

В. К. ГОРОДЕЦКИЙ, В. И. МИХАЙЛОВ, Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД

**СИНТЕЗ ИЗ САХАРОЗЫ ЭРЛОЗЫ ( $4^G$ - $\alpha$ -D-ГЛЮКОЗИЛСАХАРОЗЫ)  
И ТРИСАХАРИДА Z - ( $6^G$ - $\alpha$ -D-ГЛЮКОЗИЛСАХАРОЗЫ)  
ЭКСТРАКТАМИ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК ЖИВОТНЫХ**

(Представлено академиком С. Е. Севериным 19 VII 1971)

Было показано, что распад сахарозы в организме человека и животных происходит не только в слизистой тонкого кишечника под действием сахараз 1 и 2 (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>), но также с помощью микросомной фракции почек крыс (<sup>3</sup>), пятой фракции Кона сыворотки крови собак (<sup>4</sup>) и спермы человека (<sup>5</sup>). Нам удалось найти активность сахаразы в экстракте почек взрослых крыс, морских свинок, кроликов, собак и свиней, в экстрактах печени морских свинок, кроликов и собак и в сыворотке крови собак и крупного рогатого скота. Как правило, наибольшей сахаразной активностью обладали почки животных, затем печень и, наконец, сыворотка крови. Гидролиз сахарозы проходил как при pH 4,8 в ацетатном буфере, так и при pH 7,0 в трис-HCl-буфере. Ферментативная активность экстрактов сохранялась на холоду в течение длительного времени (до 1—2 мес. и более).

При анализе хроматограмм в опытах с ферментативным гидролизом сахарозы мы обнаружили присутствие какого-то сахара, обладающего меньшей хроматографической подвижностью, чем сахароза, при разделении в системе растворителей ацетон — *n*-бутанол — вода (7 : 2 : 1). По своему положению на хроматограмме он соответствовал трисахариду, не обладал редуцирующей способностью, так как не окрашивался щелочным раствором азотнокислого серебра, содержал остаток кетосахара (специфично окрашивался резорцином и димедоном) и окрашивался анилинфталатом при высокой температуре (прогревание при 150—160°). Представляло интерес выделить образовавшийся трисахарид и исследовать его строение. Однако при хроматографировании выделенного препарата трисахарида в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3) мы добились четкого разделения нашего препарата на два трисахарида.

Ферментативный синтез трисахаридов проводили с помощью экстрактов почек или печени животных. Почки или печень забитого животного гомогенизировали в микроизмельчителе на холоду с 4-кратным объемом (в/об) 0,1 М ацетатного буфера, pH 4,8, или 0,05 М трис-HCl-буфера, pH 7,3. Гомогенат центрифугировали на холоду при 4,5 тыс. об/мин в течение 15 мин. Полученный экстракт обессоливали диализом против дистиллированной воды или гельфильтрацией на колонке с сефадексом Г-25. Колонки уравнивали буфером, в котором гомогенизировали ткань, элюцию раствора с сефадекса проводили с помощью исходного буфера. Обессоливание на колонках с сефадексом более эффективно, чем диализ, так как требует меньше времени и исключает разбавление проб.

Для проведения ферментативного синтеза трисахаридов готовили смесь, состоящую из 0,5 мл экстракта почек собак, 0,5 мл ацетатного буфера или трис-HCl-буфера и 100 мг сахарозы. Смесь инкубировали под толуолом при 37° в течение 2 суток. После инкубации к смеси доливали этанол до конечной концентрации 50%, 5 мин. прогревали в кипящей водяной бане и центрифугировали. Надосадочную жидкость наносили на отмывую

хроматографическую бумагу «Ватман» 3 мм и хроматографировали в системе растворителей ацетон — *n*-бутанол — вода (7 : 2 : 1). После хроматографического разделения сахаров участки бумаги, содержащие трисахариды, вырезали и элюировали водой с хлороформом при комнатной температуре. Полученный элюат сгущали на роторном вакуумном испарителе при 37°, а затем лиофильно высушивали. Высушенный препарат очищали пересаживанием метанолом и ацетоном и окончательно высушивали в вакуум-эксикаторе над  $\text{CaCl}_2$ .

Образование трисахаридов можно было обнаружить хроматографически при содержании в инкубационной пробе сахарозы не ниже 10 мг/мл. Синтез трисахаридов происходил с помощью экстрактов почек и печени собак, а также печени кроликов и крыс. При pH 7,3 в трис- $\text{HCl}$ -буфере образование трисахаридов шло более интенсивно, чем при pH 4,8 в ацетатном буфере. Добавление в инкубационную среду глюкозы увеличивало образование трисахаридов. Кортиковый слой почек собак обладал большей способностью к синтезу трисахаридов, чем мозговой.

Анализ 0,2% раствора смеси трисахаридов проводили различными методами до гидролиза, после частичного гидролиза в 0,2*N*  $\text{HCl}$  при 100° в течение 10, 20 и 30 мин. и после полного гидролиза в 1*N*  $\text{HCl}$  при 100° в течение 30 мин. Полноту гидролиза контролировали хроматографически. После гидролиза пробу нейтрализовали с помощью амберлита JRA-410 [ $\text{HCO}_3^-$ ].

Истинное содержание сахаров в пробе определяли фенол-серноокислотным методом, содержание глюкозы в пробах — глюкозооксидазным методом, содержание кетосахаров в пробе до щелочной обработки и после щелочной деградации редуцирующих сахаров — с помощью  $\beta$ -индолилуксусной кислоты<sup>(6)</sup>. Величину редуцирующей способности сахаров в пробах определяли по Нельсону. Качественное определение состава сахаров в пробах до, после частичного и после полного гидролиза проводили с помощью бумажной хроматографии с использованием различных проявителей.

Для определения брали 0,1 мл раствора трисахаридов, причем по фенолу и серной кислоте было найдено, что в этой пробе содержится 60 мкг сахаров. Исследованные трисахариды не содержали примеси моно- и дисахаридов. После полного кислотного гидролиза в пробе мы обнаружили по глюкозооксидазе 41 мкг глюкозы, а по  $\beta$ -индолилуксусной кислоте 21 мкг фруктозы, что в сумме дает 62 мкг. Других сахаров, кроме глюкозы и фруктозы, хроматографически обнаружить не удалось. Таким образом, выделенные нами сахара состоят из глюкозы и фруктозы в соотношении 2 : 1 и, следовательно, являются трисахаридами — диглюкозидофруктозидами.

Для установления последовательности остатков моносахаров в трисахаридах мы проводили их частичный кислотный гидролиз. На первом этапе частичного гидролиза (10 мин.) от трисахаридов отщепляется приблизительно 21% содержащейся в них глюкозы и 100% фруктозы (рис. 1). То, что фруктоза полностью отщепляется от трисахаридов, — бесспорно и подтверждается следующими данными. Нативные трисахариды лишены редуцирующей способности (не проявляются азотнокислым серебром, редукция по Нельсону практически равна нулю, не подвергаются щелочной деградации). После 10-минутного гидролиза оба трисахарида распадаются с образованием редуцирующих продуктов (100% деградация щелочью), хотя  $\frac{4}{5}$  глюкозы остаются непрогидролизованными. Только при полном отщеплении фруктозы возможна столь исчерпывающая щелочная деградация кетосахаров в пробе. Отщепление фруктозы от трисахаридов было также подтверждено хроматографически. Очевидно, фруктоза занимает концевое положение в трисахаридах. Если бы остаток фруктозы в трисахаридах был непосредственно связан с двумя остатками глюкозы, то при частичном гидролизе часть трисахаридов осталась бы непрогидролизованной (отщепляется только 21% глюкозы) и неминуемо бы образовались сахароза и какой-либо другой глюкозидофруктозид, которые мы могли бы обнаружить хроматографически или  $\beta$ -индолилуксусной кислотой после щелочной обработки.

Поскольку трисахариды не редуцируют, наиболее вероятно, что они образованы присоединением глюкозы к глюкозному остатку сахарозы.

Известно, что  $\alpha$ -1  $\rightarrow$   $\beta$ -2 гликозидная связь в сахарозе очень лабильна и легко разрывается даже при мягких условиях гидролиза. В нашем случае

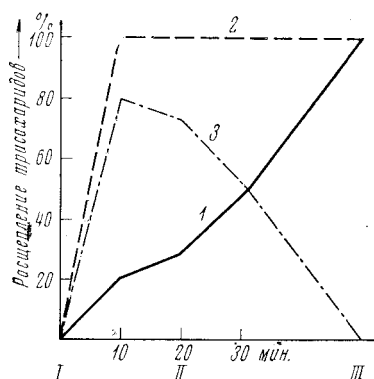


Рис. 1. Гидролитическое расщепление трисахаридов. Отщепление глюкозы (1), фруктозы (2), содержание не гидролизованных диглюкозидов (3). I — до гидролиза, II — частичный гидролиз, III — полный гидролиз

в самом начале гидролиза от трисахаридов отщепляется фруктоза и образуются редуцирующие диглюкозиды, которые также начинают частично гидролизоваться с образованием глюкозы (рис. 1). Редуцирующая способность пробы после гидролиза, определенная по Нельсону, резко возрастет и соответствует содержанию в пробе 8,6  $\mu$ г глюкозы, 21  $\mu$ г фруктозы и примерно 30  $\mu$ г редуцирующих диглюкозидов. Степень гидролиза диглюкозидов возрастает в зависимости от времени гидролиза, что приводит к увеличению свободной глюкозы и редуцирующей способности пробы.

Продукты частичного гидролиза трисахаридов были разделены хроматографически на бумаге «Ватман 1» в системе растворителей ацетон-*n*-бутанол — вода (7:2:1) и проявлены анилинфталатом, димедоном, азотнокислым серебром и щелочью, дифениламином (окрашивающим в разный цвет диглюкозиды, образованные  $\alpha$ -1 — 4-

и  $\alpha$ -1 — 6-связью) и трифенилтетразолийхлоридом (который окрашивает диглюкозиды с  $\alpha$ -1 — 4-связью, но не дает окраски с  $\alpha$ -1 — 2-связью). В результате на хроматограммах было обнаружено, что через 10 мин. гидролиза фруктоза полностью отщепляется от трисахаридов, появляется небольшое количество глюкозы, а также мальтоза и изомальтоза. Количество мальтозы в пробе было больше, чем изомальтозы. По мере удлинения срока гидролиза пятна глюкозы становились более интенсивными, а количество мальтозы и изомальтозы снижалось. Для определения типа гликозидной связи в трисахаридах ( $\alpha$ - или  $\beta$ -), мы подвергали их действию гликозидазы. Под действием  $\alpha$ -амилоглюкозидазы из *Aspergillus niger* от полученных трисахаридов (так же как и от мальтозы) отщеплялась глюкоза, под действием  $\beta$ -гликозидазы (эмульсина) распад трисахаридов не происходил, хотя этот фермент способен был отщеплять глюкозу от целлобиозы. Этот опыт свидетельствует о том, что при образовании трисахаридов глюкоза соединяется с глюкозным остатком в молекуле сахарозы  $\alpha$ -связью.

Поскольку при кислотном гидролизе трисахаридов мы обнаружили в пробе мальтозу и изомальтозу, это является лишним доказательством, что выделенный нами препарат трисахаридов является смесью двух близких по строению трисахаридов: *O*- $\alpha$ -*D*-глюкопиранозил-(1  $\rightarrow$  4)-*O*- $\alpha$ -*D*-глюкопиранозил-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -*D*-фруктофуранозида или 4<sup>G</sup>- $\alpha$ -*D*-глюкозилсахарозы, или эрлозы, и *O*- $\alpha$ -*D*-глюкопиранозил (1  $\rightarrow$  6)-*O*- $\alpha$ -*D*-глюкопиранозил-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -*D*-фруктофуранозида, или 6<sup>G</sup>- $\alpha$ -*D*-глюкозилсахарозы, или трисахарида Z. Оба трисахарида обладают сходными свойствами и близкой хроматографической подвижностью. Все приведенные выше рассуждения справедливы как для одного, так и для другого трисахарида. Как уже указывалось выше, выделенный нами препарат мы разделили на два трисахарида при хроматографировании на бумаге в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6:4:3). При частичном гидролизе из выделенной эрлозы была получена мальтоза, а из трисахарида Z — изомальтоза. Количество эрлозы в пробе (трисахарида с большей хроматографической подвижностью) было больше, чем трисахарида Z (содержание мальтозы в пробе после гидролиза трисахарида было также выше, чем изомальтозы).

До настоящего времени эрлоза была обнаружена только в меду и нектаре, выделяемом некоторыми тлями и червецами сем. Coccidae (<sup>7-10</sup>), а трисахарид Z — в культуральной среде *A. niger* (<sup>8, 10, 11</sup>). Эти трисахариды образывались из сахарозы переносом остатка глюкозы на молекулу сахарозы инвертазой меда, насекомых или плесени. Инвертаза дрожжей является трансфруктозилазой, она отщепляет от сахарозы остаток фруктозы и способна переносить его на молекулу сахарозы с образованием дифруктозидоглюкозидов (кестозы, неокестозы и др.). В отличие от нее, инвертаза тканей человека и животных, как и инвертаза насекомых, меда и плесени, отщепляет от молекулы сахарозы остаток глюкозы и обладает трансглюкозилирующим действием. Таким образом, найденная нами эрлоза и трисахарид Z образывались из сахарозы реакцией трансглюкозилирования с помощью инвертазы. Кислая  $\gamma$ -амилаза печени кролика, обладающая мальтазной активностью и трансглюкозилирующим действием, не образывала эрлозу и трисахарид Z при инкубации с сахарозой.

Образование диглюкозидофруктозидов, по-видимому, может происходить не только *in vitro*, но и в организме человека при некоторых нарушениях углеводного обмена. Так, в моче больного А-ва, страдавшего поражением поджелудочной железы, пороком сердца и другими заболеваниями, наряду с сахарозой мы обнаружили хроматографически присутствие двух трисахаридов, содержащих остатки кетосахаров.

Институт биологической и медицинской химии  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Поступило  
15 VII 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> A. Dahlqvist, *J. Clin. Invest.*, **41**, 463 (1962). <sup>2</sup> G. Semenza, S. Auricchio, A. Rubino, *Biochim. et biophys. acta*, **96**, 487 (1965). <sup>3</sup> S. Shibko, A. L. Tappel, *Biochem. J.*, **95**, 731 (1965). <sup>4</sup> F. Chytil, L. Lacko, O. Štěrba, *Blut*, **12**, 310 (1966). <sup>5</sup> A. Shetl, S. Shanta, O. Ra, *Experientia*, **18**, 370 (1962). <sup>6</sup> В. К. Гордеецкий, Е. И. Щорс, *Вопр. мед. хим.*, **15**, 310 (1969). <sup>7</sup> J. P. Wolf III, W. H. Ewart, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **58**, 365 (1955). <sup>8</sup> R. W. Bailey, *Oligosaccharides*, **4**, N. Y., 1965, p. 113. <sup>9</sup> J. W. White Jr., J. Maher, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1259 (1953). <sup>10</sup> G. Avigad, *J. Biol. Chem.*, **229**, 121 (1957). <sup>11</sup> S. A. Barker, E. J. Bourne, O. Theander, *J. Chem. Soc.*, 1957, 2064.