



УДК 577.154.26.02

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ИЗУЧЕНИЕ
СОРБИЦИОННЫХ СВОЙСТВ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ
ЭНДО- β -1,3-ГЛЮКАНАЗ ИЗ МОРСКИХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Елякова Л. А., Звягинцева Т. Н., Пивалова Н. М.

*Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного научного центра Академии наук СССР, Владивосток*

Методом картирования проведено сравнительное изучение активных центров трех эндо- β -1,3-глюканаз (ЛО, ЛIII, ЛIV) из морских беспозвоночных. Показано, что наибольшую протяженность имеет активный центр ЛО, наименьшую — ЛIII. Рассчитано сродство к мономерным остаткам субстрата трех участков связывания в активном центре глюканазы ЛIV. Сделано предположение, что этот фермент при действии на полимерный субстрат реализует механизм множественной атаки.

Между отдельными эндо- β -1,3-глюканазами (1,3-(1,3; 1,4)- β -D-глюкан-3(4)-глюканогидролазы, КФ 3.2.1.6), имеющими ряд общих каталитических свойств, наблюдаются существенные различия (различная специфичность по отношению к субстратам со смешанными типами β -глюкозидных связей, различия в скоростях гидролиза одинаковых олигосахаридов, в продуктах катализируемых ферментами реакций [1, 2] и т. д.). Причину таких различий следует искать прежде всего в том, что активные центры β -1,3-глюканаз содержат ряд участков сорбции мономерных остатков субстрата, при этом их число, сорбционные свойства и взаимное расположение в активных центрах ферментов строго индивидуальны. Сравнительная характеристика активных центров карбогидраз может быть получена картированием их с помощью субстратов известной структуры [3, 4].

Картирование активных центров карбогидраз предполагает определение количества участков сорбции мономерных остатков субстрата в активном центре ферментов, положения каталитического участка и сродства (A_i) отдельных участков связывания к мономерным остаткам субстрата. Для картирования активных центров нами был использован подход Хиромы [4], основанный на экспериментальном определении кинетических характеристик (K_m и V) процесса ферментолиза ряда субстратов, различающихся степенью полимеризации. Число участков сорбции определяется степенью полимеризации того субстрата, начиная с которого значение V реакции становится постоянным. Положение каталитического участка в активном центре определяют, основываясь на структуре продуктов ферментолиза различных субстратов. Величины A_i рассчитываются из значений K_m и V для различных субстратов по формулам, выведенным Хиромы.

В настоящей работе определены кинетические константы (K_m и V) гидролиза различных субстратов тремя эндо- β -1,3-глюканазами из дву-

створчатых моллюсков (ЛIII и ЛIV из *Spisula sachalinensis* и ЛЮ из *Chlamys abbidus*). Набор определенных нами кинетических констант позволил сравнить активные центры ферментов и оценить сорбционные свойства некоторых участков связывания в активном центре ЛIV.

Для картирования активных центров глюканаз ЛЮ, ЛIII и ЛIV мы использовали следующие субстраты: ламинарибиозу, ламинаритриозу, смесь нерастворимых в холодной воде ламинариполисахаридов со среднечисловой степенью полимеризации 8, нерастворимый β -1,3-глюкан — продукт деградации ламинарина по Смиту, растворимый ламинарин из *Laminaria cycharioides*, а также коммерческие препараты нерастворимого ламинарина из *Laminaria hyperborea*, лишенина из мха *Cetraria islandica*, глюкана ячменя и β -1,3-глюкана из *Sclerotium rolfsii* с β -1,6-разветвлениями при каждом третьем остатке глюкозы в его цепи.

Для определения K_m и V реакций, катализируемых глюканазой ЛIV, были использованы метод Нельсона [5], который регистрирует возрастание восстанавливающей способности в процессе реакции и характеризует общую сумму продуктов ферментолита, и глюкозооксидазный метод [6], определяющий количество глюкозы в смеси продуктов. Активность по отношению к глюкану ячменя определяли методом Нельсона и вискозиметрически [7].

Кинетические параметры гидролиза различных субстратов ламинариназами, полученные путем обработки данных ферментолита по методу Лайнуивера — Берка, приведены в таблице.

Разветвленный β -1,3-глюкан из *Sclerotium rolfsii* не гидролизуются нашими ферментами. Следовательно, можно предположить, что активные центры исследуемых глюканаз имеют более двух участков связывания и поэтому из-за пространственных затруднений не способны сорбировать разветвленный глюкан. Степень гидролиза лишенина (молекула лишенина состоит из блоков, внутри которых остатки глюкозы связаны либо β -1,3-, либо β -1,4-связями; $(\beta$ -1,3)/ $(\beta$ -1,4)=1 : 2) глюканазой ЛIV составляет 4,5%, ЛIII — 8,5%. По-видимому, для глюканазы ЛIV в лишенине имеется меньше доступных гидролизу связей, чем для фермента ЛIII, и соответственно можно предположить, что активный центр ЛIV должен быть больше, чем у ЛIII.

Обращает на себя внимание то, что глюканазы ЛIII гидролизует лишенин в три раза медленнее, чем ламинарин, в то время как ЛIV — в 20 раз медленнее (таблица). Этому соответствуют также данные по гидролизу глюканазы ЛIII и ЛIV глюкана овса (β -1,3; β -1,4-глюкана) (таблица), полученные в нашей лаборатории ранее [1]. Сродство ЛIII к лишенину больше, чем ЛIV. Из этих данных вытекает, что активный центр глюканазы ЛIII меньше, чем у ЛIV. Возможно также, что активный центр ЛIII обладает сродством к остаткам целлобиозы и связывает их таким образом, что при этом облегчается гидролиз соседних β -1,3-связей.

С целью сравнительного изучения эндоферментов была определена их способность снижать вязкость растворов глюкана ячменя. Было выяснено, что наибольшей активностью по отношению к глюкану ячменя обладает ламинариназа ЛIII, в 14 раз меньшей — ЛIV, в 18 раз меньшей — ЛЮ. Данные, полученные вискозиметрическим методом, согласуются с результатами определения восстанавливающей способности методом Нельсона (таблица). По-видимому, пониженная скорость ферментолита глюканазой ЛЮ этого субстрата свидетельствует о наибольшей протяженности ее активного центра.

Исследование зависимости K_m и V от степени полимеризации субстратов показало, что максимальные скорости гидролиза ламинариполисахаридов, а также сродство ламинариназ к ним увеличиваются с увеличением степени полимеризации, что типично для гликаназ (таблица). Нужно отметить, что сродство ЛIII к низкомолекулярным субстратам выше, чем ЛIV, а ЛIV выше, чем ЛЮ. В таком же порядке повышаются и скорости

Кинетические параметры действия β-1,3-глюканаз на различные субстраты, определенные глюкозооксидазным методом (А) и методом Нельсона (Б)

Субстраты	СП *	ЛІV						ЛІІІ						ЛІ0			
		А		Б		В		А		Б		В		А	Б		
		К м	V	К м	V	К м	V	К м	V	К м	V	К м	V	К м	V		
		10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁵ М. ·МИН ⁻¹	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁵ М. ·МИН ⁻¹	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁵ М. ·МИН ⁻¹	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁵ М. ·МИН ⁻¹	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁵ М. ·МИН ⁻¹	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁵ М. ·МИН ⁻¹	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁵ М. ·МИН ⁻¹		
Ламинарибиоза	2	41	3,9	47	160	3,9	20	17	60	1,1	35	94	3,1	60	300	3,3	44
Ламинаритриоза	3	66	5,6	60	300	5,6	30	40	200	1,9	50						50
Нерастворимые ламинариолиго-сахариды	8			20	250	20	110										
Ламинарин <i>L. hureborea</i>	24			5,6	200	25	120										
β-1,3-Глюкан	26			7	300	20	110										
Ламинарин <i>L. sucharioides</i>	30	13	8,3	5	250	18,5	100	5	260	3,7	100			14	700	31	100
Лихенин				6	280	1,1	4		140	1,1	35						4,5
Глюкан ячменя				4			3				80						4
Глюкан овса				0			0				50						0
Глюкан <i>S. rotfsii</i>																	

* Степень полимеризации.

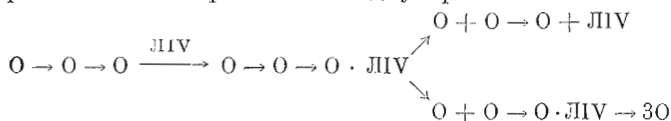
** Относительно V гидролиза ламинарина *L. sucharioides*.

гидролиза олигосахаридов относительно скорости гидролиза ламинарина: так, если ламинариназа ЛIII гидролизует ламинаритриозу в 2 раза медленнее, чем ламинарин, ЛIV — в 3 раза медленнее, то ЛО — в 10 раз (таблица). Это подтверждается и данными по гидролизу смеси олигосахаридов (СП 8): глюканазы ЛIII и ЛIV гидролизуют их со скоростью, равной скорости гидролиза ламинарина, ЛО — со скоростью, вполонину меньшей (таблица). Это, возможно, еще раз подтверждает, что активный центр фермента ЛIII меньше, чем ЛIV, а ЛIV меньше, чем ЛО.

Таким образом, из отношения к смешанным глюканам и олигосахаридам ферменты можно расположить по размерам их активных центров в следующий ряд: ЛIII < ЛIV < ЛО.

Интересно было сравнить глюканазы ЛIII, ЛIV и ЛО с другими известными β-1,3-глюканазами. Суммируя литературные данные, можно, по всей видимости, разделить β-1,3-глюканазы на 4 вида: 1) β-1,3-глюканазы, гидролизующие только β-1,3-связь, и предпочтительно в β-1,3-глюканах [8—10]; 2) β-1,3-глюканазы, гидролизующие β-1,3-связь в смешанных глюканах так же эффективно, как и в β-1,3-глюканах; этот тип глюканаз отличается от первого повышенным сродством к β-1,4-связанным гликопиранозильным остаткам [8, 11—13]; 3) β-1,3(4)-глюканазы, гидролизующие оба типа связи в смешанных глюканах, но не способные к гидролизу целлюлозы [12, 14—16]; 4) β-1,3(4)- либо β-1,3(6)-глюканазы, гидролизующие оба типа связи во всех субстратах [12, 17—19]. Глюканазы ЛIV, ЛО, вероятно, можно отнести к первому, а ЛIII — ко второму виду β-1,3-глюканаз.

Сравнивая кинетические параметры (K_m и V) действия глюканазы ЛIV на ламинаритриозу, полученные с использованием двух различных методов регистрирования активности (Нельсона и глюкозооксидазного), можно сделать предположение, что ЛIV осуществляет при действии на полимерный субстрат механизм множественной атаки. Взаимодействие ЛIV с ламинаритриозой может протекать по двум различным механизмам:



При гидролизе ламинаритриозы ($\text{O} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{O}$) по первому механизму в качестве промежуточного продукта должна образовываться ламинарибиоза, и скорость реакции, определенная методом Нельсона, должна быть больше скорости, полученной глюкозооксидазным методом. Если же реализуется второй механизм, то и сродство ЛIV к ламинаритриозе, и скорости гидролиза, определенные обоими методами, должны быть одинаковыми, как это и наблюдается в нашем случае. Следовательно, образующийся после расщепления первой глюкозидной связи комплекс ЛIV с ламинарибиозой не диссоциирует, и фермент гидролизует следующую связь с образованием двух остатков глюкоз. На основании этих рассуждений можно заключить, что степень множественности атаки глюканазы ЛIV должна быть по крайней мере равна двум или больше двух.

На рис. 1 представлены зависимости кинетических параметров гидролиза субстратов под действием ЛIV от степени полимеризации субстратов в координатах, предложенных Хироми [4]. Анализ этих зависимостей позволяет сделать вывод, что число участков сорбции в активном центре ЛIV больше трех, но меньше восьми.

Гидролиз олигосахаридов и ламинарина под действием ламинариназы ЛIV протекает следующим образом. Фермент гидролизует ламинарибиозу. Обычно эндоглюканазы практически не гидролизуют дисахариды [20—21]. Лишь некоторые ферменты составляют исключение, например осахаривающая α-амилаза из *Bacillus subtilis*, для которой мальтоза является хорошим субстратом [22]. Глюканаза ЛIV гидролизует ламинарин до глю-

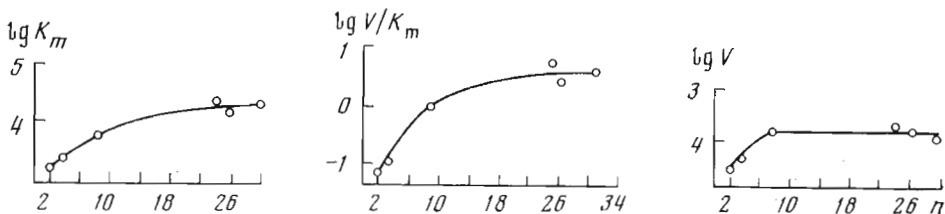


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость кинетических констант enzymатического гидролиза ламинариополисахаридов ламинариной IV (ЛIV) от степени полимеризации субстратов (n)

Рис. 2. Схема активного центра ламинарины IV

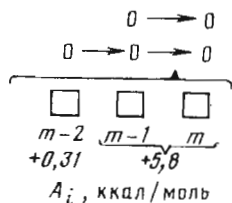


Рис. 2

козы и ламинарибиозы. Здесь также уместно провести параллель с упомянутой выше осахаривающей α -амилазой, которая гидролизует крахмал с большим выходом глюкозы, чем другие α -амилазы. Можно предположить, что ЛIV образует с ламинаритриозой только один продуктивный комплекс, такой, что отщепление глюкозы от ламинаритриозы должно осуществляться с восстанавливающего конца. В пользу такого предположения свидетельствует следующее. Величины K_m и V гидролиза ламинаритриозы под действием ЛIV, полученные с использованием метода Нельсона, регистрирующего число расщепляемых гликозидных связей, и глюкозооксидазного метода, регистрирующего количество образующейся глюкозы, совпадают. Отсюда можно сделать вывод, что гидролиз ламинаритриозы ферментом реализуется преимущественно по однопочечному механизму. Далее, ЛIV является эндогликаназой и, следовательно, должна передвигаться по цепи субстрата против направления гликозидных связей [3].

Результаты картирования активного центра ЛIV, полученные при использовании ламинарибиозы и ламинаритриозы, позволяют вывести схему активного центра фермента, показанную на рис. 2.

Из данных для ламинарибиозы была рассчитана сумма величин сродства m -го и $m - 1$ -го участков сорбции к глюкозным остаткам субстрата в активном центре ЛIV по формуле, выведенной Хироми [4]:

$$\left(\frac{k_0}{K_m}\right)_2 = 0,018k_{\text{int}} \exp \frac{A_m + A_{m-1}}{RT},$$

где k_{int} — константа скорости гидролиза ЛIV ламинарина из *L. syccharioides*.

Сродство $m - 2$ -го участка было рассчитано с использованием данных для ламинарибиозы и ламинаритриозы по формуле

$$A_{m-2} = RT \left[\ln \left(\frac{V}{K_m [E]_0} \right)_3 - \ln \left(\frac{V}{K_m [E]_0} \right)_2 \right].$$

Обращает на себя внимание тот факт, что сумма величин сродства каталитического участка ($m - 1$) и соседнего с ним «агликонового» участка (m) характеризуется для нашего фермента большой положительной величиной (+5,8 ккал). Обычно такая сумма представляет собой для эндоферментов либо отрицательную, либо небольшую положительную величину [20—24]. Это обусловлено тем, что каталитический участок эндогликаназы, обладающий повышенным сродством к искаженной конформации («полу-

кресло») моносахарида, вносит отрицательный вклад в суммарное сродство активного центра к субстрату при сорбции моносахарида, имеющего неискаженную конформацию («кресло»). В силу этого обстоятельства многие эндогликаны практически не способны связывать дисахарид в продуктивный комплекс. Если принять сродство каталитического участка нашего фермента, по аналогии с другими эндогликанами, отрицательным, то сродство соседнего m -го («агликонового») участка должно характеризоваться в продуктивных комплексах величиной, большей чем 5,8 ккал/моль. По-видимому, за счет большого сродства m -го участка и происходит связывание ламинарибиозы с ЛІV в продуктивный комплекс. Это свойство m -го участка проявляется, по-видимому, лишь при образовании продуктивных комплексов; так, нами найдено, что глюкоза не проявляет ингибирующего действия на ферментативный гидролиз ламинарина ЛІV. Возможно, этим и объясняется тот факт, что ферментативный гидролиз ламинарина проходит со значительным выходом глюкозы.

Экспериментальная часть

Очистку ферментов ЛІІІ, ЛІV, ЛІО производили способами, изложенными в работах [2, 25].

Ламинарибиоза (I) и ламинаритриоза (II) были получены разделением на угле Дагсо-60 ферментативных (ЛІV) или кислотных (0,25 н. H_2SO_4 , 100°, 75 мин) гидролизатов ламинарина из *L. cycharioides* (глубина гидролиза ламинарина ~20%). (I) — $[\alpha]_D +24^\circ$ (10 мин) $\rightarrow +19^\circ$ (24 ч, в воде); (II) — $[\alpha]_D +2^\circ$ (в воде).

β -1,3-глюкан (III) получали деградацией по Смуту ламинарина из *L. cycharioides* в условиях, отработанных для определения количества разветвлений в ламинаринах из различных источников [26]. Образующийся в процессе деградации неразветвленный β -1,3-глюкан самопроизвольно осаждался из охлажденных водных растворов. Отсутствие β -1,6-разветвлений в полученном полисахариде показано также жидкостной хроматографией на анионообменной смоле LCR-3 продуктов ферментативного гидролиза его β -1,3-глюканазой ЛІV (автоматический жидкостный анализатор JLC-6АН, Jeol, Япония) [27]. Выход β -1,3-глюкана составлял 15—20% от исходного количества ламинарина.

Нерастворимые олигосахариды (IV) самопроизвольно осаждались из водных растворов ферментативных или кислотных гидролизатов β -1,3-глюкана при охлаждении. Степень полимеризации (n_8) была определена как отношение общего количества сахара (фенолсернокислотный метод [28]) к количеству восстанавливающих групп в аликвоте (метод Нельсона [5]).

Ламинарин из *L. cycharioides* (V) получен по методике [26]. Ламинарин из *L. hyperborea* (IV) (Koch-Light, Англия) очищен переосаждением из водных растворов. Лихенин из мха *C. islandica* (VII) — препарат фирмы Koch-Light, в качестве субстрата использовалась растворимая в воде фракция. Глюкан ячменя (VIII) был любезно предоставлен проф. Маннерсом (Эдинбург, Англия), глюкан из *S. rolfii* (IX) — проф. Кирквудом (университет Миннесота, США).

Ферментативный гидролиз субстратов проводили при 37° в 0,02 М NaCl, pH 5,8 (0,025 М сукцинатный (ЛІІІ, ЛІV) или ацетатный (ЛІО) буферы).

Концентрации соответственно ЛІО, ЛІІІ, ЛІV в инкубационных смесях (мкг/мл): 5, 3 и 2.

Интервалы концентраций различных субстратов в инкубационных смесях (мкг/мл) для ЛІV: 200—575 (I), 60—350 (II), 30—200 (III), 50—300 (IV), 250—750 (V), 50—300 (VI), 140—450 (VII), 1000 (VIII), 2000 (IX); для ЛІІІ: 180—730 (I), 170—670 (II), 250—750 (V), 200—410 (VII), 1000 (VIII), 2000 (IX); для ЛІО: 260—1040 (II), 800 (III), 100—500 (V), 1000 (VIII) и 2000 (IX).

Концентрации субстратов определяли фенолсернокислотным методом [28].

Ферментативную реакцию останавливали либо добавлением реактива (метод Нельсона), либо кипячением аликвот (глюкозооксидазный метод). Глубина ферментативного расщепления субстратов не превышала 10—15%. Кинетические параметры (K_m и V) действия глюконаз LO, LIII, LIV на различные субстраты определены по методу Лайнуивера — Берка и приведены в таблице. Расчет проводили по методу наименьших квадратов. Число повторных определений K_m и V для всех субстратов — 3.

Ингибирующее действие глюкозы на ферментативный гидролиз ламинарина (1 мг/мл) под действием LIV (2 мкг/мл) изучали методом Нельсона в интервале концентраций глюкозы 0,05—1 ммоль/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sova V. V., Elyakova L. A. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 258, 219—227.
2. Елякова Л. А., Привалова Н. М. (1977) Авторское свидетельство СССР № 574469. «Открытия, изобретения, промышленные образцы, товарные знаки» № 36.
3. Хорлиа А. Я. (1974) в сб. Структура и функции активных центров ферментов, с. 39—69, «Наука», М.
4. Hiromi K. (1972) in *Proteins: Structure and Function* (Funatsu M., ed.), pp. 1—45, Kodansha Ltd, Tokyo.
5. Nelson N. (1944) *J. Biol. Chem.*, 153, 375—384.
6. Keston A. (1956) *Abstr. Paper 129, Meeting Amer. Chem. Soc.*, s31c.
7. Hultin E., Wanntorp I. (1966) *Acta chem. scand.*, 70, 2667—2677.
8. Moore A. E., Stone B. A. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 258, 248—264.
9. Moore A. E., Stone B. A. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, 258, 238—247.
10. Manners D. J., Marshall J. J. (1973) *Phytochemistry*, 12, 547—553.
11. Marshall J. J. (1973) *Carbohydr. Res.*, 26, 274—277.
12. Johnson J., Jr. (1966) *Doctor's Thesis, University of Minnesota, U. S. A.*
13. Marshall J. J. (1973) *Anal. Biochem.*, 53, 191—198.
14. Marshall J. J. (1974) *Carbohydr. Res.*, 34, 289—305.
15. Reese E. T., Mandels M. (1959) *Can. J. Microbiol.*, 5, 173—185.
16. Kabajashi I., Tanaka H., Ogasawara N. (1974) *Agr. Biol. Chem.*, 38, 959, 967, 973.
17. Marshall J. J., Grand R. G. A. (1975) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 167, 165—175.
18. Fleet G. H., Phaff H. J. (1973) in *Proceedings of the Third International Symposium on Yeast Protoplast*, pp. 33—59, Acad. Press, London.
19. Abd-el-al A. T. H., Phaff H. J. (1968) *Biochem. J.*, 109, 347—360.
20. Chipman D. M., Sharon N. (1969) *Science*, 165, 454—464.
21. Iwasa S., Aoshima H., Hiromi K., Natano H. (1974) *J. Biochem.*, 75, 969—978.
22. Ohnishi M. (1970) *J. Biochem.*, 68, 933—936.
23. Nitta Y., Mizushima M., Hiromi K., Ono S. (1971) *J. Biochem.*, 69, 567—576.
24. Thoma J. A., Brothers Ch., Spradlin J. (1970) *Biochemistry*, 9, 1768—1775.
25. Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. E. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, 212, 111—115.
26. Elyakova L. A., Zvyagintseva T. N. (1974) *Carbohydr. Res.*, 34, 241—248.
27. Звягинцева Т. Н. (1976) Канд. дис. «Изучение механизма действия β -1,3-глюконаз из *Spisula sachalinensis*», Владивосток.
28. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. R., Robers P. A., Smith F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350—356.

Поступила в редакцию
7.IV.1978

COMPARATIVE CHARACTERIZATION AND STUDIES ON THE ACTIVE SITE SORPTION PROPERTIES OF ENDO- β -1,3-GLUCANASES FROM MARINE INVERTEBRATES

ELYAKOVA L. A., ZVYAGINTSEVA T. N., PRIVALOVA N. M.
*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science
Center, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Comparative characteristics of the active sites of three endo- β -1,3-glucanases (LO, LIII, LIV) from marine invertebrates have been obtained by subsite mapping of the enzyme active sites. It was found that LO has the longest and LIII the shortest active sites, respectively. The affinity of three subsites in the LIV active site towards glucose residues was evaluated. It was proposed that LIV degrades polymeric substrates by multiple attack.