

УДК 577.321

## ДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ МОРСКОГО МОЛЛЮСКА *Littorina kurila* НА ФУКОИДАН ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *Fucus distichus*\*

© 2005 г. М.И. Билан<sup>1</sup>, М.И. Кусайкин<sup>2</sup>, А.А. Грачев<sup>1</sup>,  
Е.А. Цветкова<sup>1</sup>, Т.Н. Звягинцева<sup>2</sup>, Н.Э. Нифантьев<sup>1</sup>, А.И. Усов<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
119991 Москва, Ленинский просп., 47; факс: (095)135-5328,  
электронная почта: usov@ioc.ac.ru

<sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии  
Дальневосточного отделения РАН, 690022 Владивосток,  
просп. 100 лет Владивостоку, 159

Поступила в редакцию 28.01.05  
После доработки 18.02.05

Показано, что при действии препарата фукоиданазы из морского моллюска *Littorina kurila* на фукоидан из бурой водоросли *Fucus distichus* происходит расщепление некоторого количества гликозидных связей субстрата, но не образуются ни фукоза, ни низшие олигосахариды. Главным продуктом, выделенным из инкубационной смеси, является полисахарид, построенный из повторяющихся дисахаридных звеньев  $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(2,4-di-SO<sub>3</sub>)-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO<sub>3</sub>)-(1 $\rightarrow$ ) и совпадающий по структуре с идеализированной формулой, предложенной для исходного вещества. В качестве минорного компонента выделена полимерная фракция с углеводной цепью такого же строения, но содержащая сульфатные группы только в положениях 2 и нестехиометрически ацетилированная по положениям 3 и 4 остатков фукозы. Высказано предположение, что исходный полисахарид содержит небольшое количество несulfатированных и неацетилированных остатков фукозы, гликозидные связи которых расщепляются под действием фермента. Результат ферментативного гидролиза свидетельствует, что участки молекул исходного полисахарида, отклоняющиеся от его регулярной структуры и содержащие ацетилированные и неполностью сульфатированные повторяющиеся звенья, собраны в блоки.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** бурые водоросли, фукоидан, *Fucus distichus*, фукоиданаза, *Littorina kurila*, морские моллюски.

Фукоиданы представляют собой полисахариды, построенные преимущественно из остатков сульфатированной  $\alpha$ -L-фукозы. Эти биополимеры синтезируются главным образом бурями водорослями [1, 2] и найдены, кроме того, в морских беспозвоночных, относящихся к типу иглокожих [3]. Фукоиданы проявляют разнообразные виды биологической активности [4], что, по-видимому, связано с их способностью избирательно реагировать с некоторыми белками и специфически модифицировать свойства клеточной поверхности. Долгое время считалось, что биологические свойства фукоиданов зависят лишь от высокой степени сульфатирования этих полисахаридов [5], сейчас же выясняется, что тонкие детали структуры их молекул также

имеют большое значение [4]. Однако установление химического строения фукоиданов в каждом конкретном случае представляет собой сложное и трудоемкое исследование. Это объясняется в первую очередь отсутствием видимых признаков регулярности в молекулах подавляющего большинства водорослевых фукоиданов. Высокая степень сульфатирования этих биополимеров и наличие в их составе минорных компонентов (ксилозы, галактозы, уроновых кислот, ацетильных групп) еще более усложняют их структурный анализ. Неудивительно поэтому, что к настоящему моменту известны лишь единичные примеры водорослевых фукоиданов с более или менее надежно установленным строением [6–11]. Следовательно, до сих пор не удается связать проявление той или иной биологической активности с определенными структурными параметрами молекул фукоиданов.

Важным инструментом в изучении структурных особенностей фукоиданов могли бы ока-

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Paper in Press, BM 05-019, 29.05.2005.

\*\* Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

заться ферменты, катализирующие частичное расщепление этих полисахаридов, а именно, фукоиданазы и сульфатазы. Такие ферменты были обнаружены главным образом в морских бактериях [12] и беспозвоночных – иглокожих [13] и моллюсках [14]. В ряде работ изучено действие этих ферментов на водорослевые фукоиданы [12, 14–17]. Сложность таких исследований связана с довольно низким содержанием фукоиданаз и в бактериях, и в моллюсках (по сравнению, например, с глюканазами), а очистка этих ферментов практически всегда сопряжена со значительной потерей их активности [15]. В результате зачастую исследователи имеют дело лишь с частично очищенными ферментными препаратами [15] или даже со сложными комплексами полисахаридгидролаз [16]. Другая проблема заключена в том, что в качестве субстратов при изучении специфичности фукоидан-деградирующих ферментов, как правило, используются нефракционированные фукоиданы, структура которых не установлена. Поэтому, несмотря на то, что в некоторых работах подробно изучается строение получаемых в результате ферментолитического расщепления низкомолекулярных фрагментов фукоиданов (фукоолигосахаридов) [16], не всегда есть возможность сопоставить структуры олигосахаридов и исходного нативного полимера, а следовательно, понять специфичность действия фермента. Из работ, где это все же удалось сделать, на наш взгляд, заслуживают внимания две публикации. Одна из них посвящена выделенной из морского моллюска *Pecten maximus* региоселективной сульфатазе, которая гидролизует сульфатные группы, находящиеся только в положениях 2 фукопиранозидов [17]. В другой работе в результате обработки фукоидана из *Cladosiphon okamuranus* комплексом ферментов из морской бактерии *Fucophilus fucoidanolyticus* авторы получили набор олигосахаридов, строение которых доказало наличие в исходном полисахариде пентасахаридных повторяющихся звеньев [18]. Присутствовавшая в комплексе фукоиданаза расщепляла только гликозидные связи остатков фукозы, замещенных в положении 2 остатком глюкуроновой кислоты.

Настоящей работой мы продолжаем исследование свойств ферментов из морского брюхоногого моллюска *Littorina kurila*, катализирующих трансформацию фукоиданов. Ранее было показано [19], что в гепатопанкреасе *L. kurila* содержится фермент, обладающий фукоиданазной активностью в отношении фукоиданов из бурых водорослей *Fucus evanescens* и *Laminaria cichorioides*. Фукоиданаза была выделена и очищена от  $\alpha$ -фукозидазы и арилсульфатазы. В данной работе в качестве субстрата для фукоиданазы была

использована фракция фукоидана из *F. distichus*, представляющая собой полисахарид с высокой степенью регулярности, построенный главным образом из одинаковых дисахаридных повторяющихся звеньев [10] и отличающийся от фукоидана из *Laminaria cichorioides* структурой главной цепи, а от фукоидана из *F. evanescens* – распределением сульфатных групп и низкой степенью ацетилирования.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препарат фукоиданазы из гепатопанкреаса *L. kurila* выделяли и очищали, как описано ранее [19]. Высокосульфатированная фракция фукоидана ( $F_4$ ) из *F. distichus* также была получена ранее описанным методом [10]. Количественное определение белка проводили спектрофотометрически по методу Лоури [20], используя в качестве стандарта БСА. Количественное определение нейтральных моносахаридов после гидролиза полисахаридов (2М  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , 8 ч при 100°) проводили методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов [21] или ацетатов альдононитрилов [22] с ацетатом *мио*-инозита в качестве внутреннего стандарта. ГЖХ выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 5890А, снабженном капиллярной колонкой HP Ultra-2, пламенно-ионизационным детектором и интегратором HP 3393А при программировании температуры от 175 до 290° со скоростью 10 град/мин. Сульфат определяли турбидиметрически в виде  $\text{BaSO}_4$  после гидролиза полисахаридов в 1 М  $\text{HCl}$  [23].

**Определение активности фукоиданазы.** Активность определяли, как описано ранее [19], измеряя увеличение концентрации восстанавливающих сахаров методом Нельсона [24]. Инкубационная смесь содержала 100 мкл раствора ферментного препарата, 200 мкл раствора фукоидана  $F_4$  (4 мг/мл) и 200 мкл 0,05 М ацетатного буфера, pH 5,4. Время инкубации 5 ч. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывает увеличение восстанавливающей способности инкубационной смеси, эквивалентное образованию 1 мкмоль фукозы за 1 ч.

**Ферментативное расщепление фукоидана.** В раствор (25 мл) фукоиданазы (активность 0,23 ед/мл) в 0,05 М ацетатном буфере, pH 5,4, содержащий 0,2 М  $\text{NaCl}$ , вносили 245 мг фукоидана. После растворения субстрата смесь инкубировали в течение 21 ч при 37°, дополнительно прибавляли 5 мл раствора фермента и продолжали инкубировать в тех же условиях еще 24 ч, отбирая через произвольные интервалы времени пробы по 0,1 мл и определяя в них количество восстанавливающих сахаров по методу Нельсо-

на [24]. Далее реакцию останавливали нагреванием на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Выпавший в результате кипячения осадок отделяли центрифугированием и отбрасывали, а к супернатанту приливали 4 объема этанола. Выпавший осадок (высокомолекулярные продукты реакции — ВМП) отделяли центрифугированием, промывали этанолом, растворяли в минимальном объеме воды и лиофилизировали (выход 210 мг), а супернатант (низкомолекулярные продукты реакции и соли из буфера — НМП) упаривали досуха в вакууме (выход 140 мг).

Аналогично проводили две контрольные реакции — инкубирование раствора фермента без полисахарида и раствора полисахарида без фермента.

**Гель-проникающая хроматография.** Использовались колонки с гелем TSK HW-40(S) («Тоуорепарл», Япония),  $2,7 \times 76$  см, диапазон разделяемых масс по декстранам — 0,1–7 кДа, и с гелем TSK HW-65(S) («Тоуорепарл»),  $2,7 \times 60$  см, диапазон разделяемых масс — 10–1000 кДа. Элюция проводилась водой со скоростью 2 мл/мин, для детектирования использовали дифференциальный рефрактометр («Кнауер», Германия).

**Электрофорез.** Электрофорез проводили в 0,6%-ном агарозном геле ( $120 \times 110 \times 2$  см) в 50 мМ 1,3-диаминопропанацетатном буфере (pH 9,0) при 110 В в течение 1 ч. Гель фиксировали, сушили и окрашивали, как описано ранее [3].

**Спектроскопия ЯМР.** Спектры ЯМР получали на приборе DRX-500 («Bruker», Германия) после 1–2-кратной лиофилизации образцов из D<sub>2</sub>O и последующего растворения их в 99,96%-ной D<sub>2</sub>O. Для калибровки спектров использовали Натрий 3-(триметилсилил)-пропионової-2,2,3,3-d<sub>4</sub> кислоты (внутренний стандарт,  $\delta_{\text{H}} 0$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

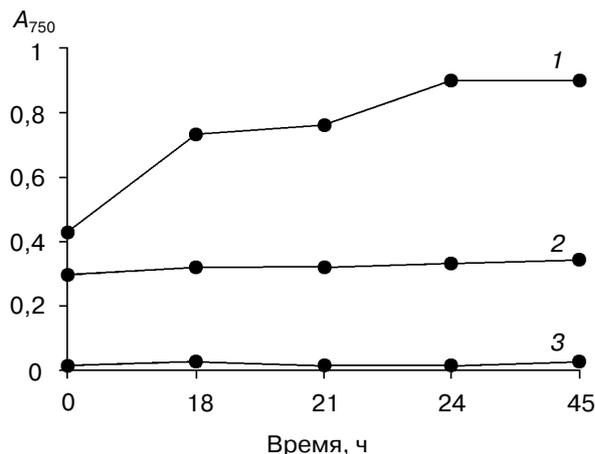
Высокосульфатированная фракция фукоидана (F<sub>4</sub>), выделенная из *F. distichus* и состоящая практически только из фукозы и сульфата, была выбрана нами в качестве субстрата для изучаемой фукоиданазы не случайно. На сегодняшний день это единственный известный пример высокорегулярного водорослевого фукоидана. Полисахарид имеет в основе молекул чередующиеся остатки 3-связанной  $\alpha$ -L-фукопиранозы, сульфатированной по положениям 2 и 4, и 4-связанной  $\alpha$ -L-фукопиранозы, сульфатированной только по положению 2. Другими словами, молекулы полисахарида содержат дисахаридное повторяющееся звено  $\rightarrow 3$ - $\alpha$ -L-Fucp-(2,4-di-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1 $\rightarrow$ ). Эта регулярность лишь незначительно замаскирована присутствием в полиса-

хариде небольшого количества O-ацетильных групп, а также неполным сульфатированием некоторых повторяющихся звеньев — мольное соотношение L-фукозы, сульфатных и ацетильных групп составляло 1 : 1,21 : 0,08. Тем не менее эти отклонения от регулярности не повлияли на качество спектров ЯМР, что позволило нам впервые установить строение нативного водорослевого фукоидана бездеструктивным методом, с помощью только спектроскопии ЯМР [10].

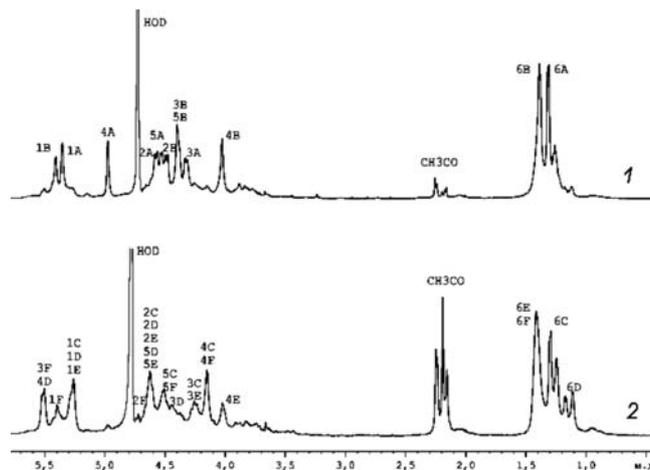
В качестве фермента для расщепления фукоидана был использован препарат из гепатопанкреаса морского брюхоногого моллюска *L. kurila*. Как было показано [19], этот источник содержит две формы фукоиданазы — кислую (pH-оптимум 5,4) и щелочную (pH-оптимум 8,5). Ранее были получены предварительные данные о специфичности действия на водорослевые фукоиданы щелочной формы фукоиданазы [25], специфичность кислой формы не изучалась. В настоящей работе исследовано действие кислой формы фукоиданазы на фукоидан с известной структурой с целью изучения специфичности фермента и получения дополнительной информации о структурных особенностях фукоидана, использованного в качестве субстрата.

Контроль за ферментализмом фукоидана проводили, измеряя количество восстанавливающих сахаров в инкубационной смеси (рис. 1). Видно, что, хотя препарат фукоиданазы изначально имел высокие значения восстанавливающей способности, увеличение этого параметра происходило только в инкубационной смеси, содержащей и фермент, и полисахарид. В двух контрольных опытах (инкубирование в аналогичных условиях только фермента либо только полисахарида) восстанавливающая способность растворов практически не менялась. Эти данные показывают, что под действием изучаемой фукоиданазы в молекулах фукоидана из *F. distichus* происходил гидролиз части гликозидных связей. После завершения ферментализма и удаления белка высокомолекулярные продукты реакции отделяли от низкомолекулярных осадением этанолом. Такая же обработка раствора полисахарида, который инкубировали в описанных выше условиях в отсутствие фермента, не привела к отделению низкомолекулярной фракции.

Как видно из табл. 1, высокомолекулярная фракция продуктов ферментализма (ВМП) по составу практически не отличается от нативного фукоидана F<sub>4</sub>. Спектры <sup>1</sup>H- (рис. 2) и <sup>13</sup>C-ЯМР этой фракции также оказались идентичными аналогичным спектрам F<sub>4</sub>. Таким образом, фракция ВМП представляет собой часть исходного фукоидана, не претерпевшую заметных изменений под действием фермента.



**Рис. 1.** Изменение восстанавливающей способности инкубационных смесей фукоидана с ферментом (1), фермента без фукоидана (2) и фукоидана без фермента (3) в зависимости от времени

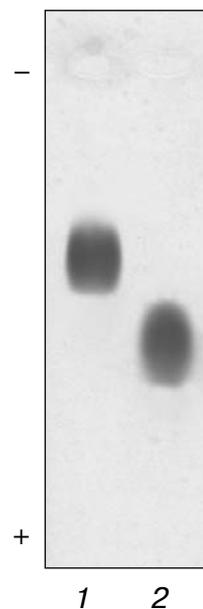


**Рис. 2.** Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР фракции ВМП (1) и фракции I-1 (2). Буквами и цифрами обозначены соответствующие атомы протонов в остатках А, В, С, D, Е и F, показанных в табл. 2

В попытке обнаружить среди продуктов ферментолиза короткие фукоолигосахариды (с 2–20 моносахаридными остатками в цепи) низкомолекулярную фракцию исследовали с помощью гель-проникающей хроматографии на геле TSK-NW-40(S) (диапазон разделяемых масс по декстранам – 0,1–7 кДа). Единственная полученная в результате хроматографии фракция I, имеющая углеводную природу (по данным спектроскопии ЯМР), элюировалась с колонки с нулевым объемом, т.е. имела молекулярную массу ≥ 7 кДа. Таким образом, олигосахариды, а также моносахариды среди продуктов ферментолиза обнаружены не были.

При хроматографировании на колонке с гелем TSK-NW-65 (диапазон разделяемых масс 10–1000 кДа) фракция I была разделена на две фракции, из которых вновь лишь одна I-1 имела углеводную природу. Выход фракции I-1 составил 6,1% (15 мг) от исходного фукоидана F<sub>4</sub>. Профиль элюции на TSK-NW-65 фракции I-1 несколько отличался от такового у нативного фукоидана. Различие в молекулярных массах фракции I-1 и нативного фукоидана было подтверждено после их восстановления боргидридом натрия, последующего гидролиза и сравнения мольных соотношений фукозы и фуцита в гидролизатах. Для фракции I-1 это соотношение составило 64 : 1, что соответствовало средней длине цепи порядка 65 моносахаридных остатков. Аналогичное соотношение для нативного фукоидана – 424 : 1, т.е. средняя длина цепи составляет 425 остатков фукозы. Разницу в мо-

лекулярной массе и/или плотности заряда между фракцией I-1 и нативным фукоиданом также демонстрирует и электрофорез в агарозном геле (рис. 3). Из табл. 1 видно, что фракция I-1 отличается от исходного фукоидана F<sub>4</sub> также и меньшим содержанием сульфатных групп (мольное соотношение фукозы и сульфата составляет 1 : 1).



**Рис. 3.** Электрофорез в 0,6%-ном агарозном геле нативного фукоидана F<sub>4</sub> (1) и фракции I-1 (2)

**Таблица 1.** Состав исходного фукоидана F<sub>4</sub> и фракций полисахарида, полученных в результате ферментативной обработки

Фракция	Нейтральные моносахариды, %			SO <sub>3</sub> Na, %
	Fuc	Xyl	Gal	
F4	40,8	0,8	0,8	34,8
ВМП	40,9	1,2	1,9	35,3
I-1	44,0	0,5	0,8	29,9

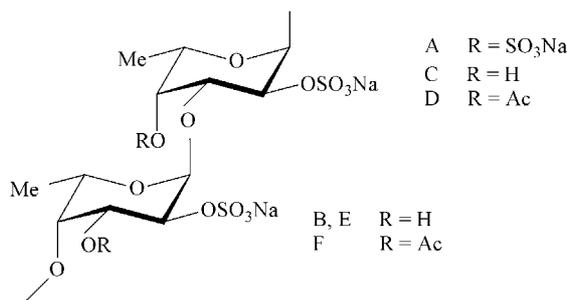
Строение полученной в результате ферментализации фракции I-1 далее исследовали с помощью спектроскопии ЯМР. Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР этой фракции имел более сложный вид по сравнению с аналогичным спектром нативного фукоидана F<sub>4</sub>. Присутствующие в спектре по крайней мере три интенсивных сигнала в области резонанса аномерных атомов углерода (94–100 м.д.), а также сигналы 16,7 и 16,8 м.д. в области высоких полей были типичны для α-фукопиранозидов. Наличие четырех интенсивных сигналов атомов углерода O-ацетильных групп (двух в высокопольной области при 20–22 м.д. и двух в области резонанса атомов карбоксильных групп при 174–175 м.д.) заметно отличало спектр <sup>13</sup>C-ЯМР фракции I-1 от соответствующего спектра нативного фукоидана F<sub>4</sub>, где эти сигналы были едва заметными. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР фракции I-1 содержал несколько интенсивных сигналов в аномерной (5,2–5,5 м.д.) и высокопольной (1,0–1,4 м.д.) областях. Сигналы при 2,2 м.д. подтверждали присутствие в полимере O-ацетильных групп. Мольное соотношение фукозы и ацетата, рассчитанное из интегральных интенсивностей сигналов соответствующих протонов, составило 1 : 0,4, т.е. фракция I-1 по сравнению с нативным фукоиданом содержит в 5 раз больше O-ацетильных групп (рис. 2).

Разрешение и протонного и углеродного спектров фракции I-1 оказалось достаточным для применения различных вариантов двумерной спектроскопии ЯМР, использованных для отнесения сигналов в спектрах. Гетероядерная двумерная корреляция <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HSQC показала, что в области резонанса сигналов аномерных атомов содержится три кросс-пика. Анализ гомоядерных <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H двумерных спектров COSY и TOCSY позволил определить химические сдвиги всех протонных сигналов фукопиранозных

остатков. Далее с помощью HSQC корреляции было проведено отнесение сигналов в спектре <sup>13</sup>C-ЯМР (табл. 2). Совместный анализ химических сдвигов в протонном и углеродном спектрах позволил идентифицировать в составе фракции I-1 несколько типов остатков 2-сульфата фукопиранозы, различающихся положениями гликозилирования и O-ацетильных групп. Анализ данных 2D ROESY спектра (ЯЭО) показал, что фракция I-1 имеет в основе молекулы дисахаридное повторяющееся звено, построенное из 1→3- и 1→4-связанных остатков 2-сульфата α-L-фукопиранозы, при этом часть 4-связанных остатков фукозы содержит O-ацетильные группы в положении 3, а часть 3-связанных остатков ацетилована по положению 4. Было установлено, что присутствие в аномерной области HSQC спектра трех кросс-пиков обусловлено различиями в химических сдвигах аномерных протонных и углеродных атомов ацетилованных и неацетилованных 4-связанных остатков 2-сульфата фукопиранозы.

Таким образом, обработка фукоидана F<sub>4</sub> из *F.distichus* ферментным препаратом из *L.kurila* привела лишь к незначительному расщеплению субстрата. Данные спектроскопии ЯМР показали, что главная часть вещества осталась без изменений, и следовательно, использованный ферментный препарат не способен расщеплять последовательность из чередующихся остатков 3-связанного 2,4-дисульфата и 4-связанного 2-сульфата α-L-фукопиранозы. Полученная с небольшим выходом в качестве продукта реакции фракция I-1 оказалась полисахаридом, построенным из чередующихся 3- и 4-связанных остатков 2-сульфата α-L-фукопиранозы, частично ацетилованных по оставшимся положениям. Необходимо подчеркнуть, что контрольная обработка полисахарида в отсутствие фермента и последующее фракционирование не привели к получению аналогичной фракции. Образование в результате ферментализации сравнительно низкомолекулярного ацетилованного полимера с отличным от исходного вещества расположением сульфатных групп можно объяснить, предположив, что в нерегулярных участках молекул нативного фукоидана имеется несколько полностью несульфатированных (а также, вероятно, и неацетилованных) остатков фукозы и что расщеплению под действием изучаемой нами фукоиданазы подвергаются только гликозидные связи этих остатков. Низкий выход фракции I-1 обусловлен малым количеством таких остатков в исходном фукоидане, а ее полимерный характер – тем, что участки, отклоняющиеся от регулярной структуры полисахарида, в молекулах субстрата собраны в блоки. Очевид-

Таблица 2. Положения сигналов (м.д.) в спектрах <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР фракции ВМП и фракции I-1



Вещество	Остаток	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
Фракция ВМП [-A-B] <sub>n</sub>	A	5,38	4,58	4,33	4,98	4,52	1,34
	B*	5,40	4,48	4,38	4,03	4,40	1,40
Фракция I-1 [-C(D)-E(F)] <sub>n</sub>	C	5,28	4,63	4,27	4,16	4,52	1,30
	D	5,27	4,65	4,40	5,50	4,63	1,15
	E*	5,27	4,60	4,23	4,03	4,64	1,40
	F	5,41	4,73	5,52	4,16	4,54	1,40
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Фракция ВМП [-A-B] <sub>n</sub>	A	100,2	76,0	74,4	81,2	68,9	16,8
	B*	99,1	77,5	68,7	84,0	69,8	16,8
Фракция I-1 [-C(D)-E(F)] <sub>n</sub>	C	100,0	74,5	73,4	69,9	67,8	16,8
	D	100,0	74,8	?	70,7	67,3	16,8
	E*	94,0	74,5	68,3	83,6	68,8	16,7
	F	94,9	74,2	70,7	79,6	68,8	16,7

\* Формально идентичные остатки В и Е в молекулах F<sub>4</sub> и I-1 находятся в разном окружении и поэтому отличаются по положению отдельных сигналов в спектрах ЯМР.

но, что главным препятствием для ферментативного гидролиза гликозидных связей в фукоидане из *Fucus distichus* является высокая степень сульфатирования его молекул. В дальнейшем планируется исследовать действие данного ферментного препарата на природные фукоиданы с другим строением углеводной цепи и другим расположением сульфатных групп, а также на продукты их химического десульфатирования.

Работа поддержана грантами ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» (микропроект 02.42.5), Президента РФ для поддержки молодых российских ученых и ведущих научных школ РФ (МК-1793.2003 и НШ-1557.2003.3), Фонда содействия отечественной науке, ФХБ РАН, Российского фонда фундаментальных исследований (№ 03-04-49534).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Percival, E., and McDowell, R.H. (1967) in *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*, Academic Press, N.Y., pp. 157–175.
- Painter, T.J. (1983) in *The Polysaccharides*, vol. 2 (Aspinall, G.O., ed.), Academic Press, N.Y., pp. 195–285.
- Pereira, M.S., Mulloy, B., and Mourao, P.A.S. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 7656–7667.
- Berteau, O., and Mulloy, B. (2003) *Glycobiology*, **13**, 29R–40R.
- Koyanagi, S., Tanigawa, N., Nakagawa, H., Soeda, S., and Shimeno, H. (2003) *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 173–179.
- Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Hashimoto, S., Kimura, K., Makino, T., Aiyama, R., Ueyama, S., and Yokokura, T. (1999) *Glycoconjugate J.*, **16**, 19–26.
- Chizhov, A.O., Dell, A., Morris, H.R., Haslam, S.M., McDowell, R.A., Shashkov, A.S., Nifant'ev, N.E., Khatuntseva, E.A., and Usov, A.I. (1999) *Carbohydr. Res.*, **320**, 108–119.
- Chevolut, L., Mulloy, B., Ratiskol, J., Foucault, A., and Collic-Jouault, S. (2001) *Carbohydr. Res.*, **330**, 529–535.
- Bilan, M.I., Grachev, A.A., Ustuzhanina, N.E., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E., and Usov, A.I. (2002) *Carbohydr. Res.*, **337**, 719–730.

10. Bilan, M.I., Grachev, A.A., Ustuzhanina, N.E., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E., and Usov, A.I. (2004) *Carbohydr. Res.*, **339**, 511–517.
11. Ponce, N.M.A., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Flores, M.L., and Stortz, C.A. (2003) *Carbohydr. Res.*, **338**, 153–165.
12. Furukawa, S., Fujikawa, T., Koga, D., and Ide, A. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1829–1834.
13. Sasaki, K., Sakai, T., Kojima, K., Nakayama, S., Nakanishi, Y., and Kato, I. (1996) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 666–668.
14. Kitamura, K., Matsuo, M., and Yasui, T. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 490–494.
15. Бакунина И.Ю., Недашковская О.И., Алексеева С.А., Иванова Е.П., Романенко Л.А., Горшкова Н.М., Исаков В.В., Звягинцева Т.Н., Михайлов В.В. (2002) *Микробиология*, **71**, 49–55.
16. Daniel, R., Berteau, O., Jozefonvicz, J., and Goasdoue, N. (1999) *Carbohydr. Res.*, **332**, 291–297.
17. Daniel, R., Berteau, O., Chevotot, L., Varenne, A., Gareil, P., and Goasdoue, N. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5617–5626.
18. Sakai, T., Ishizuka, K., Shimanaka, K., Ikai, K., and Kato, I. (2003) *Mar. Biotechnol.*, **5**, 536–544.
19. Кусайкин М.И., Бурцева Ю.В., Светашева Т.Г., Сова В.В., Звягинцева Т.Н. (2003) *Биохимия*, **68**, 384–392.
20. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
21. Слонекер Дж. (1975) В кн. *Методы химии углеводов* (пер. с англ. под ред. Хорлина А.Я.), Мир, Москва, с. 22–25 [Sloneker, J.H. (1972) *Methods Carbohydr. Chem.*, **6**, 20–24].
22. Morrison, I.M. (1975) *J. Chromatogr.*, **108**, 361–364.
23. Dodgson, K.S., and Price, R.G. (1962) *Biochem. J.*, **84**, 106–110.
24. Nelson, N. (1944) *J. Biol. Chem.*, **153**, 375–381.
25. Кусайкин М.И., Чижов А.О., Алексеева С.А., Бакунина И.Ю., Недашковская О.И., Сова В.В., Звягинцева Т.Н., Еляков Г.Б. (2004) Докл. РАН, **396**, 1–3.

**ACTION OF AN ENZYME PREPARATION  
FROM THE MARINE MOLLUSK *Littorina kurila*  
ON FUCOIDAN FROM THE BROWN ALGA *Fucus distichus***

**M. I. Bilan<sup>1</sup>, M. I. Kusaykin<sup>2</sup>, A. A. Grachev<sup>1</sup>,  
E. A. Tsvetkova<sup>1</sup>, T. N. Zvyagintseva<sup>2</sup>, N. E. Nifantev<sup>1</sup>, A. I. Usov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
Leninskii prosp. 47, 119991 Moscow, Russia; fax: (095)135-5328,  
E-mail: usov@ioc.ac.ru*

<sup>2</sup> *Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch,  
Russian Academy of Sciences, pr. 100-letiya Vladivostoka 159,  
690022 Vladivostok, Russia*

Received January 28, 2005

Revision received February 18, 2005

Action of a fucoidanase preparation from the marine mollusk *Littorina kurila* on fucoidan from the brown alga *Fucus distichus* was shown to result in splitting of some glycosidic bonds of the substrate, but neither fucose nor lower oligosaccharides were produced. The main product isolated from the incubation mixture was a polysaccharide built up of disaccharide repeating units  $\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Fucp-(2,4-di-SO}_3^-)-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Fucp-(2SO}_3^-)-(1\rightarrow$ , the structure coinciding with the idealized formula proposed for the initial substance. As a minor component, a polymer fraction with the same backbone but sulfated at positions 2 only and partially acetylated at positions 3 and 4 of fucose residues was isolated. It was suggested that the native polysaccharide contained a small amount of non-sulfated and non-acetylated fucose residues, and only their glycosidic bonds were split by the enzyme. The result of enzymatic hydrolysis evidenced that irregular regions of the native polysaccharide containing acetylated and partially sulfated repeating units are assembled in blocks.

*Key words:* brown algae, fucoidan, *Fucus distichus*, fucoidanase, *Littorina kurila*, marine mollusks