

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФУКОИДАНАЗ МОРСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ И БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

© 2004 г. М. И. Кусайкин, А. О. Чижов, С. А. Алексеева, И. Ю. Бакунина,
О. И. Недашковская, В. В. Сова, Т. Н. Звягинцева, академик Г. Б. Еляков

Представлено академиком Г.Б. Еляковым 04.02.2004 г.

Поступило 04.02.2004 г.

Высокосульфатированные полисахариды бурых водорослей – фукоиданы – обладают разнообразной биологической активностью. Наибольший интерес представляет антикоагулянтное и противовирусное действие, в том числе против ВИЧ, вирусов гепатита и герпеса [1–3]. Связь структуры и функции этих полисахаридов практически не исследована. Фукоиданы обычно имеют высокую молекулярную массу, поэтому необходима их деполимеризация для использования в качестве лекарственных препаратов.

Ферменты, катализирующие деградацию полисахаридов, широко используются для изучения их структуры, биологической активности и получения лекарственных препаратов [4]. В настоящее время фукоиданазы обнаружены только в морских организмах, и, как правило, уровень их активности чрезвычайно низок [5–7]. Имеются единичные работы по выделению и изучению фукоиданаз [8]. Тем не менее фукоиданаз из *Flavobacterium* sp. SA-0082 уже используется для деполимеризации фукоидана при получении лечебно-профилактических напитков [9]. Другие технологически ценные источники этих ферментов пока не найдены.

Настоящая работа посвящена исследованию особенностей каталитического действия фукоиданаз из различных источников.

Нами проведено сравнительное изучение специфичности трех фукоиданаз – щелочной (рН-оптимум 8.5) и кислой (рН-оптимум 5.4) из гепатопанкреаса морского моллюска *Littorina kurila* и фукоиданазы из морской бактерии *Pseudoalteromonas citrea* КММ* 3296 (рН-оптимум 7.2). Исходный уровень активности фукоиданазы в микроб-

ном источнике был более чем на порядок выше, чем в гепатопанкреасе *L. kurila*.

В качестве субстратов были использованы фукоиданы из бурых водорослей *Fucus evanescens* и *Laminaria sichorioides*. Фракция фукоидана из *F. evanescens* состояла из Fuc (95%), Xyl (2.8%), Man (0.2%), Glc (2%), молярное соотношение Fuc : SO₄²⁻ составило 1 : 0.43. В результате метилирования десульфатированной фракции этого фукоидана было получено соотношение ацетатов 2,3,4-три-О-метил- : 2,3-ди-О-метил- : 2,4-ди-О-метил- : 2-О-метил- : (3 + 4)-О-метилфуцитолов 23 : 11 : 39 : 9 : 18. Таким образом, в фукоидане из *F. evanescens*, используемом в качестве субстрата, количество (1 → 3)-связанной фукозы было в 3.5 раза больше, чем (1 → 4)-связанной фукозы. По структурным характеристикам эта фракция фукоидана заметно отличалась от описанной ранее [10]. Согласно [10], выделенный из водоросли *F. evanescens* фукоидан представлял собой линейный полимер, состоящий из чередующихся (1 → 3)- и (1 → 4)-связанных остатков фукозы, сульфатированных в основном по С-2 и частично ацетилированных по оставшимся свободными гидроксильным группам. Фукоидан из *L. sichorioides* значительно отличался от фукоидана из *F. evanescens* и по данным исследования десульфатированного и метилированного образца представлял собой практически полностью сульфатированный (1 → 3)- α -L-фукан [11].

Действием исследуемых фукоиданаз на фукоиданы из *L. sichorioides* и *F. evanescens* были получены продукты, характеристики которых приведены в табл. 1. Максимальная степень гидролиза была получена для фукоидана из *F. evanescens* под действием фукоиданазы из *P. citrea* КММ 3296. При действии щелочной формы фукоиданазы из *L. kurila* на фукоидан из *F. evanescens* выход низкомолекулярных продуктов оказался в три раза выше, чем при действии кислой формы фукоиданазы на тот же фукоидан. Это может быть связано с возможностью существования субстрата в

Тихоокеанский институт биоорганической химии,
Дальневосточное отделение
Российской Академии наук, Владивосток
Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского
Российской Академии наук, Москва

Таблица 1. Характеристика продуктов гидролиза фукоиданов под действием фукоиданаз

Фермент (рН-оптимум)	Субстрат, кДа	Характеристики			
		выход ВМП*, %	n^{**}	НМП***, %	n
Кислая фукоиданаза (5.4)	фукоидан из <i>F. evanescens</i> , 60	85	>7	15	$7 > n > 2$
	фукоидан из <i>L. sichorioides</i> , 20	95	>7	5	$7 > n > 2$
Щелочная фукоиданаза (8.5)	фукоидан из <i>F. evanescens</i> , 60	99	>7	45	$7 > n > 2$
	Фукоиданаза из <i>P. citrea</i> КММ 3296 (7.2)	фукоидан из <i>F. evanescens</i> , 60	30	>7	70

* ВМП – высокомолекулярные продукты, полученные осаждением 80%-ным водным этанолом (% от общего количества продуктов).

** n – степень полимеризации.

*** НМП – низкомолекулярные продукты.

Таблица 2. Характеристика низкомолекулярных продуктов гидролиза фукоидана из *F. evanescens* под действием фукоиданаз из гепатопанкреаса *L. kurila* и *P. citrea* КММ 3296

Источник фермента	Продукты	Выход, % от исходного субстрата	Мм, кДа или n^*	Моносахаридный состав, %						Молярное отношение Fuc : SO_4^{2-}
				Fuc	Gal	Xyl	Rha	Glc	Man	
<i>P. citrea</i>	P-1-Ps	26	$5 \geq n \geq 2$	96	4	0	0	0	0	1 : 0.31
КММ 3296	P-2-Ps	8	2–3	97.2	0.4	2.1	0.3	0	0	1 : 0.53
Гепатопанкреас	P-1-L	30	3–10	92	1	1.8	0	2.5	3.7	1 : 0.59
<i>L. kurila</i>	P-2-L	8	$7 \geq n \geq 2$	50	0	0	0	50	0	0
	P-1-1-L	17	3–10	92	1	1.8	0	2.5	3.7	1 : 0.59

* n – степень полимеризации продуктов.

протонированной и непротонированной формах. Под действием кислой фукоиданазы из *L. kurila* на фукоидан из *L. sichorioides* образуется в 3 раза меньше низкомолекулярных продуктов, чем при гидролизе фукоидана из *F. evanescens* (табл. 1). Это может быть обусловлено большей доступностью для фермента О-гликозидных связей в низкосульфатированном фукоидане из *F. evanescens* по сравнению с высокосульфатированным фукоиданом из *L. sichorioides*. Для детального анализа особенностей ферментативной трансформации были выбраны в качестве субстрата фукоидан из *F. evanescens* и два фермента – щелочная фукоиданаза из *L. kurila* и фукоиданаза из *P. citrea* КММ 3296.

Продукты, полученные в результате действия на фукоидан фукоиданазы из морской бактерии *P. citrea* КММ 3296, разделили ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе на две фракции (P-1-Ps, P-2-Ps) (табл. 2). Кислотный гидролиз продуктов показал, что они состоят в основном из фукозы. Все фракции, полученные в результате трансформации фукоидана под действием микробного фермента, были сульфатированы и общее количество сульфатов практически не изменилось по сравнению с исходным фукоиданом.

По данным жидкостной хроматографии на биогеле Р-2 фракция P-1-Ps представляла собой смесь ди-, три-, тетра- и пентафукоолигосахаридов. Эта фракция, выход которой 26%, была изучена более детально (табл. 2). Сульфатные группы составляли 30% от массы фракции, что соответствует сульфатированию одного из двух свободных гидроксильных в остатке Fuc. Сольволитическое десульфатирование с последующим метилированием фракции P-1-Ps гидролизом и ацетилированием показало, что соотношение ацетатов 2,3,4-три-О-метил- : 2,3-ди-О-метил- : 2,4-ди-О-метил- : 2-О-метил- : 3 + 4-О-метилфуцитолов 11 : 50 : 26 : 13 : 0. Таким образом, в исследуемых продуктах преобладали олигосахариды, в которых остатки фукозы были связаны (1 → 4)-О-гликозидной связью. Так как в исходном субстрате, напротив, преобладали (1 → 3)-связанные остатки фукозы, можно сделать вывод, что фукоиданаза из микробного источника катализирует расщепление в фукоидане доступных α -1 → 3-фукозидных связей.

Продукты, образующиеся под действием щелочной фукоиданазы из *L. kurila* (табл. 2), разделили комбинацией различных методов. Высокомолекулярные продукты ферментативного расщепления фукоидана осаждали из инкубационной

смеси 80%-ным водным этанолом. Низкомолекулярные продукты, оставшиеся в растворе, разделили при помощи гель-фильтрации на биоэле Р-2 на две фракции Р-1-*L* и Р-2-*L*. Фракцию Р-1-*L* подвергли ультрафильтрации на мембране 1 кДа. Фракцию, оставшуюся над мембраной (Р-1-1-*L*), анализировали (табл. 2).

В образце после полного кислотного гидролиза обнаружены Fuc (92%), Xyl (1.8%), Man (3.71%), Glc (2.5%), сульфатные группы составляли 40% от массы Р-1-1-*L*. Сольволитическое десульфатирование с последующим метилированием, гидролизом и ацетилированием этой фракции дало соотношение ацетатов 2,3,4-три-О-метил- : 2,3-ди-О-метил- : 2,4-ди-О-метил- : 2-О-метил- : 3 + 4-О-метилфуцитолов 10 : 41 : 31 : 11 : 7.

Из этих данных следует, что в Р-1-1-*L* количество образующегося 2,3-ди-О-метилфуцитола на 30% больше по сравнению с исходным фукоиданом. Это говорит об увеличении в продукте доли (1 → 4)-связанной фукозы. Следовательно, действие фермента подвергаются, как и в случае микробного фермента, (1 → 3)-О-гликозидные связи. Результаты метилирования соответствуют данным ¹³C ЯМР – спектроскопии. В ¹³C ЯМР – спектре десульфатированного Р-1-1-*L* наблюдались более интенсивные сигналы при 96.5 м.д. (С1), 69.1 м.д. (С2), 70.2 м.д. (С3), 81.1 м.д. (С4), 68.8 м.д. (С5), характерные для фрагмента → 4)-α-*L*-Fucp-(1 →, по сравнению с сигналами в области 97.3 м.д. (С1), 67.5 м.д. (С2), 76.6 м.д. (С3), 69.8 м.д. (С4), 67.7 м.д. (С5), соответствующими фрагменту → 3)-α-*L*-Fucp-(1 →, кроме того, в спектре имелись сигналы, соответствующие фрагменту → 3)-α-*L*-Fucp-(4 → : 101.5 м.д. (С1), 68.4 м.д. (С2), 77.2 м.д. (С3), 70.2 м.д. (С4), 67.7 м.д. (С5). Следовательно, в Р-1-1-*L* присутствуют фрагменты с разветвлениями по С4, которые не были обнаружены при использовании химических методов исследования [10].

Таким образом, фукоиданазы из морского моллюска и морской бактерии обладают близкой спе-

цифичностью: катализируют расщепление преимущественно α(1 → 3)-связи между остатками фукозы в молекуле полисахарида. В отличие от фукоиданазы из *L. kurila*, бактериальная фукоиданаза гидролизует фукоидан с образованием в основном ди-, три-, тетра- и пентафукоолигосахаридов, в то время как под действием щелочной формы фукоиданазы из *L. kurila* образуются более высокомолекулярные продукты с молекулярной массой 3–10 кДа (табл. 2). Вероятно, эти различия связаны с особенностями строения активных центров ферментов и механизма действия ферментов на полимерный субстрат.

Работа поддержана грантом РФФИ 03–04–49534 и программой ФХБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Usui T., Asari K., Mizuno T. // Agric. Biol. Chem. 1980. V. 44. P. 1963–1966.
2. McClure M.O., Moore J.P., Blanc D.F. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1992. V. 8. P. 18–26.
3. Nishino T., Nagumo T., Kiyohara H., Yamada H. // Carbohydr. Res. 1991. V. 211. P. 77–90.
4. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А., Исаков В.В. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 218–225.
5. Кусайкин М.И., Бурцева Ю.В., Светашева Т.Г. и др. // Биохимия. 2003. Т. 68. С. 384–392.
6. Бурцева Ю.В., Кусайкин М.И., Сова В.В. и др. // Биология моря. 2000. Т. 26. С. 429–432.
7. Бакунина И.Ю., Недашкова О.И., Алексеева С.А. и др. // Микробиология. 2002. Т. 71 С. 49–55.
8. Daniel R., Berteau O., Jozefonvicz J., Goasdoue N. // Carbohydr. Res. 1999. V. 322. P. 291–297.
9. Katsushige I., Ikonoshin K., Hiroshi K., Yoshihisa U. Eur. Pat. № 0916269.
10. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E. и др. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 719–730.
11. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al. // J. Exp. Mar. Biol. and Ecol. 2003. V. 294. P. 1–13.