существенно необходимой для реализации катализа. На это указывает тот факт, что модифицированный субстрат  $\text{GlcNAc}\beta\text{1-4Glc}\beta\text{1-ORhNO}_2$  расщепляется лизоцимом, образуя нитрофенол и дисахарид, причем локализацию моносахаридных остатков этого субстрата на участках C и D активного центра следует считать доказанной на основании данных рентгеноструктурного анализа [16].

По сравнению с ацетамидной группировкой каждая из гидроксильных групп вносит меньший вклад в энергию сорбции остатка N-ацетилглюкозамина на каталитическом участке активного центра глюкозаминидаз. Существенно, что ни одна из этих группировок в случае обеих глюкозаминидаз не играет решающей роли в образовании продуктивных комплексов. По нашим данным, глюкозаминидаза  $V_1''$  способна гидролизовать не только фенил- или *n*-пिटрофенилглюкозаминиды, но и их дезоксианалоги (табл. 2 и 5). Замещение гидроксильной группы на метоксильную также не лишает субстрат возможности гидролизоваться глюкозаминидазой  $V_1''$ . Аналогичную картину можно наблюдать и для глюкозаминидазы из *Asp. oryzae* [7].

В этой связи интересно сопоставить роль гидроксильной группы при  $C_{(6)}$  остатка N-ацетилглюкозамина в реализации ферментативного ката-

Таблица 4

Относительная скорость (в %) ферментативного гидролиза  
*n*-нитрофенилглюкозаминидов  
Цитратно-фосфатный буфер (рН 4, 5, и 0,1), концентрация фермента  
4,5 мкг/мл, время инкубации 8 мин, 37°

Субстрат	Концентрация субстрата, мМ	
	5,0	1,7
GlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> (I)	100	100
6-deGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> (II)	47	31
4-deGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> (III)	40	21
4-OMeGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> (VI)	45	24
6-OMeGlcNAc $\beta$ 1-OPhNO <sub>2</sub> (VII)	28	17

лиза глюкозаминидазами и лизоцимом куриных яиц. Именно эта группировка создает пространственные затруднения при сорбции моносахаридного остатка на каталитическом участке *D* активного центра лизоцима и обуславливает положительный вклад этого участка в суммарное изменение свободной энергии образования лизоцим-субстратного комплекса [4]. Филлиппс и др. [17] считают, что эти пространственные затруднения, приводящие к искажению конформации моносахаридного остатка, являются одним из факторов, обеспечивающих катализ. Осава [18] показал, что замещение гидроксильного при  $C_{(6)}$  на атом водорода полностью лишает субстрат способности гидролизоваться с расщеплением гликозидной связи у модифицированного остатка сахара. Результаты изучения вторичного изотопного эффекта в ферментативном гидролизе позволяют считать наиболее вероятным гидролиз субстратов лизоцима по механизму  $S_N1$ , включающему образование гликозилкатиона на скорости лимитирующей стадии [19—21].

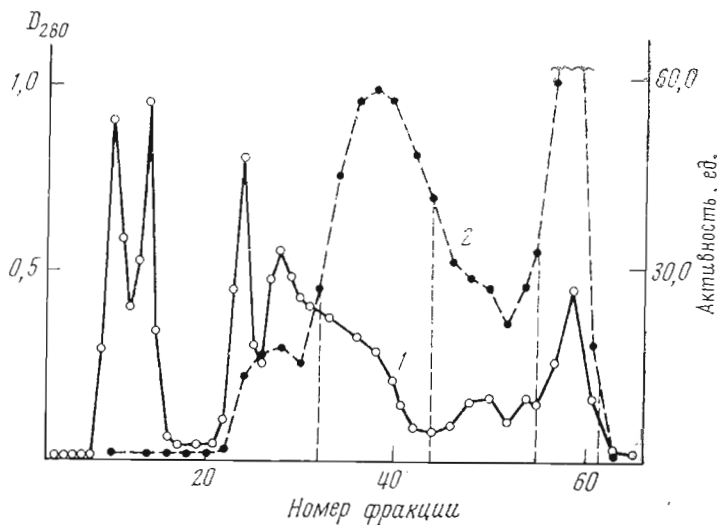
Таким образом, из приведенных выше данных следует, что для реализации катализа глюкозаминидазами гидроксильная группа при  $C_{(6)}$  субстрата не играет решающей роли, как в случае лизоцима. Этот факт позволяет предположить, что глюкозаминидазы отличаются по механизму действия от лизоцима.

Глюкозаминидаза  $V_1''$  и фермент из *Asp. oryzae*, имеющие близкие по свойствам каталитические участки, резко различаются по сорбционной способности «агликоновых» участков активных центров. Как видно из сопоставления вкладов этих участков в изменение свободной энергии образования комплексов ферментов с олигосахаридами (VIII) и (IX), сорбция на «агликоновых» участках *B* и *C* глюкозаминидазы  $V_1''$  энергетически невыгодна в отличие от сорбции на аналогичных участках активного центра глюкозаминидазы из *Asp. oryzae*. При этом оба фермента резко различают-

ся по субстратной специфичности: гидролиз олигосахаридов хитина глюкозаминидазой из *Asp. oryzae* протекает с гораздо большей скоростью, чем гидролиз, катализируемый глюкозаминидазой  $B_1''$  (ср. [7] и [22]). На основании этих данных можно прийти к выводу, что субстратная специфичность рассматриваемых в настоящей работе глюкозаминидаз при прочих равных условиях определяется сорбционными свойствами «агликоновых» участков их активных центров: чем выше сорбционные свойства этих участков в реакциях образования фермент-субстратных комплексов, тем большую специфичность обнаруживает фермент. Не исключено, что и в случае других гликозидаз [23—25] специфичность по отношению к структуре агликоновой части олигосахаридной цепи субстрата в первую очередь должна определяться сорбционными свойствами «агликоновых» участков их активных центров.

### Экспериментальная часть

*N*-ацетил- $\beta$ -*D*-глюкозаминидаза  $B_1''$ . Из эпидидимисов взрослых хряков получали сульфатаммонийную фракцию (30—55% насыщения) и хроматографировали на DEAE-целлюлозе по ранее описанному методу [9] выделяли компонент  $B_1$  с удельной активностью 190 ед/мг белка. Компонент  $B_1$  в натрий-цитратно-фосфатном буфере (рН 6,6,  $\mu$  0,02) хроматогра-



Хроматография препарата глюкозаминидазы  $B_1$  на CM-целлюлозе.  
1 — поглощение при 280 нм, 2 — активность фермента

фировали при 4° на CM-целлюлозе (колонка 2,5 × 37 см, CM-32 «Whatman»). Элюцию проводили 75 мл цитратно-фосфатного буфера, а затем 200 мл 0,09 M и 150 мл 0,57 M NaCl в том же буфере и собирали фракции по 7,3 мл. Результаты фракционирования представлены на рисунке. После диализа и лиофилизации фракции 32—44 (глюкозаминидаза  $B_1'$ ) и 55—61 (глюкозаминидаза  $B_1''$ ) имели удельную активность 260 и 400 ед/мг белка соответственно. В присутствии 0,01% бычьего сывороточного альбумина глюкозаминидаза  $B_1''$  имела удельную активность 600 ед/мг белка. При 4° в цитратно-фосфатном буфере (рН 4,5,  $\mu$  0,1) глюкозаминидаза  $B_1''$  (концентрация 400 мкг/мл) сохраняла активность в течение 4 сут. В лиофилизованном виде фермент  $B_1''$  сохраняет удельную активность при 0° в течение одного года.

За единицу активности принимали такое количество фермента, при котором образуется 1 мкмоль *n*-нитрофенола за 1 мин из *n*-нитрофенил-*N*-

ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминида (концентрация субстрата 1 мг/мл, цитратно-фосфатный буфер, рН 4,5,  $\mu$  0,1; 37°). Белок определяли по методу Лоури [26].

Субстраты и ингибиторы получали как указано в табл. 1.

Ферментативный гидролиз субстратов проводили в цитратно-фосфатном буфере (рН 4,5,  $\mu$  0,1). Раствор субстрата (0,9 мл) соответствующей концентрации и фермента (0,1 мл, концентрация 3 мкг/мл) инкубировали при 37° и к аликвотам (по 0,2 мл), отбираемым через фиксированные промежутки времени (от 4 до 30 мин), добавляли 0,2 М углекислый натрий (2 мл). Образовавшийся *p*-нитрофенол определяли спектрофотометрически при 400 нм. Концентрации субстратов (мМ): 2—6,2 (I), 3,0—9, 1 (II), 2,0—5,6 (III), 0,5—2,3 (VI) и 0,6—3,0 (VII). Здесь и далее приведены конечные концентрации реагентов.

Ферментативный гидролиз субстратов (IV) и (V) изучали в тех же условиях. К отбираемым аликвотам прибавляли 2 мл 5%-ного раствора углекислого натрия и 1 мл реагента Фолина, разбавленного в 5 раз [7], смесь выдерживали 20 мин при 37° и оптическую плотность измеряли при 660 нм. Количество фенола, образовавшегося при ферментативном гидролизе, определяли по калибровочному графику. Концентрации субстратов (мМ): 1,0—3,3 (IV) и 2,0—5,9 (V). Величины  $K_m$  и  $V$  субстратов определяли по методу Лайнуивера — Берка.

Ингибирование ферментативного гидролиза субстрата (I) олигосахаридами (VIII) — (X) и соединениями (XI) — (XIII) изучали в условиях, аналогичных условиям гидролиза субстратов. К смеси субстрата (I) и ингибитора соответствующей концентрации прибавляли раствор фермента (0,1 мл) и через 5, 10, 15, 20 и 25 мин прибавляли 0,2 М углекислый натрий. Образовавшийся нитрофенол определяли спектрофотометрически при 400 нм. Величины  $K_i$  находили из зависимости  $1/v_i - [I]$  при 0,4 и 1,0 мМ концентрации субстрата (I) по методу Диксона. Концентрации ингибиторов (мМ): 5,4—31,9 (VIII), 0,6—7,7 (X), 1,0—2,8 (XI), 1,9—18,6 (XII) и 50—200 (XIII). Число повторных определений скорости освобождения фенола или нитрофенола во всех случаях составляло 2—4. Значения  $K_m$ ,  $V$  и  $K_i$  рассчитывали по методу наименьших квадратов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Хорлин А. Я. (1974) в сб. Структура и функции активных центров ферментов, с. 39—69, «Наука», М.
2. Khorlin A. Ya., Zurabyan S. E., Dubrovina N. I., Bystrov V. F., Vikha G. V. (1972) Carbohydr. Res., 21, 316—319.
3. Levvy G. A., Snaith S. M. (1972) Advances Enzymol., 36, 151—181.
4. Chipman D. M., Sharon N. (1969) Science, 165, 454—465.
5. Thoma J. A., Rao G. V. K., Brothers C., Spradlin J., Li L. H. (1971) J. Biol. Chem., 246, 5621—5635.
6. Hiromi K. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 40, 1—6.
7. Mega T., Ikenaka T., Arita H., Fukukawa K., Matsushima Y. (1973) J. Biochem., 73, 55—60.
8. Колесников В. В., Шульман М. Л., Хорлин А. Я. (1974) Биохимия, 39, 1311—1313.
9. Виха Г. В., Хорлин А. Я., Каверзинева Е. Д. (1971) Биохимия, 36, 33—41.
10. Leaback D. H., Walker P. G. (1967) J. Biochem., 104, 70—71P.
11. Зурабян С. Э., Волосюк Т. П., Хорлин А. Я. (1968) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1612—1614.
12. Leaback D. H., Walker P. G. (1957) J. Chem. Soc., 4754—4760.
13. Barker S. A., Foster A. B., Stacey M., Webber J. M. (1958) J. Chem. Soc., 2218—2227.
14. Шульман М. Л., Абрамова Г. В., Пискаева В. П., Хорлин А. Я. (1971) Изв. АН СССР. Сер. хим., 630—632.
15. Meyer zu Reckendorf W., Bonner W. A. (1961) Chem. Ber., 94, 2431—2436.
16. Beddell C. R., Moulton J., Phillips D. C. (1970) in Molecular properties of drug receptors (Porter R., O'Conner M. L., eds.), pp. 85—112.
17. Blake C. C. F., Johnson L. N., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R. (1967) Proc. Roy. Soc., 167B, 378—388.
18. Osawa T. (1968) Carbohydr. Res., 7, 217—220.

19. Dahlquist F. W., Rand-Meir T., Raftery M. A. (1969) *Biochemistry*, 8, 4214—4221.
20. Mohr L. H., Smith E. H., Raftery M. A. (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 159, 505—511.
21. Smith E. H., Mohr L. H., Raftery M. A. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, 95, 7497—7500.
22. Виха Г. В., Каверзинева Е. Д., Шульман М. Л., Хорлин А. Я. (1972) *Биохимия*, 37, 322—328.
23. Muramatsu T., Egami F. (1967) *J. Biochem.*, 62, 700—709.
24. Muramatsu T. (1968) *J. Biochem.*, 64, 521—531.
25. Walker P. G. (1966) in *The Amino Sugars* (Balazs E. A., Jeanloz R. W., eds.), vol. IIB, pp. 155—169, Acad. Press Inc., N. Y.
26. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275.

Поступила в редакцию  
10.VII.1975

## SUBSITE MAPPING OF THE ACTIVE SITE OF PIG EPIDIDYMAL N-ACETYL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDASE

KOLESNIKOV V. V., KHORLIN A. Ya., SHULMAN M. L.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The subsite mapping of the active site of highly purified pig epididymal N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase B<sub>1</sub> was carried out with the aid of the following substrates and inhibitors: phenyl or *p*-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide and their deoxy analogs, 1,5-anhydro-N-acetyl-glucosaminitol and chitin oligosaccharides. From the data for saccharides differing by the occupation of only one subsite, the contribution to the free energy change of the enzyme-saccharide interactions at each subsite was calculated. The contribution to the binding of each hydroxyl group, defined as partial binding free energy, was estimated from the difference between phenyl or *p*-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide and their deoxy analogs. The relationship between the enzyme specificity and the active site sorption properties was discussed. Based on the experimental results and data in literature, the suggestion was made that the differences in substrate specificity of glucosidases, including glucosaminidase, are accounted for by the differences in sorption properties of the «aglycon» subsites of their active sites.