

А. И. УСОВ, М. Д. МАРТЫНОВА,
член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ

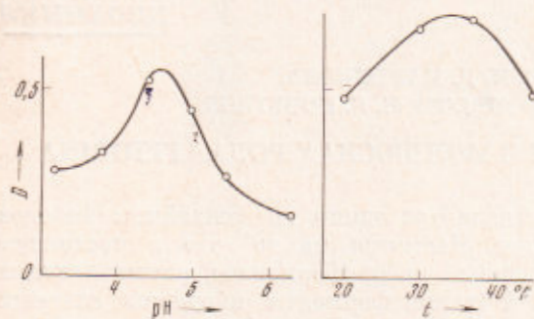
ОБНАРУЖЕНИЕ АГАРАЗЫ В МОЛЛЮСКАХ РОДА LITTORINA

Ферментативное расщепление является одним из важнейших методов изучения структуры полисахаридов. Несмотря на то что в настоящее время известен довольно ограниченный набор ферментов, расщепляющих полисахариды красных водорослей (такие ферменты получены главным образом из морских бактерий), изучение продуктов ферментативного гидролиза сыграло большую роль в установлении строения агарозы⁽¹⁾, каррагинана⁽²⁾ и порфирана⁽³⁾. В нашей работе по изучению структуры полисахаридов красных водорослей также были необходимы ферменты такого рода. В поисках новых источников их получения мы обследовали ряд беспозвоночных, для которых красные водоросли могли бы входить в состав пищевого рациона. Были изучены широко распространенные представители фауны литорали и сублиторали Японского моря, относящиеся к типам моллюсков (16 видов), иглокожих (6 видов) и членистоногих (4 вида), в том числе *Chiton* sp., *Littorina brevicula*, *L. mandshurica*, *L. squalida*, *Colisella* sp., *Tegula rustica*, *Crenomytilus grayanus*, *Strongylocentrotus intermedius*, *S. nudus*, *Stichopus japonicus*, *Cucumaria fraudatrix*, *Caprella cristibrachium* и др.* При исследовании ферментативной активности субстратами служили каррагинан из *Tichocarpus crinitus*, одонтолан из *Odonthalia cogymbifera* и агароподобный полисахарид из *Rhodomela larix*⁽⁴⁾. Растворы этих субстратов инкубировали с экстрактами из пищеварительных органов животных и измеряли увеличение восстанавливающей способности растворов по реакции с динитросалициловой кислотой. Этот тест, не обладающий очень большой чувствительностью, давал возможность обнаружить лишь достаточно высокую ферментативную активность, интересную с практической точки зрения. В результате проведенного обследования было установлено, что только экстракты печени трех видов моллюсков рода *Littorina* обладают отчетливой способностью расщеплять агароподобный полисахарид из *Rhodomela larix*. Это явление было далее изучено более подробно на примере действия ферментного препарата из *Littorina mandshurica* на коммерческий агар Дифко.

Выделение ферментного препарата. Печень 200 моллюсков *Littorina mandshurica* (20 г) растирают при 0° в ступке с песком, экстрагируют 2 × 50 мл 0,01 М фосфатного буфера рН 6,8, центрифугируют, надосадочную жидкость фильтруют и лиофилизируют. Остаток (4,25 г) обладает агаразой активностью, устойчивой при длительном хранении при 0°. 2 г этого вещества растворяют в 75 мл воды, прибавляют раствор уксусной кислоты до рН 4,3, выдерживают 1 час при 0°, осадок отделяют центрифугированием и отбрасывают; раствор диализуют 24 часа при 0° против 3 × 3 л дистиллированной воды, снова центрифугируют и лиофилизируют. Выход ферментного препарата 0,45 г; содержание белка, определенное по методу Лоури⁽⁵⁾, составляет 55% (стандарт — сывороточный альбумин).

* Эта часть работы выполнена на Морской экспериментальной станции Института биологически активных веществ АН СССР.

Контроль ферментативной активности проводят методом определения восстанавливающей способности растворов реакцией с 3,5-динитросалициловой кислотой. К 0,5 мл раствора прибавляют 0,5 мл реагента (°), тщательно перемешивают, нагревают 5 мин. при 100°, после охлаждения прибавляют 3 мл воды и измеряют оптическую плотность при 480 мμ на спектрофотометре СФ-4А. Субстратом во всех случаях служит раствор агара (Difco Vasto-agar) конечной концентрации 0,25%.



Вис. 1. Зависимость ферментативной активности от pH и от температуры

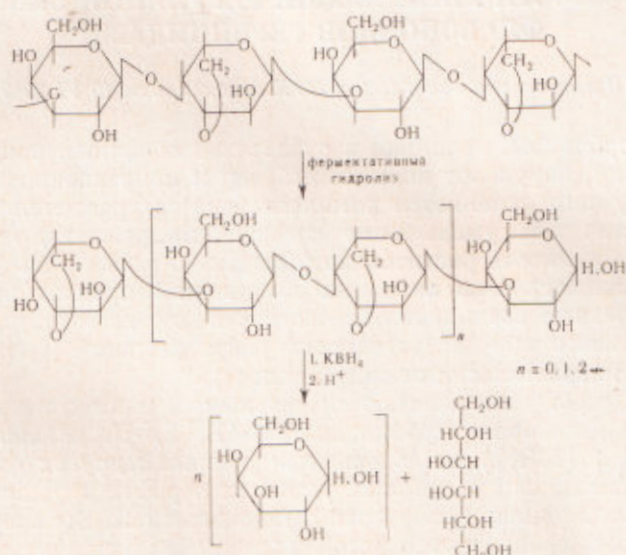
Зависимость ферментативной активности от pH. В пробирки вносят по 1,5 мл 0,5% водного раствора агара, 1,2 мл цитратно-фосфатного (0,1 M лимонная кислота и 0,2 M Na_2HPO_4) буфера с различным pH в интервале 3,2—6,3 и 0,3 мл водного раствора фермента, содержащего 11 мг белка в 1 мл. Измеряют восстанавливающую способность растворов через 5 час. инкубации при 36° против контроля, соответствующего моменту времени 0. Результаты определений изображены на рис. 1; максимальная активность фермента наблюдается при pH около 4,5. В отдельном опыте показано, что активность ферментного препарата не уменьшается при инкубировании его в отсутствие субстрата в течение 1 часа при 36° и pH 6,85; 6,0 и 4,75; некоторая инактивация отмечена только при pH 3,45.

Зависимость ферментативной активности от температуры. Пробы, содержащие 1,5 мл 0,5% раствора агара и 1,5 мл раствора фермента (1,6 мг белка в 1 мл) в цитратно-фосфатном буфере pH 4,5, инкубируют 8 час. при 20; 30; 37 и 45°. Измеряют восстанавливающую способность растворов против контроля (раствор до инкубации). Результаты приведены на рис. 1; максимальная активность фермента наблюдается при 35°.

Изучение продуктов расщепления агара. 450 мг агара в 90 мл цитратно-фосфатного буфера pH 4,5 нагревают до 100°, охлаждают до 42° и приливают нагретый до 37° раствор 200 мг фермента в 20 мл буфера; после перемешивания инкубируют при 37° 24 часа, прибавляют еще столько же ферментного препарата и инкубируют еще 2 суток. Смесь нагревают 5 мин. при 100°, охлаждают, осадок отбрасывают, а раствор концентрируют и гель-фильтрацией на колонке с 50 г Сефадекса Г-25 разделяют на полимерную и олигомерную фракции; первая после лиофилизации весит 210 мг. Олигомерная фракция, по данным хроматографии на бумаге в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6:4:3), содержит вещества с $R_{\text{фал}}$ 0,07; 0,14; 0,31; 0,70; 0,93 и слабые более подвижные зоны; препаративной хроматографией на бумаге выделяют вещества с $R_{\text{фал}}$ 0,70 (I) и 0,31 + 0,14 (II). Обе фракции восстанавливают KВH_3 , гидролизуют 2N H_2SO_4 4 часа при 100° и продукты гидролиза исследуют хроматографией на бумаге или в виде триметилсилильных производных газо-жидкостной хроматографией. При этом из фракции I получается почти исключительно дульцит; из II образуются в сравнимых количествах дульцит и галактоза.

Можно принять в первом приближении, что по химическому строению использованный субстрат аналогичен агарозе, т. е. состоит из линейных молекул с чередующимися остатками *D*-галактозы и 3,6-ангидро-*L*-галактозы (?). Тогда наличие дульцита и отсутствие 3,6-ангидродульцита в продуктах восстановления и гидролиза олигосахаридов доказывает, что

ферментативному расщеплению в молекуле агара подвергаются только галактозидные, но не 3,6-ангидрогалактозидные связи. В результате образуется набор олигомергомологов с четным числом моносахаридных остатков, галактозой на восстанавливающем конце и 3,6-ангидрогалактозой на невосстанавливающем; при действии KBH_4 концевые остатки галактозы превращаются в остатки дульцита. Последующий кислотный гидролиз полностью разрушает остатки 3,6-ангидрогалактозы и дает дульцит (из восстановленного дисахарида) или смесь дульцита и галактозы (из высших олигомеров):



Полученные результаты свидетельствуют о том, что моллюски рода *Littorina*, кроме широкого набора других полисахаридаз (⁶), содержат агаразу, по способу действия аналогичную агаразам бактериального происхождения. Интересно отметить, что выделенный препарат способен также катализировать гидролиз некоторых полисахаридов красных водорослей с более высоким, чем в агаре, содержанием сульфата (например, из *Laingia pacifica* (⁴)).

Институт органической химии
им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР
Москва

Поступило
15 XII 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. Araki, K. Arai, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **29**, 339 (1956); **30**, 287 (1957).
² J. Weigl, W. Yaphe, *Canad. J. Microbiol.*, **12**, 939 (1966). ³ J. R. Turvey, J. Christison, *Biochem. J.*, **105**, 311, 317 (1967). ⁴ А. И. Усов, Л. И. Миросникова, М. А. Рехтер, В сборн. Химия и биохимия углеводов, М., 1969, стр. 425. ⁵ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
⁶ E. H. Fisher, E. A. Stein, *Biochem. Preparations*, **8**, 27 (1964). ⁷ C. Araki, *Proc. IV Intern. Congr. of Biochem.*, **1**, 15 (1959). ⁸ L. A. Elyakova, V. V. Sova, V. E. Vaskovsky, *Biochim. et biophys. acta*, **167**, 462 (1968).