

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Кусайкин Михаил Игоревич

**Ферменты, катализирующие трансформацию полисахаридов
бурых водорослей**

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
д.х.н., профессор Звягинцева Татьяна Николаевна

ВЛАДИВОСТОК - 2017

Оглавление	
1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
2.1 Субстраты ламинариназ и фукоиданаз	10
2.2 Фукоиданы	10
2.3 Фукоиданы с главной цепью, состоящей из α -1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков сульфатированной фукозы	14
2.4 Фукоиданы, основная цепь которых состоит из чередующихся 1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 4- связанных остатков сульфатированной α -L-фукозы	16
2.5 Фукоиданы, представляющие собой сульфатированные галактофуканы или более сложные гетерополисахариды	18
2.6 Фукансульфаты иглокожих	22
2.7 Ламинараны	24
2.8 Ферменты, катализирующие трансформацию полисахаридов бурых водорослей	26
2.9 1 $\rightarrow$ 3- β -D-Глюканазы	27
2.10 Фукоиданазы	35
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
3.1 Биологическое сырье и реактивы	47
3.2 Культивирование бактерий	47
3.3 Определение концентрации белка	48
3.4 Определение восстанавливающих сахаров.....	48
3.5 Определение общих сахаров	48
3.6 Определение активности ферментов.....	48
3.7 Метод поиска продуцентов фукоиданаз среди бактерий	50
3.8 Выделение ферментов.....	50
3.9 Электрофорез белков	55
3.10 Определение pH оптимума ферментов	55
3.11 Определение температурного оптимума ферментов	55
3.12 Определение температурной стабильности ферментов	56
3.13 Определение влияния ионов двухвалентных металлов на активность ферментов.....	56

3.14 Выделение геномной ДНК бактерии <i>F. algae</i>	56
3.15 Установление последовательностей нуклеотидов в геномной ДНК бактерии <i>F. algae</i>	56
3.16 Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей	56
3.17 Получение генетических конструкций, кодирующих фукоиданазы из бактерии <i>F. algae</i>	57
3.18 Клонирование и секвенирование плазмидной ДНК, содержащей вставки генов, кодирующих фукоиданазы	58
3.19 Оптимизация экспрессии рекомбинантных фукоиданаз в штаммах <i>E. coli</i>	59
3.20 Получение и анализ продуктов ферментативного гидролиза полисахаридов ..	60
3.21 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле	62
3.22 Определение содержания сульфатных групп	62
3.23 Дезацетилирование фукоиданов	63
3.24 Десульфатирование фукоиданов	63
3.25 Определение моносахаридного состава полисахаридов	63
3.26 Масс-спектрометрия	63
3.27 ЯМР-спектроскопия	64
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	65
4.1 1→3-β-D-Глюканазы (Ламинариназы)	65
4.1.1 1→3-β-D-Глюканаза вьетнамской промысловой мидии <i>Perna viridis</i>	65
4.1.2 1→3-β-D-глюканаза моллюска Южно-Китайского моря <i>Tapes literata</i>	80
4.1.3 1→3-β-D-глюканаза из кристаллического стебелька моллюска <i>Mizuhopecten yessoensis</i>	90
4.1.4 1→3-β-D-Глюканаза из неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа <i>Strongylocentrotus intermedius</i>	93
4.1.5 1→3-β-D-Глюканаза из печени <i>Littorina sitkana</i>	98
4.2 Фукоиданазы	105
4.2.1 Метод поиска ферментов, деградирующих фукоидан	105
4.2.2 Фукоиданазы из печени моллюска <i>Littorina sitkana</i>	108
4.2.3 Фукоиданаза из морского моллюска <i>Lambis</i> sp.	116
4.2.4 Фукоиданаза из морской бактерии <i>Formosa algae</i>	124
4.2.5 Рекомбинантные фукоиданазы из морской бактерии <i>Formosa algae</i>	132

4.2.5.1 Рекомбинантная фукоиданаза FFA2.....	136
4.2.5.2 Рекомбинантная фукоиданаза FFA1.....	147
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	153
ВЫВОДЫ	156
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	158

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А.о. – аминокислотный остаток
БСА (BSA) – бычий сывороточный альбумин
ВКМ – внеклеточный матрикс
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ДМСО (DMSO) – диметилсульфоксид
ДСН (SDS) – додецилсульфат натрия
ДТТ (DTT) – дитиотреитол
ДЭАЭ–целлюлоза (DEAE-cellulose) – диэтиламиноэтил-целлюлоза
ИПТГ (IPTG) – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
МАЛДИ (MALDI) – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
ПААГ-электрофорез (PAGE) – электрофорез в полиакриламидном геле
ПСА (APS) – персульфат аммония
ТФУ (TFA) – трифторуксусная кислота
УФ (UV) – ультрафиолетовое излучение, $\lambda=280-320\text{nm}$
ЯМР (NMR) – ядерный магнитный резонанс
FFA1 – внеклеточная фукоиданаза из морской бактерии *Formosa algae*
FFA2 – внутриклеточная фукоиданаза из морской бактерии *Formosa algae*
Fuc– фукоза
Gal– галактоза
Glc – глюкоза
Man – манноза
Rha – рамноза
U – уроновая кислота
Xyl – ксилоза

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Полисахариды бурых водорослей (фукоиданы, альгиновые кислоты, ламинараны) разнообразны по своей структуре и биологической активности. Интерес к $1\rightarrow3;1\rightarrow6\text{-}\beta\text{-D-}$ глюканам, к которым относится ламинаран, связан с их влиянием на системы иммунитета растений, животных и человека. Фукоиданы – сульфатированные гетерополисахариды - проявляют антикоагулянтное, иммуномодулирующее, противоопухолевое и противовирусное действие и в настоящее время уже предлагаются как потенциальные лекарственные средства. Несмотря на широкую известность этих полисахаридов, не решен вопрос о взаимосвязи биологической активности и химической структуры, так как структуры фукоиданов полностью не установлены. Трудности связаны с тем, что содержание и структура полисахаридов зависят от вида водоросли, стадии развития, в меньшей степени от сезона, места сбора, возраста и т.д. Язык полисахаридов является гораздо более сложным, чем язык генов или белков. В то время как гены используют только четыре «буквы», а белки используют двадцать, в алфавите сахаров имеется более двадцати «букв», которые могут быть модифицированы различными заместителями, во-вторых, «буквы» могут быть связаны различными способами, и, наконец, они могут образовывать разветвлённые структуры. Это делает анализ структуры полисахаридов невероятно сложным. Даже применение ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии не всегда позволяет с достаточной точностью установить структуру сложных полисахаридов.

Важными инструментами в структурных исследованиях полисахаридов служат ферменты с установленными специфичностью и механизмом действия. Ферментативная трансформация различных веществ представляет большой интерес, поскольку параметры ферментативной реакции можно легко контролировать, выход целевых продуктов, как правило, высок, а их структура постоянна, что не достигается при проведении реакций, протекающих в отсутствие ферментов. Кроме того, ферментативная трансформация полисахаридов открывает перспективы получения новых стандартных препаратов с более высокой биологической активностью.

Таким образом, актуальными являются систематические исследования распространения в морских организмах ферментов, принимающих участие в деградации полисахаридов; разработка методов выделения индивидуальных ферментов; изучение их свойств, специфичности, механизма действия и возможности их применения в структурных исследованиях углеводов и для получения новых биологически активных веществ.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является установление структуры и особенностей каталитического действия $1\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканаз и фукоиданаз из морских организмов, а также получение их рекомбинантных форм для дальнейшего использования в исследовании процессов деполимеризации полисахаридов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1) Разработать схемы выделения индивидуальных фукоиданаз и $1\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканаз из морских организмов. 2) Изучить каталитические свойства, специфичность и тип действия выделенных ферментов. 3) Установить структуры продуктов ферментативной трансформации полисахаридов. 4) Определить аминокислотные последовательности выделенных ферментов. 5) Получить и охарактеризовать рекомбинантные ферменты.

Научная новизна и практическая значимость работы. Изучены четыре новые $1\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканазы морского происхождения. Установлены их первичные структуры, особенности каталитического действия, определены оптимальные акцепторы в реакциях трансгликозилирования.

Разработан простой метод скрининга продуцентов фукоиданаз среди микроорганизмов. Из морской бактерии *Formosa algae* КММ 3553Т и печени морского моллюска *Lambis* sp. выделены ферменты, катализирующие расщепление фукоидана. Определены их основные биохимические свойства, специфичность и тип действия. Установлены структуры основных продуктов трансформации фукоидана, полученных под действием выделенных ферментов. Установлены первичные структуры двух фукоиданаз из морской бактерии *F. algae* КММ 3553Т.

Получены две рекомбинантные фукоиданазы и проведено исследование их каталитических свойств.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Глюканы из морских моллюсков *Perna viridis*, *Tapes literata*, *Mizuhopecten yessoensis* и *Littorina sitkana* являются глюкан эндо-1→3-β-D-глюканазами и относятся к 16 структурному семейству гликозид гидролаз. Они катализируют гидролиз β-1→3 гликозидных связей в молекулах растворимых 1→3;1→6-β-D-глюканов с сохранением конфигурации расщепляемой связи и обладают трансгликозилирующей способностью.
2. Фукоиданаза из морского моллюска *Lambis* sp. является ферментом эндо-типа действия и катализирует расщепление α-1→4-О-гликозидных связей между остатками L-фукозы в молекуле фукоидана из *Fucus evanescens*.
3. Рекомбинантная фукоиданаза FFA1 является ферментом эндо-типа действия и катализирует расщепление α-1→4-О-гликозидных связей между остатками L-фукозы в молекулах фукоиданов из *F. evanescens* и *Sargassum horneri*.
4. Внутриклеточная фукоиданаза FFA2, выделенная из морской бактерии *F. algae* KMM 3553T, является ферментом эндо-типа действия и катализирует расщепление α-1→4-О-гликозидных связей между остатками L-фукозы в молекуле фукоидана из *F. evanescens*. Для осуществления каталитического процесса необходимо наличие в молекуле субстрата сульфатных групп при C2 остатков фукозы.
5. Рекомбинантная фукоиданаза FFA2 катализирует расщепление α-1→4-О-гликозидных связей между остатками L-фукозы в молекулах сульфатированных фукоолигосахаридов. Активность фукоиданазы снижается с уменьшением их степени полимеризации. Атака ферментом осуществляется ближе к восстанавливающему концу субстрата.
6. Фукоиданазы FFA1 и FFA2 относятся к 107 структурному семейству О-гликозид гидролаз.

7. Разработанный экспресс-метод обнаружения фукоиданаз в бактериях применим для масштабного поиска продуцентов ферментов различной специфичности.

Апробация работы. Материалы данной работы были представлены на следующих конференциях и симпозиумах:

International Symposium on Marine Natural Products Nago, Okinawa. 2001; XVI International Symposium on glucoconjugates, The Hague, The Netherlands, 2001; 4th European conference on marine natural products, Paris, France, 2005; I International Symposium on Marine Enzymes and Polysaccharides, Nhatrang, Vietnam, 2012; The 5th Korea-Russia Bio Joint Forum on the Natural Products Industrialization and Application, Republic of Korea, 2013.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 22 статьи в рецензируемых российских и международных журналах, 4 патента и 8 тезисов докладов в материалах научных конференций.

Личный вклад автора. Основные результаты были получены лично автором, либо под его непосредственным руководством. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, выбор методов, анализ результатов и подготовку публикаций.

Структура диссертации. Диссертационная работа содержит следующие разделы: Введение, Литературный обзор, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Выводы и Список литературы. Список литературы включает 265 источников. Диссертация изложена на 184 страницах и содержит 73 рисунка и 55 таблиц.

2. Обзор литературы

2.1 Субстраты ламинариназ и фукоиданаз

Одной из основных характеристик ферментов является специфичность их действия. Для определения специфичности необходимо иметь субстраты различной структуры и владеть как простыми аналитическими методами контроля над трансформацией субстрата, так и современными способами анализа состава и структуры продуктов ферментативной реакции.

Дополнительные сложности возникают при использовании в качестве субстратов полисахаридов, которые должны быть высокоочищенными, а их структура установлена с точностью, которую позволяют достичь современные методы анализа.

Установление специфичности 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз (ламинариназ) в настоящее время не представляет особой сложности, поскольку субстратами являются относительно простые молекулы природных 1 $\rightarrow$ 3-, 1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6- либо 1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4- β -D-глюканов.

Трудности в исследовании фукоиданаз связаны с тем, что фукоиданы – субстраты фукоиданаз, являются сложными молекулами, построенными, в основном, из остатков сульфатированной α -L-фукозы; часто они включают остатки других моносахаридов, иногда сульфатированных, соединенных разными типами гликозидных связей. Стоит отметить и трудности, связанные с количественным определением уровня активности фукоиданаз. Далее мы рассмотрим известные структуры фукоиданов и ламинаранов, выделенных из разных видов бурых водорослей.

2.2 Фукоиданы

Фукоидан был впервые выделен из бурых водорослей более 100 лет назад шведским ученым из университета г. Упсала Н.З. Kylin, который назвал его фукоидином [1]. Содержание фукоиданов в бурых водорослях колеблется в довольно широких пределах (от 0,4 до 28,3%) и зависит от вида водоросли и стадии

развития [2]. Достаточно высокое содержание фукоидана наблюдается в водорослях порядка Fucales: от 13,4% до 16,5 % - у *Fucus vesiculosus* и от 10,0% до 11,5% - у *Ascophyllum nodosum* [3]. В дальневосточных представителях порядка Laminariales содержание фукоидана меньше: от 0,6 до 6,5%, а водорослях порядка Fucales: от 1,5 до 7,9% [4, 5]. Такое различие в содержании фукоидана, вероятно, определяется сезонными изменениями таких абиотических факторов, как температура, концентрация элементов минерального питания, освещенность [6], и зависит от репродуктивного статуса водоросли [4].

Фукоиданы являются основным компонентом внеклеточного матрикса (ВКМ) концептакулов фукоидов, что было определено гистохимическими методами [7, 8]. Концентрация этих полисахаридов во ВКМ концептакулов в несколько десятков раз выше, чем в межклетниках сердцевины [8]. С помощью иммуноцитохимического метода окрашивания удалось обнаружить, что фукоидан локализован в области клеточной стенки. Однако он был обнаружен не только в области эпидермальных клеток, но и во внутреннем кортикальном слое. Было показано, что в клетках водоросли *Saccharina japonica* фукоидан находится на расстоянии 50 - 150 мкм от поверхности [9]. Предполагается, что фукоиданы, благодаря их гигроскопичности, помогают в высвобождении репродуктивных клеток. Они вовлечены в процессы ионного и осмотического регулирования и механической поддержки клеточной стенки [10]. Фукоиданы, наряду с альгиновыми кислотами, предохраняют растения, произрастающие на литорали, от высыхания и обеспечивают стабильность клеточных стенок [11]. Предполагается также экранирующая функция фукоидана против ультрафиолетовой радиации высокой интенсивности [12].

В последние годы наблюдается устойчивый рост интереса исследователей к изучению фукоидана. Это связано с широким спектром биологического действия и множеством возможных сфер его применения [10, 13]. Основные биологические эффекты и идентифицированные мишени для фукоиданов приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 - Виды биологической активности фукоиданов

Вид биологической активности	Идентифицированные мишени	Ссылки
Антикоагулянтная/антитромботическая	Антитромбин, гепариновый кофактор II	[14-16]
Антикомплементарная	C4, C4b,2a, C3, и C3b, Bb	[16-18]
Противовоспалительная	P-селектин и L-селектин	[16, 19-27]
Ангиогенная/антиангиогенная	VEGFs, bFGF, FGF-2/ α 6, β 1, и PECAM-1 субъединица интегрина	[15, 16, 20, 28-39]
Противоопухолевая	Каспазы-3, -8 and -9, MAPK и их ингибиторы, HIF-1	[40-60]
Антидиабетическая	α -глюкозидаза, α -амилаза	[61-68]
Иммуномодулирующая	NK-клетки, Т-клетки, дендритные клетки	[24, 69-72]

Фукоиданы обладают высокой степенью сродства к ионам двухвалентных металлов. Это обстоятельство нашло свое применение в исследованиях, касающихся вопросов выведения свинца и других тяжелых металлов из организма млекопитающих и человека. Установлено, что катионы двухвалентных металлов по способности связываться с фукоиданами из *Ascophyllum nodosum* располагаются в следующей последовательности: Pb^{2+} Ba^{2+} Cd^{2+} Cr^{2+} Cu^{2+} Fe^{2+} Co^{2+} Zn^{2+} Mg^{2+} Mn^{2+} Ni^{2+} Ca^{2+} .

История изучения структуры фукоиданов началась с исследования фукоидана, выделенного из бурой водоросли *F. vesiculosus*, которая относится к порядку Fucales. На протяжении долгого времени считалось, что углеводные цепи этого полисахарида содержат преимущественно остатки фукозы, соединенные α -1 $\rightarrow$ 2-О-гликозидными связями и сульфатированные по C4. Пересмотр этой структуры привел авторов другой статьи к выводу, что основная цепь полисахарида, выделенного из *F. vesiculosus*, содержит α -1 $\rightarrow$ 3-связанные остатки фукозы, разветвления присоединены к ним в положении 2, тогда как сульфатные группы - в положении 4 остатков фукозы [73]. В 2001 году Chevolot с соавторами было установлено, что основная цепь этого фукоидана состоит из остатков сульфатированной фукозы, связанной чередующимися α -1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 4-гликозидными связями [74].

В настоящее время известные сульфатированные фукозосодержащие полисахариды бурых водорослей условно можно разделить на несколько структурных групп:

1. Фукоиданы, главная цепь которых состоит из остатков фукозы, связанных α -1 $\rightarrow$ 3-гликозидными связями. Выделены из бурых водорослей порядков Ectocarpales и Laminariales.
2. Фукоиданы, главная цепь которых состоит из остатков фукозы, связанных α -1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 4-гликозидными связями. Выделены из бурых водорослей порядка Fucales.
3. Сульфатированные галактофуканы - полисахариды, содержащие в главной цепи остатки фукозы и галактозы в качестве основных моносахаридов.
4. Фукоиданы сложного состава – сульфатированные гетерополисахариды, содержащие остатки фукозы, маннозы, ксилозы, уроновой кислоты, галактозы и сульфата в различных соотношениях.

Молекулярная масса фукоиданов варьирует в широких пределах: от 13 кДа [75] до 1800 кДа [76] (табл. 2.2). Это, в известной степени, приблизительные оценки, поскольку нет стандартных образцов сульфатированных полисахаридов с установленной молекулярной массой [12]. Существует мнение, что достоверно методом ЯМР-спектроскопии можно установить структуру фукоиданов с молекулярной массой, не превышающей 20 кДа [12]. Следовательно, фукоиданы с высокой молекулярной массой должны подвергаться деполимеризации, например, с помощью ферментов для последующего анализа структуры получившихся фрагментов.

Родственные фукоиданам сульфатированные полисахариды, состоящие только из остатков α -L-фукозы, выделены из иглокожих [51]. В наземных организмах полисахариды, подобные фукоиданам, до сих пор не обнаружены.

Таблица 2.2 - Молекулярная масса фукоиданов

Источник	Молекулярная масса, кДа	Ссылка
<i>Ascophyllum nodosum</i>	13	[77]
<i>Ascophyllum nodosum</i>	16	[78]
<i>Sargassum fusiforme</i> (<i>Hizikia fusiforme</i>)	25	[79]
<i>Fucus vesiculosus</i>	100-180	[80]
<i>Fucus vesiculosus</i>	160	[81]
<i>Costaria costata</i>	160	[76]
<i>Saccharina japonica</i>	189	[82]
<i>Cladosiphon okamuranus</i>	200	[83]
<i>Fucus evanescens</i>	650	[76]
<i>Saccharina gurjanovae</i>	810	[76]
<i>Alaria ochotensis</i>	860	[76]
<i>Sargassum fusiforme</i> (<i>Hizikia fusiforme</i>)	950	[79]
<i>Saccharina cichorioides</i>	1160	[76]
<i>S. japonica</i>	1800	[76]

2.3 Фукоиданы с главной цепью, состоящей из α -1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков сульфатированной фукозы

В большинстве случаев для установления структуры фукоиданов выбираются фракции, основным компонентом которых является фукоза. Фукоиданы, выделенные из бурых водорослей, принадлежащих к порядкам Chordariales и Laminariales (рис. 2.1), представляют собой полисахариды, состоящие из α -1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков сульфатированной фукозы. Подробно изучен фукоидан, выделенный из бурой водоросли *Chorda filum* [84]. ^1H ЯМР-спектр его десульфатированного и дезацетилированного производного соответствовал гексасахаридному повторяющемуся фрагменту, в котором на пять 1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков фукозы приходится один остаток фукозы в качестве разветвления при C2. Остатки фукозы в нативном фукоидане сульфатированы при C4 и реже - при C2. Некоторые 3-связанные остатки фукозы ацетилированы по положению 2.

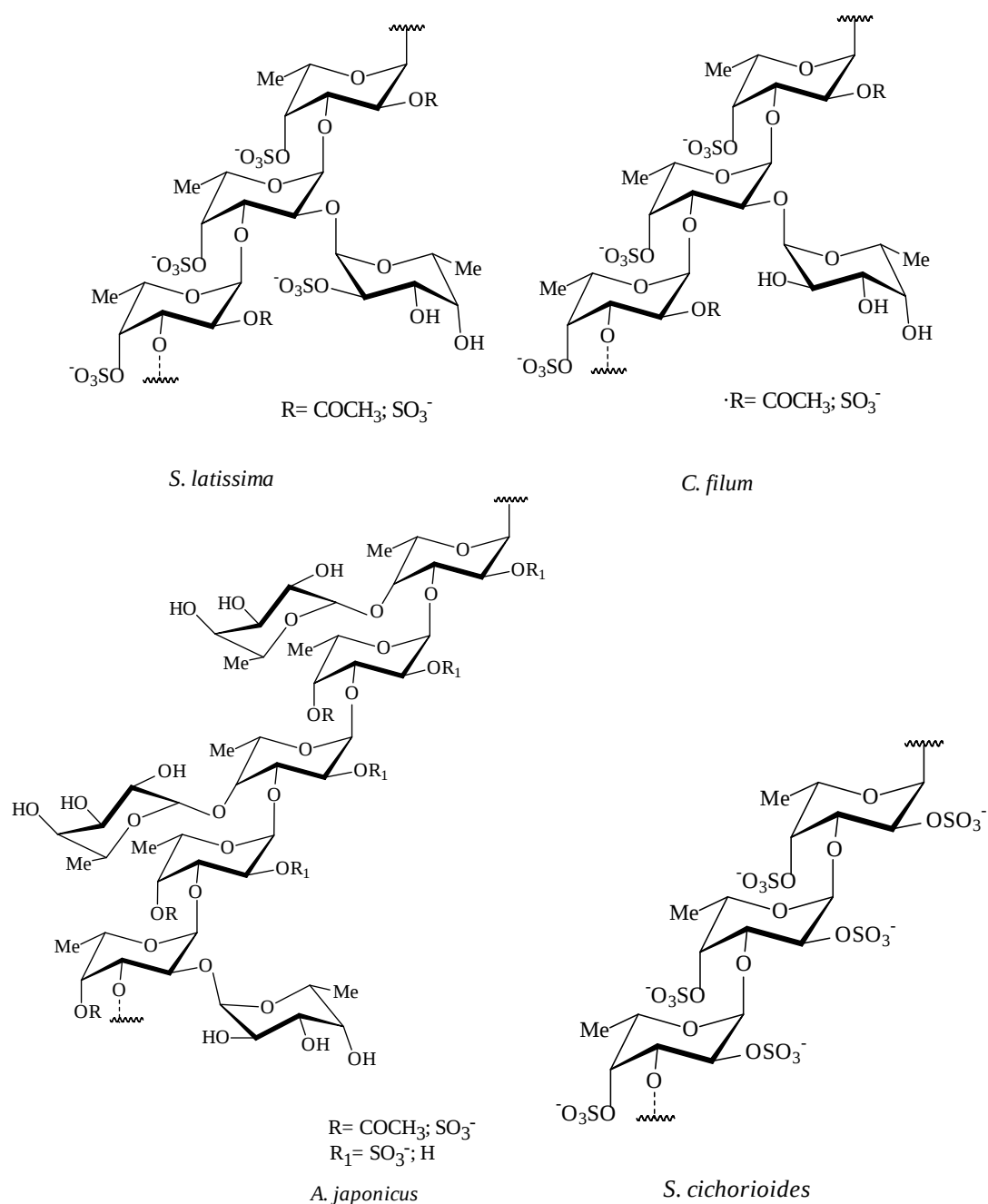


Рисунок 2.1 – Фукоиданы из различных видов бурых водорослей, построенные из α -1→3-связанных остатков сульфатированной L-фукозы.

Похожие фукоиданы были выделены и из других видов водорослей: *Saccharina latissima* (*Laminaria saccharina*) [85], *S. cichorioides* [86], *Lessonia vadosa* [87]. Эти фукоиданы построены по общему для представителей порядка Laminariales плану: основная цепь содержит остатки фукозы, связанные α -1→3 гликозидными связями. Фукоидан, выделенный из *S. latissima*, содержит разветвления в виде фукозных остатков при незамещенных сульфатной группой C2

[85]. *S. cichorioides* синтезирует самый высокосульфатированный фукоидан среди известных: практически все остатки фукозы в нем сульфатированы при C2 и C4 [86].

Фукоидан из *Analipus japonicus* имеет такую же основную цепь, состоящую из 1→3-связанных остатков α -L-фукозы, но содержит многочисленные заместители в виде единичных остатков α -L-фукопиранозы (три разветвления при C4 и одно при C2) на каждые 10 остатков фукозы главной цепи. Сульфатные группы располагаются, в основном, при C2 и реже при C4. В этом фукоидане обнаружены ацетильные группы, которые локализованы главным образом при C4. Большинство концевых невосстанавливающих остатков фукозы сульфатированы при C2 и C4 [88].

Из *Cladosiphon okamuranus* был выделен ацетилированный фукоидан, содержащий такую же основную цепь с единичными остатками α -D-глюкопиранозилуроновой кислоты в качестве ответвления при C2 остатков фукозы [89, 90]. Необычный полисахарид этого типа был выделен из *Chordaria flagelliformis*. Около одной трети остатков фукозы основной цепи гликозилированы при C2 остатками α -D-глюкопиранозилуроновой кислоты, примерно половина которых гликозилирована при C4 остатками α -L-фукофуранозы или дисахаридов α -L-Fucf-(1→2)- α -L-Fucf-(1→ [91].

2.4 Фукоиданы, основная цепь которых состоит из чередующихся 1→3- и 1→4-связанных остатков сульфатированной α -L-фукозы

Основная цепь фукоиданов бурых водорослей порядка Fucales (Cyclosporoophyceae) построена из чередующихся α -1→3 и α -1→4-связанных остатков сульфатированной фукозы (рис. 2.2). По всей видимости, различия в структуре основной цепи фукоиданов связаны с разным механизмом биосинтеза этих полисахаридов у бурых водорослей, принадлежащих к классам Phaeosporophyceae и Cyclosporoophyceae.

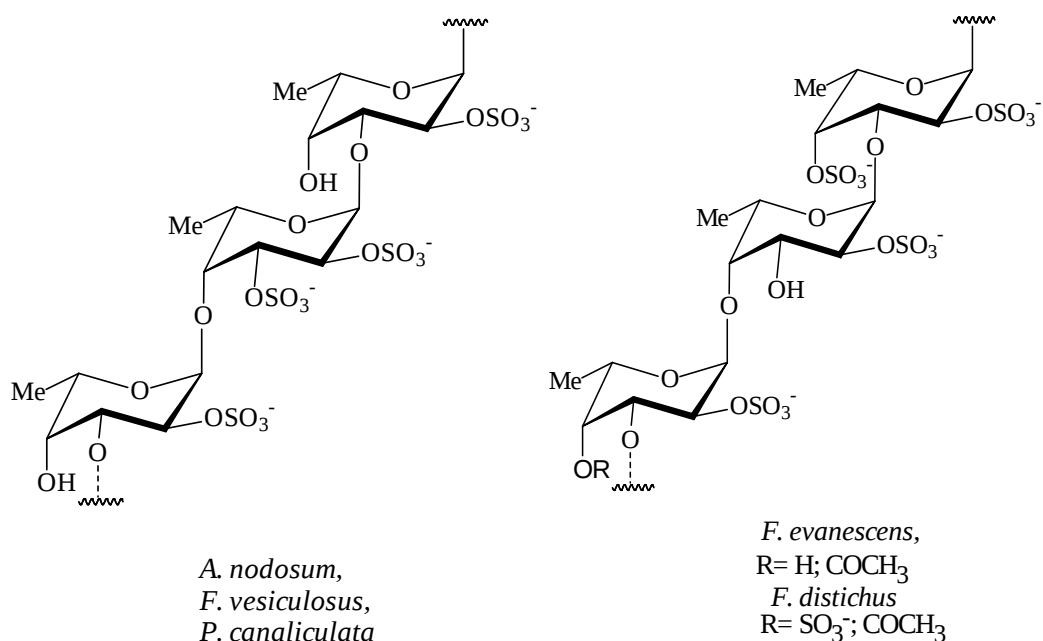


Рисунок 2.2 - Фукоиданы, построенные из α -1 $\rightarrow$ 3- и α -1 $\rightarrow$ 4-связанных остатков сульфатированной L-фукозы.

В работе Билан М.И. и др. было показано, что фракция фукоидана, выделенная из Тихоокеанской бурой водоросли *F. evanescens*, обладает линейной структурой и состоит из чередующихся 1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 4-связанных остатков α -L-фукопиранозы, сульфатированных по C2. Небольшое количество дополнительных сульфатных групп расположено в положениях 3 и 4 остатков α -L-Фус. Кроме того, в фукоидане часть остатков фукозы ацетилирована [92]. Другими авторами [93] из *F. evanescens* была выделена фракция фукоидана с более высоким содержанием α -1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков L-фукозы (1 $\rightarrow$ 3:1 $\rightarrow$ 4 = 1,5:1). Очевидно, бурая водоросль *F. evanescens* синтезирует разные типы фукоиданов. Из бурой водоросли *Coccophora langsdorfii* была выделена фракция фукоидана, основная цепь которого состояла из остатков α -L-фукозы, связанной чередующимися 1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 4-гликозидными связями, сульфатные группы располагались при C2 и C4 1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков α -L-фукозы [94].

Водоросль *Ascophyllum nodosum* синтезирует несколько типов сульфатированных полисахаридов. Фракцию, содержащую наибольшее количество сульфатных групп, подвергали частичному кислотному гидролизу и изучали с помощью ЯМР-спектроскопии. В результате для этой фракции была предложена регулярная структура из повторяющихся дисахаридных звеньев [74]. Из *Fucus*

distichus была выделена фракция фукоидана, характеризующаяся необычно высокой регулярностью [95], построенная из повторяющихся дисахаридных звеньев α -L-фукозы, связанных 1 $\rightarrow$ 3 и 1 $\rightarrow$ 4 гликозидными связями.

2.5 Фукоиданы, представляющие собой сульфатированные галактофуканы или более сложные гетерополисахариды

Как уже отмечалось, фукоиданы из многих видов водорослей являются гетерополисахаридами и часто кроме фукозы содержат небольшие количества других моносахаридов: галактозу, ксилозу, маннозу, глюкуроновую кислоту. Известны полисахариды, состоящие примерно из равных количеств сульфатированных остатков α -L-фукозы и β -D-галактозы, так называемые галактофуканы. Галактофуканы были выделены из целых талломов *S. japonica* [96], *S. gurjanovae* [97], *S. patens* [98] или спорофиллов бурых водорослей *Alaria fistulosa* [99] и *U. pinnatifida* [100]. Необходимо отметить, что во многих статьях, посвященных изучению биологического действия фукоиданов, данные о структуре чаще приводятся как ссылка на работы других исследователей. Сведения о структуре в таких работах могут быть некорректными, так как из одной и той же водоросли могут быть получены фракции фукоиданов с разной структурой. Например, из бурой водоросли *U. pinnatifida* была выделена фракция сульфатированного галактофукана, главная цепь которого построена из 1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков α -L-фукопиранозы и β -D-галактопиранозы в соотношении 1:0,9. Минорные количества ксилозы и маннозы также были обнаружены в составе этого полисахарида [101]. Из этого же вида водоросли был выделен сульфатированный галактофукан, с таким же соотношением остатков α -L-фукопиранозы и β -D-галактопиранозы (1:0,9). Было установлено, что этот полисахарид состоял из блоков, включающих остатки фукозы и галактозы ($n=2-5$). Остатки α -L-фукопиранозы были сульфатированы при C2 и реже при C4, положение сульфатных групп также отмечалось при C3 и/или C6 остатков β -D-галактопиранозы [4].

Wang с соавторами разделили общую фракцию фукоидана из *S. japonica* на три фракции (LF1, LF2, LF3) [102]. Основная фракция LF2 содержала остатки L-

фукозы, D-галактозы и сульфатные группы в соотношении 6:1:9. С помощью одно- и двумерной ЯМР-спектроскопии было показано, что главная цепь построена из 1→3- (75%) и 1→4-связанных (25%) остатков α -L-фукопиранозы. В точках разветвления при C4 находятся остатки β -D-галактопиранозы (35%) или остатки α -L-фукозы (65%). Сульфатные группы находятся в положении 2 или 4, иногда 2 и 4 остатков фукозы и в положении 3 и/или 4 остатков галактозы.

Ксилофукоглюкуронан, выделенный из бурой водоросли *A. nodosum*, был назван аскофилланом. Его основная цепь состояла из соединенных 1→4-связями остатков D-глюкуроновой кислоты, к которым присоединены ксилоза и сульфатированные остатки L-фукозы и D-галактозы [103]. Фукоиданы подобного строения были выделены из бурой водоросли *Dictyota menstrualis* [104].

Другой тип сульфатированных полисахаридов, который первоначально выделили из бурой водоросли *Sargassum linifolium*, был назван саргассаном. Такие полисахариды отличались от других фукозосодержащих полисахаридов высоким содержанием галактозы и глюкуроновой кислоты [105]. Основная цепь молекулы саргассана состояла из остатков D-глюкуроновой кислоты и маннозы, а разветвления представляли собой остатки D-галактозы, D-ксилозы и L-фукозы; сульфатные группы были присоединены к некоторым остаткам галактозы и фукозы. Фукоидан саргассанового типа, не содержащий фукозы в составе кора, был выделен из бурой водоросли *Hizikia fusiforme* (*Sargassum fusiforme*) [79]. Его главная цепь состояла из чередующихся остатков 2-связанной α -D-маннопиранозы и 4-связанной β -D-глюкуроновой кислоты с небольшим количеством остатков 4-связанной β -D-галактозы. В недавней статье сообщалось, что китайские исследователи из Shanghai Institute of Materia Medica выделили фукоидан из того же вида водорослей, который содержал, по данным авторов, не α -L-фукозу, а β -L-фукозу, что является весьма сомнительным утверждением [106]. Полисахарид с глюкурономанновым кором был найден ранее в *Saccharina sculpera* (*Kjellmaniella crassifolia*) [107].

Фракционирование нативного фукоидана из *S. angustata* var. *longissima* (ранее *Laminaria angustata*) позволило выделить небольшое количество сульфатированного галактана, содержащего лишь следы фукозы и глюкуроновой

кислоты [108]. Исследования полученного образца полисахарида позволили авторам сделать вывод, что его основная цепь может быть представлена повторяющимся фрагментом следующей структуры: $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow]_n$. Большинство сульфатных групп занимает положение 6 в $1\rightarrow 3$ -связанных остатках галактозы, сульфатные группы также расположены при C3 в 6-связанных остатках галактозы. Разветвления в виде остатков фукозы присоединены по C4 остатков галактозы.

Таким образом, фукоиданы водорослей представляют собой семейство чрезвычайно разнообразных по химической структуре сульфатированных полисахаридов. Один и тот же вид водорослей может синтезировать несколько типов фукоиданов. Например, из *A. nodosum* было выделено 3 типа фукоиданов. Один из них представлял собой ксилофукоглюкуронан (аскофиллановый тип). Его основная цепь состояла из остатков глюкуроновой кислоты, соединенных $1\rightarrow 4$ -гликозидными связями, к которым присоединены сульфатированные остатки L-фукозы и D-ксилозы [103]. Основная цепь другого фукоидана была построена из $1\rightarrow 3$ - и $1\rightarrow 4$ -связанных остатков α -L-фукопиранозы, сульфатированной по положению C2 и, частично, по C3 (сульфатированный фукан) [74]. Dillon с соавторами [109] получили из *A. nodosum* сульфатированный полисахарид, содержащий остатки фукозы и галактозы в соотношении 8:1. Из *Spatoglossum schroederi* были выделены два сложных сульфатированных полисахарида [110]. Один из них содержал остатки фукозы, ксилозы, глюкуроновой кислоты и сульфата. Этот полисахарид имел основную цепь, состоящую из $1\rightarrow 3$ -связанных остатков β -D-глюкуроновой кислоты, а разветвления при C4 представляли собой $1\rightarrow 3$ -связанные остатки α -L-фукозы (аскофиллановый тип). Второй полисахарид практически не содержал уроновых кислот и состоял из фукозы, ксилозы, галактозы и сульфата в мольном отношении 1,0:0,5:2,0:2,0. Его главная цепь была образована в основном $1\rightarrow 4$ -связанными остатками β -D-галактозы, частично сульфатированными по C3 (фукогалактан). Из *Adenocystis utricularis* выделили сульфатированные полисахариды, имеющие разные типы структур: галактофукан и низкосульфатированный гетерогенный полисахарид аскофилланового типа [111]. Из ризоидов марикультуры *S. japonica* были выделены два типа фукоиданов

[112]. Один из них представлял собой сульфатированный фукан, а другой, помимо фукозы, содержал галактозу, маннозу и значительное количество уроновых кислот.

Из бурой водоросли *Sargassum stenophyllum* были выделены две фракции фукоиданов [104]. Первая фракция состояла из остатков сульфатированной α -L-фукозы и α -D-глюкуроновой кислоты. Галактоза, манноза, глюкуроновая кислота, глюкоза и ксилоза также содержались в значительном количестве. Вторая фракция состояла в основном из остатков сульфатированной α -L-фукозы и несulfатированной галактозы с небольшим количеством α -D-глюкуроновой кислоты. Исследования структур этих фукоиданов позволяют предположить, что эти полисахариды имеют общую базовую структуру, построенную из остатков 1→6-связанной β -D-Gal и/или 1→2-связанной β -D-Man с разветвлениями при C3 и/или C4 галактозы, представленными остатками α -L-Fuc или остатками α -D-GlcA при C4 галактозы.

Из бурой водоросли *Saccharina latissima* (ранее *Laminaria saccharina*) было выделено пять фракций фукоиданов [85]. Основным по содержанию являлся сульфатированный фукан, главная цепь которого состояла из 3-связанных α -L-фукопиранозных остатков, сульфатированных по C4 и/или C2 и разветвленных по C2 моносulfатированных остатков α -L-фукопиранозы. Другими полисахаридами были: фукогалактан с основной цепью из 6-связанных β -D-галактопиранозных остатков, разветвленных в основном по C4 и содержащих терминальные остатки фукозы и галактозы; фукоглюкурономаннан с основной цепью из чередующихся 4-связанных остатков β -D-глюкопиранозилуруновой кислоты и 2-связанных α -D-маннопиранозных остатков с α -L-фукопиранозой в качестве единичных разветвлений по C3 α -D-маннопиранозы и фукоглюкуронан с основной цепью из 3-связанных остатков β -D-глюкопиранозилуруновой кислоты с α -L-фукопиранозой в качестве единичных разветвлений по C4. Таким образом, один вид водоросли может синтезировать сульфатированные полисахариды, отличающиеся по своей структуре.

Из бурой водоросли *Padina gymnospora* был выделен фукоидан, основная цепь которого была представлена остатками β -D-глюкуроновой кислоты, связанными 1→3 и 1→4 гликозидными связями. В качестве разветвлений были обнаружены

остатки α -L-фукопиранозы и β -D-ксилозы, которые находились при C2 остатков β -D-глюкуроновой кислоты. Сульфатные группы находились при C3 1→4-связанных остатков α -L-фукопиранозы [113]. Фукоидан, полученный из бурой водоросли *Padina tetrastrum*, состоял из остатков фукопиранозы, сульфатированных при C2 и C4 и связанных 1→2 и 1→3 гликозидными связями. Этот фукоидан содержал значительные количества ксилозы и галактозы [114].

Биосинтез фукоиданов, имеющих разные структуры, по-видимому, прежде всего связан с видовой принадлежностью водоросли. Но прослеживаются и некоторые закономерности для каждого порядка, например, в хордариевых обнаружены только сульфатированные фуканы, в ламинариевых они преобладают [115].

2.6 Фукансульфаты иглокожих

Фукансульфаты были выделены из оболочки оплодотворенных яйцеклеток морских ежей *Strongylocentrotus franciscanus*, *Strongylocentrotus pallidus* [116], *Strongylocentrotus purpuratus*, *Arbacia lixula* [117], *Lytechinus variegatus* [118]. Они построены из α -1→3-связанных остатков фукозы и, в отличие от фукоиданов, обладают четко выраженной регулярной линейной структурой и не содержат других моносахаридных остатков и ацетатных групп. Из клеточной стенки икры морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis* были выделены два фукансульфата, которые имели различия в расположении сульфатных групп [116]. Первый фукан был построен в основном из повторяющихся тетрасахаридных единиц $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2OSO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2OSO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow]_n$, в то время как второй состоял из $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(2OSO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow]_n$ (рис. 2.3). Фукансульфаты, полученные из стенок голотурий *Ludwigothurea grisea* [119], *Isostichopus badionotus* [120], *Acaudina molpadioides* [121], *Apostichopus japonicus* (*Stichopus japonicus*) [122], *Thelenota ananas* [123], *Pearsonothuria graeffei* [124], также построены из α -1→3-связанных остатков фукозы, однако не обладают строгой регулярностью и, в некоторой степени, похожи на фукоиданы водорослей (рис. 2.4). Для установления структуры этих полисахаридов применялись не только

классические методы углеводной химии, но также были использованы ферменты, катализирующие расщепление фукоидана [125].

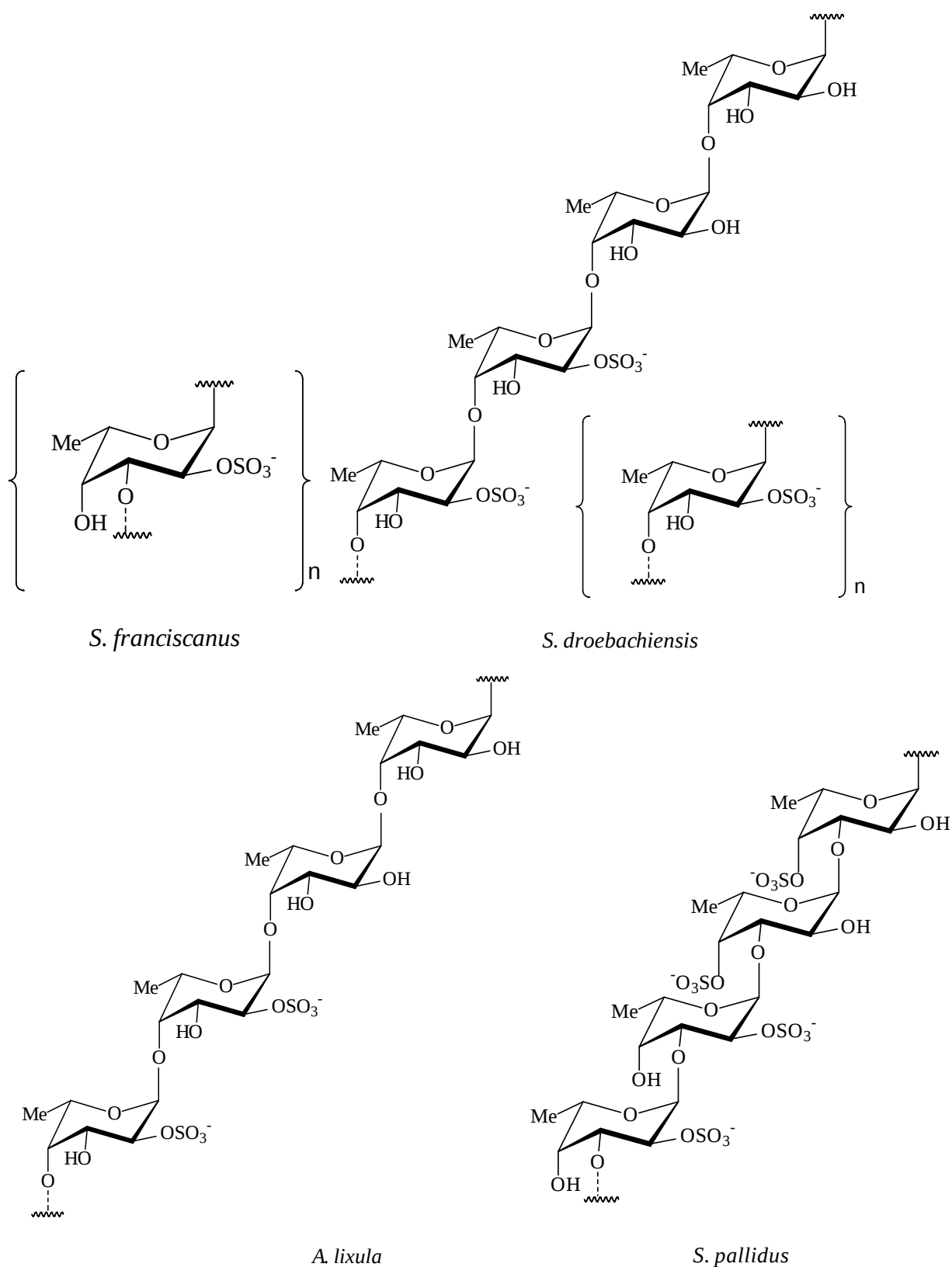


Рисунок 2.3 – Фрагменты структур фукансульфатов морских ежей.

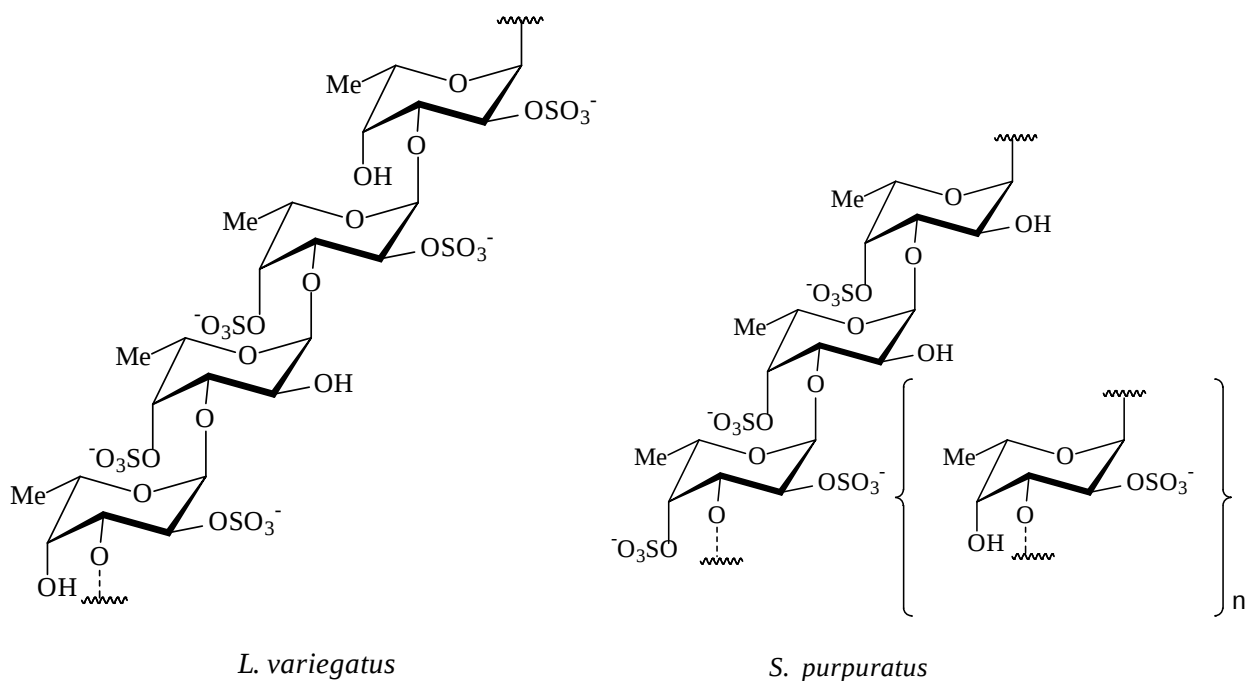


Рисунок 2.3 – Фрагменты структур фукансульфатов морских ежей (Продолжение).

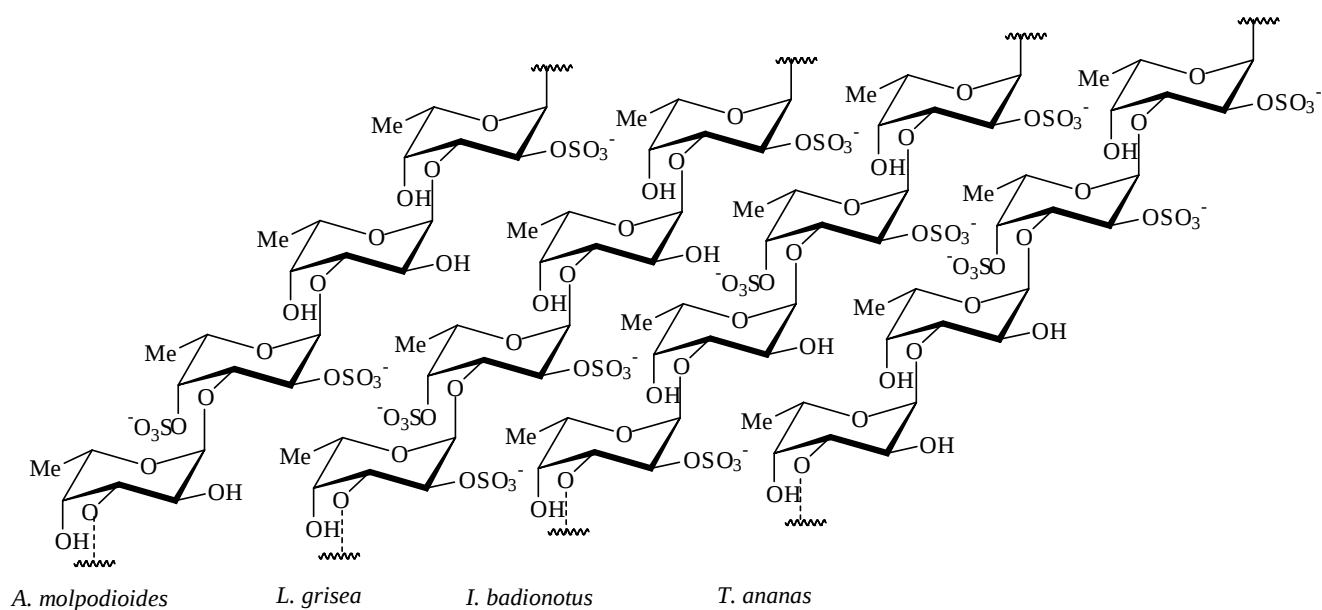


Рисунок 2.4 – Фрагменты структур фукансульфатов голотурий.

2.7 Ламинараны

Ламинараны – водорастворимые нейтральные полисахариды бурых водорослей, которые выполняют запасную функцию в клетках водорослей и содержатся в вакуолях внутри хлоропластов. Содержание и структура ламинаранов

зависят от вида, стадии развития, места произрастания и сезона сбора водорослей. Условия окружающей среды также оказывают заметное влияние на содержание ламинарана. Так, повышенный уровень нитратов и нитритов в воде вызывает бурный рост водорослей, однако накопления ламинарана в них не происходит.

Впервые ламинаран был выделен Шмидебергом из бурых водорослей рода *Laminaria* [126]. Ламинараны, выделенные из большинства различных видов водорослей, очень похожи по строению. Они имеют основную цепь, состоящую из 20-30 1→3 связанных остатков β-D-глюкопиранозы, разветвления присоединены к основной цепи 1→6 гликозидными связями и представляют собой также остатки β-D-глюкопиранозы. Характеристики некоторых 1→3;1→6-β-D-глюканов приведены в таблице 2.3, а общий план строения приведен на рисунке 2.5.

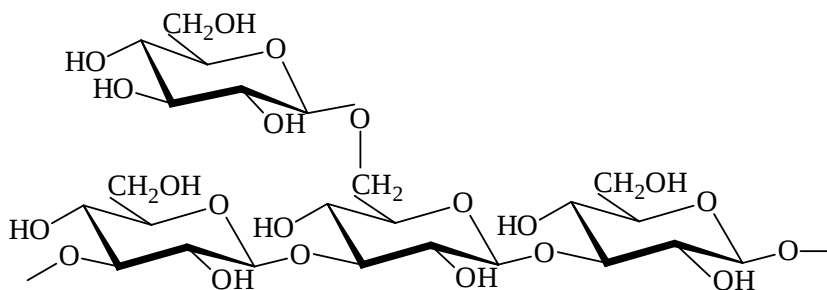


Рисунок 2.5 – Ламинараны - 1→3;1→6-β-D-глюканы

Некоторые молекулы ламинарана имеют на восстанавливающем конце остаток маннита (М-цепи), остальные молекулы оканчиваются остатком β-D-глюкозы, замещенной по С3 (G-цепи). Природная метка в субстрате в виде М-цепей очень удобна для исследования некоторых свойств глюканаз, например, способности к трансгликозилированию. Некоторые ламинараны совсем не содержат маннита на концах молекул [127].

Ламинараны, выделенные из разных видов водорослей, отличаются как соотношением 1→3 и 1→6 связей, так и способом включения их в цепь полисахарида. Например, ламинараны, выделенные из водорослей видов *Laminaria hyperborea*, *Turbinaria conoides*, *Saccharina gurjanovae* оказались линейными 1→3-β-D-глюканами [97, 128, 129], практически не содержащими 1→6-связанных остатков глюкозы (содержание <1-2%). Ламинараны из бурых водорослей *S. cichorioides* и *Costaria costata* содержат разветвления в виде 1→6-связанных

остатков глюкозы, а ламинаран из *F. evanescens* содержит в разветвлениях помимо глюкозы еще и гентиобиозу [5, 130]. Высокоразветвленный ламинаран был выделен из водоросли вида *Eisenia bicyclis*. Соотношение 1→3 к 1→6 связям было в диапазоне от 3:1 до 3:2, кроме того, часть 1→6-связанных остатков глюкозы была включена и в основную цепь ламинарана [127, 131]. Другими авторами из этого же вида водорослей был выделен еще более разветвленный ламинаран с соотношением 1→3:1→6 связей равным 1,5:1 [132]. Ламинараны из *Ishige okamurae* и *Chorda filum* имели в основной цепи, наряду с 1→3, 1→6-связанные остатки глюкозы [133, 134].

Таблица 2.3 – Характеристики структуры некоторых 1→3;1→6-β-D-глюканов водорослей

Источник получения	Mr, кДа	Соотношение 1→3:1→6	Ссылка
<i>Saccharina latissima</i>	5	7:1	[135]
<i>Laminaria hyperborea</i>	3-5	98:1	[135]
<i>S. japonica</i>	4		[130]
<i>S. gurjanovae</i>	5	98:2	[130]
<i>Fucus evanescens</i>	5	65:35	[130]
<i>Eisenia bicycles</i>	4	3:2	[132]
<i>E. bicycles</i>		2:1	[136]

Типичные ламинараны, которые синтезируются большинством видов бурых водорослей, имеют 6-10% 1→6-связанных остатков глюкозы в виде единичных разветвлений. Гораздо реже встречаются бурые водоросли, синтезирующие так называемый «нерастворимый» ламинаран, который содержит менее 2% 1→6-связанных остатков глюкозы, или «разветвлённый» ламинаран, содержащий >20% 1→6-связанных остатков глюкозы.

2.8 Ферменты, катализирующие трансформацию полисахаридов бурых водорослей

Гликозидазы (К.Ф. 3.2.1 О-гликозид гидролазы) являются ключевыми ферментами метаболизма углеводов. Они катализируют расщепление О-гликозидных связей в углеводах и углеводсодержащих биополимерах. Участвуя в сложных процессах жизнедеятельности, О-гликозид гидролазы обладают

относительно простым механизмом действия, что делает их удобной моделью, с помощью которой решались и продолжают решаться важные проблемы энзимологии.

Ферменты, имеющие код КФ 3.2.1.x (О-гликозид гидролазы) катализируют гидролиз О-гликозидных связей между двумя или более остатками сахаров или между сахаром и несхарным остатком (3 означает гидролазы, 3.2 – гликозид гидролазы, 3.2.1 - О-гликозид гидролазы). Последняя цифра кода обозначает субстрат и в какой-то степени может отражать механизм действия фермента. Эти ферменты могут катализировать гидролиз либо олигосахаридов (олигосахарид гидролазы), либо полисахаридов (полисахарид гидролазы). Последние действуют или по экзо-типу (атакуют полисахарид с невосстанавливающего конца), или по эндо-типу (атакуют полисахарид ближе к центру молекулы). Эндо-ферменты, как правило, сохраняют конфигурацию расщепляемой связи, тогда как экзо-ферменты катализируют гидролиз с обращением конфигурации.

2.9 1→3-β-D-Глюканазы

Распространение

1→3-β-D-Глюканазы встречаются у представителей всех царств живой природы от археобактерий до эукариот [137, 138]. Ген, кодирующий 1→3-β-D-глюканазу, обнаружен в геноме вируса PBCV-1. Этот ген кодирует 1→3-β-D-глюканазу 16 семейства CAZy [139]. 1→3-β-D-Глюканазы были выделены из бактерий рода *Flavobacterium* [140-142], *Arthrobacter* [143], *Paenibacillus* [144], *Rugosoccus* [145]. Всего из бактерий выделено и охарактеризовано около двадцати 1→3-β-D-глюканаз (<http://www.brenda-enzymes.org>). Из грибов, в том числе и морских, были выделены и охарактеризованы несколько 1→3-β-D-глюканаз [146]. Такие ферменты достаточно широко распространены в высших растениях [147, 148]. Уникальными концентраторами 1→3-β-D-глюканаз, выполняющих пищеварительную функцию, оказались кристаллические стебельки морских двустворчатых моллюсков. Содержание 1→3-β-D-глюканаз в кристаллических стебельках в 500-1000 раз выше, чем в других объектах [149]. Было обнаружено,

что активная 1→3-β-D-глюканаза содержится не только в пищеварительных органах, но и в неоплодотворенных яйцеклетках большинства видов морских ежей [150, 151].

Классификация

В настоящее время широко используются два вида классификации ферментов: по типу катализируемой реакции и сходству аминокислотной последовательности.

Согласно классической номенклатуре ферментов, 1→3-β-D-глюканазы имеют следующие номера: КФ 3.2.1.6, КФ 3.2.1.39 и КФ 3.2.1.58. Классификационный номер КФ 3.2.1.58 присвоен 1→3-β-D-глюканазам экзо-типа действия, которые последовательно отщепляют глюкозу (реже олигосахарид) с невосстанавливающего конца молекулы глюкана (рис. 2.6). Известны два типа эндо- ферментов: эндо-1→3-β-D-глюканазы (КФ 3.2.1.39), для действия которых необходимым является наличие в молекуле субстрата как минимум двух соседних 1→3-связанных остатков глюкозы, и менее специфичные эндо-1→3-β-D-глюканазы (КФ 3.2.1.6), которые могут также гидролизовать β-1→4-связи, расположенные рядом с β-1→3, как, например, в молекуле лихенана.

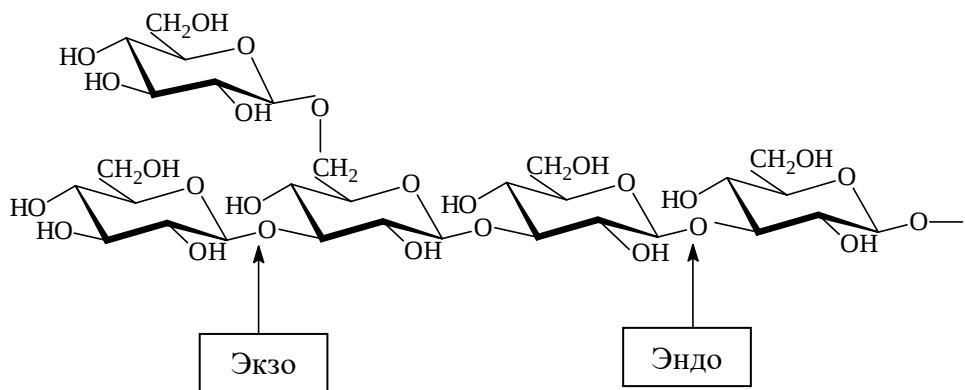


Рисунок 2.6 - Схема действия ферментов экзо- и эндо- типов действия

Альтернативой классификации по типу катализируемой реакции является классификация, основанная на гомологии аминокислотных последовательностей ферментов. Такая классификация была названа CAZy – Carbohydrate Active Enzyme (www.cazy.org). Для сравнения последовательностей аминокислот, в основном,

используется алгоритмический метод оценки информации. В случае гликозид гидролаз (GH) этот подход позволил разделить их на 135 семейств (GH family). В отдельное семейство (GH family) входят белки, которые имеют сходство первичной и вторичной структур. Эта классификация позволяет систематизировать белки, для которых пока нет данных о биохимических свойствах и функциях. Иногда CAZy позволяет предсказать каталитические и молекулярные свойства ферментов [152], а также геометрию расщепляемых ими гликозидных связей [153]. В настоящее время 135 семейств гликозид гидролаз разделены на 14 кланов. Некоторые гликозид гидролазы являются мультифункциональными ферментами и могут принадлежать сразу к нескольким семействам CAZy.

1 $\rightarrow$ 3- β -D-Глюканазы можно обнаружить в нескольких структурных семействах. Эндо-глюканазы КФ 3.2.1.39 находятся в семействах 16, 17, 55, 64, 81 и 128, КФ 3.2.1.6 – в семействах 9 и 16, экзо-глюканазы КФ 3.2.1.58 – в семействах 3, 5, 17, 55. В 5 и 55 структурные семейства CAZy попадают исключительно экзо-глюканазы КФ 3.2.1.58. Ситуация, когда ферменты одного типа действия попадают в разные структурные семейства, может говорить или о наличии тонких различий в механизмах действия ферментов, имеющих одинаковую специфичность или о явлениях дивергенции и конвергенции кодирующих их генов в процессе эволюции. Функциональная конвергенция проявляется в том, что структурно различные, и, следовательно, негомологичные ферменты проявляют способность катализировать одну и ту же биохимическую реакцию. В противоположность этому, в результате функциональной дивергенции мы можем наблюдать, что многие структурно подобные молекулы ферментов действуют на различные по структуре субстраты и катализируют различные биохимические реакции.

Структура

Следует отметить, что до сих пор не описано ни одной кристаллической структуры 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз, выделенных из морских беспозвоночных, хотя на сегодняшний день установлены третичные структуры более чем 67500 белков. Несмотря на сходство первичных структур, эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы животных и бактерий имеют ряд отличий. Так, молекулы эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз животных примерно на 80-90 аминокислот длиннее бактериальных и имеют добавочный

цистеиновый остаток для формирования дисульфидной связи. Фермент сосновой нематоды *Buesaphelenchus xylophilus* является исключением. В отличие от других эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз беспозвоночных, фермент сосновой нематоды не имеет добавочного остатка цистеина и показывает от 43 до 49 % гомологии первичной структуры со структурами бактериальных ферментов. Предполагают, что эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза нематоды произошла из фермента бактерии, благодаря горизонтальному переносу генов [154].

Активный центр 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз, как и всех гликозид гидролаз, имеет два ключевых аминокислотных остатка, один из которых – донор протонов, а другой – нуклеофил. Топология активных центров различается: для экзо-ферментов характерен активный центр типа «карман», в то время как для эндо-ферментов характерны активные центры типа «щель» и «туннель». Многие гликозид гидролазы имеют модульную структуру. В растениях были обнаружены два типа 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз: «большие» глюканазы и «маленькие». «Большие» глюканазы имеют молекулярную массу 42-50 кДа и состоят из двух доменов. N-концевой домен (33-40 кДа) обладает каталитической активностью, а меньший - С-концевой домен (около 10 кДа) - является углевод-связывающим доменом. «Маленькие» глюканазы (33-41 кДа) не имеют углевод-связывающего домена. В структуре эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз морских беспозвоночных были обнаружены и каталитический, и углевод-связывающий домены [155].

Исследуемые нами эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы морских беспозвоночных включены в 16 структурное семейство. Филогенетическое дерево 16 семейства CAZy, построенное на основе сходства аминокислотных последовательностей, имеет две различные группы ферментов, одна из них - это белки беспозвоночных, а другая - белки бактерий. Необходимо отметить, что ферменты 16 семейства имеют характерную вторичную структуру, состоящую почти исключительно из β -слоёв (рис. 2.7).

Несмотря на то, что аминокислотные последовательности некоторых ферментов имеют значительные различия, их третичные структуры очень близки, что свидетельствует о более консервативном характере третичной структуры.

Свойства

Молекулярные массы 1→3-β-D-глюканаз бактерий варьируют в широком диапазоне: от 16 кДа до 144,6 кДа [141, 156], однако в большинстве случаев их масса находится в пределах от 30 до 50 кДа. Значения оптимума pH для глюканаз бактерий находятся в интервале от 5,5 до 6,0, а температурный оптимум от 50 до 60 °C, что в среднем на 10 °C выше, чем для глюканаз из других источников.

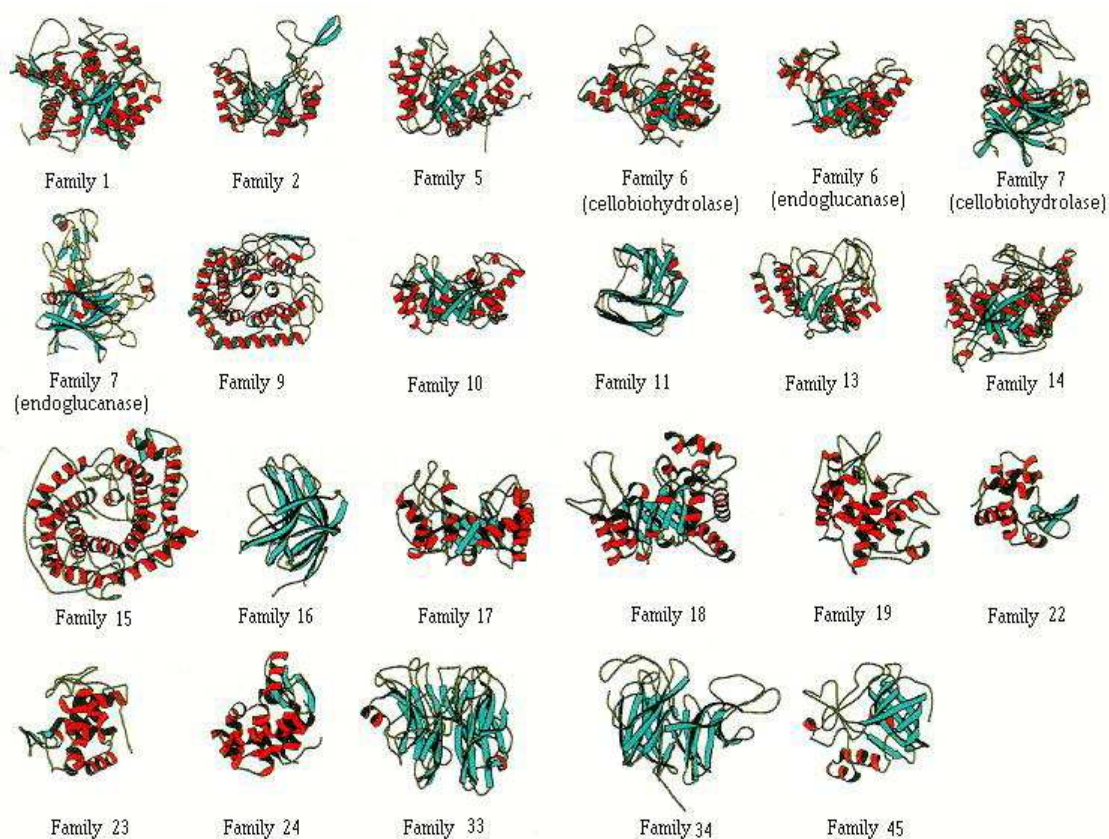


Рисунок 2.7 – Пространственная организация гликозид гидролаз некоторых семейств CAZy. Синим отмечены β-слои, красным – α-спирали.

Большинство 1→3-β-D-глюканаз грибов имеет оптимум pH в слабокислой области (3,8-6,0) [157]. Для некоторых глюканаз оптимальное значение pH их действия лежит в нейтральной или слабощелочной области [158]. Грибные глюканазы обычно стабильны в широком диапазоне pH (4,0 - 10,0) и температур (0 – 70 °C) [159], а температурный оптимум не отличается от других глюканаз и составляет от 30 до 65 °C [160]. Грибы продуцируют 1→3-β-D-глюканазы экзо- и эндо-типа действия. В морских беспозвоночных и бактериях экзо-1→3-β-D-глюканаз пока не обнаружено. Необычным является то, что некоторые экзо-

глюканазы грибов гидролизуют субстрат с сохранением аномерной конфигурации гликозидной связи [161] и обладают способностью к трансгликозилированию [162]. По составу продуктов действия эндо-глюканаз грибов на глюканы эти ферменты можно условно разделить на две группы. Первая – ферменты, катализирующие образование высокомолекулярных продуктов (олиго- и полисахаридов). Вторая группа – ферменты, катализирующие образование низкомолекулярных продуктов (моно- и олигосахаридов с небольшой степенью полимеризации). Конечными продуктами гидролиза субстрата некоторыми эндо-1→3-β-D-глюканазами грибов являются глюкоза, ламинарибиоза и ламинаритетраоза – продукты, нехарактерные для этой группы гликаназ [163]. Среди эндо-1→3-β-D-глюканаз грибов практически не обнаружено металлозависимых ферментов. Ионы металлов Hg⁺, Ag⁺ либо умеренно ингибируют активность [159], либо не влияют на активность вовсе [161, 164].

1→3-β-D-Глюканазы растений обычно имеют очень небольшую молекулярную массу по сравнению с глюканазами из других источников. Их массы варьируют от 17 до 35 кДа, и только в виде исключения встречаются белки с молекулярной массой 60 кДа. Оптимум pH 1→3-β-D-глюканаз растений находится в слабокислом диапазоне от 4,5 до 6,0 (<http://www.brenda-enzymes.org>). 1→3-β-D-Глюканазы растений осуществляют гидролиз по классическому эндо-типу, когда конечными продуктами гидролиза полимерного субстрата являются олигосахариды при практическом отсутствии глюкозы [148].

В царстве животных 1→3-β-D-глюканазы обычно встречаются в беспозвоночных - иглокожих, ракообразных и моллюсках - где они принимают участие в пищеварении и играют важную роль в эмбриогенезе иглокожих.

Сведений о 1→3-β-D-глюканазах, выделенных из морских организмов немного. На сегодняшний день исследовано всего около 30 1→3-β-D-глюканаз животного происхождения [138].

Известно, что 1→3-β-D-глюканазы могут катализировать три реакции: гидролиза (с образованием олигосахаридов различной степени полимеризации и/или глюкозы), трансгликозилирования (синтеза гликозидов в качестве продуктов)

и глюканозилтрансферазную (диспропорционирующую или ветвящую), продуктами которой являются более высокомолекулярные и разветвленные, по сравнению с исходным, глюканы.

Особого внимания заслуживает уникальная способность $1\rightarrow3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканаз морских беспозвоночных модифицировать полисахариды [165-170]. Она дает возможность получать новые биологически активные соединения, отличные от исходных полисахаридов. Ранее в лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН методом ферментативной трансформации ламинарана был получен новый глюкан – транслам, обладающий радиопротекторными, противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами [171]. В результате ферментативной трансформации в продукте реакции увеличивалось содержание $1\rightarrow6$ связей на 15%, а молекулярная масса возросла с 3-5 кДа до 8-10 кДа. Показано, что $1\rightarrow3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканазы морских беспозвоночных могут образовывать не только набор олигосахаридов, но и различные продукты трансгликозилирования в результате переноса гликоновой части субстрата на молекулы, содержащие гидроксильную группу [172]. Более того, скорость реакции трансгликозилирования для $1\rightarrow3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканаз морского происхождения обычно выше скорости реакции гидролиза, в отличие от $1\rightarrow3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканаз наземных организмов. Оказалось, что $1\rightarrow3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканазы морского происхождения катализируют гидролиз только $\beta\text{-}1\rightarrow3$ -гликозидных связей, а синтезировать могут не только $\beta\text{-}1\rightarrow3$ -, но $\beta\text{-}1\rightarrow4$ - и $\beta\text{-}1\rightarrow6$ -гликозидные связи [173, 174].

Биологические функции и применение

$\beta\text{-}1\rightarrow3$ -Глюканазы являются ферментами, выполняющими незаменимую роль для потребления питательных веществ и производства энергии в бактериях и грибах. Они имеют большое число примеров промышленного применения: в пивоваренной и кормовой промышленности, в коммерческом производстве дрожжевого экстракта, конверсии водорослевой биомассы в ферментируемые сахара и др. В то же время, благодаря особенной роли $\beta\text{-}1\rightarrow3$ -глюканов в формировании стенки микотических клеток, данные ферменты находят и специализированное применение [175].

Так, например, β -1 $\rightarrow$ 3-глюканаза из мицеллы *Trichoderma harzianum* обладает потенциалом биологического подавления роста патогенного гриба *Crinipellis perniciosa*, являющегося опаснейшим фитопатогеном какао-деревьев. Наряду с другими хитиназами и глюканазами, она влияет на подавление растительных патогенов путём лизиса β -глюканов, входящих в состав их клеточных стенок, тем самым разрушая эти стенки [176]. Кроме того, этот фермент в составе коммерческого препарата Glucanex был успешно использован в винодельческой промышленности для удаления преципитата β -1 $\rightarrow$ 3-глюкана, образующегося в ходе жизнедеятельности плесневого гриба *Botrytis cinerea* [177]. Вышеупомянутый глюкан нерастворим в 30%-ном этаноле и препятствует эффективной фильтрации перебродившего сырья.

β -1 $\rightarrow$ 3-Глюканаза из бактерии *Pseudomonas aeruginosa* МССВ 123 была использована при выделении ДНК из ряда видов грибов [178]. Проблема заключается в том, что пока не существует универсального метода экстракции ДНК из грибных и дрожжевых клеток любого вида. В то же время данный фермент показал лизирующую активность в отношении широкого спектра штаммов. Лизис проводился при 65 °С в течение 60 минут в 50 мМ Трис-НСl буфере при pH 7,0. По сравнению с традиционными методами (фенол-хлороформная экстракция, использование детергентов, растирание с песком, замораживание в жидком азоте и т. д.), такой способ получения лизирующего реагента и сам процесс лизиса отличаются низкой трудо- и материалоемкостью, что в сочетании с широким спектром действия и специфичностью применяемого фермента делает его использование коммерчески привлекательным.

В промышленном масштабе производятся также β -глюканазы некоторых штаммов *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* [179]. Использованию этих ферментов способствует то, что они не обладают цитотоксическим эффектом по отношению к животным клеткам, а в больших концентрациях даже способствуют их пролиферации [178]. Так, по заключению Офиса безопасности пищевых добавок (FDA) США в 2013 году, β -глюканаза, целлюлаза и ксиланаза из аскомицета *Talaromyces emersonii* были признаны в целом безопасными (GRAS).

В 2000 г. группа исследователей из института общей генетики им. Вавилова получила химерный белок, состоящий из укороченной молекулы лихеназы бактерии *Clostridium thermocellum* (LicBM2) и зелёного флуоресцентного белка из *Aequorea victoria* [180]. По сравнению с исходным ферментом данный белок обладает большей устойчивостью при температурном оптимуме ферментативной активности (65 °C) и может быть использован в качестве бифункционального репортера регуляции экспрессии генов, в том числе, в отдельной клетке.

Использование химерных белков может привести к увеличению скорости катализируемой реакции и к повышению её специфичности. Так, был получен бифункциональный фермент на основе β -1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4-глюканазы и Cu²⁺-зависимой оксидазы (лакказы) из *Bacillus subtilis*. Гидролитическая активность химерной конструкции в отношении перемолотого жома сахарного тростника оказалась на 20 % выше, чем у эквимольной смеси соответствующих исходных ферментов, что авторы объясняют возникновением междоменного взаимодействия [181]. В 2012 г. была получена химера из укороченной и локально модифицированной последовательности лихеназы (TFs_{W203F}) из *Fibrobacter succinogenes* и ламинариназы (TmLam) из гипертермофильной бактерии *Thermotoga maritima* [182]. Бифункциональный фермент показал более высокую удельную активность, число оборотов, субстратную специфичность и температурную стабильность по сравнению с исходными глюканазами.

Одной из наиболее необычных областей применения β -1 $\rightarrow$ 3-глюканаз является их использование в иммобилизованном виде в сенсорных системах. Примером может служить методика амперометрического определения содержания ламинарана в растворе [183].

Данные факты позволяют заключить, что возможности практического использования β -1 $\rightarrow$ 3-глюканаз лишь начинают раскрываться.

2.10 Фукоиданазы

Классификация

Ферменты, катализирующие расщепление гликозидных связей между остатками сульфатированной фукозы в молекулах фукоиданов, называют

фукоиданазами. Эти ферменты относят к классу гликозидаз (КФ 3.2.1.-). В настоящее время в классификации по типу катализируемой реакции содержатся неверные сведения о фукоиданазах (КФ 3.2.1.44), как о ферментах, катализирующих гидролиз α -1 $\rightarrow$ 2-гликозидных связей. Это связано с неточно установленной структурой субстрата - фукоидана из *F. vesiculosus*, который, как полагали авторы, состоял из остатков сульфатированной фукозы, связанных α -1 $\rightarrow$ 2-гликозидными связями [184]. Позднее в структуре этого фукоидана были обнаружены в основном α -1 $\rightarrow$ 3 и α -1 $\rightarrow$ 4 связи [73], но отнесение фукоиданаз к 1 $\rightarrow$ 2- α -L-фукоиданазам не исправлено до сих пор.

На основании классификации CAZy фукоиданазы относятся к 107 (GH 107) структурному семейству гликозид гидролаз. Первым представителем этого семейства стала фукоиданаза FcpA из морской бактерии *Mariniflexile fucanivorans* SW5, первичная структура которой была опубликована в работе [185]. Авторы провели сравнительный анализ элементов вторичных структур фукоиданазы FcpA и других фукоиданаз, для которых уже была установлена аминокислотная последовательность. В результате анализа это структурное семейство было расширено, в него вошли помимо FcpA две фукоиданазы, выделенные из [*Alteromonas*] sp. SN-1009 [186].

В настоящее время информация о ферментативной трансформации фукоиданов, равно как и самих ферментах, принимающих в ней участие, чрезвычайно ограничена. Это связано с рядом проблем: низким уровнем активности ферментов, отсутствием удобных количественных методов регистрации активности и использованием в большинстве случаев в качестве субстратов неочищенных фракций фукоиданов или фукоиданов с неустановленной структурой. Теоретически на фукоиданы может действовать достаточно большое количество ферментов разной специфичности: фукоиданазы, сульфатазы, галактаназы, маннаназы, ксиланазы, различные гликозидазы и т.д. Это могут быть как индивидуальные ферменты, высокоспецифичные к определенным структурным фрагментам субстрата, так и комплексы ферментов, которые могут совместно действовать на фукоиданы определенной структуры.

Несмотря на трудности, связанные с многообразием и сложностью структур фукоиданов, интерес к ферментам, катализирующим их превращения, постоянно растет. Он обусловлен возможностями использования ферментов в исследованиях структуры субстратов и для получения биологически активных фрагментов фукоиданов, более подходящих для создания БАД или лекарственных препаратов.

Распространение

Фукоиданазы обнаружены в морских беспозвоночных и морских бактериях. В представителях наземной фауны и микроорганизмах фукоиданазы не найдены. Имеется несколько публикаций, посвященных распространению фукоиданаз в морских бактериях – эпифитах бурых водорослей и ассоциантах голотурий [187] и морских беспозвоночных Японского моря [188]. К настоящему времени фукоиданазы выделены из морских микроорганизмов *Vibrio* sp. N-5, [189], "*Fucobacter marina*" SI-0098 (*Flavobacterium* sp. SA-0082) [190], морских протеобактерий *Pseudoalteromonas citrea* KMM 3296, KMM 3297, KMM 3298 [191], морских беспозвоночных *Haliotus* sp. [192], *Mizuhopecten yessoensis* (*Patinopecten yessoensis*) [193], морского ежа *Strongylocentrotus nudus* [194]. Ранее было отмечено присутствие фукоиданазы, наряду с другими гликозидазами, в экстракте печени морского моллюска *Littorina* sp. [195]. Подобный комплекс ферментов был найден и в кристаллическом стебельке моллюска *Telescopium telescopium* [196].

Структура

Первые сведения о структуре гена, кодирующего фукоиданазу морской бактерии *M. fucanivorans* SW5^T, первого члена нового 107 структурного семейства гликозидаз были опубликованы в 2006 году [185], в этом же году была получена рекомбинантная фукоиданаза FcpA. С помощью биоинформационного анализа гена фукоиданазы FcpA было выявлено пять доменов. Анализ аминокислотной последовательности с помощью серверов BLAST^{tr} и PSI-BLAST показал, что 60% последовательности не имеют гомологов среди белков, последовательности которых были депонированы в базе данных GENBANK. Гены фукоиданаз Fda1 и Fda2 из морской бактерии [*Alteromonas*] sp. SN-1009 были клонированы и экспрессированы японскими учёными в 2002 году, однако эта работа не содержала

сведений о биохимических свойствах ферментов [186]. Аминокислотные последовательности Fda1 и Fda2 имели, соответственно, 24% и 23% идентичности к N-концевому участку молекулы FcpA. Возможно, такая низкая идентичность связана с разной специфичностью ферментов: FcpA специфичен к α -1 $\rightarrow$ 4 связям, в то время как Fda1 и Fda2 - к α -1 $\rightarrow$ 3 связям [197]. Высокая степень сходства аминокислотных последовательностей N-концевых фрагментов FcpA и Fda2 указывает на общие элементы вторичной структуры этих полипептидов, что было выявлено с помощью гидрофобного кластерного анализа (HCA) [198] и анализа с помощью сервера RADAR [199]. В аминокислотной последовательности FcpA с помощью RADAR были обнаружены три повторяющихся домена, состоящие из 105 аминокислот [185]. Согласно данным базы Pfam [200], эти домены принадлежат к семейству кадгерин-подобных доменов. Кадгерины – большое семейство кальций-зависимых белков, которые принимают участие в процессах адгезии клеток и влияют на морфогенез тканей высших организмов [201]. Необходимо отметить, что функция кадгерин-подобных доменов в составе белков, синтезируемых бактериями, практически не изучена [202]. Предположительно, кадгерин-подобные домены участвуют в клеточной адгезии через механизм белок-белкового взаимодействия и/или ответственны за связывание полисахаридов [203]. Функция этих доменов в молекуле фукоиданазы FcpA остается невыясненной, однако, по мнению авторов, они не участвуют в каталитическом процессе. С-концевая аминокислотная последовательность FcpA длиной 75 аминокислот имеет высокий процент идентичности с С-концевыми областями некоторых белков, в основном, гликозид гидролаз и протеаз бактерий, принадлежащих к типу *Bacteroidetes*. Функция этого домена остается неизвестной, однако, каталитическая активность этого домена не обнаружена. Анализ генома морской бактерии *Shewanella violacea* DSS12^T показал наличие последовательности нуклеотидов, вероятно кодирующих гипотетический белок SVI-0379, обладающий фукоиданазной активностью. Множественное выравнивание N-концевого фрагмента FcpA, состоящего из 384 аминокислотных остатков показало 24%, 23% и 21% идентичности с Fda1, Fda2 и гипотетическим белком SVI-0379 соответственно. Как было показано [185], именно этот фрагмент обладает каталитической активностью.

Элементы вторичной структуры исследовались только для одной фукоиданазы, выделенной из *Fusarium* sp. LD8, причем аминокислотная последовательность этой фукоиданазы не была установлена [204]. Основным элементом вторичной структуры являлись β -листы (58,6%), α -спирали составляли 12%, β -повороты и неупорядоченные области занимали 15,39 и 14,5% соответственно. Было показано, что температурный оптимум этой фукоиданазы составляет 60 °С. При такой температуре количество β -поворотов уменьшалось, а α -спиралей – увеличивалось. Содержание β -листов и неупорядоченных областей оставалось неизменным. Вероятно, что при температуре 60 °С конформационный переход β -поворотов в α -спирали приводит к оптимальному соотношению элементов вторичной структуры, необходимых для проявления фукоиданазной активности [204].

Свойства

Несмотря на интерес к фукоидам, фукоиданазы остаются слабо изученными ферментами. В большинстве случаев для фукоиданаз определены лишь некоторые свойства: рН-оптимум, рН-стабильность, температурный оптимум, температурная стабильность, молекулярная масса, предположен тип действия и охарактеризованы продукты ферментативного гидролиза, иногда определена специфичность действия (табл. 2.4). Ферменты беспозвоночных, как правило, имеют оптимум в кислой области рН, за исключением одной молекулярной формы фукоиданазы, выделенной из брюхоногого моллюска *L. sitkana*, которая обладала наибольшей активностью при рН 8,5 [93]. Фукоиданазы, выделенные из моллюсков *Haliotus* sp. и *M. yessoensis* и морского ежа *S. nudus*, проявляли максимальную активность в диапазоне рН 3,5-5,5. Температурный оптимум фукоиданаз беспозвоночных лежит в области 38-45 °С, а молекулярная масса составляет от 85 до 200 кДа.

Имеется две публикации о фукоиданазах, обнаруженных в грибах *Dendryphiella arenaria* TM94 и *Fusarium* sp. LD8 [205, 206]. Фукоиданазы грибов проявляли максимальную активность при рН 6,0 и температуре 50-60 °С. Молекулярная масса фукоиданаз из *D. arenaria* TM94 и *Fusarium* sp. LD8 составила 180 кДа и 64 кДа соответственно. Время полуинактивации фукоиданазы из *D.*

arenaria TM94 составило 1 ч при 56 °С, а фукоиданазы из *Fusarium* sp. LD8 – 1 ч при 50 °С.

По сравнению с ферментами, выделенными из морских моллюсков и грибов, фукоиданазы бактерий имели рН-оптимум в нейтральной или слабощелочной среде (табл. 2.4). Фукоиданазы, продуцируемые морской бактерией *Vibrio* sp. N-5, оставались активными в диапазоне температур от 50 до 60 °С [189], в то время как фукоиданаза из "F. marina" SA-0082 теряла активность при температуре 30 °С [207]. Температура 20-25 °С и рН 7,5 были оптимальными для проявления активности фукоиданазы из *M. fucanivorans* SW5^T [185].

Влияние ингибиторов и активаторов на активность фукоиданаз практически не исследовано. Установлено, что фукоиданазы морской бактерии *Vibrio* sp. N-5 и морского моллюска *Haliotis* sp. ингибируются ионами Ag⁺ и двухвалентных металлов (Hg²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺) [189, 192]. ЭДТА, ионы Cu²⁺, Pb²⁺ не влияли на активность этих же ферментов, тогда как ионы Co²⁺, Mg²⁺ слабо активировали их активность. Ионы Cu²⁺ и Zn²⁺ ингибировали активность фукоиданаз из морских бактерий "F. marina" SA-0082 и [Alteromonas] sp. SN-1009 [186, 207].

Таблица 2.4 - Физико-химические свойства фукоиданаз

Источник	Е	Тип действия/ расщепляе- мой связи	Т-Опти- мум, °С	рН- Опти- мум	рН- Стабиль- ность	рI	Ингибит оры	Актива торы	Mr, кДа
Бактерии: <i>Vibrio</i> sp. No.5, [189]	E1	экзо	38-45	6,0	4,0-9,0	5,80	Hg ²⁺ , Fe ³⁺ , Ag ⁺ ;	Co ²⁺ (2 mM)	39,5
	E2	экзо	38-45	6,0	4,0-9,0	5,75			68,0
	E3	экзо	38-45	7,5	4,0-9,0	7,65			68,0
<i>Formosa algae</i> KMM 3553 ^T , [208]	E1	эндо/ α-1→4	n.d.	6,5-9	н.о.	н.о.	Cu ²⁺ , Zn ²⁺	Mg ²⁺ Ca ²⁺ Ba ²⁺	96
[Alteromonas] sp. SN-1009, [209]	E1	эндо	30-35	6,5-8,0	н.о.	н.о.	Cu ²⁺ Zn ²⁺ .	0,4M NaCl Ca ²⁺	100
<i>Pseudoalteromonas</i> <i>citrea</i> KMM 3296, KMM 3297, KMM 3298, [191]	E1	эндо/ α-1→3	н.о.	6,5-7,0	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i> PF-1 [210]	E1	эндо	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
"Fucobacter marina" SA-0082, [207]	E1	эндо	40	7,5	н.о.	н.о.	Ag ⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺	0,4M NaCl	

Продолжение табл. 2.4

<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5 ^T [211]	E1	эндо/ α -1 $\rightarrow$ 4	20-25	7,5	н.о.	н.о.	н.о.	Ca ²⁺	105
Беспозвоночные: <i>Pecten maximus</i> , [212]	E1	эндо	н.о.	5,5	н.о.	7,4	н.о.	н.о.	85
<i>Haliotis</i> sp., [192]	E1	эндо	38	5,4	2,0-10,0	н.о.	Hg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ag ⁺ (0,001 M)	Mg ²⁺ (0,01 M)	100 - 200
<i>L. sitkana</i> , [213]	E1 E2	эндо эндо	н.о. н.о.	5,4 8,5	н.о. н.о.	н.о. н.о.	н.о. 0,2M NaCl	0,2M NaCl н.о.	н.о. н.о.
<i>Lambis</i> sp., [214]	E1	эндо α -1 $\rightarrow$ 4	45	5,0	н.о.	н.о.	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺	н.о.	50
<i>Strongulocentrotus nudus</i> , [194]	E1	экзо	45	3,0-4,0	2,0-5,0	н.о.	н.о.	н.о.	130
Грибы: <i>Dendryphiella arenaria</i> TM94, [206]	E1	эндо	50	6,0	5,0-7,0	4,4	н.о.	н.о.	180
<i>Fusarium</i> sp. LD8, [205]	E1	эндо	60	6,0	6,0	4,5	н.о.	н.о.	64

н.о. – не определено

Е – фермент

Специфичность и тип действия

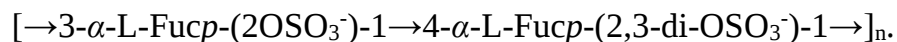
Исследование и сравнение свойств и специфичности фукоиданаз из различных источников затруднены из-за структурного разнообразия фукоиданов и отсутствия хорошо охарактеризованных субстратов, а также из-за сложности выделения индивидуальных ферментов и отсутствия количественных методов определения их активности. Фукоиданазы, как и другие гликозид гидролазы, можно разделить по типу действия на две группы: экзо- и эндо-ферменты. Экзо-фукоиданазы способны отщеплять сульфатированную или несulfатированную фукозу с невозстанавливающего конца молекулы фукоидана. Эндо-фукоиданазы катализируют расщепление гликозидных связей внутри молекулы фукоидана с образованием в качестве продуктов олигосахаридов различной степени полимеризации. В 2003 году японскими учёными был открыт фермент, расщепляющий фукоглюкурономаннан по лиазному механизму [107]. Этот фермент оказался высокоспецифичным именно к этому субстрату и не катализировал расщепление родственных полисахаридов, включая альгиновую кислоту.

Из бактерии *Vibrio* sp. N-5 были выделены три фукоиданазы. Они катализировали деполимеризацию фукоидана из *Saccharina sculpera* (*Kjellmaniella crassifolia*) [189], с меньшей скоростью - фукоидана из *C. decipiens* и не действовали на фукоидан из *Tinocladia crassa* (Futomuzuku-fucoidan). Согласно данным гель-фильтрации и тонкослойной хроматографии основными продуктами действия фукоиданаз на фукоидан из *S. sculpera* были сульфатированные фукоза и фукобиоза, что может говорить об экзо-типе действия этих ферментов [189]. Фукоиданаза экзо-типа действия была также выделена из пищеварительной системы морского ежа *S. nudus*. Эта фукоиданаза катализировала отщепление 2-О-сульфо- α -L-фукопиранозы от синтетического субстрата – 2-О-сульфо- α -L-фукопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-пиридиламинофукозы [194]. Из пищеварительной системы морского моллюска *Pecten maximus* была выделена экзо-фукоиданаза, которая катализировала отщепление фукозы от фукоидана из *A. nodosum*. Кроме того, этот же фермент расщеплял синтетический субстрат – *n*-нитрофенилфукопиранозид. Остальные известные фукоиданазы обладали эндо-типом действия. Как упоминалось ранее, ферменты эндо-типа действия катализируют расщепление субстрата с образованием множества олигосахаридов разной степени полимеризации.

Специфичность действия фукоиданаз из морской протеобактерии *P. citrea* (штаммы KMM 3296, KMM 3297, KMM 3298) была исследована при помощи фукоиданов из *S. cichorioides* и *F. evanescens*, различающихся структурными характеристиками (рис. 2.1, 2.2) [191]. Фукоидан из *S. cichorioides* (1 $\rightarrow$ 3- α -L-фукан) содержит в 2 раза больше сульфатных групп, чем фукоидан из *F. evanescens* (1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4- α -L-фукан). Фукоиданазы бактериальных штаммов KMM 3297 и KMM 3298 эффективнее катализировали расщепление фукоидана из *S. cichorioides*, тогда как ферменты штамма 3296 – фукоидана из *F. evanescens*. При действии этих фукоиданаз на фукоиданы образовывались высокосульфатированные продукты с молекулярной массой от 1 до 3,5 кДа, заметного количества фукозы и дисахаридов не обнаруживалось. Авторы полагают, что исследуемые штаммы биосинтезируют фукоиданазы эндо-типа действия [191].

В литературе имеются сведения о трансформации фукоидана из *A. nodosum* под действием частично очищенного препарата фукоиданазы из печени *P. maximus*. [75]. Авторы показали, что при действии фермента на фукоидан в качестве продукта реакции образуются фрагменты с молекулярной массой 3 кДа. Моносахаридные остатки в этих фрагментах соединены α -1 $\rightarrow$ 3-связью, кроме того, имеются 1 $\rightarrow$ 4-связанные остатки фукозы. Сульфатные группы присоединены по C2 и, возможно, по C4 положениям остатков фукозы. В исследованной фракции также содержатся несulfатированные α -1 $\rightarrow$ 3- и 1 $\rightarrow$ 4-связанные остатки L-фукозы [75]. Авторы этой работы не делают заключений о типе гидролизуемой связи.

В 2006 году французскими исследователями была опубликована работа по исследованию рекомбинантной фукоиданазы FcpA [185]. Для установления специфичности рекомбинантной фукоиданазы авторы использовали в качестве субстрата фукоидан из бурой водоросли *Pelvetia canaliculata*. Этот фукоидан построен из повторяющихся дисахаридных звеньев, состоящих из sulfатированных остатков фукозы, связанных чередующимися α -1 $\rightarrow$ 3- и α -1 $\rightarrow$ 4 гликозидными связями: [$\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-(2OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$ 4- α -L-Fucp-(2,3-di-OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$]. В качестве продуктов реакции были получены тетра и гексасахариды следующей структуры:



Дополнительная информация о специфичности ферментативного расщепления фукоидана была получена с помощью ЯМР-спектроскопии. Методом ¹H-ЯМР-спектроскопии была исследована низкомолекулярная фракция продуктов. Показано, что интенсивность сигналов протонов при C1 (5,45 м.д.), соответствующих sulfатированному при C2 и C3 остатку фукозы, связанному α -1 $\rightarrow$ 4 гликозидной связью, уменьшается, в то время как сигналы протонов при C1 (5,3 м.д.), соответствующие остатку фукозы, sulfатированному при C2 и связанному с соседним остатком фукозы α -1 $\rightarrow$ 3 гликозидной связью, не изменяются. Кроме того, в спектрах COSY отсутствовали сигналы при 5,45 м.д. и 4,69 м.д., соответствующие внутренним α -1 $\rightarrow$ 4 гликозидным связям во фрагментах, содержащих α -L-Fucp-(2,3-di-OSO₃⁻) [185]. На основании полученных данных Colin и соавторы пришли к выводу, что фукоиданаза FcpA катализирует

расщепление α -1 $\rightarrow$ 4 гликозидных связей внутри фрагмента [$\rightarrow$ 4)- α -L-Fucp-(2,3-di-OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-(2OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$] [185].

Штамм CZ1127 морской бактерии семейства Flavobacteriaceae является продуцентом внутри- и внеклеточных фукоиданаз, которые катализируют деполимеризацию как фукан-сульфатов иглокожих, так и фукоиданов бурых водорослей [215]. В качестве субстрата для этих ферментов были использованы фукансульфаты голотурии *Acaudina molpadioides*. Было показано, что внутриклеточный фермент расщепляет субстрат на короткие фрагменты с молекулярной массой 3,7 кДа, в то время как внеклеточный продуцирует крупные фрагменты с молекулярной массой около 57 кДа [216]. Препарат фукоиданазы из штамма бактерии CZ1127 был использован для установления структуры фуканов из *A. molpadioides* и *Thelenota ananas* [121]. Авторы показали, что основной структурный фрагмент фуканов из этих иглокожих имеет следующую структуру: [$\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-1 $\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-(2,4-di-OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$]. Кроме того, авторы пришли к выводу, что этот фермент является α -1 $\rightarrow$ 3-фуканазой, так как катализирует гидролиз α -1 $\rightarrow$ 3 гликозидных связей в молекулах фуканов.

В морской бактерии "Fucophilus fucoidanolyticus" SI-1234 была обнаружена внутриклеточная фукоиданаза. Она имела сходную специфичность и тип действия с вышеописанной [90]. В качестве субстрата был использован фукоидан из *Cladosiphon okamuranus*, который был добавлен в культуральную среду. Бактерии на такой среде культивировались 3 суток, после чего была определена средняя молекулярная масса фукоидана. Она уменьшилась с 2000 кДа до 20 кДа. Среди низкомолекулярных продуктов реакции были обнаружены олигосахариды со степенью полимеризации 4-12, которые имели следующую структуру: [$\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-1 $\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-(4OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-(4OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-1 $\rightarrow$]; [$\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-1 $\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-(4OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$ 3- α -L-Fucp-(4OSO₃⁻)-1 $\rightarrow$ 3-(α -D-GlcUA-1 $\rightarrow$ 2)- α -L-Fucp)_m (m = 0, 1, 2 и 3).

В морской бактерии *Sphingomonas paucimobilis* PF-1 была обнаружена фукоиданаза, ассоциированная с клеточной стенкой [210]. Этот фермент катализировал деполимеризацию фукоидана из бурой водоросли *Undaria*

pinnatifida и продуцировал низкомолекулярные олигосахариды. Фукоза в продуктах реакции не была обнаружена. Фукоиданаза не расщепляла синтетический *n*-нитрофенил-фукопиранозид. Таким образом, эта фукоиданаза обладала эндо-типом действия. Внутриклеточная фукоиданаза из другой морской бактерии - *Flavobacterium* sp. штамм F-31 - катализировала быструю деполимеризацию фукоидана с молекулярной массой 240 кДа, выделенного из *S. okamuranus* [217]. Поскольку в результате ферментативной реакции были получены фрагменты с молекулярной массой около 8 кДа, можно предположить, что фермент обладал эндо-типом действия.

Имеется информация еще об одной фукоиданазе, хотя по всем признакам фермент является фукоидан-лиазой. Этот фермент был получен из морской бактерии "F. marina" SA-0082. Была исследована структура продуктов ферментативной трансформации фукоидана из *S. sculpera* [218]. Среди этих продуктов были обнаружены трисахаридные фрагменты, содержащие остатки галактозы, связанные α -1 $\rightarrow$ 3-гликозидной связью, D-маннозы, которые являются точками разветвления. В качестве заместителей были представлены остатки D-глюкуроновой кислоты, связанные с остатками маннозы β -1 $\rightarrow$ 2-гликозидной связью, и остатки L-фукозы, связанные α -1 $\rightarrow$ 3-гликозидной связью. Структура фрагмента имела следующий вид: $\Delta^{4,5}\text{Glc}pA-(1\rightarrow2)\text{-L-Fuc}p(3\text{OSO}_3^-)-\alpha-(1\rightarrow3)\text{-D-Man}p$; $\Delta^{4,5}\text{Glc}pA-1\rightarrow2\text{-L-Fuc}p-(3\text{OSO}_3^-)-\alpha-(1\rightarrow3)\text{-D-Man}p-(6\text{OSO}_3^-)$; $\Delta^{4,5}\text{Glc}pA-(1\rightarrow2)\text{-L-Fuc}p-(2,4\text{OSO}_3^-)-\alpha-(1\rightarrow3)\text{-D-Man}p-(6\text{OSO}_3^-)$. Выделен также пентасахарид, содержащий остаток D-маннозы, связанный α -1 $\rightarrow$ 3-гликозидной связью с остатком глюкуроновой кислоты, и ряд других олигосахаридов [218]. Почти все продукты ферментативной реакции имеют на невосстанавливающем конце 4-дезоксиг-эритро-гекс-4-енопиранозилуруновую кислоту, а на восстанавливающем конце – маннозу или ее сульфатированные производные. Авторы предполагают, что в фукоидане из *S. sculpera* присутствуют чередующиеся дисахаридные фрагменты, построенные из глюкуроновой кислоты и маннозы. Поскольку среди продуктов реакции были обнаружены олигосахариды, имеющие двойную связь в остатке глюкуроновой кислоты на невосстанавливающем конце,

вероятно, что расщепление О-гликозидных связей субстрата идет по механизму β -элиминирования. Необходимо отметить, что этот же препарат фукоиданазы расщеплял фукоиданы, выделенные из других видов водорослей: *U. pinnatifida* и *Lessonia nigrescens* [190]. Структуры некоторых продуктов, полученных из *S. sculpera* под действием этого фермента, представлены на рисунке 2.8.

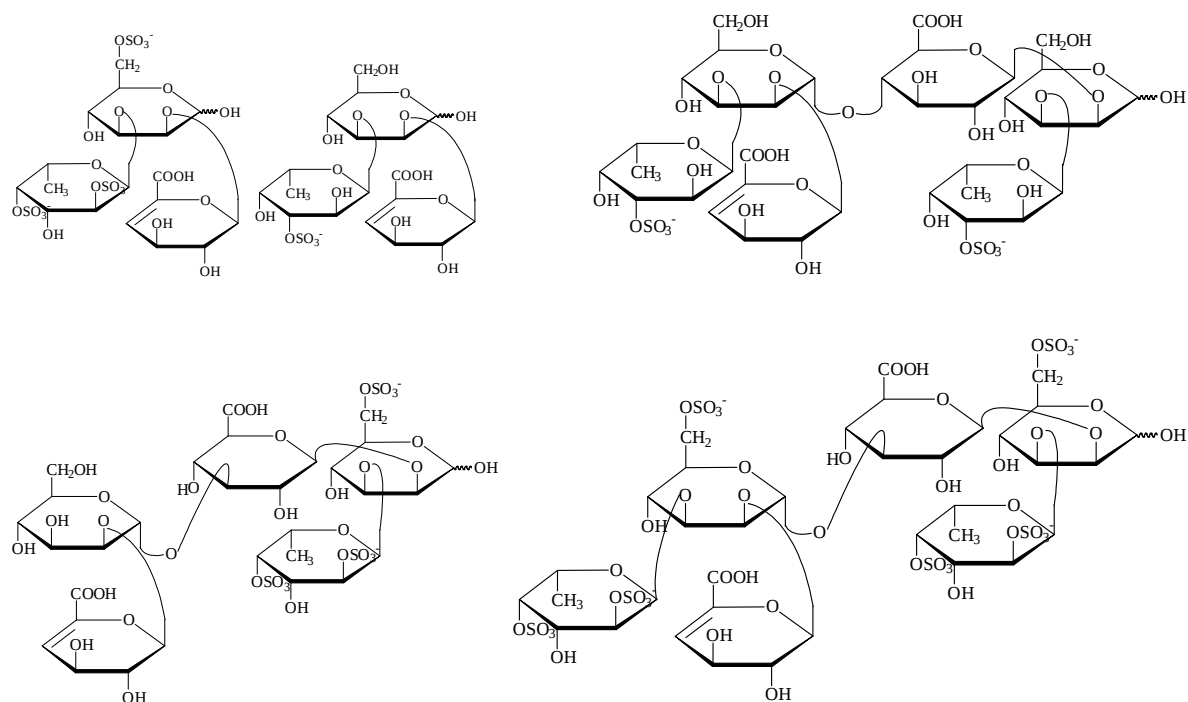


Рисунок 2.8 – Продукты деградации фукоидана из бурой водоросли *Saccharina sculpera* под действием фукоиданазы из морской бактерии "F. marina" SA-0082.

Следует подчеркнуть, что к настоящему времени исследованы всего несколько фукоиданаз из различных источников: определены их физико-химические характеристики, для некоторых установлен тип действия и специфичность. Можно надеяться, что трудности, связанные с выделением, определением активности и экспрессией генов фукоиданаз в скором времени будут преодолены. Будут выделены фукоолигосахариды – продукты ферментативной трансформации нативных фукоиданов, расшифрована их структура, что позволит установить механизм действия фукоиданаз.

3. Материалы и методы

3.1 Биологическое сырье и реактивы

Морские моллюски *Perna viridis*, *Tapes literata* и *Lambis* sp. были собраны в прибрежной зоне Социалистической Республики Вьетнам в Южно-Китайском море в июле 2007 и августе 2009 года. Кристаллические стебельки были сразу извлечены и хранились в замороженном виде. Брюхоногие моллюски *Littorina sitkana* были собраны в июле 2009 в бухте Троицы залива Петра Великого Японского моря.

Ламинаран был выделен из бурой водоросли *Saccharina cichorioides* по методу [219], периодатно-окисленный ламинаран был получен как описано ранее [220]. Транслам синтезирован путём ферментативной трансформации ламинарана из *S. cichorioides* [171]. Морские бактерии взяты из коллекции морских микроорганизмов (КММ) ТИБОХ ДВО РАН.

Пустулан из лишайника *Umbilicaria russica*, дрожжевой глюкан из клеточных стенок пекарских дрожжей, пахиман из *Poriacocos* и аубазидан из *Aureobasidium pullulans* предоставлены сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН.

Синтетические сульфатированные фукоолигосахариды были любезно предоставлены сотрудниками ИОХ РАН – чл.-корр. Н.Э. Нифантьевым и с.н.с. Н.Е. Устюжаниной.

Носители для ионообменной хроматографии: CM-MacroPrep, DEAE-MacroPrep (Bio-Rad, США), и KM-целлюлоза (Sigma, США), носители для гель-фильтрационной хроматографии: сефадекс G-25, G-50, G-75 (GE Healthcare, США) и сефакрил S-100 (Sigma, США). *n*-Нитрофенильные производные сахаров *n*-нитрофенилглюкозид, *n*-нитрофенилксилозид, *n*-нитрофенилгалактозид, азид натрия, бычий сывороточный альбумин (БСА), толуидиновый синий, акриламид, бис-акриламид, глицин – коммерческие препараты фирмы (Sigma, США).

3.2 Культивирование бактерий

Микроорганизмы выращивали на питательной среде pH 7,5-7,8 (морская вода: дистиллированная вода 1:1), содержащей 0,5 %-ый бакто-пептон (Difco,

США), 0,1 % дрожжевой глюкан, 0,02 % K_2HPO_4 ; 0,005 % $MgSO_4$ (среда А), на термостатированной качалке (160 об/мин) при 28 °С в течение 24 ч. Для первичного направленного поиска продуцентов фукоиданаз в жидкую питательную среду А добавляли 0,1 % глюкозы.

3.3 Определение концентрации белка

Концентрацию белка в растворах определяли по методу Брэдфорд [221], при проведении хроматографии – по поглощению при 280 нм. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

3.4 Определение восстанавливающих сахаров

Восстанавливающие сахара определяли по методу Нельсона [222]. В качестве стандартов использовали фукозу (для анализа фукоиданазной активности), глюкозу (для анализа глюканазной активности), ксилозу (для анализа изменений восстанавливающей способности жидкой питательной среды в процессе роста бактерий).

3.5 Определение общих сахаров

Содержание общих сахаров в образцах определяли фенол-сернокислотным методом [223]. Концентрацию общих сахаров рассчитывали по соответствующим калибровочным графикам. Глюкоза и фукоза использовались в качестве стандартов.

3.6 Определение активности ферментов

Активность гликозидаз определяли с использованием в качестве субстратов *n*-нитрофенильных производных соответствующих сахаров. Реакционная смесь содержала 50 мкл раствора фермента в 0,025 М Na-сукцинатном буфере, рН 5,0 - для ферментов морских беспозвоночных (**буфер А**) или в 0,015 М Na-фосфатном буфере рН 7,2 – для ферментов морских бактерий (**буфер Б**) и 150 мкл раствора соответствующего *n*-нитрофенилгликозида (1 мг/мл) в буфере. Время инкубации 20-40 мин при 37 °С. Затем добавляли 100 мкл 1 М раствора Na_2CO_3 . Поглощение окрашенных растворов измеряли при 410 нм на планшетном спектрофотометре

(BioTek, США) относительно соответствующих контролей. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмоль *n*-нитрофенола за 1 минуту. Удельную активность определяли как число единиц активности фермента на 1 мг белка.

Для определения активности полисахарид-гидролаз реакционная смесь содержала 200 мкл раствора полисахарида (ламинарана, гулулоната натрия, альгината натрия, КМ-целлюлозы, амилопектина, пустулана – 1 мг/мл или фукоидана - 4 мг/мл) и 50 мкл раствора фермента в буфере А – для морских беспозвоночных или буфере Б – для морских бактерий. Активность определяли по возрастанию количества восстанавливающих сахаров, как описано выше.

За единицу активности принимали количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу или фукозу) за 1 ч. Удельную активность определяли как число единиц активности фермента на 1 мг белка.

Активность фукоиданаз морских бактерий определяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле. Реакционную смесь, содержащую 50 мкл раствора фермента в буфере Б и 100 мкг фукоиданов из *F. evanescens*, *F. vesiculosus*, *S. cichorioides* или *U. pinnatifida*, инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Реакцию останавливали замораживанием при – 20 °С. Продукты ферментативного расщепления фукоидана смешивали с 10 мкл 0,02 %-го раствора фенолового красного в 10 % водном растворе глицерина. Полученные образцы подвергались электрофорезу в полиакриламидном геле, состоящем из концентрирующего геля (5 % раствор акриламида – бис-акриламида в соотношении 29:1 в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 6,8) и разделяющего геля (27% раствор акриламида – бис-акриламида в соотношении 29:1 в 150 мМ трис-НСl буфере рН 8,8). Электрофорез проводили при силе тока 40 мА в течение 1,5 – 2 ч при комнатной температуре. После электрофореза пластину полиакриламидного геля окрашивали в течение двух часов 0,01 % раствором *O*-толуидинового синего в смеси C₂H₅ОН: АсОН: Н₂О в объемном отношении 2:1:1. Отмывание геля от несвязавшегося красителя проводили водой или раствором C₂H₅ОН: АсОН: Н₂О в

отношении 1:1:3 в течение 10-20 ч. Фукоиданазную активность регистрировали по появлению окрашенных полос, соответствующих олигосахаридам.

3.7 Метод поиска продуцентов фукоиданаз среди бактерий

Для определения фукоиданазной активности штаммы бактерий выращивали на твердой среде, содержащей морской агар 2216 (BD), в течение 2 суток при температуре 28 °С. Затем бактерии пересеивали на среду, содержащую 0,5 % фукоидана из *F. evanescens*, культивировали при 28 °С в течение 1 – 3 суток. После инкубирования бактериальные клетки удаляли с поверхности твердой питательной среды, которую затем обрабатывали 1% водным раствором гексадецилтриметиламмоний бромидом (цетавлоном) в течение 30–40 мин при 25 °С. Фукоиданазную активность оценивали по наличию прозрачных зон (обедненных фукоиданом) в твердой питательной среде на месте посева бактерий.

3.8 Выделение ферментов

Выделение и очистка 1→3-β-D-глюканазы из мидии *Perna viridis*

Кристаллические стебельки (6,6 г) гомогенизировали с 70 мл охлажденного буфера А. Выдерживали гомогенат в течение 3 часов при 4 °С, а затем центрифугировали на центрифуге с охлаждением 15 мин при 10000 g. Супернатант наносили на колонку с КМ-целлюлозой, предварительно уравновешенную рабочим буфером. Элюирование проводили линейным градиентом NaCl в буфере (по 150 мл) от 0 до 1 М со скоростью 0,5 мл/мин, собирали фракции по 3,5 мл. Фракции, содержащие 1→3-β-D-глюканазную активность, объединяли, концентрировали с 52,4 до 10,5 мл ультрафильтрацией на мембране PM-10 («Amicon», Голландия). Препарат фермента наносили на колонку с сефадексом G-75 (1,5×18 см), уравновешенную рабочим буфером. Элюировали буфером со скоростью 0,3 мл/мин, объем фракций 1 мл. Анализ фракций на содержание 1→3-β-D-глюканазы проводили методом Нельсона. Фракции, проявившие ферментативную активность, объединяли.

Выделение и очистка 1→3-β-D-глюканазы из моллюска *Tapes literata*

Кристаллические стебельки (9,1 г) гомогенизировали с 90 мл охлажденного рабочего буфера. Гомогенат выдерживали 3 часа при 4 °С, а затем центрифугировали 15 мин при 10000 g. Супернатант наносили на колонку с CM-MасгоРрег, предварительно уравновешенную рабочим буфером. Элюирование проводили линейным градиентом NaCl в буфере (по 200 мл) от 0 до 1,5 М со скоростью 0,5 мл/мин, собирали фракции по 5 мл. Фракции, содержащие 1→3-β-D-глюканазную активность, объединяли, концентрировали до 3,5 мл ультрафильтрацией. Препарат фермента наносили на колонку с сефадексом G-50 (1,5×110 см), уравновешенную рабочим буфером. Элюировали буфером со скоростью 0,3 мл/мин, объем фракций 1 мл. Фракции, содержащие 1→3-β-D-глюканазную активность, объединяли, концентрировали до 1 мл ультрафильтрацией. Препарат фермента наносили на колонку с биогелем Р-30 (1,0×80 см). Фракции, содержащие 1→3-β-D-глюканазную активность, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией и наносили на колонку с сефадексом G-50 (1,0×80 см).

Выделение и очистка 1→3-β-D-глюканазы из гребешка *Mizuhopecten yessoensis*

Кристаллические стебельки (20 г) гомогенизировали в 60 мл охлажденного 0,05 М Na-ацетатного буфера (рН 5,0) в течение 60 мин при 4 °С. Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 9000 g. Супернатант смешивали с 50 мл CM-Sephadex C-50, уравновешенным 100 мл 0,05 М Na-ацетатного буфера (рН 5,0) и оставляли на 1–2 ч при 4 °С. После этого CM-Sephadex C-50 (GE Healthcare, США) последовательно промывали 0,05 М Na-ацетатным буфером (рН 5,0), и 0,1 М и 0,15 М NaCl в том же буфере. Фракции, содержащие глюканазную активность, объединяли и наносили на колонку с Phenyl-Sepharose CL-4B (1,3×2 см) (GE Healthcare, США), уравновешенную 0,05 М Na-ацетатным буфером (рН 5,0), содержащим 1 М NaCl. Затем колонку последовательно промывали тем же буфером и 50% раствором этиленгликоля. Фракции, содержащие активность фермента, объединяли, подвергали гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-75 (GE Healthcare, США) (1,5×40 см) и использовали в дальнейшей работе.

Выделение и очистка $1 \rightarrow 3$ - β -D-глюканазы из неоплодотворённых яйцеклеток морского ежа *S. intermedius*

Яйцеклетки морского ежа (2,5 г) суспендировали в 200 мл 0,02 М Tris-HCl буфере, pH 7,5 и центрифугировали при 10000 g 20 мин. Супернатант наносили на колонку (40×2,5 см) с DEAE-Toyopearl (ToyoSoda, Япония), уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl (0-0,5 М, общий объем 2000 мл) со скоростью 1 мл/мин. Фракции, содержащие глюканазную активность объединяли и концентрировали методом ультрафильтрации на мембране PM-10 (Amicon, США). Концентрат наносили на колонку (60×2,5 см) с Sephadex G-200 (GE Healthcare, США). Белки элюировали тем же буфером со скоростью 0,5 мл/мин. Фракции, содержащие глюканазу, концентрировали и подвергали хроматографии на колонке Mono-Q (GE Healthcare, США). Элюцию вели линейным градиентом NaCl (0-0,6 М, общий объём 500 мл). Фракции, содержащие глюканазу, объединяли и использовали в дальнейшей работе.

Выделение и очистка внутриклеточной фукоиданазы из печени *L. sitkana*

Печень моллюсков (100 г) измельчали в гомогенизаторе 30 секунд при 15 000 об/мин и экстрагировали 0,1 М Na-сукцинатным буфером (pH 5,4). Полученный экстракт центрифугировали 20 мин при 9000 g, в супернатант добавляли сульфат аммония до 90%-ного насыщения. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием и растворяли в минимальном количестве 0,05 М Na-сукцинатного буфера (pH 5,4), содержавшего 0,2 М NaCl. Полученный таким образом препарат фермента наносили на колонку с Phenyl-Sepharose CL-4B (2×10 см), уравновешенную 0,05 М Na-сукцинатным буфером (pH 5,4), который содержал 2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Элюцию вели ступенчатым градиентом $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2, 1, 0,5, 0,05 М). Фракции, содержащие фукоиданазную активность, объединяли и обессоливали на колонке с сефадексом G-25 (3×70 см).

Выделение и очистка внутриклеточной фукоиданазы из морской бактерии *F. algae*

Все стадии выделения фермента проводили при температуре + 4 °С. После культивирования в жидкой среде в течение 24 ч клетки бактерий отделялись центрифугированием 40 мин при 4500 *g*. Полученный осадок бактериальной массы (30 г) суспендировали в 90 мл буфера Б. Клетки бактерий разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Sonopuls (Bandelin, Германия) при 20 кГц (20 раз по 20 сек). Гомогенат центрифугировали при 10000 *g* в течение 40 мин. Полученный супернатант (87 мл) наносили на колонку с DEAE-MacroPrep, 3×10 см (Bio-Rad, США), уравновешенную буфером Б. Элюирование белков проводили линейным градиентом 0–0,5 М NaCl в том же буфере (150×150 мл) со скоростью потока 0,7 мл/мин. Активные фракции объединяли и концентрировали до 1 мл при помощи ультрафильтрации на целлюлозоацетатной мембране (10 кДа). Полученный препарат фермента наносили на колонку с Sephacryl S-200, 1×100 см (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером Б. Элюирование вели буфером Б со скоростью 0,2 мл/мин. Фракции, проявлявшие фукоиданазную активность, объединяли и подвергали анионообменной хроматографии на хроматографе «Agilent 1100» (Agilent, Германия) с использованием колонки Source 15Q (GE Healthcare, США). Элюирование проводили линейным градиентом 0,15 – 0,3 М NaCl в буфере Б (20×20 мл) со скоростью 0,4 мл/мин. Фракции, проявлявшие фукоиданазную активность, собирали и подвергали ВЭЖХ на колонке для гель-фильтрации TSKgel G2000 SW (Toyo Soda, Япония). Элюирование проводили буфером Б со скоростью 0,3 мл/мин, пик, соответствующий фукоиданазе, собирали и хранили при - 20°C.

Выделение и очистка рекомбинантных фукоиданаз из морской бактерии *F. algae*

Экстракты трансгенных бактерий *E. coli* BL21 star (DE3)pLysS, содержащих вставки генов фукоиданаз, подвергали Ni-аффинной хроматографии методом ВЭЖХ на картридже «HisTrap FF crude» (GE Healthcare, США), уравновешенном 0,02 М трис-HCl буфером, pH 8,0, содержащим 0,5 М NaCl и 0,015 М имидазол. Элюирование вели линейным градиентом 0,015 М – 0,5 М имидазола в 0,02 М

трис-НCl буфере, pH 8,0 содержащим 0,5 М NaCl, со скоростью 1 мл/мин. Фракции фукоиданаз, элюированные в диапазоне 0,25 - 0,35 М имидазола, собирали и концентрировали до 1 мл на ультрафильтрационной мембране с пределом отсечения 10 кДа. Препараты фермента обессоливали на картридже для гель-фильтрации «Bio-Scale mini» (10 мл) Bio-gel P-6 (Bio-Rad, США), уравновешенном 0,02 М трис-НCl буфером, pH 7,2. Элюирование вели тем же буфером со скоростью 1 мл/мин. Полученные препараты подвергали анионообменной хроматографии на хроматографе высокого давления «Agilent 1100» (Agilent, Германия) с использованием колонки MonoQ (GE Healthcare, США). Элюирование проводили линейным градиентом 0,1 – 0,4 М NaCl в 0,02 М трис-НCl буфере, pH 7,2 (20×20 мл) со скоростью 0,4 мл/мин. Фракции, обладавшие фукоиданазной активностью, концентрировали до 1 мл и наносили на колонку с Sephacryl S-200 (1×100 см), уравновешенную 0,02 М трис-НCl буфером, pH 7,2. Элюирование вели тем же буфером со скоростью 0,2 мл/мин. Полученный фермент хранили при – 20 °С.

Выделение и очистка фукоиданазы из моллюска *Lambis* sp.

Выделение фукоиданазы проводили при температуре + 4 °С. Навеску 150 г печени *Lambis* sp. гомогенизировали с 450 мл буфера А и экстрагировали в течение 3 ч. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин, липидную часть отделяли декантированием. Супернатант последовательно фракционировали насыщением сульфатом аммония до 60, 70 и 80%. Осадки отделяли центрифугированием и растворяли в минимальном объеме буфера А. Полученные фракции анализировали на наличие фукоиданазной активности. Фракцию, обладавшую наибольшей фукоиданазной активностью, наносили на колонку с гидрофобным сорбентом Phenyl-Sepharose 6 Fastflow, 1,5×15 см (GE Healthcare, США), уравновешенную 2 М раствором сульфата аммония в буфере А. Элюирование проводили ступенчатым градиентом сульфата аммония 2 М, 1,5 М, 1 М, 0,5 М в буфере, затем буфером А. Фракцию, обладавшую наибольшей фукоиданазной активностью, концентрировали на ультрафильтрационной мембране с пределом отсечения 10 кДа (Millipore, США) и наносили на колонку с Sephacryl S-100, 1×120 см (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером А. Элюировали буфером А со скоростью 0,2 мл/мин. Фракции, обладавшие

фукоиданазной активностью, наносили на колонку с анионообменным сорбентом DEAE-MacroPrep, 3×10 см (Bio-Rad, США), уравновешенную буфером А. Элюирование вели линейным градиентом 0-1,5 М NaCl (150×150 мл) в буфере А со скоростью 0,7 мл/мин. Фракции, содержащие фукоиданазу, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией и подвергали ВЭЖХ на колонке для гель-фильтрации хроматографии TSKgel G2000 SW (Toyo Soda, Япония). Элюцию вели буфером А со скоростью 0,7 мл/мин. Полученный фермент хранили при – 20 °С.

3.9 Электрофорез белков

Гомогенность и молекулярную массу ферментов устанавливали методом SDS-электрофореза по Лэммли [224]. В качестве стандартов использовали набор стандартных белков (Bio-Rad, США) с молекулярными массами от 10 до 250 кДа. Гели сканировали с помощью денситометра GS-800 (Bio-Rad, США). Обработку изображений проводили с помощью программы Quantity One 4.6.7 (Bio-Rad, США).

3.10 Определение pH оптимума ферментов

Реакционную смесь, содержащую 50 мкл раствора фермента, 100 мкл 0,2 М Na-сукцинатного, Na-фосфатного или трис-HCl буфера с различными значениями pH (3,5–9,0) и 100 мкл водного раствора соответствующего субстрата (фукоидана – 8 мг/мл, ламинарана 1 мг/мл), инкубировали 30 мин (для 1→3-β-D-глюканаз) и 3 ч (для фукоиданаз) при 37 °С. Активность ферментов определяли методом C-PAGE электрофореза (для фукоиданаз из *F. algae*) или методом Нельсона (для ферментов из других источников).

3.11 Определение температурного оптимума ферментов

Реакционную смесь, содержащую 50 мкл раствора фермента и 200 мкл раствора субстрата (фукоидан – 4 мг/мл, ламинаран 1 мг/мл) в соответствующем буфере, инкубировали 30 мин (для 1→3-β-D-глюканаз) и 3 ч (для фукоиданаз) при различных температурах в диапазоне от 4 °С до 60 °С, затем определяли в пробах количество восстанавливающих сахаров (для ферментов из *Lambis* sp.) или подвергали C-PAGE электрофорезу (для фукоиданаз из *F. algae*).

3.12 Определение температурной стабильности ферментов

По 100 мкл раствора фермента в соответствующем буфере выдерживали в течение 20 мин при различных температурах от 20 °С до 70 °С. Полученные пробы охлаждали до +4 °С. К охлажденным пробам добавляли 200 мкл раствора соответствующего субстрата (фукоидан – 4 мг/мл, ламинаран – 1 мг/мл), инкубировали 30 мин (для 1→3-β-D-глюканаз) и 3 ч (для фукоиданаз) при 37 °С и определяли активность фермента методом Нельсона или C-PAGE электрофорезом [225].

3.13 Определение влияния ионов двухвалентных металлов на активность ферментов

К 50 мкл раствора фермента в соответствующем буфере приливали 100 мкл 0,01 М раствора соли двухвалентного металла или ЭДТА и инкубировали при +4 °С в течение 20 мин. К полученной смеси приливали 100 мкл раствора субстрата в соответствующем буфере (фукоидан – 8 мг/мл, ламинаран – 1 мг/мл) и определяли остаточную активность ферментов соответствующим методом.

3.14 Выделение геномной ДНК бактерии *F. algae*

Выделение и очистку геномной ДНК проводили с использованием набора «Gen Elut Bacterial Genomic DNA Kit» (Sigma, США) согласно рекомендациям производителя.

3.15 Установление последовательностей нуклеотидов в геномной ДНК бактерии *F. algae*

Полногеномное секвенирование ДНК бактерии *F. algae* было выполнено сотрудниками лаборатории биоинформационного анализа (департамент химии, Норвежский центр структурной биологии, г. Тромсø, Норвегия) при помощи нуклеотидного генетического анализатора HiSeq 2500 (Illumina, США).

3.16 Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности анализировали с помощью программ BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Clustal W 1.8

(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) и SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Аминокислотная последовательность была установлена на основе нуклеотидной последовательности генов с помощью сервера EXPASY программы (<http://expasy.org/tools/dna.html>). Установление доменной организации белков проводили с помощью сервера InterProScanV4 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>).

3.17 Получение генетических конструкций, кодирующих фукоиданазы из бактерии *F. algae*

Дизайн рекомбинантных фукоиданаз проводили в соответствии с данными, полученными с помощью сервера InterProScan. Для получения генетических конструкций с генами, кодирующими фукоиданазы, использовали безрестрикционный метод клонирования. В качестве матрицы для синтеза и амплификации генов фукоиданаз использовали геномную ДНК бактерии *F. algae*. В качестве затравки для начала синтеза генов использовали праймеры, одновременно комплементарные участкам генов фукоиданаз и участкам плазмиды pCold-TEVII, имеющей ген устойчивости к ампициллину. Дизайн праймеров проводили при помощи сервера (<http://www.rf-cloning.org/>). Получение рекомбинантных плазмид pCold-TEVII, содержащих гены, кодирующие полноразмерные фукоиданазы, проводили в 2 раунда ПЦР. Первый раунд ПЦР - получение «мегапраймеров» (содержащих последовательность генов фукоиданаз и участки, комплементарные участкам плазмиды). Для этого проводили ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной ДНК бактерии, а в качестве затравки для синтеза полинуклеотидов праймеры: для FFA1 прямой - 5'-CCGAGAACCTTTACTTCCAGGGGATTCCAGATCCGGATCAAGG-3', обратный - 5'-TCTTAGATTCTGTGCTTTTAAGCAGAGATTACСТААТТАСГСТТCACAААСТТТТТААСТ-3'; для FFA2 прямой - 5'-CCGAGAACCTTTACTTCCAGGGGGTTCCAGATCCAGATTTAGGCT-3', FFA2 обратный - 5'-TCTTAGATTCTGTGCTTTTAAGCAGAGATTACСТААТТАСГСТТААСААСТТТТТААСА-3'

TCTTAGATTCTGTGCTTTTAAGC – нуклеотидная последовательность, комплементарная участку плазмиды pColdTEVII; GTTCCAGATCCAGATTTAGGCT – нуклеотидная последовательность, комплементарная участку гена фукоиданазы FFA1 или FFA2. Второй раунд ПЦР: Интеграция генов фукоиданаз в плазмиду pColdTEVII. Продукты ПЦР («мегапраймеры»), полученные после 1-го раунда ПЦР, использовали в качестве затравки для синтеза дочерней плазмиды, содержащей целевой ген, а в качестве матрицы – плазмиду pCold TEVII (материнская плазида). После проведения ПЦР исходную (материнскую) плазмиду удаляли путем ее расщепления рестриктазой DpnI, специфичной к метилированным остаткам аденозина в участке GATC. Продукты ПЦР выделяли при помощи набора для выделения плазмидной ДНК («Promega», США) согласно рекомендациям производителя.

Открытые рамки считывания (ORF) полученных генетических конструкций содержали гены, кодирующие полноразмерные фукоиданазы (FFA1 (Ile27 – Asn1008) и FFA2 (Val9 – Asn890)), и их усеченные производные (FFA1-SD (Ile27 – Asn735), FFA1-KD (Ile27 – Pro415), FFA2-SD (Val9 – Ala620), FFA2-KD (Val9 – Phe404)), полигистидиновый участок (6×His).

3.18 Клонирование и секвенирование плазмидной ДНК, содержащей вставки генов, кодирующих фукоиданазы

Для клонирования ПЦР-продуктов использовали компетентные штаммы бактерий *E. coli* XL 10 Gold (Stratagen, США). Трансформацию компетентных штаммов рекомбинантными плазмидными ДНК и их культивирование проводили согласно рекомендациям производителя. Скрининг бактериальных колоний, содержащих плазмиды с искомыми вставками, проводили методом ПЦР с использованием праймеров Coldp (R и F). Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли методом Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя.

3.19 Оптимизация экспрессии рекомбинантных фукоиданаз в штаммах *E. coli*

Штаммы бактерий *E. coli* Rosetta-gami (DE3)pLysS, BL21 star (DE3)pLysS, BL21 (DE3)GroEL (Invitrogen, США) были трансформированы рекомбинантными плазмидами (продукты 2 раунда ПЦР) pCold-TEVII, содержащими гены фукоиданаз (FFA1, FFA2), согласно рекомендациям производителя. Скрининг бактериальных колоний, содержащих плазмиды с искомыми вставками (резистентных к антибиотику – ампициллину), проводили на твердой питательной среде LB, pH 7,5, содержащей 0,01 % ампициллина, 1 % агара, 1 % триптона, 0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % – NaCl. Трансформированные штаммы бактерий культивировали в 5 мл стерильной стандартной жидкой питательной среды (LB), pH 7,5, содержащей 1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1 % NaCl с добавлением 5 мкл ампициллина (100 мг/мл) при 37 °C, 160 об./мин в течение 15 ч. Полученные суспензии клеток («ночная культура») инокулировали в колбы с 400 мл стерильной питательной среды LB, pH 7,5 с добавлением 400 мкл ампициллина (100 мг/мл). Культивирование каждого из трансформированных штаммов, содержащих гены фукоиданаз и их производных, проводили при двух различных температурах 37 °C и 20 °C, 200 об./мин до достижения плотности клеток в жидкой питательной среде со значением ОП при 600 нм – 0,8. Затем проводили индуцирование экспрессии желаемых генов путем добавления 4 мл 0,4 М изопропилтиогалактозида (ИПТГ) и продолжали культивирование трансформированных штаммов в течение 24 ч. Полученные культуры клеток отделяли от жидкой питательной среды центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин. Осадки трансгенных штаммов взвешивали, суспендировали в 0,02 М Na-фосфатном буфере, pH 7,5 в соотношении 1:3 (масса/об.) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (20 кГц, 10 раз по 5 мин при температуре +1 – +6 °C). Гомогенаты разделяли на растворимые и нерастворимые фракции путем центрифугирования при 20000 об./мин в течение 30 мин. Растворимые (экстракт) и нерастворимые (осадок) фракции штаммов трансформированных бактерий анализировали при помощи SDS-электрофореза.

3.20 Получение и анализ продуктов ферментативного гидролиза полисахаридов

Анализ продуктов ферментативного гидролиза ламинарана проводили с использованием колонки Zorbax-NH₂ (4,6 × 250 мм, Германия) на хроматографе Agilent 1100. Элюцию проводили смесью ацетонитрил – вода 80:20. Детектирование осуществляли с помощью рефрактометра.

Анализ продуктов реакции трансгликозилирования, катализируемой глюканазами (донор – ламинаран, акцептор -*n*-нитрофенил-β-D-глюкозид) проводили на колонке C₈ (4,6 × 150 мм, Zorbax, Германия) на хроматографе Agilent 1100. Элюцию вели в градиенте ацетонитрил – вода от 0 до 80% ацетонитрила со скоростью 1 мл/мин. Продукты трансгликозилирования регистрировали УФ детектором при длине волны 410 нм.

Получение и анализ низкомолекулярных продуктов гидролиза фукоидана нативными фукоиданазами из *F. algae*

Фукоидан из *F. evanescens* или *S. horneri* (0,5 г) растворяли в 50 мл раствора фермента в Tris-HCl буфере, pH 7,2 с добавлением 5 mM CaCl₂ и инкубировали в течение 72 ч при 25°C. Высокомолекулярные продукты гидролиза осаждали 75 % водным раствором этанола. Выпавший осадок отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин. Супернатант упаривали на ротонном испарителе, растворяли в 3 мл дистиллированной воды и наносили на термостатируемую колонку с Bio-Gel P-6, 1×120 см (Bio-Rad, США), уравновешенную деионизованной водой, элюировали водой со скоростью 0,7 мл/мин. Присутствие сахаров в исследуемых фракциях проверяли фенол-сернокислотным методом [223]. Низкомолекулярные фракции олигосахаридов объединяли, концентрировали на ротонном испарителе и рехроматографировали. Полученные фракции лиофильно высушивали и анализировали при помощи спектроскопии ЯМР.

Получение и анализ продуктов гидролиза фукоидана рекомбинантными фукоиданазами из *F. algae* методом ВЭЖХ

К двум навескам фукоидана по 10 мг каждая приливали по 1 мл ($0,10 \pm 0,01$ мМ) растворов рекомбинантных фукоиданаз FFA1 и FFA2 в 0,02 М трис-HCl буфере, pH 7,2, содержащем 5 мМ CaCl_2 (конечная концентрация), и инкубировали при 37 °C. Из реакционной смеси отбирали аликвоты по 20 мкл через 1, 3, 8, 24, 36, 48 и 72 ч и анализировали их методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1100 (Германия), снабженным рефрактометрическим детектором и последовательно соединенными колонками для гель-фильтрации TSKgel G4000 SW и TSKgel G2000 SW. Элюирование проводили 0,05 М водным раствором Na_2SO_4 при температуре 50 °C со скоростью 0,5 мл/мин. Молекулярные массы фукоидана и продуктов его ферментативного гидролиза определяли по калибровочной кривой с использованием в качестве стандартов декстранов с известными молекулярными массами.

Получение низкомолекулярных продуктов гидролиза фукоидана фукоиданазой из *Lambis* sp.

Фукоидан из *F. evanescens* (0,5 г) растворяли в 50 мл раствора фермента в 0,25 М Na-сукцинатном буфере, pH 5,0 и инкубировали в течение 72 ч при 25 °C. Высокомолекулярные продукты гидролиза осаждали 75 %-ным водным раствором этанола. Выпавший осадок отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин. Полученный супернатант упаривали на роторном испарителе, растворяли в 10 мл дистиллированной воды и наносили на колонку с DEAE-MacroPrep, 3×10 см (GE Healthcare, США), уравновешенную водой. Элюирование проводили линейным градиентом NaCl 0-1 М (150×150 мл) со скоростью 0,7 мл/мин. Общие сахара в исследуемых фракциях определяли фенол-сернокислотным методом [223]. Фракции, содержащие сахара, обессоливали на колонке Sephadex G-10, 1×70 см (GE Healthcare, США), упаривали на роторном испарителе и наносили на термостатируемую колонку (60 °C) с Bio-Gel P-2, 1×120 см (Bio-Rad, США). Элюирование вели водой со скоростью 0,2 мл/мин. Фракции, в которых содержались сахара, объединяли, лиофильно высушивали и анализировали при помощи спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии.

Получение продуктов ферментативного расщепления фукоидана из *Fucus distichus* фукоиданазой из *Littorina sitkana*. В раствор (25 мл) фукоиданазы (10^{-2} ед.) в 0,05 М ацетатном буфере, pH 5,4, содержащий 0,2 М NaCl, вносили 245 мг фукоидана. После растворения субстрата смесь инкубировали в течение 21 ч при 37 °С, затем добавляли 5 мл раствора фермента и продолжали инкубировать в тех же условиях еще 24 ч, отбирая через определенные интервалы времени из ферментативной смеси аликвоты по 0,3 мл и определяя в них количество восстанавливающих сахаров по методу Нельсона [222]. 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) отделяли центрифугированием, промывали этанолом, растворяли в минимальном объеме воды и лиофилизировали (выход 210 мг), а супернатант (низкомолекулярные продукты реакции вместе с солями буфера) упаривали досуха в вакууме (выход 140 мг по сахару).

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

3.21 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Анализ продуктов ПЦР и рекомбинантных плазмид проводили в 1 % агарозном геле в 50 мМ трис-ацетатном буфере pH 8,0. Окрашивание проводили 0,01 %-ным раствором этидиумбромидом в 50 мМ трис-ацетатного буфера pH 8,0. Нуклеиновые кислоты, окрашенные этидиумбромидом, регистрировали в геле при помощи системы для гель-документирования ChemiDoc XRS (Bio-Rad, США) при длине волны 365 нм.

3.22 Определение содержания сульфатных групп

Содержание сульфатных групп в полисахаридах оценивали с помощью турбидиметрического метода [226].

3.23 Дезацетилирование фукоиданов

Дезацетилирование фукоиданов проводили 2,5 % водным раствором аммиака. Навеску фукоидана (1 г) растворяли в 90 мл дистиллированной воды и приливали 10 мл 25 % водного раствора аммиака. Смесь выдерживали в течение 20 ч при 37 °С и диализовали на мембране Snake Skin с пределом отсека 10 кДа (Termo Scientific, США) в течение 48 ч. Полученный раствор концентрировали в вакууме и лиофильно высушивали.

3.24 Десульфатирование фукоиданов

Навеску дезацетилированного фукоидана (200 мг) растворяли в 10 мл дистиллированной воды, наносили на колонку с катионитом КУ-2, 1,5×10 см, элюат собирали в колбу с 0,5 мл пиридина. Колонку дополнительно промывали 20 мл воды, полученный раствор концентрировали на ротаторном испарителе и лиофильно сушили. К сухому остатку добавляли 20 мл ДМСО, перемешивали до полного растворения полисахарида и нагревали 3 ч при 100 °С. Образец диализовали на мембране с пределом исключения 10 кДа (Millipore, США). Раствор концентрировали и лиофильно сушили.

3.25 Определение моносахаридного состава полисахаридов

Образцы полисахаридов (5 мг) подвергали гидролизу 4 N HCl при 100 °С (5 ч). Моносахаридный состав продуктов кислотного гидролиза определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC-20A, (Япония) (колонка Shim-pack ISA-07/S2504, 0,4×25 см; 60 °С), обнаружение проводили бицинхонинатным методом. Моносахариды (Rha, Rib, Man, Fuc, Gal, Xyl, Glc) и ламинарибиозу использовали в качестве стандартов.

3.26 Масс-спектрометрия

MALDI масс-спектры фукоолигосахаридов были получены с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра ULTRAFLEX (Bruker, Германия) с азотным лазером (337 нм) при ускоряющем напряжении 19 кВ. В режиме регистрации положительных ионов в качестве матрицы использовали 50 % раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл), в смеси ацетонитрил/вода (1:1). В режиме регистрации

отрицательных ионов в качестве матрицы использовали раствор фенилозона D-эритро-пентозы (арабиноозона) в метаноле. Водные растворы исследуемых веществ (1 мг/мл) наносили на мишень в количестве 1 мкл, после чего наносили матрицу (1 мкл) и высушивали в потоке воздуха. Масс-спектры получены с использованием внешней калибровки по пикам матрицы и ангиотензина-II (Sigma, США).

3.27 ЯМР-спектроскопия

^1H , ^{13}C -ЯМР и 2D ЯМР (COSY, TOCSY, HMBC, HSQC) спектры для растворов полисахаридов в D_2O были получены на ЯМР-спектрометре Bruker Avance DPX-700 NMR с рабочей частотой 700 МГц при температуре 308 К.

4. Результаты и их обсуждение

4.1 1→3-β-D-Глюканазы (Ламириназы)

4.1.1 1→3-β-D-Глюканаза вьетнамской промысловой мидии *Perna viridis*

1→3-β-D-глюканазы широко встречаются в морских организмах, так же как целлюлазы и амилазы в наземных объектах. Уникальными концентраторами этих ферментов, выполняющих у морских беспозвоночных пищеварительную функцию, оказались кристаллические стебельки двустворчатых моллюсков. Содержание 1→3-β-D-глюканаз в кристаллических стебельках в 500-1000 раз выше, чем в других объектах.

В кристаллическом стебельке ранее не исследованной мидии *P. viridis* 1→3-β-D-глюканаза также является наиболее активным ферментом [227]. Активность других гликозидаз, катализирующих гидролиз амилопектина, КМ-целлюлозы и пуштулана была незначительной или вообще отсутствовала (табл. 4.1).

Таблица 4.1 – Состав гликозидаз кристаллического стебелька *P. viridis*

Фермент	Субстрат	Тип связи	Активность, %
1→3-β-D-глюканаза	ламинаран	β-1→3;β-1→6	100
1→6-β-D-глюканаза	пуштулан	β-1→6	0,2
амилаза	амилопектин	α-1→4;α-1→6	6,4
целлюлаза	КМ-целлюлоза	β-1→4	4
α-фукозидаза	<i>n</i> -нитрофенил-α-D-фукопиранозид	α	0
β-глюкозидаза	<i>n</i> -нитрофенил-β-D-глюкопиранозид	β	0
β-галактозидаза	<i>n</i> -нитрофенил-β-D-галактопиранозид	β	0
α-маннозидаза	<i>n</i> -нитрофенил-α-D-маннопиранозид	α	0

Поэтому схема очистки 1→3-β-D-глюканазы оказалась очень простой и включала катионообменную хроматографию на КМ-целлюлозе и гель-фильтрацию на сефадексе G-75 (табл. 4.2). В результате была получена гомогенная по данным SDS-электрофореза 1→3-β-D-глюканаза с молекулярной массой 33 кДа (рис. 4.1). Выход фермента составил 10,6%.

Таблица 4.2 – Очистка 1→3-β-D-глюканазы из кристаллического стебелька *P. viridis*

Стадия очистки	Общий белок, мг/мл	Общая активность, ед. акт.	Удельная активность, ед. акт./мг белка	Степень очистки (раз)	Выход, %
Экстракция	89,1	22,6	0,25	1	100
Ионообменная хроматография на КМ-целлюлозе	11,7	11,6	1,0	4	51,2
Гель-фильтрация на сефадексе G-75	1,5	2,4	1,6	6,4	10,6

1→3-β-D-Глюканаза проявляла максимальную активность в широком диапазоне pH: от 4 до 6,5 (рис. 4.2) и при температуре 45 °С (рис. 4.3). Время полуинактивации фермента (понижения активности на 50%) при 45 °С составляло 180 мин, при 50 °С оно уменьшалось до 20 мин (рис. 4.4).

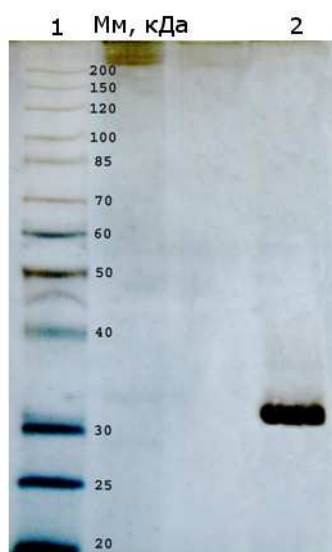


Рисунок 4.1 – SDS-электрофорез глюканазы из *P. viridis*. 1-маркеры, 2-очищенная 1→3-β-D-глюканаза.

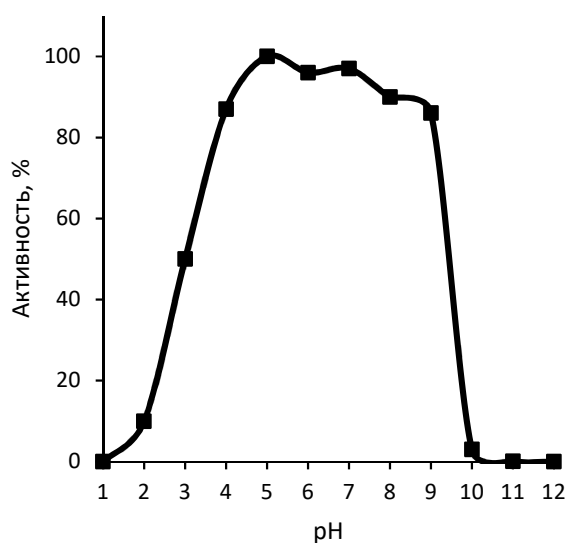


Рисунок 4.2 – pH-Оптимум 1→3-β-D-глюканазы из кристаллического стебелька *P. viridis*.

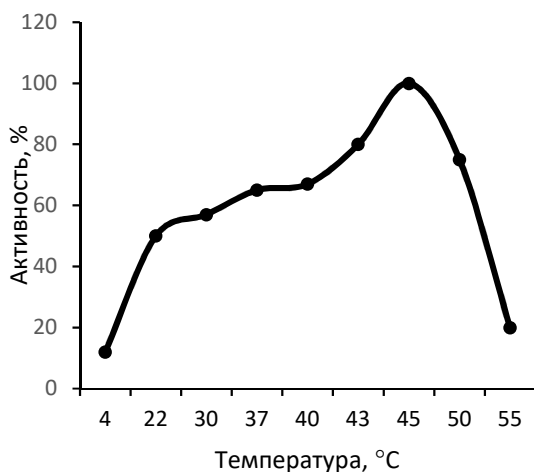


Рисунок 4.3 – Температурный оптимум 1→3-β-D-глюканазы из кристаллического стебелька *P. viridis*.

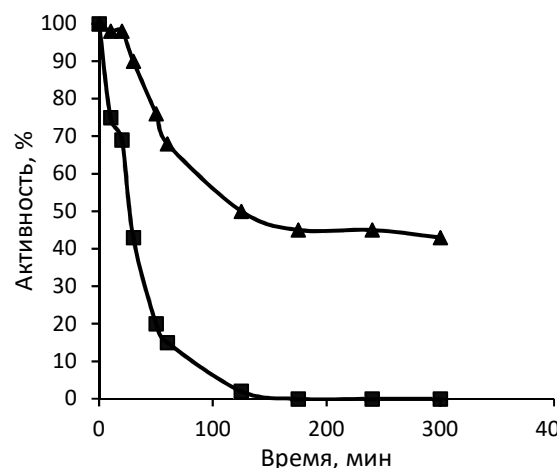


Рисунок 4.4 – Температурная стабильность 1→3-β-D-глюканазы из кристаллического стебелька *P. viridis*.
▲ - При 45°C и -■- при 50°C.

K_m была рассчитана по методу Лайнуивера-Берка для гидролиза ламинарана, который использовался в качестве субстрата, и составляла 0,3 мг/мл, что сопоставимо с K_m для 1→3-β-D-глюканаз из различных источников [228]. Так для 1→3-β-D-глюканазы из морского гриба *Trichoderma aureviride*, K_m составляет 0,3 мг/мл [229], для 1→3-β-D-глюканаз морских моллюсков ЛЮ, ЛІV и ЛІV – 0,7; 0,25 и 0,6 мг/мл соответственно [173, 230].

Изучение специфичности 1→3-β-D-глюканазы из *P. viridis* показало (табл. 4.3), что она катализировала расщепление β-1→3-связи в смешанных 1→3;1→6-β-D-глюканах: с высокой скоростью катализировала гидролиз ламинарана, транслама, слабо - дрожжевого глюкана, не гидролизовала высокомолекулярные и плохо растворимые глюканы – пахиман и аубазидан. Высокоочищенные глюканы с другим типом связи (пустулан, амилопектин и КМ-целлюлоза) гидролизу не подвергались. Различие в скорости гидролиза хорошо растворимых глюканов – ламинарана и транслама, по-видимому, связано с особенностями структуры этих субстратов. В молекуле транслама, полученного ферментативной трансформацией природного ламинарана [171], β-1→6-связанные остатки глюкозы присутствуют как в виде включений в основную цепь глюкана, так и в виде разветвлений, и сосредоточены на невозстанавливаемом конце молекулы.

Таблица 4.3 – Специфичность 1→3-β-D-глюканазы из кристаллического стебелька *P. viridis*

Субстрат	Тип связи, соотношение	Молекулярная масса, кДа, Растворимость	Активность, %
Ламинаран	β-1→3;1→6 90:10	5-6 Раств.	100
Периодатно-окисленный ламинаран	β-1→3 100	5-6 Раств.	100
Транслам	β-1→3;1→6 75:25	8-10 Раств.	32,1
Дрожжевой глюкан	β-1→3;1→6 90:10	>200 Слабо раств.	1,6
Пахиман	β-1→3;1→6 98:2	50-120 Слабо раств.	0
Аубазидан	β-1→3;1→6 50:50	500-550 Слабо раств.	0
Пустулан	β-1→6	30 Раств.	0
Амилопектин	α-1→4	2000 Раств.	0
КМ-целлюлоза	β-1→4	>2000 Раств.	0

В молекулах ламинарана разветвления в виде β-1→6-связанных остатков глюкозы относительно равномерно распределены по всей цепи 1→3-β-D-глюкана. Можно предположить, что 1→3-β-D-глюканаза предпочтительно атакует β-1→3-связи, расположенные ближе к невосстанавливающему концу субстрата, поэтому наличие в трансламе разветвлений в этой части молекулы замедляет скорость его расщепления по сравнению с ламинараном.

Модификация восстанавливающего и невосстанавливающего концов молекулы ламинарана (периодатно-окисленный ламинаран) не изменяла скорости его гидролиза 1→3-β-D-глюканазой из *P. viridis* (табл. 4.3) по сравнению с нативным ламинараном. Это типичная картина для ферментов эндо-типа действия, которые расщепляют внутренние связи в молекуле глюкана. Как известно, экзо-1→3-β-D-глюканазы, последовательно отщепляющие глюкозу (реже олигосахарид) с невосстанавливающего конца глюкана, не гидролизуют периодатно-окисленный ламинаран.

Анализ продуктов гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазой из *P. viridis* проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (рис. 4.5). При степени гидролиза субстрата около 20% в продуктах реакции были обнаружены глюкоза и глюкоолигосахариды различной степени полимеризации. В спектрах наблюдали основные пики с m/z $[M+Na]^+$: Glc₁ (203,3), Glc₂ (365,2), Glc₃ (527,2), Glc₄ (689,2), Glc₅ (851,3), Glc₆ (1013,5), Glc₇ (1175,7), Glc₈ (1338,0), Glc₉ (1501,0), Glc₁₀ (1662,3), Glc₁₁ (1825,5), Glc₁₂ (1987,6), Glc₁₃ (2150,6), Glc₁₄ (2312,4).

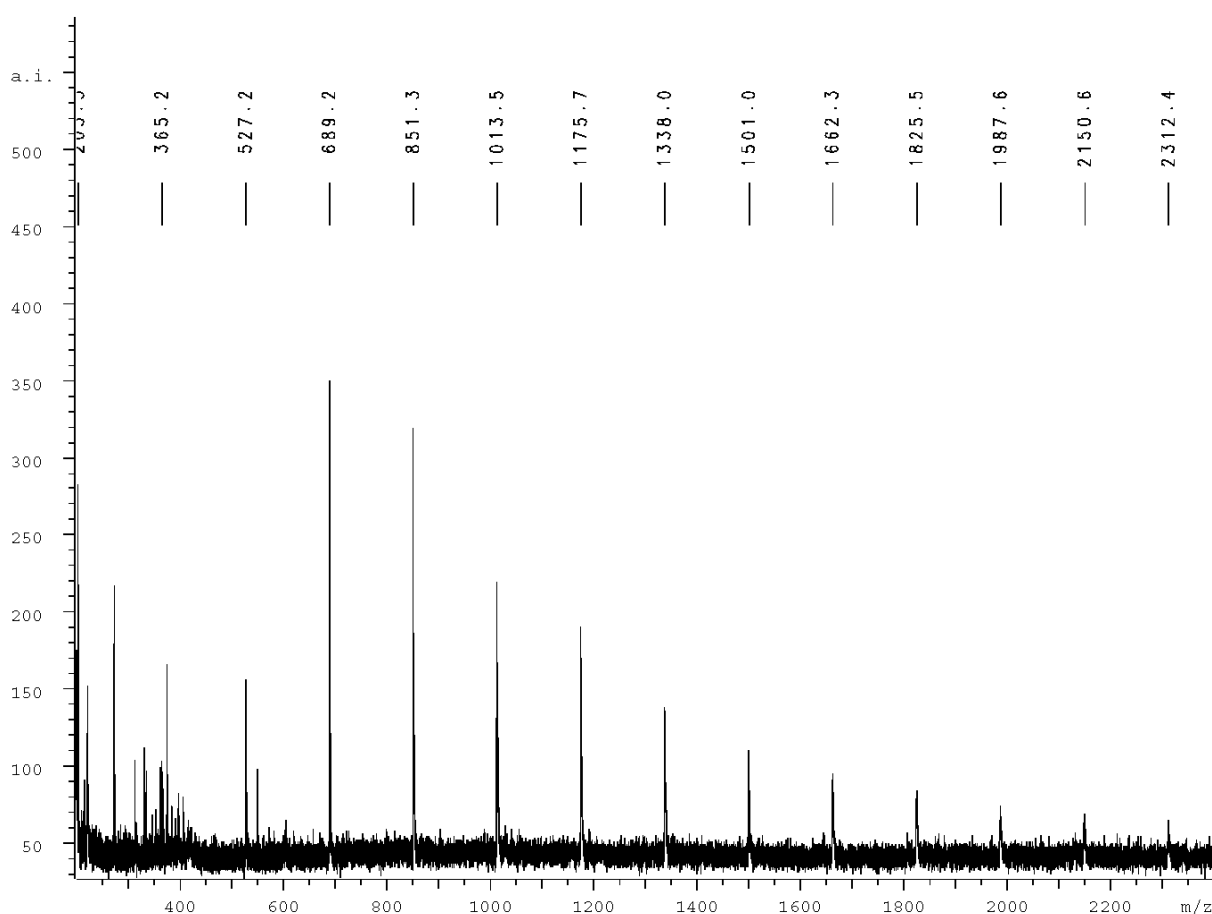


Рисунок 4.5 – MALDI-TOF масс-спектр продуктов гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазой из кристаллического стебелька *P. viridis*.

Степень расщепления ламинарана при исчерпывающем гидролизе 1→3-β-D-глюканазой из *P. viridis* достигала 74%. Согласно данным ВЭЖХ, основными продуктами при данной глубине гидролиза являлись глюкоза, ди-, три- и

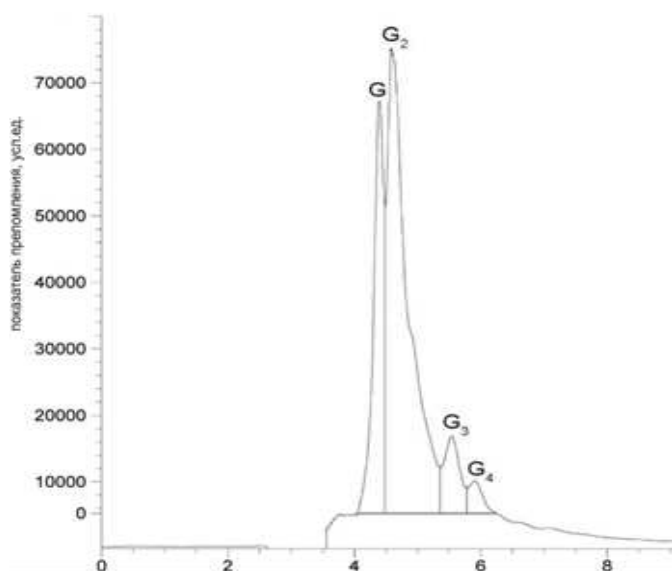


Рисунок 4.6 – ВЭЖХ продуктов исчерпывающего гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазой из кристаллического стебелька *P. viridis*. G- глюкоза, G₂-биоза, G₃-триоза, G₄– тетраоза.

тетрасахаридами (рис. 4.6). Состав продуктов подтверждает, что 1→3-β-D-глюканаза гидролизует внутренние связи молекулы глюкана, т.е. является ферментом эндо-типа действия. В условиях исчерпывающего гидролиза олигосахаридами со степенью полимеризации >4 практически полностью расщепляются ферментом до глюкозы и ламинарибиозы, β-1→6-связанные остатки глюкозы накапливаются в три- и тетрасахаридах. Для

подтверждения специфичности выделенного фермента к гидролизу β-1→3-связей было проведено сравнение ¹H ЯМР-спектров ламинарана и продуктов его ферментативного гидролиза. Показано, что в спектрах ламинарана (рис. 4.7 А) присутствует дублет аномерного протона Н1 4,98 м.д. ($J=7.9$ Гц), относящийся к β-1→3-связанным остаткам глюкозы, и группа сигналов в области 4,44 – 4,35 м.д., которая соответствует аномерным протонам β-1→6-связанных остатков глюкозы. В спектре продуктов ферментативного гидролиза ламинарана (рис. 4.7 Б) наблюдается увеличение интенсивности сигналов восстанавливающих остатков глюкозы α (5,46 м.д.) и β (4,41 м.д.), слабо выраженных в спектре нативного ламинарана, что свидетельствует о расщеплении молекулы полисахарида. Кроме того, после ферментативного гидролиза в спектре увеличивается количество сигналов в области 5,01-4,95 м.д., соответствующих аномерным протонам β-1→3-связанных остатков глюкозы, входящих в состав образующихся олигосахаридов. Сигналы аномерных протонов β-1→6-связанных остатков глюкозы 4,44 – 4,35 м.д. не претерпевают изменений после проведения ферментативного гидролиза ламинарана.

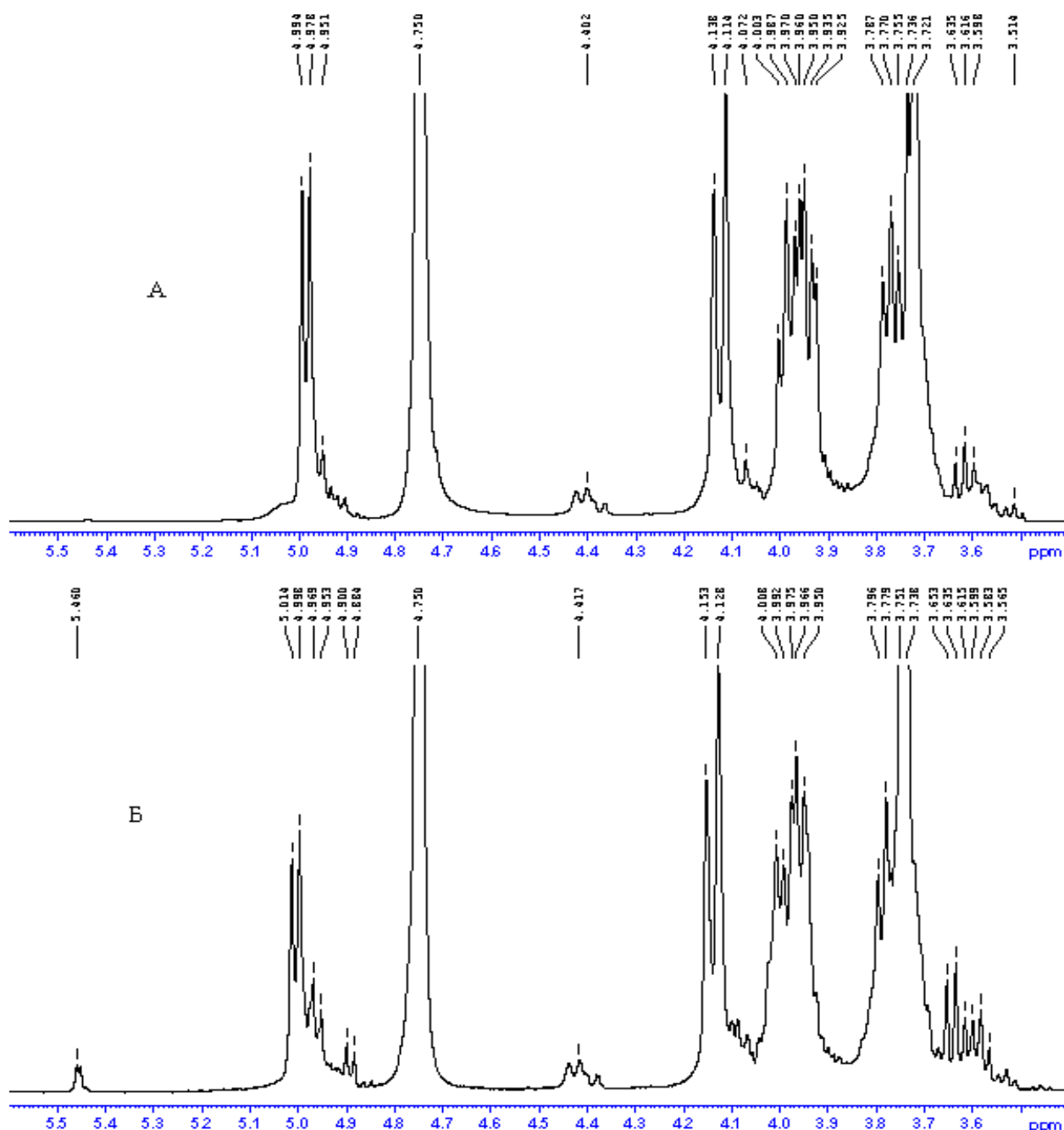


Рисунок 4.7 – ^1H ЯМР-спектры ламинарана (А) и продуктов гидролиза ламинарана $1\rightarrow3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканазой из кристаллического стебелька *P. viridis* (Б).

Как известно, гидролиз гликозидных связей под действием глюканаз проходит с обращением или сохранением конфигурации связи [231]. Для установления конфигурации расщепляемой связи был использован метод ^{13}C ЯМР-спектроскопии. На спектре, соответствующем 15 минутам реакции, катализируемой глюканазой (рис. 4.8), появляются сигналы в области 97,2 м.д., которые соответствуют С-1 остатка глюкозы с β -конфигурацией ОН-группы. При

продолжении реакции сигнал, соответствующий β -конфигурации C-1 (97,2 м.д.), растёт, и появляется новый сигнал в области 93,7 м.д., который принадлежит C-1 остатка глюкозы с α -конфигурацией ОН-группы. Этот сигнал (93,7 м.д.) появляется значительно позже как следствие мутаротации, следовательно, фермент гидролизует гликозидную связь с сохранением её конфигурации.

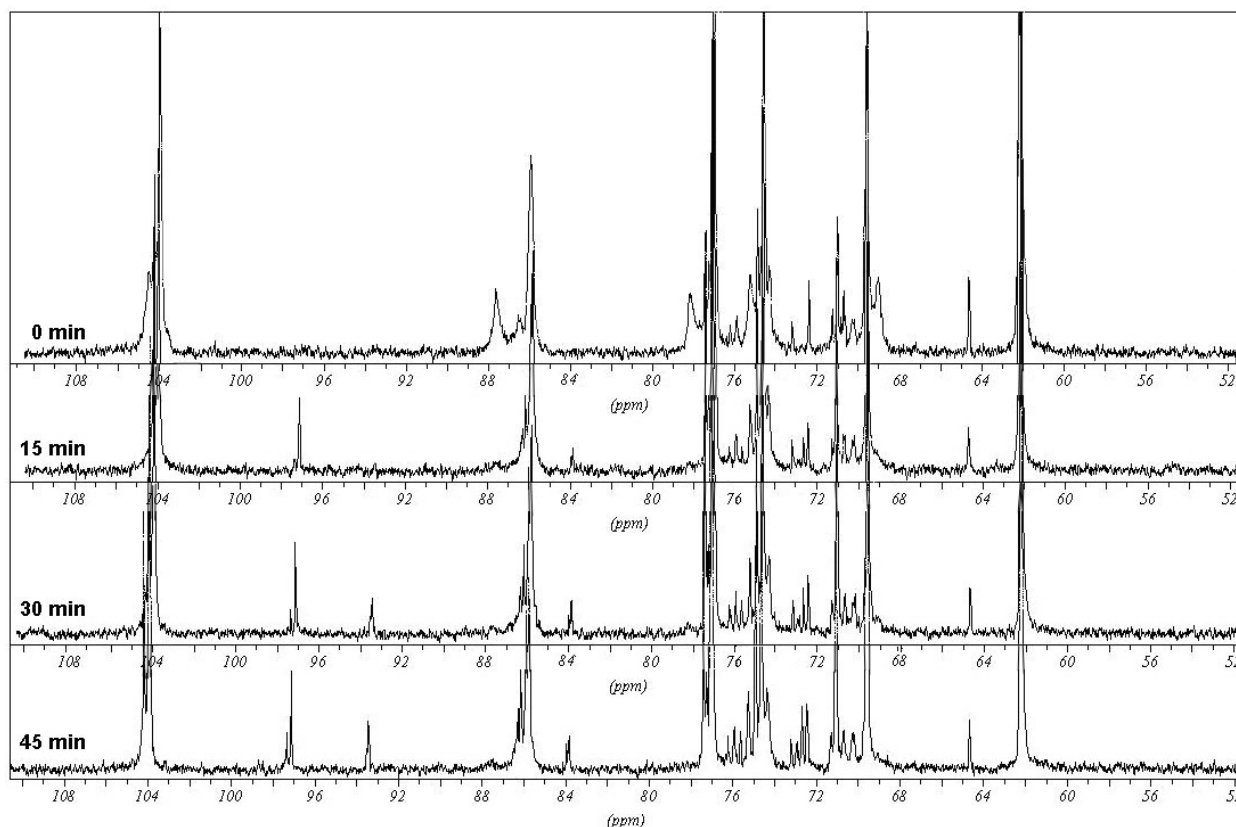


Рисунок 4.8 – ^{13}C ЯМР-спектры ламинарана и продуктов гидролиза ламинарана 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазой из кристаллического стебелька *P. viridis*.

Известно, что эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы из кристаллических стебельков морских моллюсков, являясь типичными гидролазами, обладают повышенной, по сравнению с наземными ферментами, способностью к реакциям трансгликозилирования, т.е. к реакциям переноса гликоновой части субстрата не только на воду (реакция гидролиза), но и на различные гидроксилсодержащие вещества (реакция трансгликозилирования). Для эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз LIV и L0, при использовании ламинарана в качестве донора гликозильных остатков, а в качестве акцептора – *n*-нитрофенил- β -D-глюкозида, отношение констант скорости

реакций трансгликозилирования и гидролиза k_T / k_F равно 2×10^4 . Для ферментов (амилаз и лизоцима) из наземных источников это соотношение намного меньше и в лучшем случае составляет не более 10^2 [232].

Методом ВЭЖХ нами было установлено, что $1 \rightarrow 3$ - β -D-глюканаза из *P. viridis* эффективно катализирует процесс трансгликозилирования, протекающий с образованием *n*-нитрофенил-глюкоолигозидов (рис. 4.9).

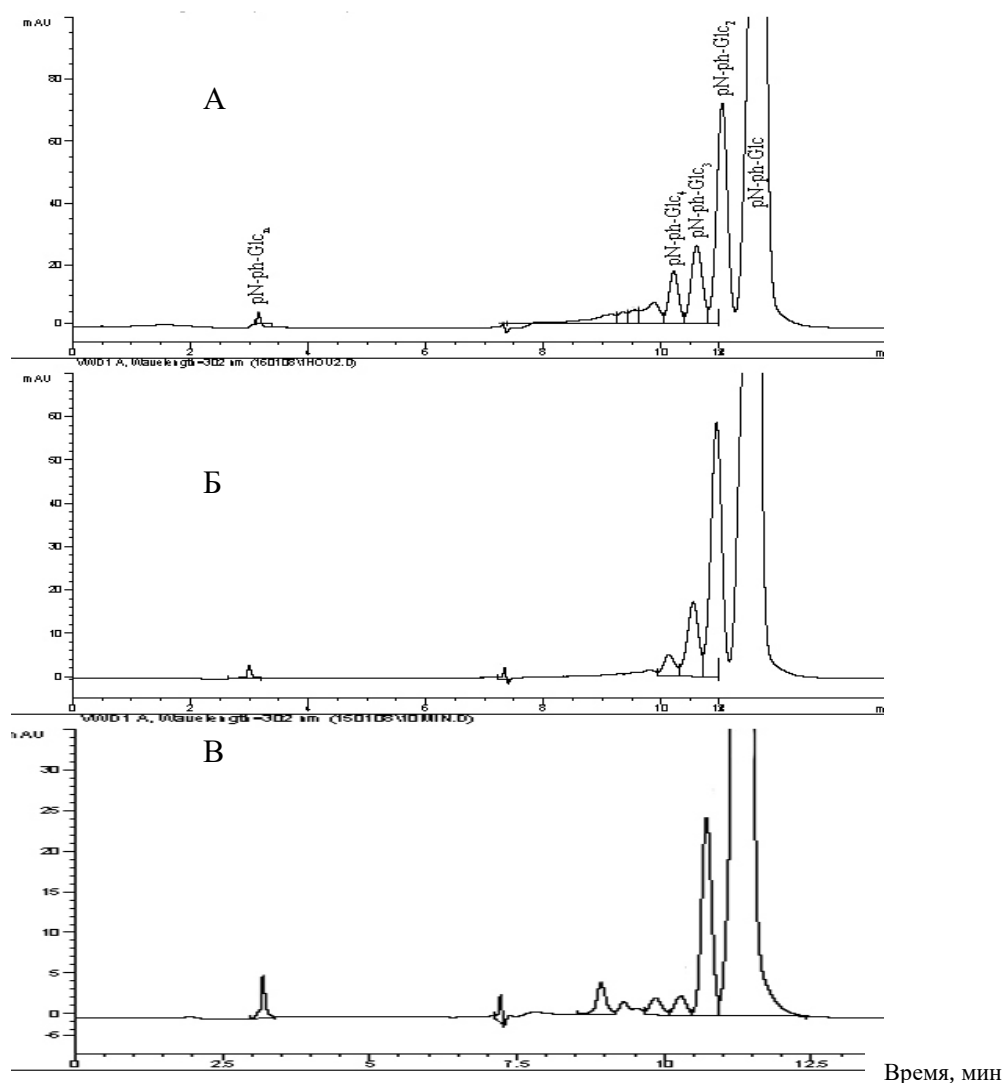


Рисунок 4.9 – ВЭЖХ продуктов реакции трансгликозилирования, катализируемой $1 \rightarrow 3$ - β -D-глюканазой из кристаллического стебелька *P. viridis*. *pN-ph-Glc* – *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид, *pN-ph-Glc_n* – *n*-нитрофенил-глюкоолигозиды, $n=2-4$. Время реакции 10 мин. (А), 30 мин.(Б), 24 часа (В). *n*-нитрофенол элюируется на 30 минуте.

Анализ состава продуктов на различных стадиях реакции показал, что наблюдается картина, характерная для действия эндо-ферментов: первоначальное образование более крупных *n*-нитрофенил-глюкоолигозидов и последующее

превращение их в более короткие олигомеры в процессе вторичного гидролиза [233].

Исследование реакции трансгликозилирования было проведено более детально с использованием метода масс-спектрометрии (рис. 4.10). С помощью ESI- и MALDI масс-спектрометрии можно регистрировать одновременно продукты гидролиза и продукты трансгликозилирования [230, 234, 235].

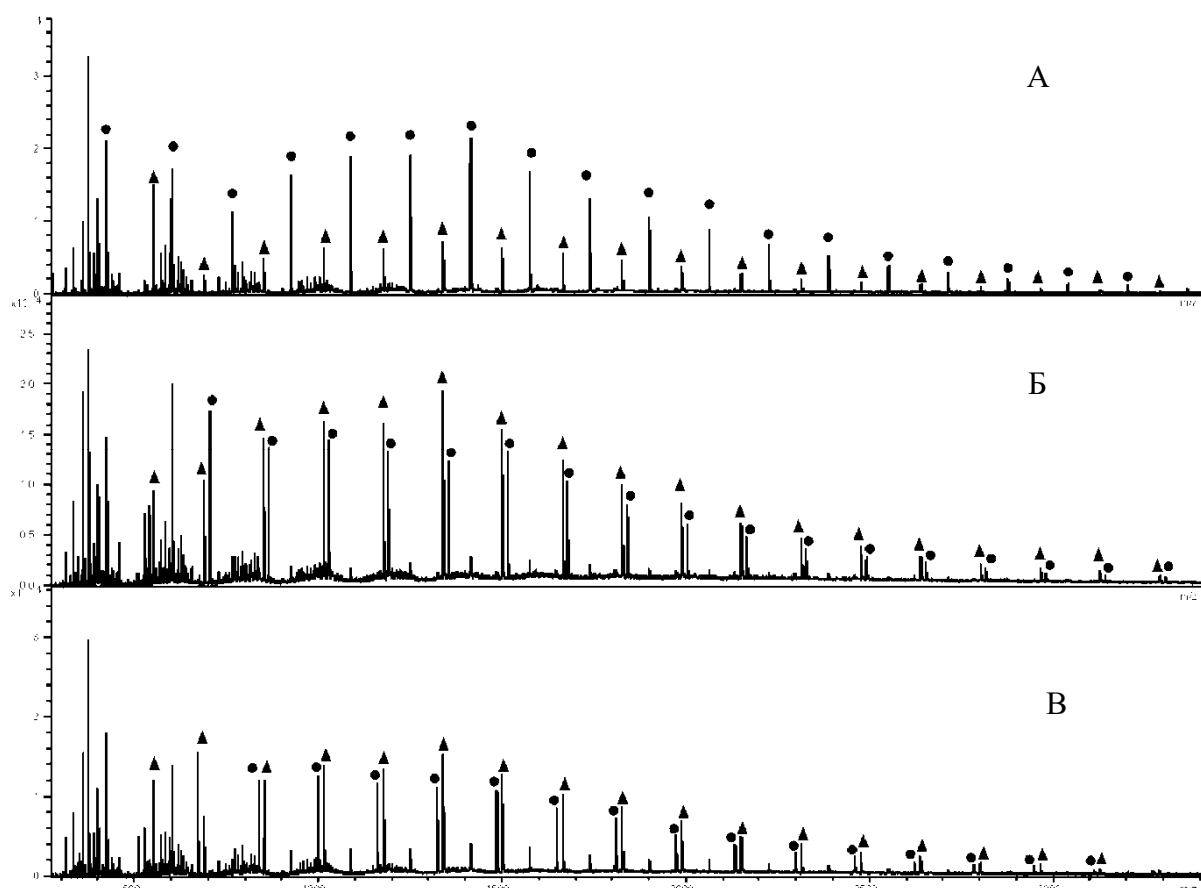


Рисунок 4.10 - MALDI-TOF масс-спектр продуктов трансгликозилирования, полученных в результате действия 1→3- β -D-глюканазы из *P. viridis* на ламинаран в присутствии различных акцепторов: глицерина (А); метил- β -D-глюкопиранозид (Б); метил- β -D-ксилопиранозид (В). ▲ - продукты гидролиза; ● – продукты трансгликозилирования.

Этот метод значительно чувствительнее, чем ВЭЖХ, хотя не лишен ряда недостатков. Не все акцепторы могут быть использованы для проведения реакции и последующего детектирования продуктов. Эти методы не позволяют определить тип гликозидной связи и ее конфигурацию (в положительно заряженном поле с одним масс анализатором) и плохо детектируют ионы моносахаридов, такие как $[\text{Glc}+\text{Na}]^+$. Эффективность ионизации сахаров в положительно заряженном поле

зависит от концентрации ионов Na^+ в образце [236]. Все это не позволяет с достаточной достоверностью применять масс-спектрометрические методы для количественных экспериментов. Постановка количественного эксперимента требует отдельного трудоемкого исследования эффективности ионизации различных сахаров. Для того, чтобы получить количественные данные о продуктах реакции ферментативного гидролиза, была изучена кинетика реакции двумя методами одновременно: методом гель-фильтрации и масс-спектрометрии.

Продукты реакции анализировали количественным методом на автоматическом анализаторе с колонкой Bio-gel P-2, эта же реакционная смесь анализировалась с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESIMS) (рис. 4.11). Были рассчитаны площади пиков хроматограммы гель-фильтрации, соответствующие отдельным продуктам реакции, и эти данные сопоставлены с интенсивностью сигналов, полученных с помощью ESIMS. Были вычислены поправочные коэффициенты для отдельных олигосахаридов (табл. 4.4, рис. 4.11), которые позволили количественно оценивать их содержание в ESIMS спектрах.

Таблица 4.4 – Расчет поправочных коэффициентов для количественного определения олигосахаридов по данным ESIMS

Масса иона (ESIMS)	Степень полимеризации продуктов, n	Соотношение сахаров (согласно данным гель-фильтрации)	Содержание сахаров (данные ESIMS)	Поправочный коэффициент
203	1	4	20055	43
365	2	1	216584	1,00
527	3	0,437	140598	0,67
689	4	0,12	31262	0,833
851	5	0,041	14649	0,606

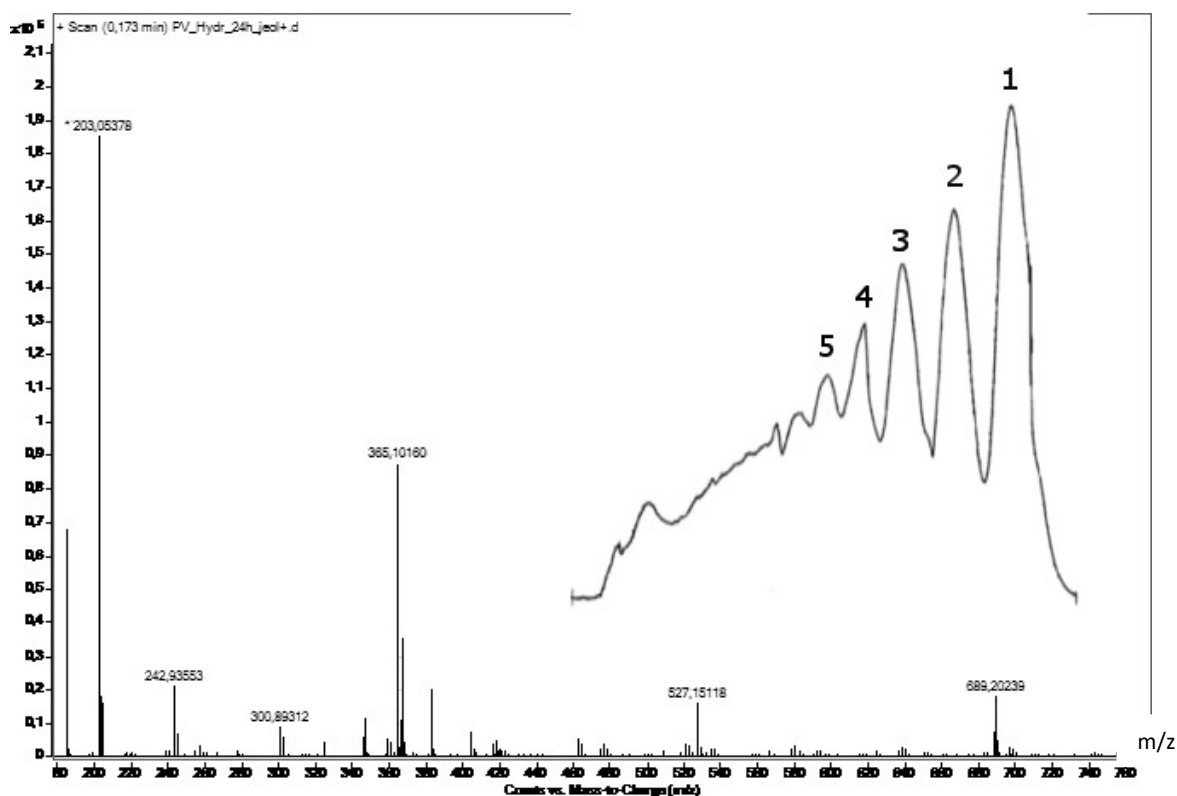


Рисунок 4.11 – ESIMS спектр и гель-фильтрация продуктов гидролиза ламинарана на колонке с Bio gel P-2 (1, 2, 3, 4, 5 – степень полимеризации). Степень гидролиза –20%

Кинетика накопления низкомолекулярных продуктов реакции, согласно откорректированным данным ESIMS, приведена на рисунке 4.12.

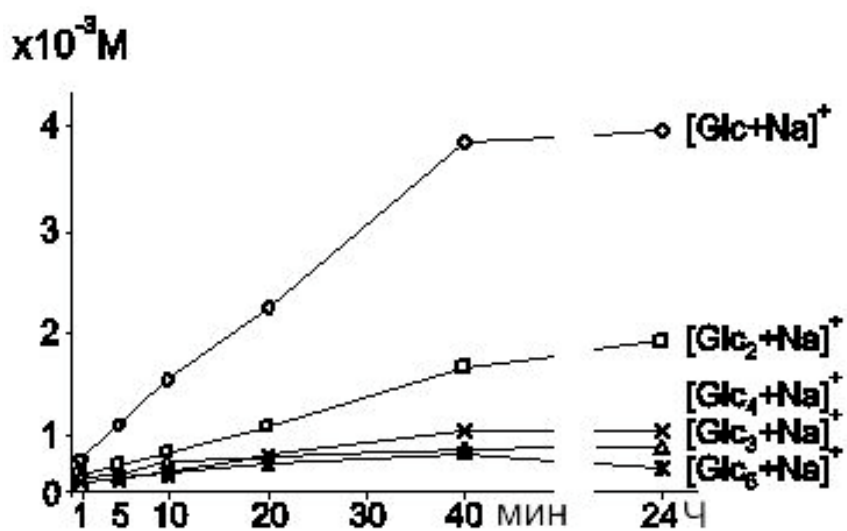


Рисунок 4.12 – Кинетика гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазой из кристаллического стебелька *P. viridis*.

Основными продуктами гидролиза являлись моно- и дисахариды, что типично для глюканаз морских беспозвоночных [155, 230]. Интересно отметить, что после исчерпывающего гидролиза количество тетрасахаридов было больше, чем трисахаридов, а количество глюкозы возрастало линейно с начала гидролиза. Отсутствие лаг периода означает, что глюкоза - продукт первичной атаки [237]. Через 24 часа реакции концентрация глюкозы составляла $\sim 4 \times 10^{-3}$ моль/мл, что соответствовало примерно 70% глубине гидролиза ламинарана. Количество олигосахаридов со степенью полимеризации ≥ 3 постепенно уменьшалось после 40 минут реакции. Это свидетельствует о том, что фермент медленно деполимеризовал олигосахариды со степенью полимеризации 4 и 5. Низкая скорость их гидролиза, возможно, связана с тем, что в структуре олигосахаридов содержатся β -1 $\rightarrow$ 6-гликозидные связи, которые затрудняют доступ фермента к β -1 $\rightarrow$ 3-связанным остаткам глюкозы [238].

Исследование первичной структуры фермента проводили методами генной инженерии. Нуклеотидную последовательность кДНК эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы из *P. viridis* определяли методом ОТ-ПЦР в сочетании с быстрой амплификацией кДНК концов (RACE метод). Полученная последовательность внесена в генетическую базу данных (GenBank) под номером FJ623758. кДНК состоит из 1380 нуклеиновых оснований с открытой рамкой считывания; 1332 нуклеиновых основания кодируют 443 аминокислотных остатка. Зрелый белок начинается со 118 аминокислотного остатка и состоит из 328 аминокислотных остатков. N-концевая область установленной аминокислотной последовательности белка AVVFRDDFHSFNKGS полностью совпадает с N-концевой последовательностью очищенного фермента, которая была определена по методу Эдмана на автоматическом секвенаторе. Анализ аминокислотной последовательности эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы из мидии *P. viridis*, проведенный с помощью программы SMART tool (<http://smart.embl-heidelberg.de>), позволил отнести фермент к 16 семейству гликозид гидролаз CAZy.

Результаты поиска с использованием сервиса BLAST2 установили высокую гомологию аминокислотной последовательности эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы из мидии *P. viridis* с эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазами гребешка *M. yessoensis* (GenBank

номер AY848857), *C. albidus* (GenBank номер DQ093347) (53% идентичности, 68% и 66% гомологии, соответственно), и эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазой из двустворчатого моллюска *P. sachalinensis* (GenBank номер AAP74223) – 43% идентичности и 58% сходства. Несколько меньшее сходство (30% идентичности и 40% сходства) было получено при сравнении с аминокислотной последовательностью бактериальной 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы. Множественное выравнивание последовательностей 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз беспозвоночных и бактерий (рис. 4.13) показало, что фермент содержит высоко консервативный участок Gly150-Glu156 (исходя из нумерации аминокислотной последовательности 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы мидии *P. viridis*), включающий в себя две каталитических аминокислоты Glu151 и Glu156. Участок для связывания субстрата представлен фрагментом молекулы фермента, ограниченным Trp131-Leu137.

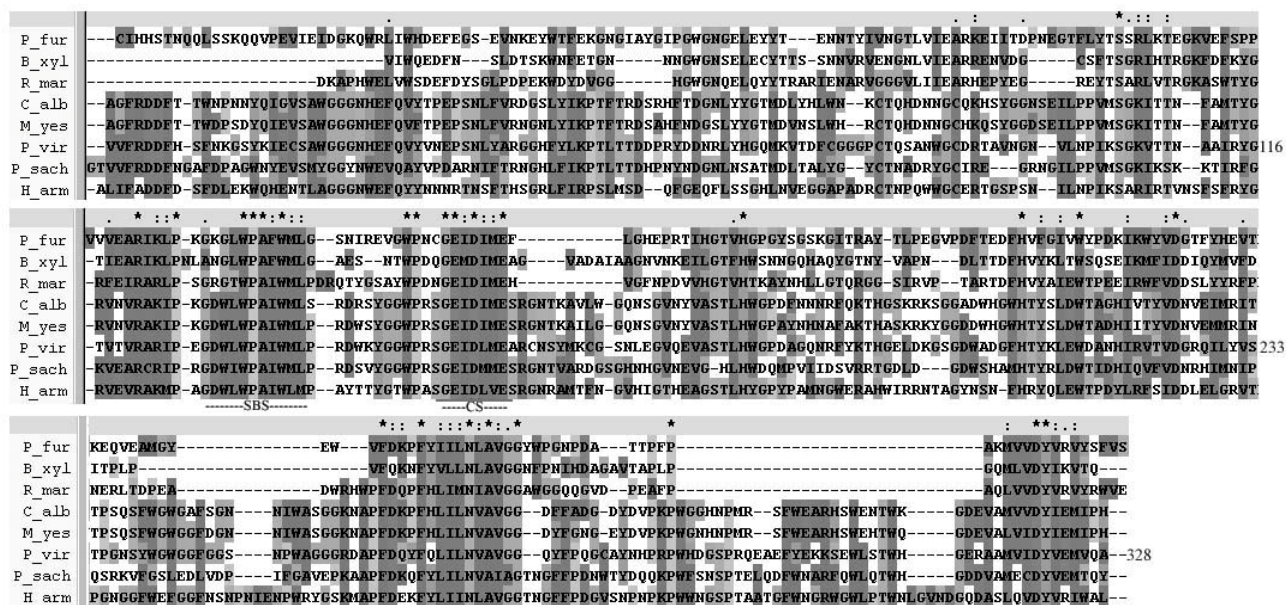


Рисунок 4.13 - Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз беспозвоночных и бактерий.

P-fur – *Pyrococcus furiosus* (GenBank AAC25554), B-xyl – *Bursaphelenchus xylophilus* (BAE02683), R-mar – *Rhodothermus marinus* (AAC69707), C-alb – *Chlamys albidus* (DQ093347), M-yes – *Mizuhopecten yessoensis* (AY848857), P-vir – *Perna viridis* (FJ623758), P-sach – *Pseudocardium sachalinensis* (AAP74223), H-arm – *Helicoverpa armigera* (ABU98621).

Методом химической модификации ранее было показано, что аминокислотный остаток гистидина играет важную роль для каталитической активности эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз моллюсков [230]. Анализ данных множественного выравнивания

позволил предположить, что эту роль могут выполнять два гистидиновых аминокислотных остатка His180 и His 209, находящихся в консервативном участке эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза 16 структурного семейства CAZy. Интересно, что эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза мидии *P. viridis*, как и другие эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы моллюсков, имеют около 40% структурного сходства с 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюкан-связывающими белками беспозвоночных и грамм-отрицательных бактерий, запускающих иммунный ответ на заражение микроорганизмами [239]. Согласно действующей классификации, основанной на гомологии аминокислотной последовательности, эти белки также принадлежат к 16 структурному семейству CAZy (<http://www.cazy.org/fam/GH16.html>).

Эти белки содержат в области, гомологичной каталитическому центру эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза, все ключевые аминокислоты, однако не проявляют глюканазной активности, сохраняя лишь 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюкан-связывающую активность [240]. В связи с этим, остается открытым вопрос о том, какие аминокислотные остатки, помимо уже известных [241, 242], важны для каталитической активности эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза. Аналогичная картина наблюдается и для β -1 $\rightarrow$ 3-глюкан-связывающих белков растений (GBPs), которые относятся к 81 структурному семейству CAZy. Они имеют область, имеющую высокую гомологию с каталитическим центром 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза растений, однако не способны гидролизовать гликозидную связь. Как и в предыдущем случае, эти β -1 $\rightarrow$ 3-глюкан-связывающие белки запускают защитный ответ растений против патогенов [243-245]. Имеется гипотеза о том, что β -1 $\rightarrow$ 3-глюкан-связывающие белки произошли из древнего гена эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы простой дупликацией [246].

Таким образом, из кристаллического стебелька промышленного вида вьетнамской мидии *P. viridis* в гомогенном состоянии выделена и охарактеризована 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза, которая гидролизует β -1 $\rightarrow$ 3-связи в глюканах по эндо-типу с сохранением конфигурации связи и обладает способностью катализировать реакцию трансгликозилирования. Фермент классифицирован как глюкан эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюкозидаза (КФ 3.2.1.39) и отнесен к 16 структурному семейству CAZy.

Фермент может быть использован для установления структуры 1→3-β-D-глюканов и энзиматического синтеза новых углеводсодержащих соединений.

4.1.2 1→3-β-D-глюканаза моллюска Южно-Китайского моря *Tapes literata*

Двустворчатый моллюск *Tapes literata* является промысловым видом, обитающим у берегов Социалистической Республики Вьетнам. Анализ состава О-гликозид гидролаз в экстракте кристаллического стебелька моллюска показал, что 1→3-β-D-глюканаза является преобладающим ферментом [247]. Активность других глюканаз, катализирующих гидролиз амилопектина, КМ-целлюлозы и пуллулана была незначительной.

Очистка фермента включала в себя стадии экстракции, центрифугирования, ионообменной хроматографии на СМ-MacroPrep, ультрафильтрации, гель-фильтрации на сефадексе G-50 и биогеле Р-30 (табл. 4.6).

Таблица 4.6 – Схема очистки 1→3-β-D-глюканазы из кристаллического стебелька *T. literata*

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, ед.акт.	Удельная активность, ед.акт./мг белка	Степень очистки (раз)	Выход, %
Экстракция	91,3	15,5	0,17	1	10
СМ-MacroPrep	20,7	13,2	0,6	3,8	85,4
Гель-фильтрация на сефадексе G-50	10,2	10,4	0,9	5,4	66,9
Гель-фильтрация на биогеле Р-30	8,4	9,2	1,1	6,5	59,5
Гель-фильтрация на сефадексе G-50	5,8	8,1	1,4	8,2	52,3

Высокая концентрация 1→3-β-D-глюканазы в исходном экстракте позволила при небольшой степени очистки (в 8,24 раз) получить фермент, гомогенный по данным SDS-электрофореза. Выделенный фермент имел молекулярную массу 34,2 кДа (рис. 4.14). Выход фермента составил 52,3%, что значительно выше, чем у 1→3-β-D-глюканазы из *P. viridis*.

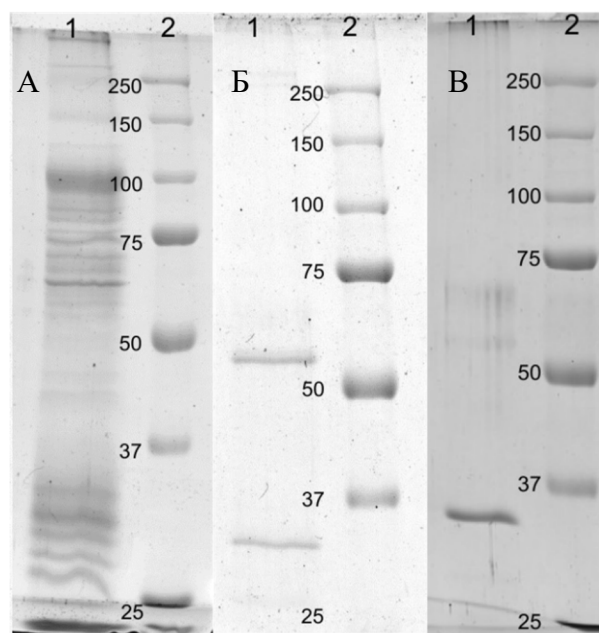


Рисунок 4.14 – SDS-электрофорез препаратов 1→3-β-D-глюканазы из кристаллического стебелька *T. literata* на разных стадиях очистки: экстракт (А), после CM-MacroPrep (Б), после гель-фильтрации на сефадексе G-50 (В). 1 – препарат белка, 2- стандартные белки.

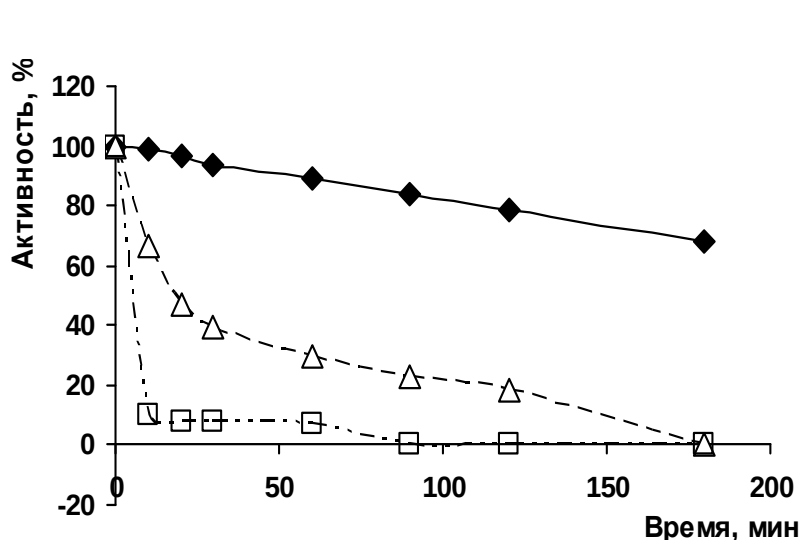


Рисунок 4.15 - Температурная стабильность 1→3-β-D-глюканазы из кристаллического стебелька *T. literata*.

(♦) - 37 °C; (Δ) - 50 °C; (□) - 55 °C.

1→3-β-D-Глюканаза

проявляла максимальную активность в широком диапазоне pH: от 4,5 до 7,5. Исследование термостабильности показало, что время полуживучести фермента составило 30 минут при 50 °C (рис. 4.15). NaCl до концентрации 1,5 М так же, как и ионы двухвалентных метал-

лов, на активность фермента не влиял. Необходимо отметить, что физико-химические свойства ферментов, выделенных из моллюсков, собранных у берегов Вьетнама, достаточно близки. Однако они заметно отличаются от свойств 1→3-β-

D-глюканаз, выделенных из моллюсков, обитающих в Японском и Охотском морях. Для этих ферментов характерна относительно низкая термостабильность и узкий интервал оптимальных значений pH.

Специфичность 1→3-β-D-глюканазы из *T. literata* к β-1→3-связи в смешанных 1→3;1→6-β-D-глюканах установлена на серии глюканов. Показано, что фермент эффективно катализировал гидролиз ламинарана и периодатно-окисленного ламинарана, практически не действовал на высокомолекулярные и плохо растворимые 1→3; 1→6-β-D-глюканы: пахиман, дрожжевой глюкан и аубазидан. Глюканы с другим типом связи (пустулан, амилопектин и КМ-целлюлоза) гидролизу не подвергались (табл. 4.7).

Тот факт, что 1→3-β-D-глюканаза из *T. literata* с одинаковой скоростью гидролизовала природный ламинаран и периодатно-окисленный, подтверждает эндо-тип действия фермента.

Таблица 4.7 – Специфичность 1→3-β-D-глюканазы из *T. literata*

Субстрат	Тип связи, соотношение	Молекулярная масса, кДа Растворимость	Активность, %
Ламинаран	β-1→3; β-1→6 90:10	5-6 Раств.	100
Периодатно-окисленный ламинаран	β-1→3 100	5-6 Раств.	100
Дрожжевой глюкан	β-1→3;β-1→6 90:10	>200 Слабо раств.	2
Пахиман	β-1→3; β-1→6 98:2	50-120 Слабо раств.	1
Аубазидан	β-1→3; β-1→6 50:50	500-550 Слабо раств.	0
Пустулан	β-1→6	30 Раств.	0
Амилопектин	α-1→4	2000 Раств.	0
КМ-целлюлоза	β-1→4	>2000 Раств.	0

Константа Михаэлиса (K_m) для гидролиза ламинарана была рассчитана по методу Лайнуивера-Берка и составляла 0,25 мг/мл, что является величиной, характерной для 1→3-β-D-глюканаз из различных источников: морских грибов, моллюсков и др.

В продуктах гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазой из *T. literata* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии были обнаружены глюкоза и глюкоолигосахариды различной степени полимеризации (рис. 4.16).

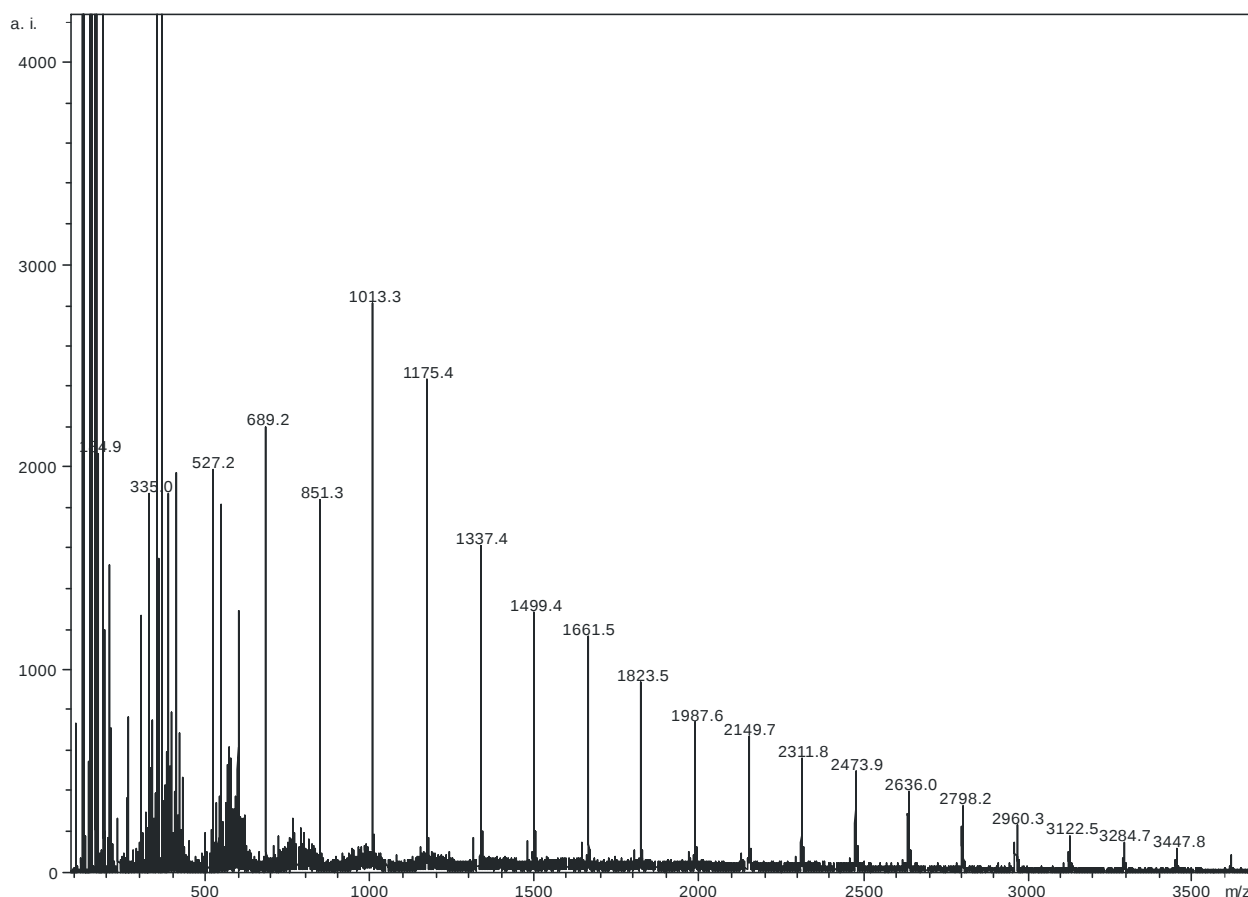


Рисунок 4.16 – MALDI-TOF масс-спектр продуктов исчерпывающего гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазой из кристаллического стебелька *T. literata*.

В спектрах наблюдали основные пики с m/z $[M+Na]^+$: Glc₁ (203,3), Glc₂ (365,2), Glc₃ (527,2), Glc₄ (689,2), Glc₅ (851,3), Glc₆ (1013,3), Glc₇ (1175,4), Glc₈ (1337,4), Glc₉ (1499,4), Glc₁₀ (1661,5), Glc₁₁ (1823,5), Glc₁₂ (1987,6), Glc₁₃ (2149,7), Glc₁₄ (2311,8), Glc₁₅ (2473,9), Glc₁₆ (2636,0), Glc₁₇ (2798,2).

Тип действия фермента был изучен методом ¹³C ЯМР-спектроскопии. Показано, что гидролиз β-1→3 связей в молекуле ламинарана проходит с сохранением конфигурации расщепляемой связи, что характерно для ферментов, обладающих трансгликозилирующей способностью.

Трансгликозилирующая способность 1→3-β-D-глюканазы из *T. literata* была исследована методом MALDI TOF масс-спектрометрии, который позволяет одновременно регистрировать продукты гидролиза и трансгликозилирования, а также оценивать динамику расхода субстрата. В качестве донора углеводной компоненты был использован ламинаран в качестве акцепторов - метил-β-D-глюко- (β-D-Glcp-O-Me), метил-β-D-ксилопиранозид (β-D-Xylp-O-Me), глицерин и метанол. Образцы продуктов отбирались через 1, 5, 15 мин и 24 ч после начала реакции. На рисунке 4.17 приведены масс-спектры продуктов трансгликозилирования и гидролиза за 5 мин действия фермента. Анализ масс-спектров показал, что фермент осуществлял активный перенос на все акцепторы, кроме метанола. Продуктов переноса на метанол обнаружено не было. В таблице 4.8 представлены сигналы всех выявленных продуктов реакции трансгликозилирования. Следует отметить, что интенсивность ионов низкомолекулярных продуктов переноса на акцептор β-D-Glcp-O-Me была максимальной (рис. 4.17 А). В случае, когда в качестве акцептора использовался β-D-Xylp-O-Me (рис. 4.17 Б) интенсивность ионов низкомолекулярных продуктов переноса была ниже, чем интенсивность сигналов высокомолекулярных продуктов переноса. Кроме того, заметно выше была интенсивность сигналов продуктов гидролиза. Ранее было показано, что для 1→3-β-D-глюканазы из двустворчатого моллюска *Perna viridis* глицерин являлся наиболее предпочтительным акцептором в реакции трансгликозилирования [228]. Напротив, для 1→3-β-D-глюканазы из *T. literata*, глицерин оказался самым неподходящим акцептором. На спектре (рис. 4.17 В) видно, что через 5 мин реакции с глицерином помимо высокомолекулярных продуктов переноса невысокой интенсивности, в реакционной смеси присутствует еще практически не гидролизованный ламинаран, который в контрольной пробе (рис. 4.17 Г) за это время уже был расщеплен на олигосахариды. Понижение скорости расхода субстрата может быть вызвано ингибирующим действием глицерина. Ранее подобное действие глицерина было отмечено для 1→3-β-D-глюканазы из *Littorina sitkana* [248].

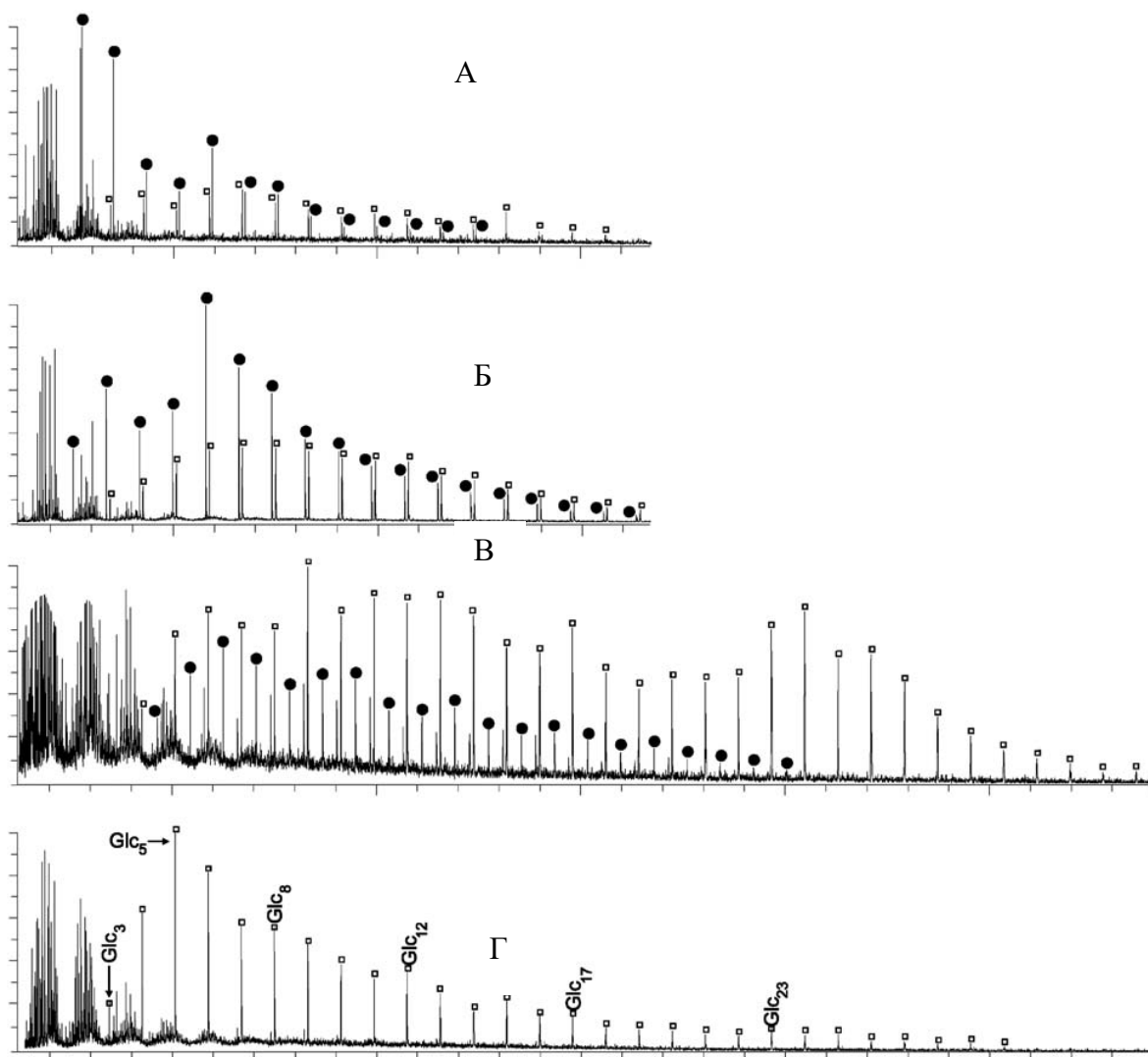


Рисунок 4.17 – MALDI-TOF масс-спектры продуктов трансгликозилирования, полученных действием 1→3-β-D-глюканазы из *T. literata* на ламинаран в течение 5 мин в присутствии акцепторов: β-D-Glc-O-Me (А), β-D-Xyl-O-Me (Б), глицерина (В), воды (гидролиз) (Г). ■– продукты гидролиза; ●– продукты трансгликозилирования.

Таблица 4.8 - Продукты реакции трансгликозилирования, полученные при действии 1→3-β-D-глюканазы из кристаллического стебелька *T. literata* на ламинаран в присутствии различных акцепторов

Акцептор		
Глицерин	Xyl-O-Me	Glc-O-Me
Продукты трансгликозилирования		
Glc ₁ Gly 277,1	Glc ₁ XylOMe 186,9	Glc ₁ OMe 217,0
Glc ₂ Gly 439,4	Glc ₂ XylOMe 349,2	Glc ₂ OMe 379,3
Glc ₃ Gly 601,6	Glc ₃ XylOMe 511,4	Glc ₃ OMe 541,5

Glc ₄ Gly 763,8	Glc ₄ XylOMe 673,5	Glc ₄ OMe 703,7
Glc ₅ Gly 925,4	Glc ₅ XylOMe 835,7	Glc ₅ OMe 865,9
Glc ₆ Gly 1088,1	Glc ₆ XylOMe 997,9	Glc ₆ OMe 1028,1
Glc ₇ Gly 1250,3	Glc ₇ XylOMe 1160,1	Glc ₇ OMe 1190,3
Glc ₈ Gly 1412,4	Glc ₈ XylOMe 1322,2	Glc ₈ OMe 1352,4
Glc ₉ Gly 1574,6	Glc ₉ XylOMe 1484,4	Glc ₉ OMe 1514,6
Glc ₁₀ Gly 1736,7	Glc ₁₀ XylOMe 1646,6	Glc ₁₀ OMe 1676,7
Glc ₁₁ Gly 1898,9	Glc ₁₁ XylOMe 1808,8	Glc ₁₁ OMe 1838,9
Glc ₁₂ Gly 2061,0	Glc ₁₂ XylOMe 1970,9	Glc ₁₂ OMe 2001,0
Glc ₁₃ Gly 2223,2	Glc ₁₃ XylOMe 2133,1	Glc ₁₃ OMe 2163,2
Glc ₁₄ Gly 2385,4	Glc ₁₄ XylOMe 2295,3	Glc ₁₄ OMe 2325,4
Glc ₁₅ Gly 2548,5	Glc ₁₅ XylOMe 2457,5	Glc ₁₅ OMe 2487,5

Аминокислотная последовательность 1→3-β-D-глюканазы из *T. literata* была определена методами молекулярной биологии. Суммарная РНК, выделенная из печени *T. literata*, была использована для синтеза первой цепи кДНК, которая затем была амплифицирована методом ПЦР. Для амплификации фрагментов кДНК, кодирующих 1→3-β-D-глюканазу из *T. literata* были использованы вырожденные олигонуклеотидные праймеры Glu1 и Glu2, созданные на консервативные участки WPAIWM и PFDKPF аминокислотных последовательностей 1→3-β-D-глюканаз. В результате ПЦР был получен фрагмент кДНК длиной около 400 п.н., который был клонирован в плазмидном векторе pTZ57R/T и секвенирован. Анализ установленной нуклеотидной последовательности этого фрагмента кДНК с помощью сервера BLAST2 показал, что ее ближайшими гомологами были 1→3-β-D-глюканазы моллюсков *M. yessoensis*, *Ch. albidus*, *P. sachalinensis* и *P. viridis*, структура которых была установлена нами ранее [155, 228, 230, 246]. На основе нуклеотидной последовательности фрагмента кДНК были сконструированы олигонуклеотидные праймеры для амплификации концевых участков кДНК 1→3-β-D-глюканазы *T. literata*. Амплификацию проводили с использованием

модифицированного метода RACE. В результате ПЦР были получены фрагменты кДНК длиной 380 п.н. и 1100 п.н., которые были клонированы в плазмидном векторе pTZ57R/T и секвенированы. Таким образом, нами была установлена нуклеотидная последовательность трех перекрывающихся фрагментов кДНК 1→3-β-D-глюканазы *T. literata*. При их сопоставлении была реконструирована полная нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующей 1→3-β-D-глюканазу, длина которой составила 1481 п.н. Аминокислотная последовательность 1→3-β-D-глюканазы была установлена на основе нуклеотидной последовательности кДНК, кодирующей этот белок. Анализ последовательности кДНК показал, что она включает в себя одну протяженную открытую рамку считывания длиной 1329 п.н., которая кодирует полипептид, состоящий из 442 аминокислотных остатков. N-Концевая последовательность зрелого белка начинается предположительно с 121 а.о. (SVFRDDFNGA). Вероятно, первые 120 а.о. отщепляются в ходе посттрансляционной модификации предшественника 1→3-β-D-глюканазы. Зрелый белок состоит из 322 а.о. Расчетная молекулярная масса белка составляет 36,8 кДа, что согласуется со значением, полученным экспериментально методом масс-спектрометрии (37,0 кДа). Изоэлектрическая точка белка составляла 6,32. Сравнение аминокислотной последовательности 1→3-β-D-глюканазы из *T. literata* с 1→3-β-D-глюканазами других моллюсков выявило наибольшую степень гомологии с белком из *P. sachalinensis* (68% идентичности и 77% гомологии). Степень структурной гомологии с остальными 1→3-β-D-глюканазами моллюсков также высока и составляет 62–71% (идентичность – 51–58%) (табл. 4.9).

Таблица 4.9 – Степень идентичности/гомологии эндо-1→3-β-D-глюканаз
МОЛЛЮСКОВ

Вид, степень идентичности/гомология, %	<i>T. literata</i>	<i>Ch. albidus</i>	<i>P. viridis</i>	<i>M. yessoensis</i>	<i>P. sachalinensis</i>
<i>T. literata</i>	100	51/62	51/66	52/65	68/77
<i>C. albidus</i>		100	53/66	86/93	48/58
<i>P. viridis</i>			100	53/68	44/57
<i>M. yessoensis</i>				100	48/60
<i>P. sachalinensis</i>					100

Структурная гомология с 1→3-β-D-глюканазами других видов беспозвоночных несколько ниже – 44 - 58% [249]. Анализ последовательности 1→3-β-D-глюканазы из *T. literata* с помощью сервера SMART показал, что она содержит каталитический домен 16-го семейства гликозид гидролаз длиной 199 а.о. (Asn199–Trp397). Таким образом, согласно структурной классификации, 1→3-β-D-глюканаза из моллюска *T. literata* является новым представителем 16 семейства (GHF 16) О-гликозид гидролаз. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей 1→3-β-D-глюканаз беспозвоночных представлено на рисунке 4.20. Их сравнительный анализ показал, что наиболее консервативным является фрагмент с 145 по 151 а.о. (здесь и далее нумерация по 1→3-β-D-глюканазе *T. literata*) Gly-Glu-Ile/Met-Asp-Xxx-Xxx-Glu, представляющий собой активный центр гликозид гидролаз 16 семейства. Как было показано ранее для 1→3; 1→4-β-D-глюканаз, относящихся к 16 семейству О-гликозид гидролаз [148], два остатка глутаминовой кислоты (Glu146 и Glu151) принимают непосредственное участие в катализе. Консервативной является также последовательность Trp-Pro-Ala-Xxx-Trp-Met-Leu (Xxx – гидрофобный аминокислотный остаток), являющаяся участком связывания субстрата [250]. Инвариантными для 1→3-β-D-глюканаз являются остатки триптофана Trp126, Trp130 и Trp141. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей эндо-1→3-β-D-глюканаз выявило также наличие двух консервативных остатков гистидина – His176 и His202 (рис. 4.18), что позволяет предположить их важную роль для активности ферментов.

Таким образом, из кристаллических стебельков двустворчатого моллюска *T. literata* в гомогенном виде была выделена новая 1→3-β-D-глюканаза, которая катализирует гидролиз β-1→3-связей в глюканах с сохранением конфигурации расщепляемой связи и обладает способностью к реакции трансгликозилирования. Фермент классифицирован как глюкан эндо-1→3-β-D-гликозидаза (КФ 3.2.1.39). Анализ аминокислотной последовательности позволил отнести эндо-1→3-β-D-глюканазу к 16-му структурному семейству О-гликозид гидролаз.

APPSPPTASGTHAPTEICSGDLTPEDEPDE--LDMQNMHESY--JGCGGN--EYFN--TWS--RVNSYTFE--GTYIKPTLLAD--ENGEDFLSSGOLDINGGSPADE--CINPOWYGCARYG--
 --POBBPDS--FNLID--EHMG--ACGCGN--EYFN--TWN--RNSYVVRUGKLFKPTLTED--KLGESSLSSGTLDMGSSPANL--CIGNAWYGC--SRTG--
 --GALTP--DDPDS--FNLID--OHEN--LACGCGN--EYFN--NN--RNSYFTHSGULFPTLTSLD--QFGSQFLSSGHLAVGSGAPDR--CINPOWYGC--RTG--
 --GTVP--DDPDS--ADPAG--NYEVS--MIGGN--EYFN--VFD--ARNIFTRNGHLFKPTLTSLDHPNTNCGNLNSATMDLTALYV--YCINADRYGC--ETRE--
 -----VFD--DDEAG--AFNPG--NYEVS--MIGGN--EYFN--VFD--PKVIFTRNGHLFKPTLTIDDPFRS--NLNSDVMQMKWAMY--YCINSDRYGC--HRE--
 --GAVN--DDPDS--GGGLD--NYEVS--MIGGN--EYFN--TWD--KSNVYTNWGLFKPTKTVDPPRMDENFLSGVMDVQIWMG--YCFOSAQVGC--HRE--
 --AC--DDPDT--WDPSDQIUEVS--ANGGGB--EYFN--TFPE--PSNLVFN--GLYIKPTFTTRDSAHFNTDGSLYTGTMDVNSLMH--YCFOHDNNGCCKHQSYG--
 --AC--DDPDT--WMPNNTQIGVS--ANGGGB--EYFN--TFPE--PSNLVFN--GLYIKPTFTTRDSAHFNTDGSLYTGTMDVNSLMH--YCFOHDNNGCCKHQSYG--
 -----VFD--DDEAS--FNKGSYKIECS--ANGGGB--EYFN--VNE--PSNLVARGCHYFKPTLTIDDPDRYDNRNLVHGOMKYVDFCGGGR--CFOSANWGC--DTAVN--
 --GNTV--DSD--FNSHOLNPKH--EHEIL--C--GCGN--EYFN--TFPE--AANTYINK--GLYIKPTFTAD--KFGDDFFOGLVDLVQKQMG--SCFOAQNDC--RRQ--
 -----LWDEB--AG--GNLADR--NPELGC--CKG--GN--EYFN--TWD--KSNVYTNWGLFKPTKTVDPPRMDENFLSGVMDVQIWMG--YCFOHDNNGCCKHQSYG--
 -----GVLN--DDEAS--LDT--K--NFEETGNNNG--CNSELEQATYS--SNNRVEN--GNLIVS-----AYREWNWGDGVNPK--

[illegible]

ycc

AII

[illegible]

Рисунок 4.18 - Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей эндо-1→3-β-D-глюканаз беспозвоночных. В скобках указаны номера последовательностей в базе данных GenBank. Черным цветом выделены идентичные а.о., серым цветом – гомологичные. Отмечены активный центр (АЦ) и участок связывания субстрата (УСС), ? – каталитические аминокислотные остатки.

<i>T. molitor</i>	TD	---TAAAFKID	VKRMAL	-----	356
<i>S. purpuratus</i>		---EBAQVNV	VEVYXEPGQTT	KKLRDR	319
<i>H. armigera</i>		---VNDGGDS	LSQVLD	VRMALT	339
<i>P. sachalinensis</i>		---DVAMECD	VEVMTQY	-----	326
<i>T. literata</i>		---AVAMEVD	VDMMQC	-----	322
<i>L. sitkana</i>		---KVAMEID	IEKMYL	-----	322
<i>M. yessoensis</i>		---EVALVID	IEKMPH	-----	324
<i>C. albidus</i>		---EVANVVD	IEKMPH	-----	324
<i>P. viridis</i>		---RAANVVD	VEBQVA	-----	327
<i>H. discus</i>		---DVAKVKVKS	VKNQIQY	-----	329
<i>C. antarcticus</i>		---TFEVEV	VKNQVNN	-----	249
<i>B. xylophilus</i>		---OMLVDT	IKVDTQ	-----	236

4.1.3 1→3-β-D-глюканаза из кристаллического стебелька моллюска *Mizuhopecten yessoensis*

1→3-β-D-глюканаза из кристаллического стебелька *M. yessoensis* (LV) была получена в гомогенном состоянии. Последовательность стадий очистки фермента представлена в таблице 4.9.

Таблица 4.9 – Схема выделения 1→3-β-D-глюканазы LV

Стадия очистки	Белок, мг	Общая активность, ед.акт.	Удельная активность ед.акт/мг	Степень очистки	Выход (%)
Экстракт	2810	267	0.095	1	100
Ионообменная хроматография на CM–Sephadex C-50	210	224	1,07	11	84
Гидрофобная хроматография на Phenyl-Sephagrose с последующей гелевой фильтрацией на Sephadex G-75	15	66,7	4,2	44	25
Ионообменная хроматография на CM-Cellulose CM-52	6,3	37,8	6,0	65	14

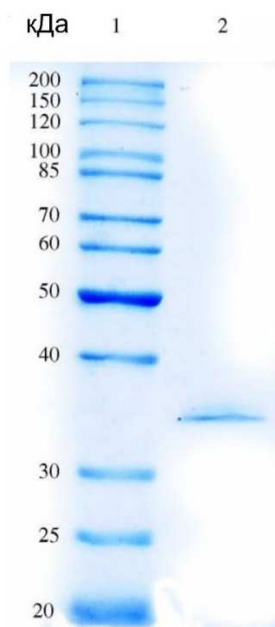


Рисунок 4.19 – SDS-электрофорез 1→3-β-D-глюканазы из кристаллического стебелька *M. yessoensis* (LV).

По данным SDS-электрофореза молекулярная масса LV составляла 36 кДа (рис. 4.19)

Максимальную активность фермент проявлял при pH в области 4,0-5,0 и температуре 30-45 °C. LV был достаточно стабильным ферментом и сохранял активность при 25 °C в течение 1 месяца, полностью фермент терял активность после выдерживания раствора при 37 °C в течение 2 ч. Активность LV увеличивалась в присутствии NaCl и была максимальной при концентрации NaCl 0,5 М. Константа Михаэлиса составила 0,6 мг/мл при использовании ламинарана из *S. cichorioides* в качестве субстрата. 1→3-β-D-Глюканаза из

кристаллического стебелька *M. yessoensis* не действует на нерастворимые и высокоразветвлённые 1→3;1→6-β-D-глюканы, а также 1→3-β-D-ксилан, пустулан, фукоидан и амилопектин.

Масс-спектрометрический анализ продуктов гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазой LV показал среди продуктов исчерпывающего гидролиза наличие глюкозы и широкого набора олигосахаридов различной степени полимеризации (m/z $[M+Na]^+$): Glc₂ (365,5), Glc₃ (527,2), Glc₄ (689,1), Glc₅ (851,3), Glc₆ (1013,4), Glc₇ (1175,5), Glc₈ (1337,6), Glc₉ (1500,1), Glc₁₀ (1662,5) (рис. 4.20).

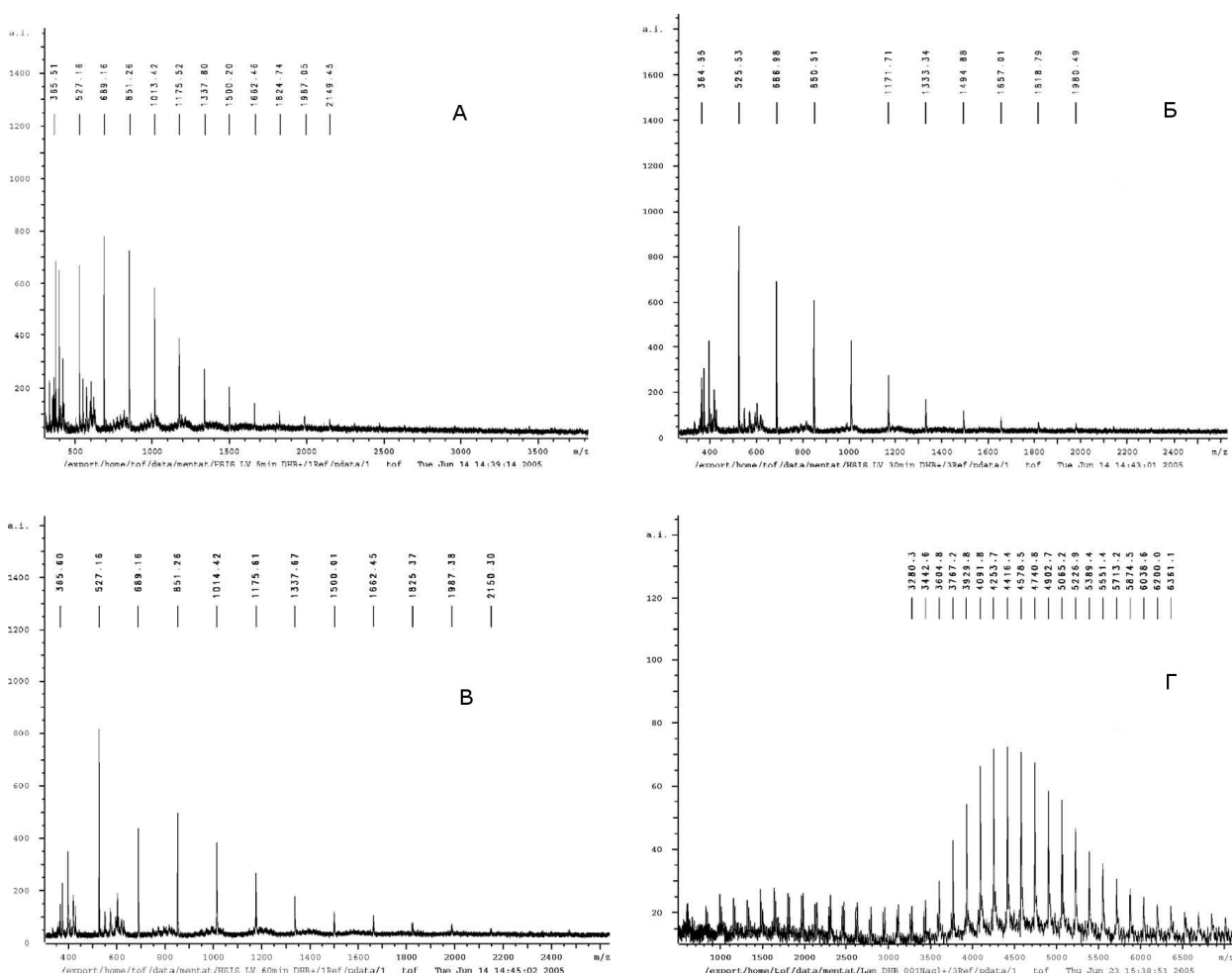


Рисунок 4.20 – MALDI масс-спектры продуктов гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазой LV через 5 мин (А), 10 мин (Б), 30 мин (В). Негидролизированный ламинаран (Г).

По данным поляриметрии при гидролизе ламинарана 1→3-β-D-глюканазой LV оптическое вращение раствора практически не изменяется. Следовательно,

обращения конфигурации расщепляемой связи не происходит и LV можно причислить к «сохраняющим» ферментам.

Глюканаза LV эффективно катализировала реакцию трансгликозилирования с использованием ламинарана в качестве донора и метил-бета-D-глюкопиранозида в качестве акцептора. Продукты этой реакции были идентифицированы с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии как метилглюкоолигозиды с m/z $[M+Na]^+$: Glc₂-OCH₃ (379,5), Glc₃-OCH₃ (541,17), Glc₄-OCH₃ (703,15), Glc₅-OCH₃ (865,3), Glc₆-OCH₃ (1027,5), Glc₇-OCH₃ (1189,7), Glc₈-OCH₃ (1351,7), Glc₉-OCH₃ (1514,2), Glc₁₀-OCH₃ (1676,4) (рис. 4.22).

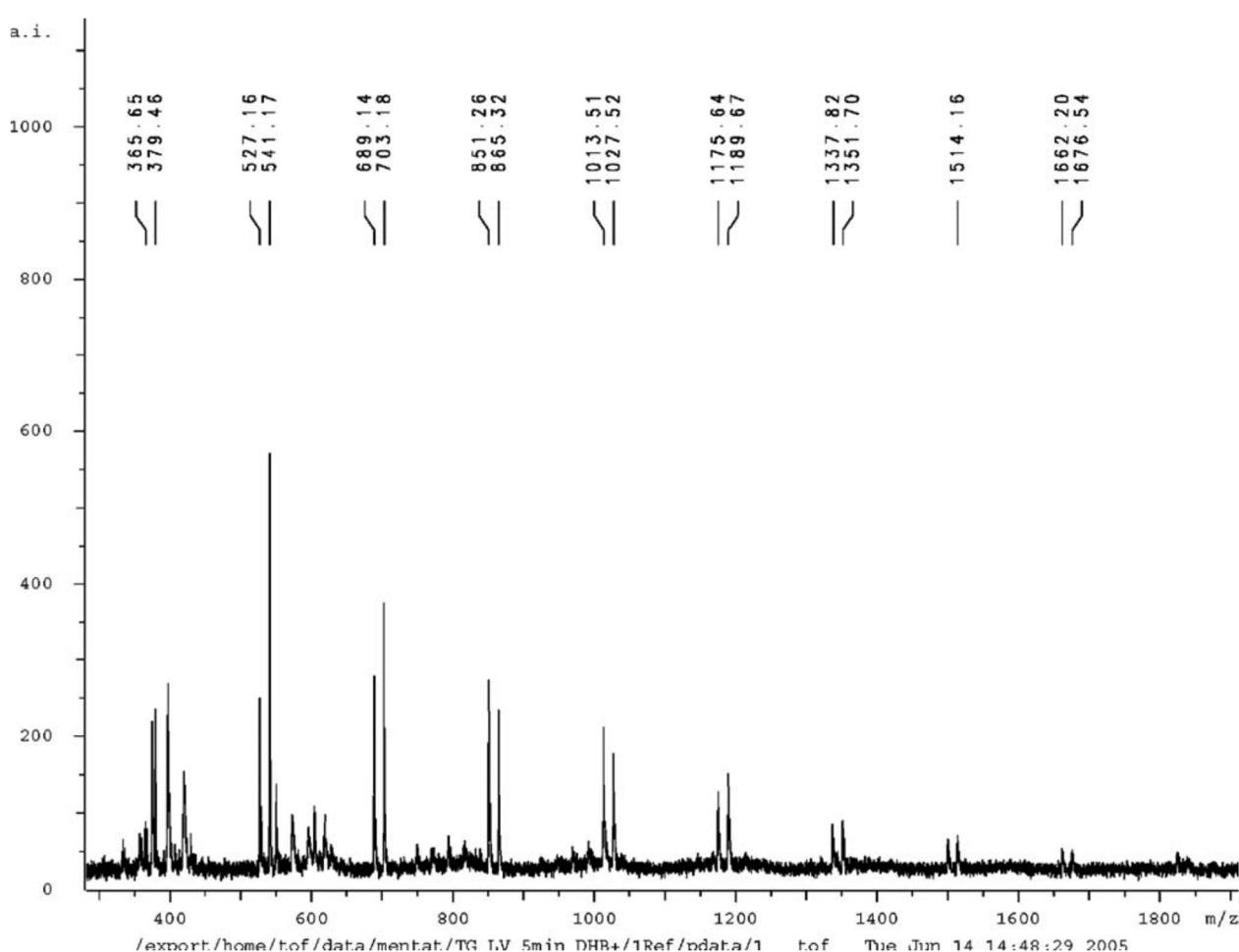


Рисунок 4.21 - MALDI-TOF масс-спектр продуктов трансгликозилирования, полученных в результате действия 1→3-β-D-глюканазы LV на ламинаран в присутствии акцептора-метил глюкопиранозида.

Аминокислотная последовательность 1→3-β-D-глюканазы из *M. yessoensis* была определена методами молекулярной биологии. кДНК содержала 1115 нуклеотидов. Открытая рамка считывания включала 1017 нуклеотидов, кодирующих 339

аминокислот. Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего 1→3-β-D-глюканазы из *M. yessoensis*, была депонирована в GenBank под номером AY848857. Зрелый белок содержал 324 аминокислотных остатка, теоретическая молекулярная масса составила 36.9 кДа, что близко к значению, полученному с помощью электрофореза. С помощью сервиса SMART [251] был проведен анализ аминокислотной последовательности глюканазы, который выявил наличие домена (с 80 по 304 а.о.), характерного для 16 семейства гликозид гидролаз.

Таким образом, выделенный фермент можно классифицировать как глюкан эндо 1→3-β-D-глюканазу, обладающий трансгликозилирующей активностью и относящийся к 16 структурному семейству гликозид гидролаз.

4.1.4 1→3-β-D-Глюканаза из неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*

Ранее было показано, что 1→3-β-D-глюканазы широко распространены в морских беспозвоночных. Исследование свойств, специфичности и механизма действия 1→3-β-D-глюканаз из кристаллических стебельков морских моллюсков позволило отнести их к эндо-ферментам. Обнаружена особенность действия эндо-1→3-β-D-глюканаз морских моллюсков: они гидролизуют ламинаран со значительно более высоким выходом моносахарида (глюкозы), чем эндо-ферменты из растений, грибов и других источников [173].

1→3-β-D-Глюканазы присутствуют в неоплодотворенных яйцеклетках морских ежей. Предполагается их участие в процессе оплодотворения, но субстрат в ежах для них не найден. 1→3-β-D-Глюканазы из неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* [252] и эмбрионов на стадии бластулы *Strongylocentrotus intermedius* [150] исследователи отнесли к экзо-1→3-β-D-глюканазам основываясь, главным образом, на результатах анализа продуктов ферментативной реакции, содержащих большие количества глюкозы.

В этой части нашей работы мы решили уточнить тип действия 1→3-β-D-глюканазы из неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа *S. intermedius* (Je) и

провели сравнение некоторых её свойств с ранее изученными в нашей лаборатории ферментами двух типов действия – эндо-1→3- β -D-глюканазой из кристаллического стебелька морского моллюска *Pseudocardium sachalinensis* (ЛIV) [173] и экзо-1→3- β -D-глюканазой из наземного моллюска *Eulota maakii* (Л II) [253].

Схема очистки 1→3- β -D-глюканазы из неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа *S. intermedius*, использованная нами, несколько отличалась от опубликованных для подобных объектов и включала ионообменную хроматографию на DEAE-Toyopearl, гель-фильтрацию на сефадексе G-200, хроматографию на моно-Q [254].

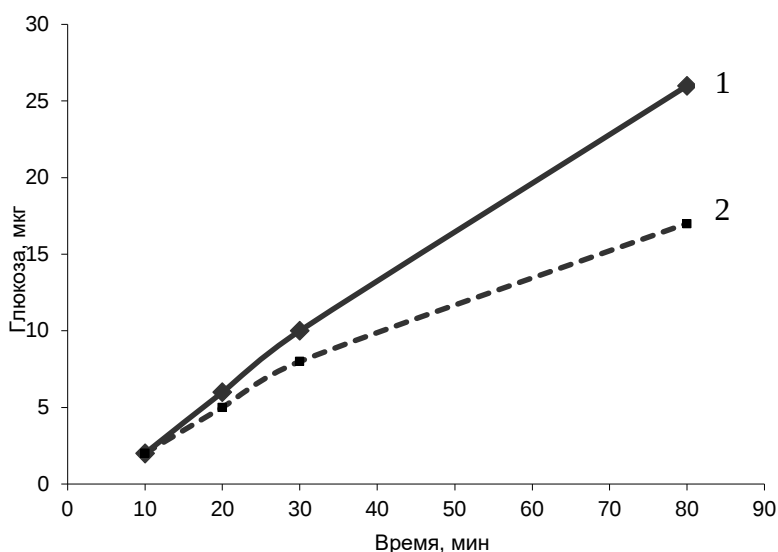


Рисунок 4.22 – Действие β -1→3-глюканазы Ле на ламинаран; накопление восстанавливающих сахаров (1), и глюкозы (2).

Для установления типа действия 1→3- β -D-глюканазы из неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа *S. intermedius* использовали несколько подходов.

Был проведен анализ продуктов реакции двумя методами: все восстанавливающие сахара были определены методом Нельсона [222], содержание глюкозы устанавливали глюкозо-оксидазным методом [255]. Как показано ранее, для экзо-1→3- β -D-глюканазы из *E. maakii* [253] на начальных стадиях гидролиза содержание восстанавливающих сахаров полностью совпадало с количеством глюкозы, а для эндо-1→3- β -D-глюканазы из *P. sachalinensis* содержание восстанавливающих сахаров превышало уровень глюкозы, что говорит о

присутствии в продуктах реакции ламинариолигосахаридов. Из данных, полученных для 1→3-β-D-глюканазы *S. intermedius* (рис. 4.22), можно сделать вывод, что на начальных этапах гидролиза ламинарана в составе продуктов преобладает глюкоза, на более поздних стадиях гидролиза накапливаются олигосахариды.

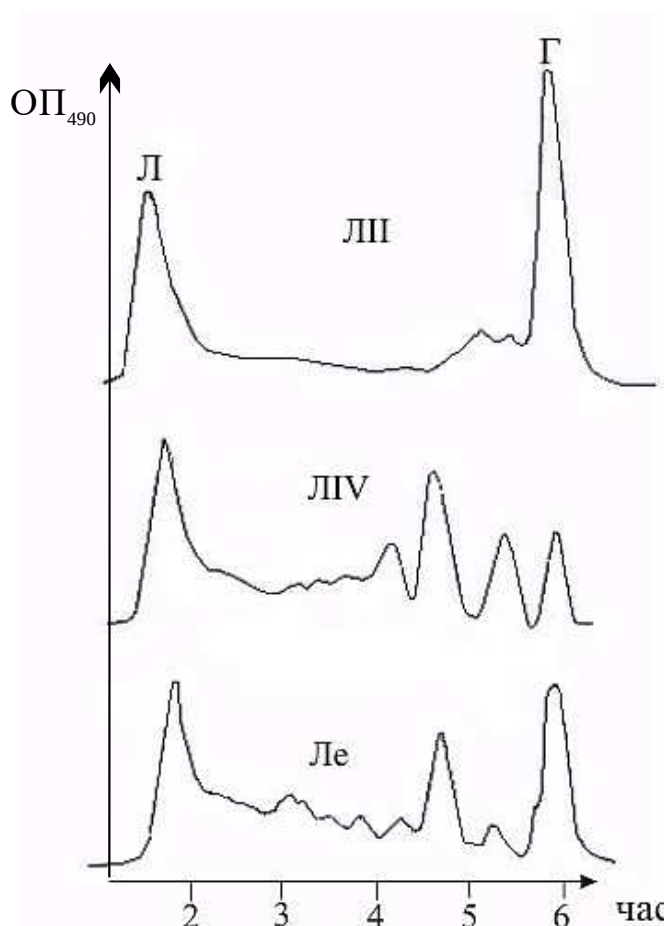


Рисунок 4.23 – Гель-фильтрация продуктов гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазами Ле, ЛІІІ и ЛІІІ на биогеле Р-2. Л -ламинаран, Г-глюкоза.

Сравнение продуктов, образовавшихся при действии ферментов на ламинаран, было проведено также с помощью автоматического жидкостного анализатора. На рисунке 4.23 приведены результаты жидкостной хроматографии продуктов гидролиза ламинарана тремя исследуемыми ферментами при одинаковой степени гидролиза субстрата. Видно, что состав продуктов, образовавшихся под действием Ле, совпадает с составом, полученным при действии на ламинаран ЛІІІ – фермента эндо-типа действия. Содержание глюкозы в продуктах исчерпывающего гидролиза ламинарана этими ферментами приведено в таблице 4.10.

Таблица 4.10 - Характеристика продуктов исчерпывающего гидролиза ламинарана из *S. cichorioides* под действием 1→3-β-D-глюканаз

1→3-β-D-глюканаза (10 ⁻² ед.)	Тип действия	Степень гидролиза субстрата, %	Количество глюкозы в продуктах, %
ЛІІІ	Экзо	95	90
Ле	?	63	33
ЛІV	Эндо	60	40

Одним из критериев при определении типа действия гликаназ является стереохимия продуктов ферментативного гидролиза. Как уже отмечалось, экзо-глюканазы катализируют гидролиз субстрата с обращением, а эндо- с сохранением конфигурации расщепляемой связи. Конфигурация продуктов гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазами была определена по изменению величины оптического вращения инкубационной смеси (табл. 4.11).

Таблица 4.11 - Изменение величины оптического вращения реакционной смеси в процессе гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазами

Время, с	[α] _D , град.		
	ЛІІІ	Ле	ЛІV
5	-19	-23	-18
10	-13	-22	-11
15	-8	-20	-5
20	+2	-18	-3
30	+11	-16	+3
добавлено 100 мкл NH ₄ OH	+1	-15	+3

[α]_D ламинарана из *S. cichorioides* (10 мг/мл) = -23°

[α]_D α- глюкозы = +105°

[α]_D β- глюкозы = +20°

[α]_D равновесной смеси α и β аномеров глюкозы = +55°

В процессе гидролиза ламинарана под действием ЛІІІ наблюдалось равномерное увеличение величины оптического вращения раствора до положительного значения, которое резко уменьшалось при добавлении капли аммиака - катализатора реакции аномеризации. Следовательно, гидролиз ламинарана под действием ЛІІІ приводит к образованию α-D-глюкозы, т.е. фермент действует с обращением конфигурации расщепляемой связи.

При гидролизе ламинарана ЛІV оптическое вращение раствора не достигает высокого положительного значения и не изменяется при добавлении аммиака (табл. 4.11). Ранее методом ЯМР-спектроскопии также было показано, что ЛІV гидролизует ламинаран с сохранением конфигурации расщепляемой связи. Увеличение оптического вращения в случае действия на ламинаран 1→3-β-D-глюканазы Ле из яйцеклеток морского ежа происходит медленнее и практически не меняется с добавлением капли аммиака. Вероятнее всего, что так же, как и в случае ЛІV, здесь образуются продукты, имеющие β-конфигурацию при C1.

Известно, что субстраты с измененным невозстанавливающим концом молекулы не подвергаются действию экзоферментов, тогда как такая модификация практически не сказывается на скорости гидролиза этих субстратов эндоферментами. Среди исследуемых глюканаз только ЛІІ не катализировала расщепление модифицированного ламинарана, ЛІV и Ле гидролизировали его с высокой скоростью (табл. 4.12). Близкими оказались скорости гидролиза глюканазами ЛІV и Ле высокомолекулярного 1→3-β-D-глюкана – пахимана и смешанного 1→3;1→4-β-D-глюкана – лихенана.

Таблица 4.12 - Действие 1→3-β-D-глюканаз на различные субстраты

Субстрат	Относительная скорость гидролиза, %		
	ЛІІ	Ле	ЛІV
Ламинаран из <i>S. cichorioides</i>	100	100	100
Периодатно-окисленный ламинаран	0,5	85	90
Пахиман	0	13	10
КМ-пахиман	7	24	14
Лихенан	16	22	20
<i>n</i> -Нитрофенил-β-D-глюкопиранозид	0	7	2,1

Известно, что эндоглюканазы катализируют как реакцию гидролиза, так и реакцию трансглюкозилирования, а экзоферменты, за редким исключением, осуществляют только гидролиз гликозидных связей субстрата. Сведения о трансглюкозилирующих свойствах 1→3-β-D-глюканаз крайне ограничены. В большинстве публикаций лишь отмечается присутствие или отсутствие трансглюкозилирующих свойств у этой группы ферментов. Ранее нами было

показано, что для эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз из морских моллюсков характерна повышенная способность к реакциям трансгликозилирования по сравнению с гликозид гидролазами из других источников. Трансгликозилирующую способность исследуемых 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз сравнивали по скорости образования меченых *n*-нитрофенолом продуктов, образующихся при использовании ламинарана в качестве донора, а *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид - в качестве акцептора. Было показано, что 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза ЛІІІ не катализирует реакцию трансгликозилирования. При равной гидролитической активности за 1 час ЛІІІІ катализировала включение 11,5% акцептора в продукты реакции, а Ле - 0,4%. Трансгликозилирующая активность Ле значительно меньше ЛІІІІ, но сопоставима с активностью эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз растений.

Таким образом, более тщательное исследование, проведённое нами, показало, что 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза из яйцеклеток морского ежа *S. intermedius*, несмотря на наличие большого количества глюкозы в продуктах реакции, осуществляет гидролиз ламинарана с сохранением конфигурации расщепляемой связи, действует на модифицированные субстраты и обладает трансгликозилирующей активностью. Все эти свойства делают его более похожим на фермент эндо-типа действия, а не на экзоферменты, как это утверждалось в работе [150].

Некоторые отличия в составе продуктов гидролиза ламинарана 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазами ЛІІІІ и Ле, их трансгликозилирующей способности, вероятно, связаны с различным строением их активных центров и участков связывания субстратов и акцепторов.

4.1.5 1 $\rightarrow$ 3- β -D-Глюканаза из печени *Littorina sitkana*

Из печени морского моллюска *L. sitkana* была выделена 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза G-I [235]. Схема очистки была довольно сложной и включала несколько последовательных стадий разделения с помощью ионообменной хроматографии низкого и высокого давления, гель-фильтрации и ультрафильтрации (табл. 4.13). В результате процедуры очистки был получен препарат G-I с удельной активностью

(ламинаран в качестве субстрата) 0,285 ед./мг белка (выход фермента составил 3,7%).

Таблица 4.13 Схема выделения 1→3-β-D-глюканазы G-I

Стадия очистки	Белок, мг	Общая активность, ед.акт.	Удельная активность ед.акт/мг	Степень очистки	Выход (%)
Экстракция	1174	4660	3,9	1	100
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	190	3140	16,5	4,2	67
Рехроматография	99,6	2233	22,4	5,7	48
Ультрафильтрация	38,5	1559	40,5	10,4	33,5
Гель-фильтрация на Sephacryl S-100	6,4	469	73,3	18,8	10
ВЭЖХ на TSK: DEAE-5PW	0,6	171	285	73,1	3,7

Аминокислотная последовательность G-1 была установлена с помощью методов молекулярной биологии. Кодировочная последовательность состояла из 1636 п.н. Анализ последовательности кДНК показал, что она включает в себя одну протяжённую рамку считывания длиной 1017 п.н., которая кодирует полипептид, состоящий из 442 а.о., зрелый белок состоит из 322 а.о. Информация о первичной структуре белка депонирована в GenBank под номером FJ641204. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности G-1 показало высокую степень гомологии – 52-67% с другими глюканазами. Анализ аминокислотной последовательности с помощью сервера SMART показал, что G-1 содержит характерные для гликозид гидролаз 16 семейства каталитический домен и два консервативных домена. Таким образом, из печени *L. sitkana* была выделена новая эндо-1→3-β-D-глюканаза, относящаяся к 16 семейству гликозид гидролаз.

Молекулярная масса G-I, согласно данным SDS-электрофореза, составила 40±1 кДа (рис. 4.24), по данным гель-фильтрации - 32 ±5 кДа. Точное значение молекулярной массы, которое составило 39,3 кДа, было получено с помощью MALDI TOF масс-спектрометрии. Расчетная молекулярная масса, полученная на основании аминокислотной последовательности, отличалась от практически полученной и составила 36,7 кДа, что, вероятно связано с посттрансляционными модификациями молекулы.

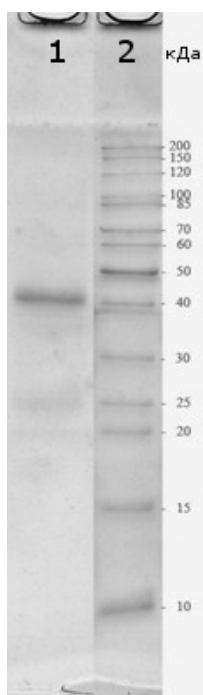


Рисунок 4.24 –
Электрофореграмма
1→3-β-D-глюканазы G-I (1),
маркеры (2).

G-1 проявляла свою активность в широком диапазоне значений pH, с максимумом в области 5,4 в 0,2 М цитрат-фосфатном буфере. Температурный оптимум этого фермента лежал в области 40 °С, а инактивация фермента наблюдалась при 45 °С.

Константа Михаэлиса в реакции с ламинараном из *S. cichorioides* составила 0,13 мг/мл, что является близким к значениям K_m уже известных 1→3-β-D-глюканаз, выделенных ранее из других источников [230, 256], а также изученных в нашей работе.

Специфичность G-1 была изучена с помощью коллекции глюканов различной структуры (табл. 4.14). 1→3-β-D-Глюканаза G-1 с высокой скоростью катализировала расщепление растворимых субстратов – ламинарана и транслама. Скорость гидролиза высокомолекулярных или плохо растворимых субстратов была крайне низкой. В большинстве случаев такие субстраты не подвергались действию фермента вообще. Фермент был специфичен к β-1→3-связям в молекулах 1→3;1→4 и 1→3;1→6-β-D-глюканов, и не катализировал превращение глюканов с другими типами связи.

Таблица 4.14 - Специфичность 1→3-β-D-глюканазы из *L. sitkana*

Субстрат	Тип связи, соотношение	Молекулярная масса, кДа Растворимость	Относительная активность, %
Ламинаран	β-1→3;β-1→6 90:10	5-6 Раств.	100
Транслам	β-1→3;β-1→6 75:25	8-10 Раств.	86
Периодатно-окисленный ламинаран	β-1→3 100	5-6 Раств.	95
Дрожжевой глюкан	β-1→3;β-1→6 90:10	>200 Слабо раств.	0,24
Пахиман	β-1→3;β-1→6 98:2	50-120 Слабо раств.	0,18

Продолжение табл. 4.14			
Аубазидан	β -1 $\rightarrow$ 3; β -1 $\rightarrow$ 6 50:50	500-550 Слабо раств.	0
Пустулан	β -1 $\rightarrow$ 6	30 Раств.	0
Амилопектин	α -1 $\rightarrow$ 4	2000 Раств.	0
КМ-целлюлоза	β -1 $\rightarrow$ 4	>2000 Раств.	0
Лихенан	β -1 $\rightarrow$ 3; β -1 $\rightarrow$ 4 70:30	10-20 Слабо раств.	0,17

1 $\rightarrow$ 3- β -D-Глюканаза из *L. sitkana* катализировала расщепление периодатно-окисленного ламинарана почти с той же скоростью, что и немодифицированный ламинаран, что характерно для ферментов эндо-типа действия.

Масс-спектрометрический анализ продуктов исчерпывающего гидролиза ламинарана показал наличие глюкозы и олигосахаридов различной степени полимеризации (рис. 4.25): Glc ($[M+Na]^+$ с $m/z = 203,3$), Glc₂ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 365,2$), Glc₃ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 527,2$), Glc₄ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 689,2$), Glc₅ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 851,3$), Glc₆ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 1013,5$), Glc₇ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 1175,7$), Glc₈ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 1338,0$), Glc₉ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 1501,0$), Glc₁₀ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 1663,1$), Glc₁₁ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 1825,5$), Glc₁₂ ($[M+Na]^+$ с $m/z = 1987$). На начальных стадиях реакции в масс-спектрах, кроме этих сигналов были обнаружены сигналы ионов $[Glc_nHex+Na]^+$, которые характерны для ламинариолигосахаридов с маннитом на восстанавливающем конце молекулы ламинарана. Это свидетельствует о том, что атака фермента приходится на молекулу субстрата ближе к восстанавливающему концу.

В соответствии с данными ВЭЖХ, основными продуктами гидролиза являлись глюкоза и ламинаритриоза (рис. 4.25).

Конфигурацию продуктов расщепления устанавливали с помощью методов поляриметрии и ЯМР-спектроскопии. Измерение оптического вращения продуктов ферментативной реакции показало, что этот показатель практически не изменяется в течение реакции. Значения находились в диапазоне от -12,7 до -10,6.

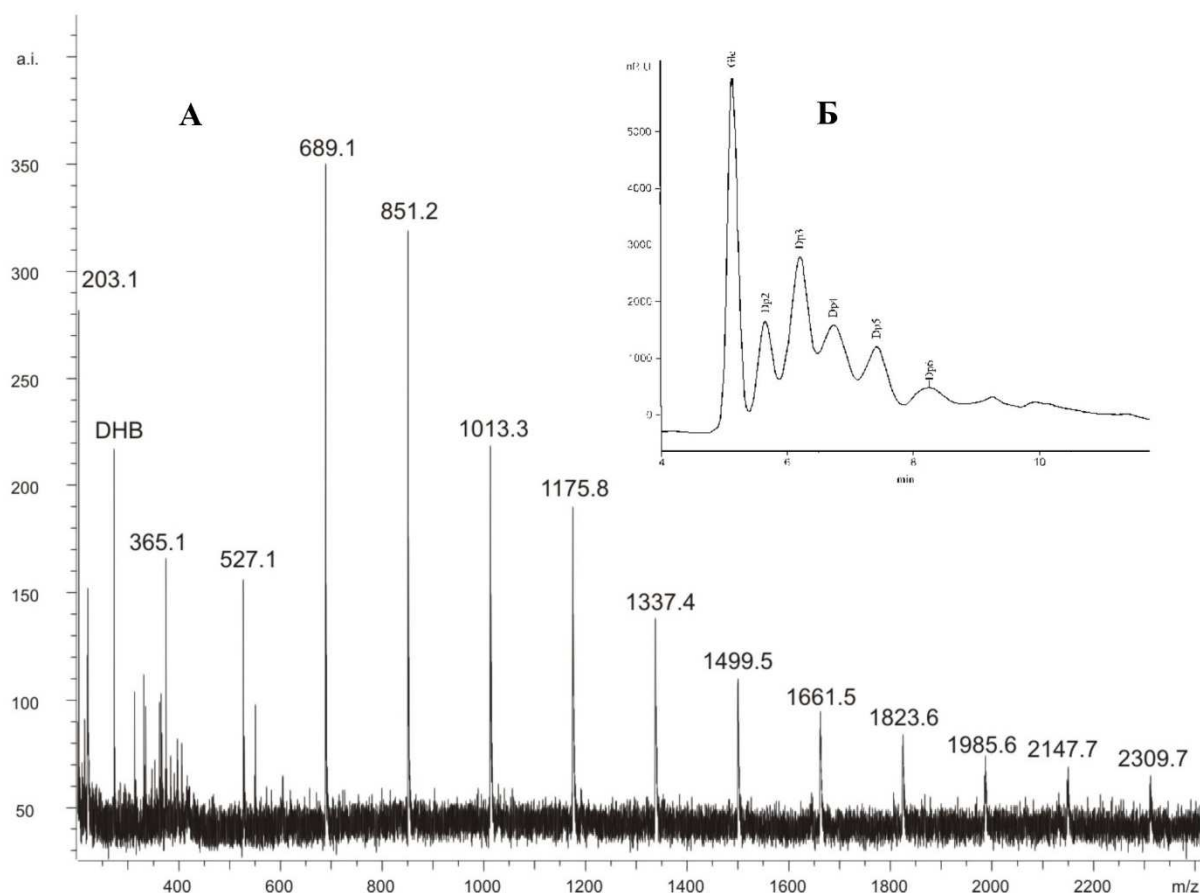


Рисунок 4.25 – MALDI-TOF масс-спектр (А) и ВЭЖХ (Б) продуктов исчерпывающего гидролиза ламинарана 1→3-β-D-глюканазой из печени *L. sitkana*.

Отрицательные значения сохранялись и после добавления NH_4OH , что свидетельствует о сохранении конфигурации расщепляемой связи. Полученные данные были подтверждены методом ЯМР-спектроскопии. Как показано на рисунке 4.26, через 15 минут реакции появляется сигнал в области 97,2 м.д., что соответствует β-конфигурации C1. Далее, в течение реакции интенсивность этого сигнала увеличивается и появляется сигнал в области 93,7 м.д., соответствующий α-конфигурации C1, который возникает вследствие реакции аномеризации. Это свидетельствует о том, что ферментативная реакция протекает с сохранением конфигурации связи, и фермент обладает «сохраняющим» механизмом действия.

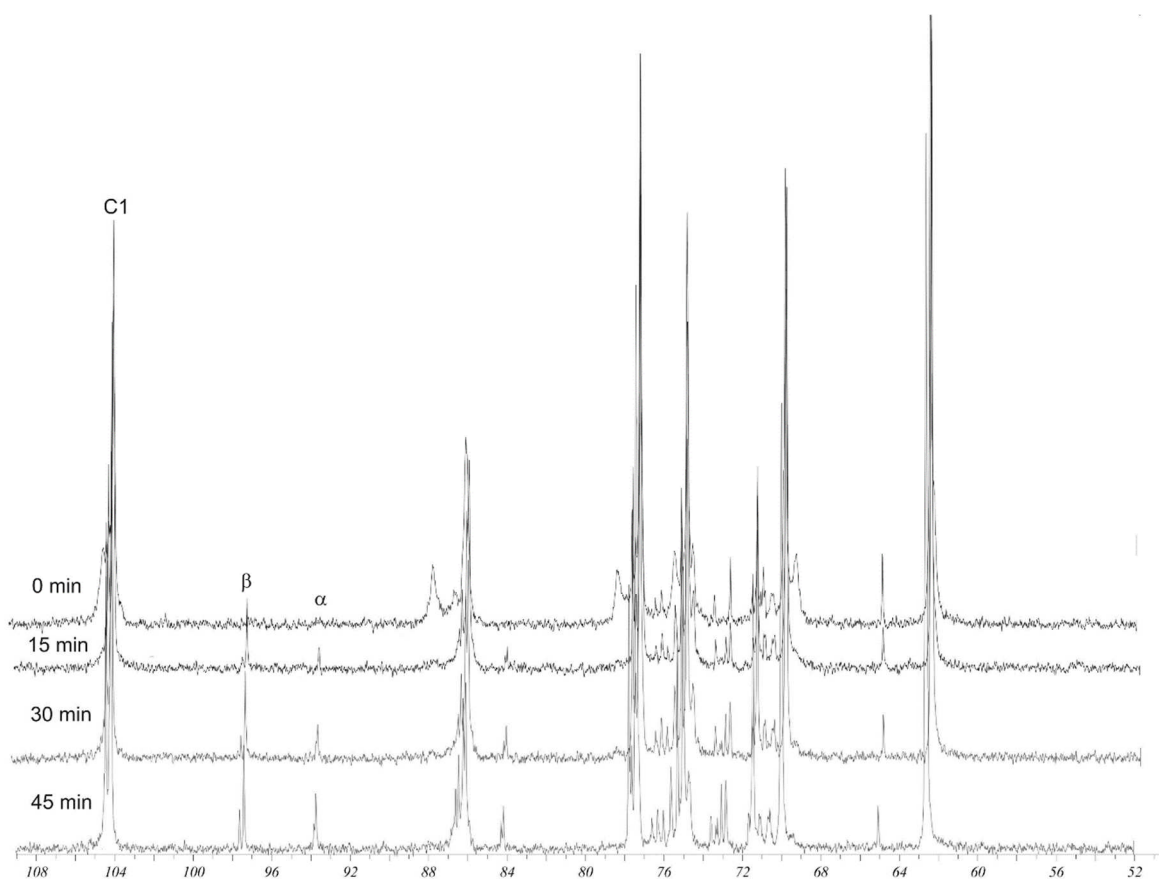


Рисунок 4.26 – ^{13}C ЯМР-спектры ламинарана из *S. cichorioides* (0 мин) и продуктов его гидролиза под действием 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы из печени *L. sitkana* (15, 30, 45 мин).

Для исследования реакции трансгликозилирования метанол, метил- β -D-глюкопиранозид и метил- β -D-ксилопиранозид были использованы в качестве акцепторов, а ламинаран – в качестве донора. Полученные данные показали, что G-1 с высокой эффективностью катализирует реакцию трансгликозилирования. Как показано на рисунке 4.27 интенсивность сигналов, соответствующих продуктам трансгликозилирования в реакции с метил- β -D-глюкопиранозидом и метил- β -D-ксилопиранозидом превышала интенсивность сигналов, соответствующих продуктам гидролиза. Использование метанола в качестве акцептора сдвигало равновесие реакции в сторону образования продуктов гидролиза [248]. Все продукты реакции, которые были идентифицированы на масс-спектрах приведены в таблице 4.15.

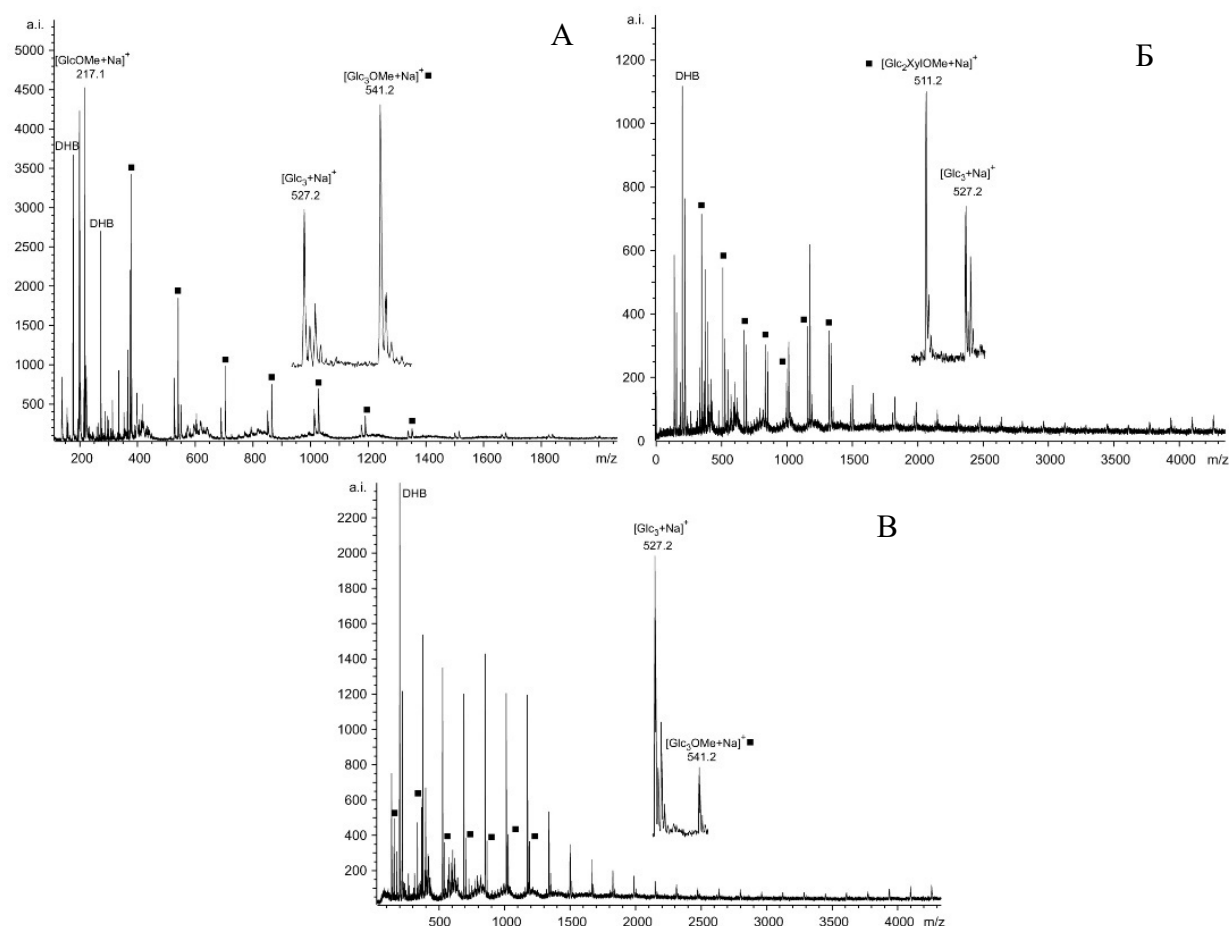


Рисунок 4.27 – MALDI масс-спектры продуктов трансформации ламинарана, катализируемой ферментом G-I в присутствии различных акцепторов: метил- β -D-глюкопиранозид (А) и метил- β -D-ксилопиранозид (Б), метанол (В). ■ - продукты трансгликозилирования.

Таблица 4.15 – Продукты реакции трансгликозилирования, катализируемой G-1

Акцептор	Продукты, m/z						
MeOH	GlcOMe 217,1	Glc ₂ OMe 379,1	Glc ₃ OMe 541,2	Glc ₄ OMe 703,2	Glc ₅ OMe 865,3	Glc ₆ OMe 1027,3	Glc ₇ OMe 1189,4
Glc-O-Me	Glc ₂ OMe 379,1	Glc ₃ OMe 541,2	Glc ₄ OMe 703,2	Glc ₅ OMe 865,3	Glc ₆ OMe 1027,3	Glc ₇ OMe 1189,4	Glc ₈ OMe 1351,4
Xyl-O-Me	GlcXylOMe 349,1	Glc ₂ XylOMe 511,1	Glc ₃ XylOMe 673,2	Glc ₄ XylOMe 835,3	Glc ₅ XylOMe 997,3	Glc ₆ XylOMe 1159,4	Glc ₇ XylOMe 1321,4

Глюканаза G-I, подобно глюканазам, выделенным из *Haliotis tuberculata* [257], *P. sachalinensis* [170] и *Ch. albidus* [258], является ферментом эндо-типа, принадлежащим к 16 семейству гликозид гидролаз.

Таким образом, было проведено детальное изучение пяти ламинариаз из различных видов морских беспозвоночных, обитающих в Южно-Китайском и

Японском морях. Все изученные глюканазы являются ферментами эндо-типа действия, которые катализировали не только реакцию гидролиза, но и трансгликозилирования. Анализ аминокислотных последовательностей 1→3-β-D-глюканаз показал, что два остатка цистеина являются консервативными для всех 1→3-β-D-глюканаз моллюсков. Вероятно, эти остатки образуют дисульфидную связь, играющую важную роль в стабилизации молекул. Известно, что термостабильность ферментов во многих случаях определяется степенью их конформационной подвижности: чем выше конформационная подвижность белковой молекулы, тем, как правило, меньше ее термостабильность [247]. Одним из факторов, понижающих конформационную подвижность, является наличие дисульфидных связей. Таким образом, 1→3-β-D-глюканазы морских моллюсков можно расположить в порядке возрастания их термостабильности следующим образом: *M. yessoensis* (два остатка цистеина), *T. literata* (три), *P. viridis* (семь). Просматривается следующая закономерность – чем больше остатков цистеина (и, вероятно, дисульфидных связей) в молекуле 1→3-β-D-глюканазы, тем более термостабилен фермент. Изучение аминокислотной последовательности позволило выявить консервативную последовательность - GEIDIXE, характерную для всех членов 16 семейства гликозид гидролаз. Она содержит два каталитически активных остатка глутаминовой кислоты, первый из которых является нуклеофилом, а второй – кислотнo-основным катализатором. Гомология между аминокислотными последовательностями 1→3-β-D-глюканаз морских моллюсков составляет 67,3–97,2%.

4.2 Фукоиданазы

4.2.1 Метод поиска ферментов, деградирующих фукоидан

Большинство методов поиска гликозид гидролаз основано на определении их активности по увеличению восстанавливающих сахаров, которые образуются в результате ферментативного расщепления гликозидных связей между двумя моносахаридными остатками или между моносахаридным остатком и неуглеводным фрагментом. Наиболее популярными методами являются метод

Нельсона-Сомоджи [222], динитросалициловый метод [259], методы с использованием Na-2,2'-бицинхонината [260] и ферроцианида калия [261]. Иногда используются методы вискозиметрии для контроля изменения вязкости субстрата [193]. Однако эти методы оказались практически непригодными для фукоиданаз. Даже если по данным электрофореза фукоиданаз эффективно расщепляла фукоидан, восстанавливающая способность раствора, измеренная методом Нельсона, была близка к нулю.

В настоящее время наиболее распространенным методом для обнаружения активности фукоиданаз является электрофорез продуктов ферментативного расщепления фукоидана в полиакриламидном геле. Однако, этот метод неколичественный, дорог, отнимает много времени и не очень подходит для скрининга большого количества образцов. Разработанный нами метод основан на способности катионного детергента – цетавлона – образовывать нерастворимый комплекс с фукоиданом. Фукоидан, который подвергся ферментативному расщеплению, имеет низкую плотность заряда и не осаждается цетавлоном.

Чтобы продемонстрировать применимость нашего метода, мы выбрали штаммы, продуцирующие фукоиданазы (*F. algae* KMM 3553T и *Formosa* sp. MF 2-3) и штаммы не продуцирующие фукоиданазы (*Coheasibacter* sp. SF 2-8 и *Cytophagas* p. ZBS 33F). Бактерии выращивали на стандартной агаризованной питательной среде с добавлением фукоидана, затем удаляли клетки бактерий с поверхности агара и проводили обработку раствором цетавлона. При взаимодействии цетавлона с фукоиданом образуется нерастворимый в воде осадок, который придает агару молочно-белый оттенок. Штаммы – продуценты фукоиданаз были обнаружены по формированию прозрачных зон (обедненных фукоиданом) в месте их посева (рис. 4.28 А).

Следует отметить, что оптимальная концентрация фукоидана в среде составляла 0,5%. Фукоидан при более низких концентрациях (0,1% - 0,4%) формировал с цетавлоном незначительный осадок, недостаточный для надёжной идентификации активности. Применение красителей, которые обычно используются для окрашивания анионных полисахаридов, не выявило разницы между штаммами, продуцирующими и не продуцирующими фукоиданазы,

поскольку красители с одинаковой интенсивностью окрашивали нативный и расщеплённый фукоидан. Преимуществом разработанного нами экспресс-метода перед другими, используемыми для поиска продуцентов фукоиданаз, является отсутствие необходимости приготовления клеточного экстракта.

Результаты определения фукоиданазной активности, полученные в агаре, были подтверждены с помощью электрофореза. Этим же методом было показано, что штаммы 2 и 4, выращенные на жидкой питательной среде с добавлением фукоидана, утилизируют его в процессе роста клеток (рис. 4.28 Б). Фукоиданазная активность также была обнаружена в клеточных экстрактах штаммов 2 и 4, что подтверждается образованием хорошо видимых на электрофореграмме полос низкомолекулярных фукоолигосахаридов (рис. 4.28 В).

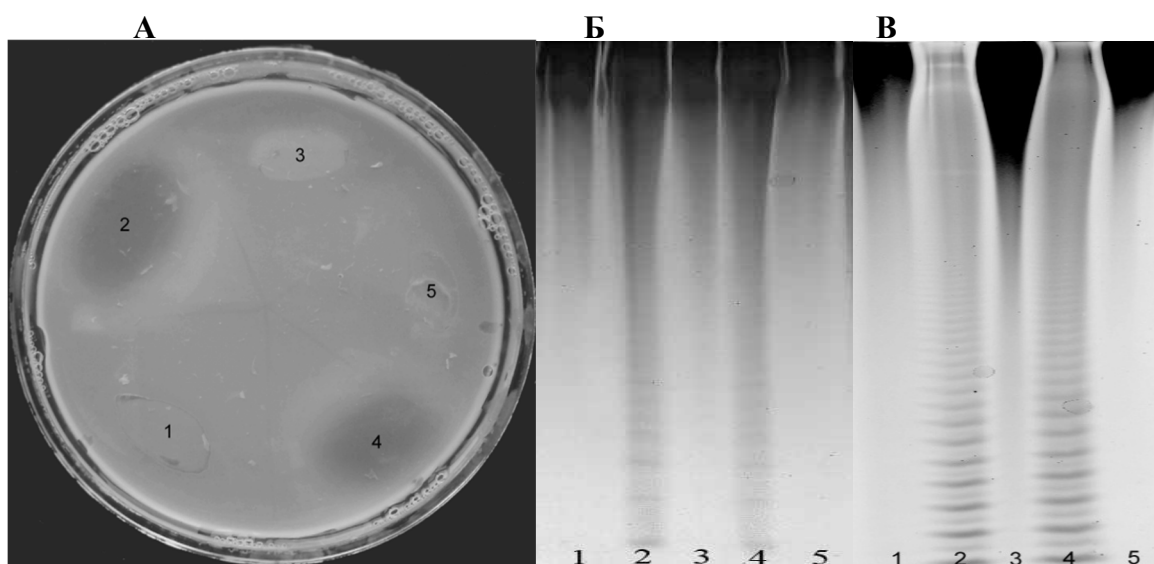


Рисунок 4.28 – Агаризованная питательная среда с добавлением фукоидана из *F. evanescens* после обработки 1 % водным раствором цетавлона (А). Зоны посева штаммов: 1- *Coheasibacter* sp. SF 2-8; 2- штамм МФ 2-3; 3- *Cytophaga* sp. ZBS 33F; 4- *F. algae* KMM 3553T; 5-МФ 4-5; электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана внеклеточными (Б) и внутриклеточными (В) фукоиданазами.

Методом Нельсона, который регистрирует восстанавливающие сахара и используется для определения активности О-гликозид гидролаз, не обнаружена фукоиданазная активность в штаммах 2 и 4. По-видимому, эти фукоиданазы расщепляют фукоидан на большие фрагменты, незначительно повышая содержание восстанавливающих сахаров в реакционной смеси. Может быть и

другая причина, связанная с особенностями структуры продуктов ферментативной реакции. Вероятно, наличие и расположение сульфатных групп в образовавшихся фрагментах затрудняют образование окрашенного комплекса в методе Нельсона.

Разработанный нами экспресс-метод поиска продуцентов фукоиданаз более информативный, чем метод Нельсона и менее трудоемкий, чем электрофоретический метод. Кроме того, возможности метода могут быть расширены. Например, использование фукоиданов различной структуры может дать предварительную информацию о субстратной специфичности фукоиданаз, продуцируемых исследуемыми микроорганизмами.

4.2.2 Фукоиданазы из печени моллюска *Littorina sitkana*

Исследование состава и уровня активности различных гликозид гидролаз печени *L. sitkana* показало (табл. 4.16), что в экстракте присутствуют высокоактивные гликозидазы (β -D-галактозидаза, α -D-маннозидаза, β -D-глюкозидаза, α -L-фукозидаза), сульфатаза и глюканазы (1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза, амилаза, целлюлаза).

Таблица 4.16 - Гликозид гидролазы печени *L. sitkana*

Фермент	Субстрат	Удельная активность, ед./мг белка*
Фукоиданаза	фукоидан из <i>F. evanescens</i>	0,071
1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаза	ламинаран из <i>S. cichorioides</i>	3,5
Амилаза	амилопектин	1,1
Целлюлаза	КМ-целлюлоза	1,6
Агараза	агар (галактогликан)	0,1
Пустуланаза	1 $\rightarrow$ 6- β -D-глюкан	0,2
β -D-Галактозидаза	<i>n</i> -нитрофенил- β -D-галактопиранозид	1,1
β -D-Глюкозидаза	<i>n</i> -нитрофенил- β -D-глюкопиранозид	1,1
α -D-Маннозидаза	<i>n</i> -нитрофенил- α -D-маннопиранозид	3,4
α -L-Фукозидаза	<i>n</i> -нитрофенил - α -L-фукопиранозид	4,4
Сульфатаза	<i>n</i> -нитрофенил -сульфат	1,2

*За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль глюкозы, фукозы или *n*-нитрофенола за 1 мин в расчёте на 1 мг белка

Однако активность фукоиданазы была более чем на порядок ниже активности других ферментов, гидролизующих полисахариды [188].

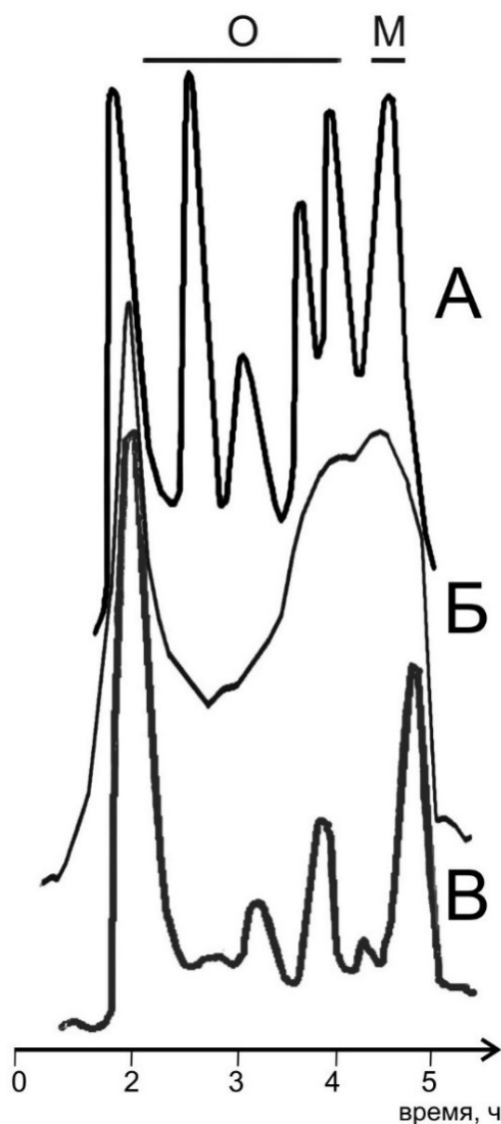


Рисунок 4.29 – Гель-фильтрация на биогеле Р-2 (автоматический жидкостной анализатор Jeol-JLC-6АН) низкомолекулярной фракции продуктов гидролиза фукоидана из *F. evanescens* (А) и *S. cichorioides* (Б) фукоиданазой при рН 5,4, продуктов гидролиза фукоидана из *F. evanescens* фукоиданазой при рН 8,4 (В). М - мономер, О - олигосахариды со степенью полимеризации $n \geq 2$.

Нами были исследованы продукты исчерпывающего гидролиза фукоиданов из *F. evanescens* и *S. cichorioides* двумя формами фукоиданаз – кислой (рН 5,4) и щелочной (рН 8,5). Максимальная степень гидролиза фукоидана из *F. evanescens* была достигнута действием щелочной фукоиданазы (по выходу восстанавливающих сахаров) и составляла 45% [93]. С помощью автоматического жидкостного анализатора проведен анализ низкомолекулярной фракции (НМФ). Эта фракция содержалась в супернатанте, полученном после осаждения 80%-ным водным спиртом высокомолекулярных фрагментов (ВМФ) фукоидана из продуктов исчерпывающего гидролиза фукоидана из *F. evanescens* фукоиданазой при рН 5,4. Результаты хроматографии показали, что в качестве продуктов образуется смесь олигосахаридов и мономера (рис. 4.29 А). Моносахарид идентифицирован как фукоза методом ВЭЖХ.

Состав продуктов действия щелочной фукоиданазы (рН 8,5) на фукоидан из *F. evanescens* значительно отличается от продуктов, полученных при рН 5,4 (рис. 4.29 А, В). Увеличивается доля моносахарида в инкубационной смеси, доля дисахарида значительно

уменьшается, продукты со степенью полимеризации в интервале 5-10 отсутствуют. Распределение продуктов, полученных после действия фукоиданазы в аналогичных условиях на фукоидан из *S. cichorioides*, имеет совсем другой характер (рис. 4.29 Б).

Анализ продуктов, полученных под действием кислой формы фукоиданазы, показал, что при расщеплении фукоидана из *S. cichorioides* образуется в три раза меньше НМФ, чем при гидролизе фукоидана из *F. evanescens* (табл. 4.17). Этот факт указывает на то, что в низкосульфатированном фукоидане из *F. evanescens* для фукоиданазы с рН-оптимумом 5,4 имеется большее количество доступных для гидролиза связей. При расщеплении фукоидана из *F. evanescens* щелочной формой фукоиданазы выход НМФ оказался в три раза выше, чем при действии кислой формы фукоиданазы (табл. 4.17).

Таблица 4.17 - Характеристика продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов

Фермент, рН-оптимум	Субстрат	Выход продуктов реакции, %	
		ВМФ*	НМФ**
Фукоиданаза, рН 5,4	фукоидан из <i>F. evanescens</i>	85	15
	фукоидан из <i>S. cichorioides</i>	95	5
Фукоиданаза, рН 8,4	фукоидан из <i>F. evanescens</i>	55	45

*ВМФ - высокомолекулярная фракция ($n \geq 12$)

**НМФ -низкомолекулярная фракция (олигосахариды $12 \geq n \geq 2$, фукоза)

Для детального изучения структуры продуктов ферментативной трансформации фукоидана из *F. evanescens* нами была выбрана НМФ, полученная под действием щелочной фукоиданазы. Была разработана схема разделения продуктов ферментативного расщепления фукоидана (рис. 4.30). Выход продуктов определялся фенол-сернокислотным методом.

Установлены характеристики фракции продуктов Р-1.1, образующейся под действием щелочной фукоиданазы из *L. sitkana*. В образце после полного кислотного гидролиза методом ВЭЖХ идентифицированы Fuc (92%), Xyl (1,8%), Man (3,7%) Glc (2,5%). Молярное соотношение Fuc:SO₄²⁻ составило 1:0,59.

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 и 4-О-метилфуцитов = 10:41:31:11:7.

Из этих данных следует, что в Р-1.1 количество образующегося 2,3-ди-О-метилфуцита на 27% больше по сравнению с исходным фукоиданом. Это говорит об увеличении в продуктах доли 1→4- связанной фукозы. Вероятно, действию фермента подвергаются 1→3-О-гликозидные связи.

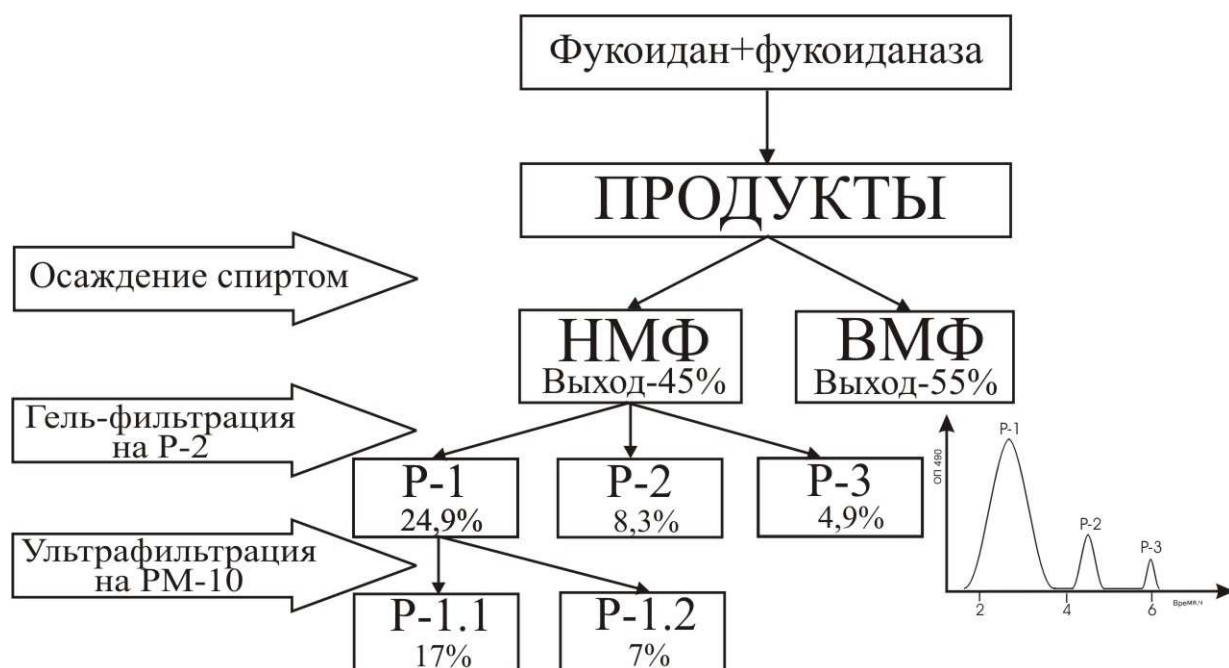


Рисунок 4.30 – Схема разделения продуктов трансформации фукоидана из *F. evanescens* щелочной фукоиданазой. ВМФ - высокомолекулярная фракция ($n \geq 12$), НМФ - низкомолекулярная фракция (олигосахариды $12 \geq n \geq 2$, фукоза).

Результаты метилирования согласуются с данными ^{13}C ЯМР-спектроскопии. В ^{13}C ЯМР-спектре десульфатированного Р-1.1 наблюдались более интенсивные сигналы при 97,3 м.д. (C1), 67,5 м.д. (C2), 76,6 м.д. (C3), 69,8 м.д. (C4), 67,7 м.д. (C5), соответствующие фрагменту $\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow$, по сравнению с сигналами в области 96,5 м.д. (C1), 69,1 м.д. (C2), 70,2 м.д. (C3), 81,1 м.д. (C4), 68,8 м.д. (C5), характерными для фрагмента $\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow$. Кроме того, в спектре имелись сигналы, соответствующие фрагменту $\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-Fucp-(4}\rightarrow$: 101,5 м.д. (C1), 68,4 м.д. (C2), 77,2 м.д. (C3), 70,2 м.д. (C4), 67,7 м.д. (C5). Следовательно, в Р-1.1

присутствуют фрагменты с разветвлениями при C4, которые не были обнаружены химическими методами исследования.

По всей видимости, щелочная фукоиданаза из морского моллюска *L. sitkana* катализирует расщепление преимущественно α -1 $\rightarrow$ 3-связи между остатками фукозы в молекуле полисахарида.

При действии кислой фукоиданазы (pH 5,4) из морского моллюска *L. sitkana* на фукоидан из бурой водоросли *Fucus distichus* происходило расщепление некоторого количества гликозидных связей субстрата, но ни фукоза, ни низшие олигосахариды не образовывались [213]. Высокосульфатированная фракция фукоидана (F4), выделенная из *F. distichus* и состоящая практически только из остатков фукозы и сульфата, была выбрана нами в качестве субстрата для изучаемой фукоиданазы не случайно. Этот фукоидан относится к редким высокорегулярным фукоиданам водорослей. Полисахарид имеет в основе молекул чередующиеся остатки 3-связанной α -L-фукопиранозы, сульфатированной по положениям 2 и 4, и 4-связанной α -L-фукопиранозы, сульфатированной только по положению 2. Другими словами, молекулы полисахарида содержат дисахаридное повторяющееся звено $\rightarrow$ 3)- α -L-Fucp-(2,4diSO₃⁻)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Fucp-(2SO₃⁻)-(1 $\rightarrow$. Эта регулярность лишь незначительно замаскирована присутствием в полисахариде небольшого количества О-ацетильных групп, а также неполным сульфатированием некоторых повторяющихся звеньев – мольное соотношение L-фукозы, сульфатных и ацетильных групп составляло 1 : 1,21 : 0,08 [95].

Высокомолекулярная фракция продуктов ферментализа (ВМФ) по составу практически не отличается от нативного фукоидана. Спектры ¹H (рис. 4.31) и ¹³C ЯМР этой фракции также оказались идентичными аналогичным спектрам исходного фукоидана. Таким образом, ВМФ представляет собой часть исходного фукоидана, не претерпевшую заметных изменений под действием фермента.

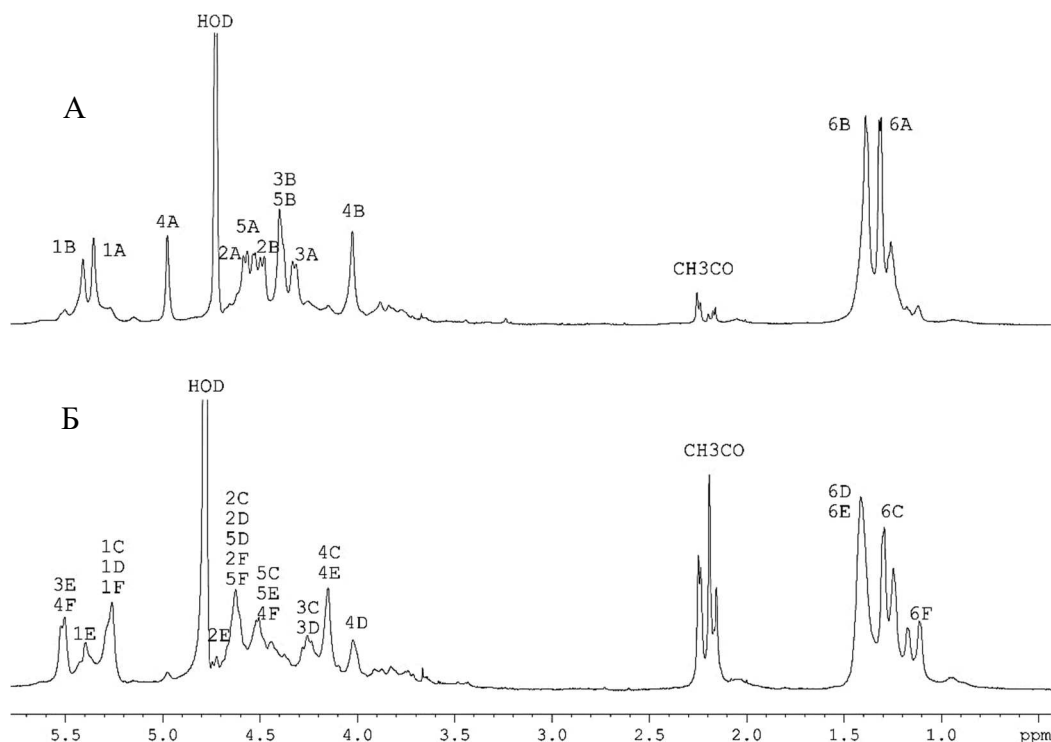


Рисунок 4.31 – Спектры ^1H ЯМР фракции ВМФ (А) и фракции I-1 (Б). Буквами и цифрами обозначены соответствующие атомы протонов в остатках А, В, С, D, Е и F, показанных в табл. 4.18

Низкомолекулярную фракцию (фракция I) исследовали с помощью гель-фильтрации на колонке с TSK-HW 65 (диапазон разделяемых масс 10–1000 кДа). НМФ была разделена на две фракции, из которых лишь одна I-1 имела углеводную природу. Выход фракции I-1 составил 6,1% (15 мг) от исходного фукоидана. Профиль элюции на TSK-HW 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.

Строение полученной в результате ферментативного расщепления фракции I–1 далее исследовали с помощью спектроскопии ЯМР. Спектр ^{13}C ЯМР этой фракции имел более сложный вид по сравнению с аналогичным спектром нативного фукоидана. 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 О-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 ^{13}C ЯМР фракции I–1 от соответствующего спектра нативного фукоидана, где эти сигналы были едва заметными. Спектр ^1H 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 О-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 О-ацетильных групп (рис. 4.31). 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 ^1H - ^{13}C HSQC показала, что в области резонанса сигналов аномерных атомов содержится три кросс-пика. Анализ гомоядерных ^1H - ^1H 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 ^{13}C ЯМР (табл. 4.18). Совместный анализ химических сдвигов в протонном и углеродном спектрах позволил идентифицировать в составе фракции I–1 несколько типов остатков фукопиранозы, сульфатированной при C2 различающихся положениями гликозилирования и О-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 О-ацетильные группы в положении 3, а часть 3-связанных остатков ацетилирована по положению 4.

Таблица 4.18 – Химические сдвиги (м.д.) в ЯМР-спектрах высокомолекулярной фракции (ВМФ) и фракции I-1

Фракция/остаток	¹ H/ ¹³ C химические сдвиги (м.д.)					
	H1 / C1	H2 / C2	H3/ C3	H4/ C4	H5/ C5	H6/ C6
ВМФ						
A →3)-α-L-Fucp(2,4OSO ₃ ⁻)-(1→	5,38/100,2	4,58/76,0	4,33/74,4	4,98/81,2	4,52/68,9	1,34/16,8
*B →4)-α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→	5,40/99,1	4,48/77,5	4,38/68,7	4,03/84,0	4,40/69,8	1,40/16,8
Фракция I-1						
C →3)-α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→	5,28/100,0	4,63/74,5	4,27/73,4	4,16/69,9	4,52/67,8	1,30/16,8
D →3)-α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻ , 4Ac)-(1→	5,27/100,0	4,65/74,8	4,40/?	5,50/70,7	4,63/67,3	1,15/16,7
*E →4)-α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→	5,27/94,0	4,60/74,5	4,23/68,3	4,03/83,6	4,64/68,8	1,40/16,7
F →4)-α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻ , 4Ac)-(1→	5,41/94,9	4,73/74,2	5,52/70,7	4,16/79,6	4,54/68,8	1,40/16,7

* Формально идентичные остатки В и Е в молекулах исходного фукоидана и фракции I-1 находятся в разном окружении и поэтому отличаются по положению отдельных сигналов в спектрах ЯМР.

Было установлено, что присутствие в аномерной области HSQC спектра трех кросс-пиков обусловлено различиями в химических сдвигах аномерных протонных и углеродных атомов ацетилированных и неацетилированных 4-связанных остатков 2-сульфата фукопиранозы. Таким образом, главным продуктом при действии фермента на фукоидан из *F. distichus* являлся полисахарид, построенный из повторяющихся дисахаридных звеньев →3)-α-L-Fucp-(2,4diSO₃⁻)-(1→4)-α-L-Fucp-(2SO₃⁻)-(1→ и практически не отличающийся по структуре от исходного вещества. В качестве минорного компонента выделена полимерная фракция с углеводной цепью такого же строения, но содержащая сульфатные группы только в положениях 2 и ацетилированная по положениям 3 и 4 остатков фукозы. Вероятно, в этом случае ферментативный гидролиз фукоидана происходит только по гликозидным связям несульфатированных остатков фукозы, содержание которых в исходном полимере весьма невелико. Очевидно, что участки молекул исходного полисахарида, отклоняющиеся от его усредненной структуры, собраны в блоки, в которых сконцентрированы неполностью сульфатированные и ацетилированные повторяющиеся звенья.

4.2.3 Фукоиданаза из морского моллюска *Lambis* sp.

Морской моллюск *Lambis* sp. был собран в Южно-Китайском море во время экспедиции научно-исследовательского судна «Академик Опарин».

Экстракт печени содержал большое количество ферментов, катализирующих гидролиз олиго- и полисахаридов (табл. 4.19). Фукоиданаза была очищена до гомогенного состояния комбинацией методов высаливания, ионообменной, гидрофобной хроматографии и гель-фильтрации [214].

Таблица 4.19 – Гликозид гидролазы печени *Lambis* sp.

Фермент	Субстрат	Удельная активность, ед./мг белка*
Фукоиданаза	фукоидан из <i>F. evanescens</i>	0,026
Альгинат-лиаза	альгинат натрия	6,9
Амилаза	амилопектин	8,3
Целлюлаза	КМ-целлюлоза	7,5
1→3-β-D-глюканаза	ламинаран из <i>S. cichorioides</i>	7,5
Пустуланаза	1→6-β-D-глюкан	0,5
β-D-Галактозидаза	<i>n</i> -нитрофенил-β-D-галактопиранозид	11,3
β-D-Глюкозидаза	<i>n</i> -нитрофенил-β-D-глюкопиранозид	16,8
α-D-Маннозидаза	<i>n</i> -нитрофенил-α-D-маннопиранозид	2,4
α-L-Фукозидаза	<i>n</i> -нитрофенил-α-L-фукопиранозид	11,9

*За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль глюкозы, фукозы или *n*-нитрофенола за 1 мин в расчёте на 1 мг белка

Несмотря на то, что на первой стадии очистки происходили значительные потери активности, она позволила отделить около 70% балластных белков. Наиболее чистая фракция была получена при 80% насыщении экстракта сульфатом аммония (табл. 4.20). Последующие стадии очистки позволили получить фукоиданазу в гомогенном состоянии (рис. 4.32). Выход фермента составил 0,75%. Молекулярная масса по данным электрофореза составила 50 кДа.

Таблица 4.20 – Схема выделения фукоиданазы из печени *Lambis* sp.

Стадия очистки	Общий белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед./мг белка	Степень очистки, раз	Выход, %
Экстракция	1443	37,4	0,026	1	100
Осаждение сульфатом аммония (80 % насыщения)	198	13,6	0,069	2,6	36
Гидрофобная хроматография на Phenyl Sepharose 6 fast flow	24,6	5,2	0,211	8,1	14
Гель-фильтрация на Sephacryl S-100	4,88	1,3	0,280	10,8	4
Ионообменная хроматография на DEAE-MacroPrep	1,74	0,56	0,327	12,6	1,5
Ионообменная хроматография на CM-MacroPrep	0,8	0,53	0,666	25,6	1,4
ВЭЖХ на колонке TSKgel G2000 SW	0,11	0,28	2,571	99,0	0,75

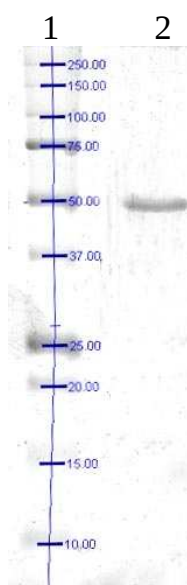


Рисунок 4.32 – SDS-электрофорез фукоиданазы из печени *Lambis* sp.
1 -Маркеры молекулярной массы белков;
2 – фукоиданаза.

Для регистрации активности фермента применяли два метода: метод определения восстанавливающих сахаров и метод электрофореза. В качестве субстрата был выбран высокоочищенный фукоидан из *F. evanescens*.

Значение оптимума pH фукоиданазы не отличалось от такового для других О-гликозид гидролаз и составило 5,0 (рис. 4.33). Температурный оптимум лежал в области 45°C (рис. 4.34),

а время полуинактивации составило 2 мин при 54°C. Активность фукоиданазы из *Lambis* sp. несколько увеличивалась в присутствии ионов Ca^{2+} и Ba^{2+} , ионы Mg^{2+} не влияли на активность фермента, а ионы Cu^{2+} , Zn^{2+} и Hg^{2+} оказывали ингибирующее действие (табл. 4.21).

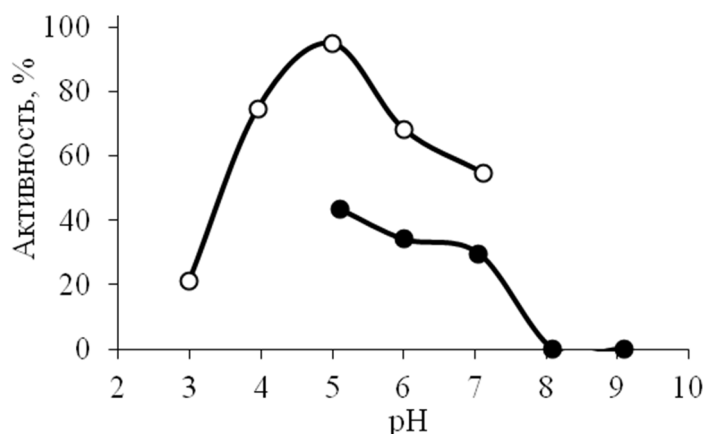


Рисунок 4.33 – pH-Оптимум фукоиданазы из печени *Lambis* sp. (○) – 0,025 М сукцинатный буфер; (●) – 0,025 М трис-НСl буфер.

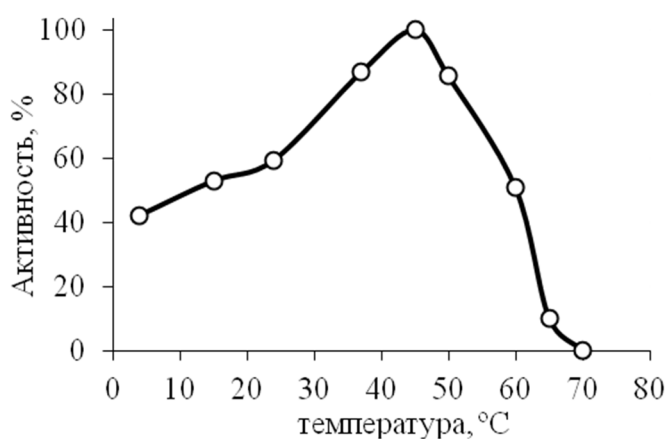


Рисунок 4.34 – Температурный оптимум фукоиданазы из печени *Lambis* sp.

Таблица 4.21 – Влияние ионов двухвалентных металлов на активность фукоиданазы из печени *Lambis* sp.

Ионы металлов, 0,07 М	Относительная активность, %
----	100
Cu^{2+}	25
Ca^{2+}	113
Mg^{2+}	108
Ba^{2+}	110
Zn^{2+}	45
Hg^{2+}	20

Кинетика гидролиза фукоидана из *F. evanescens* была изучена с помощью электрофореза продуктов реакции. Образование сульфатированных олигосахаридов наблюдалось на электрофореграмме спустя 30 мин инкубирования

реакционной смеси, максимальный выход продуктов ферментативного гидролиза фукоидана зафиксирован через 48 ч (рис. 4.35).

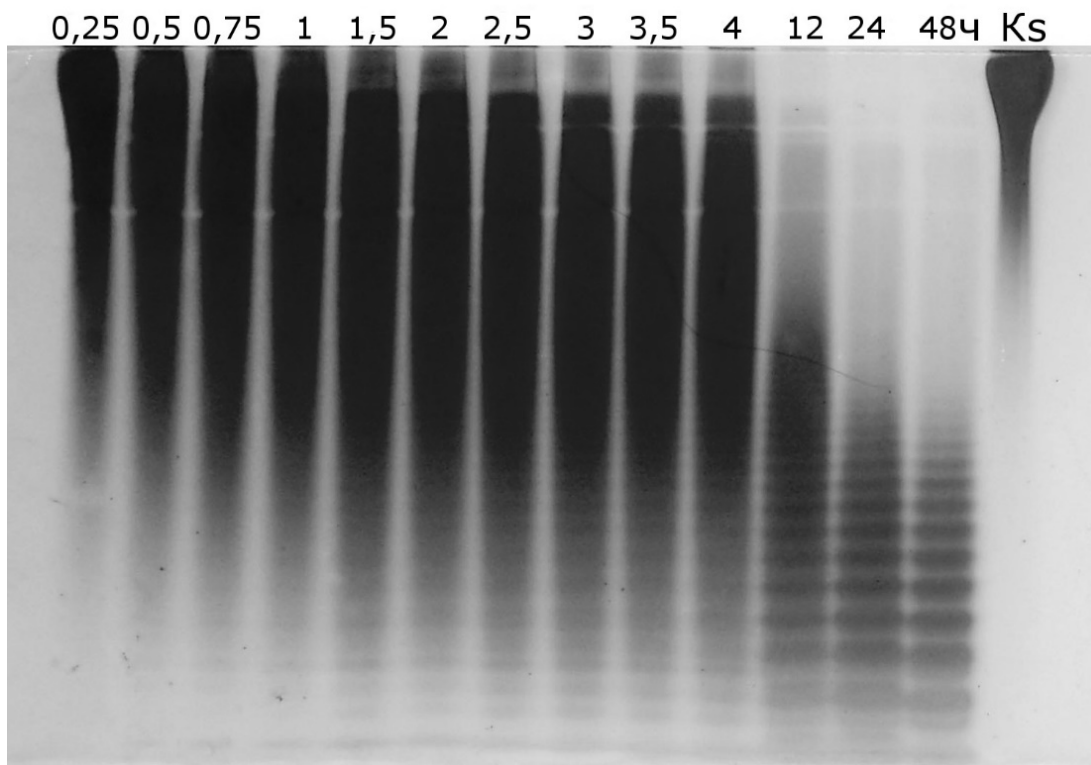


Рисунок 4.35 – Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана из *F. evanescens* фукоиданазой из печени *Lambis* sp. **Ks** – фукоидан.

Для изучения специфичности фукоиданазы были использованы фукоиданы различной структуры, а также их десульфатированные и дезацетилированные производные. Было показано, что фукоиданаза расщепляла фукоиданы из *F. evanescens* и *F. vesiculosus*, содержащие α -1 $\rightarrow$ 3- и α -1 $\rightarrow$ 4-связанные остатки сульфатированной α -L-фукопиранозы. Фукоидан из *S. cichorioides*, который состоял из α -1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков сульфатированной L-фукопиранозы, не подвергался ферментативному гидролизу. По всей видимости, фукоиданаза специфична к расщеплению α -1 $\rightarrow$ 4-О-гликозидных связей в молекулах фукоиданов. Дезацетилированные и десульфатированные производные фукоидана из *F. evanescens* подвергались ферментативному гидролизу с большей скоростью по сравнению с исходным фукоиданом (табл. 4.22). Очевидно, что наличие заместителей в молекуле фукоидана уменьшает количество доступных для расщепления гликозидных связей. С более низкой скоростью по сравнению с

фукоиданом из *F. evanescens* фукоиданаза катализировала расщепление фукоидана из *F. vesiculosus*, что может быть связано с различием их структур, например, с расположением сульфатных групп или других заместителей.

Таблица 4.22 – Специфичность фукоиданазы из печени *Lambis* sp.

Субстрат	Активность, %
Фукоидан из <i>F. evanescens</i>	100
F. dAc*	137
F. dAcS**	279
Фукоидан из <i>F. vesiculosus</i>	27
Фукоидан из <i>S. cichorioides</i>	0

*F. dAc – дезацетилированный фукоидан из *F. evanescens*;

**F. dAcS - дезацетилированный и десульфатированный фукоидан из *F. evanescens*
(Fuc:OSO₃⁻ = 1:0,2 моль)

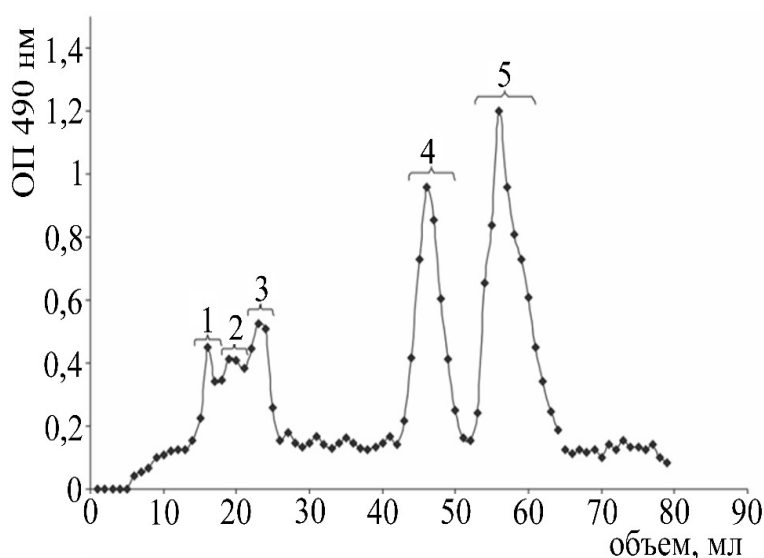


Рисунок 4.36 – Анионообменная хроматография НМФ на колонке с DEAE Macro Prep.

Другая причина - наличие в составе коммерческого препарата фукоидана из *F. vesiculosus* фирмы «Sigma» примесей анионных полисахаридов различной структуры [262], которые, по-видимому, не подвергаются ферментативному гидролизу. Для детального изучения специфичности фукоиданазы были исследованы продукты

ферментативного расщепления фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens*. После завершения ферментативной реакции высокомолекулярные продукты (ВМФ) реакции отделялись от низкомолекулярных продуктов (НМФ) осаждением ВМФ 75% водным этанолом. Выход НМФ составил 73%. Затем, НМФ фракционировали на колонке с DEAE Macro Prep (рис. 4.36). Выход фракций 1, 2, 3, 4 и 5 был 3,6; 4,5; 4; 13,7 и 15,8% соответственно.

Для детального изучения структуры были выбраны фракции 3, 4 и 5, имеющие ^1H и ^{13}C ЯМР-спектры достаточного разрешения.

На спектрах COSY и TOCSY фракции 3 наблюдались два кросс-пика в аномерной области, что указывает на наличие двух типов остатков α -фукопираноз (**A** и **B**) в молекуле. Анализ HMBC спектров фракции 3 показал, что остатки фукозы **A** замещены остатками фукозы **B** при C-3 (кросс-пик H-1 (**A**)/C-3 (**B**) при 5,33/74,1 м.д.). Кросс-пики на спектрах HSQC в слабом поле H-2/C-2 при 4,47/76,4 и при 4,52/74,7 м.д. свидетельствуют о наличии сульфатных групп в положении 2 остатков **A** и **B**. Таким образом, фракция 3 содержит в основном дисахарид (рис. 4.37). Химические сдвиги в спектрах этого дисахарида представлены в таблице 4.23.

В аномерной области COSY и TOCSY спектров фракции 4 были обнаружены кросс-пики, соответствующие пяти различным типам остатков α -фукопиранозы (**A''**, **B''**, **C''**, **D''** и **E''**). Остатки фукопиранозы отличались типами гликозидных связей, а также положением заместителей. На спектрах HMBC присутствовали сигналы с химическими сдвигами, характерными как для α -1 $\rightarrow$ 3-, так и для α -1 $\rightarrow$ 4-связанных остатков L-фукопираноз (кросс-пики H-1 (**A''**)/C-3 (**B''**) при 5,29/77,2 м.д., H-1 (**B''**)/C-4 (**C''**) при 5,35/83,9 м.д., H-1 (**B''**)/C-4 (**D''**) при 5,34/73,9 м.д. H-1 (**D''**)/C-4 (**B''**) при 5,49/79,6 м.д.). Присутствие кросс-пиков в слабом поле H-2/C-2 при 4,47/76,9 (**A''**), 4,73/75,1 (**B''**), 4,47/76,7 (**D''**) и 4,52/74,7 (**E''**) м.д. на спектрах HSQC, указывает на присутствие сульфатных групп в положении 2 этих остатков. На основании полученных данных можно предположить, что основным компонентом фракции 4 является разветвленный сульфатированный пентасахарид (рис. 4.37).

Структура фракции 5 была установлена с помощью одно- и двумерной спектроскопии ЯМР. TOCSY и COSY спектры фракции 5 содержали в аномерной области 4 корреляционных пика, соответствующих остаткам фукозы, обозначенным как **A'**, **B'**, **C'**, **D'**. Три корреляционных пика в HMBC спектре указывают на тип связи между остатками фукозы: H1 (**A'**)/C3 (**B'**) при 5,35/73,5 м.д., H1 (**B'**)/C4 (**C'**) при 5,29/73,5 м.д. и H1 (**C'**)/C3 (**D'**) при 5,34/73,9 м.д. Анализ HSQC показал наличие сульфатных групп при C2 остатков фукозы: кросс-пики

H2/C2 при 4,47/76,6 м.д. – остаток фукозы **A'**, 4,60/74,7 – остаток фукозы **B'**, 4,49/76,7 – остаток фукозы **C'**, 4,52/74,7 – остаток фукозы **D'**. Таким образом, основным компонентом фракции 5 является сульфатированный линейный тетрасахарид (рис. 4.37, табл. 4.23).

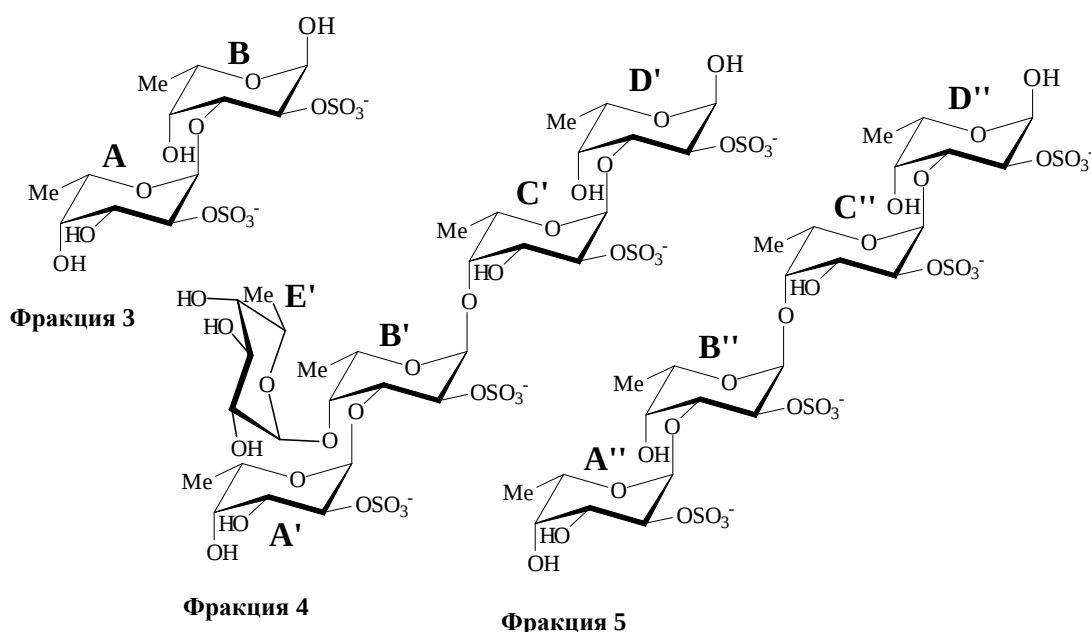


Рисунок 4.37 – Структура олигосахаридов фракций 3, 4 и 5, полученных ферментативным гидролизом фукоидана из *F. evanescens* фукоиданазой из *Lambis* sp.

Таблица 4.23 – Химические сдвиги (м.д.) в ЯМР-спектрах фукоолигосахаридов (3, 4 и 5) полученных гидролизом фукоидана из *F. evanescens* фукоиданазой из *Lambis* sp.

Фракция/остаток	¹ H/ ¹³ C химические сдвиги (м.д.)					
<i>Фракция 3</i>	H1 / C1	H2 / C2	H3/ C3	H4/ C4	H5/ C5	H6/ C6
A α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→3)	5,33/95,4	4,47/76,4	4,02/68,5	3,89/73,3	4,46/68,1	1,23/16,6
B →3)-α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-	5,49/91,7	4,52/74,7	4,02/74,1	4,06/70,0	4,22/67,1	1,24/16,6
<i>Фракция 4</i>						
A'' α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→3)	5,29/98,7	4,47/76,9	4,20/68,6	3,89/73,5	4,54/68,2	1,25/16,7
B'' →3,4)-α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→4)	5,35/100,6	4,73/75,1	4,03/77,2	4,24/79,6	4,47/68,6	1,23/16,5
C'' →4)-α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→3)	5,34/95,3	4,47/76,7	4,19/68,9	4,00/83,9	4,45/70,5	1,39/16,9
D'' →3)-α-L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)	5,49/91,8	4,52/74,7	4,14/73,9	4,01/69,9	4,23/67,1	1,24/16,6
E'' α-L-Fucp-(1→4)	5,49/100,1	3,82/73,5	4,05/70,6	3,84/70,7	4,27/68,0	1,37/17,2

Фракция 5						
A' α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→3)	5,35/95,0	4,47/76,6	4,11/68,8	3,89/73,2	4,51/68,0	1,25/16,8
B' →3)- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→4)	5,29/100,6	4,60/74,7	4,18/73,5	4,12/70,0	4,41/68,6	1,26/16,5
C' →4)- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→3)	5,34/95,3	4,49/76,7	4,19/69,0	4,00/83,8	4,52/68,9	1,39/16,6
D' →3)- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)	5,49/91,8	4,52/74,7	4,05/73,9	4,08/69,9	4,23/67,1	1,24/16,7

MALDI TOF спектры фракций 3, 4 и 5 содержали сигналы, соответствующие ди-, пента-и тетрасахаридам с различным количеством сульфатных групп, а также сигнал, соответствующий свободным сульфатным группам (рис. 4.38).

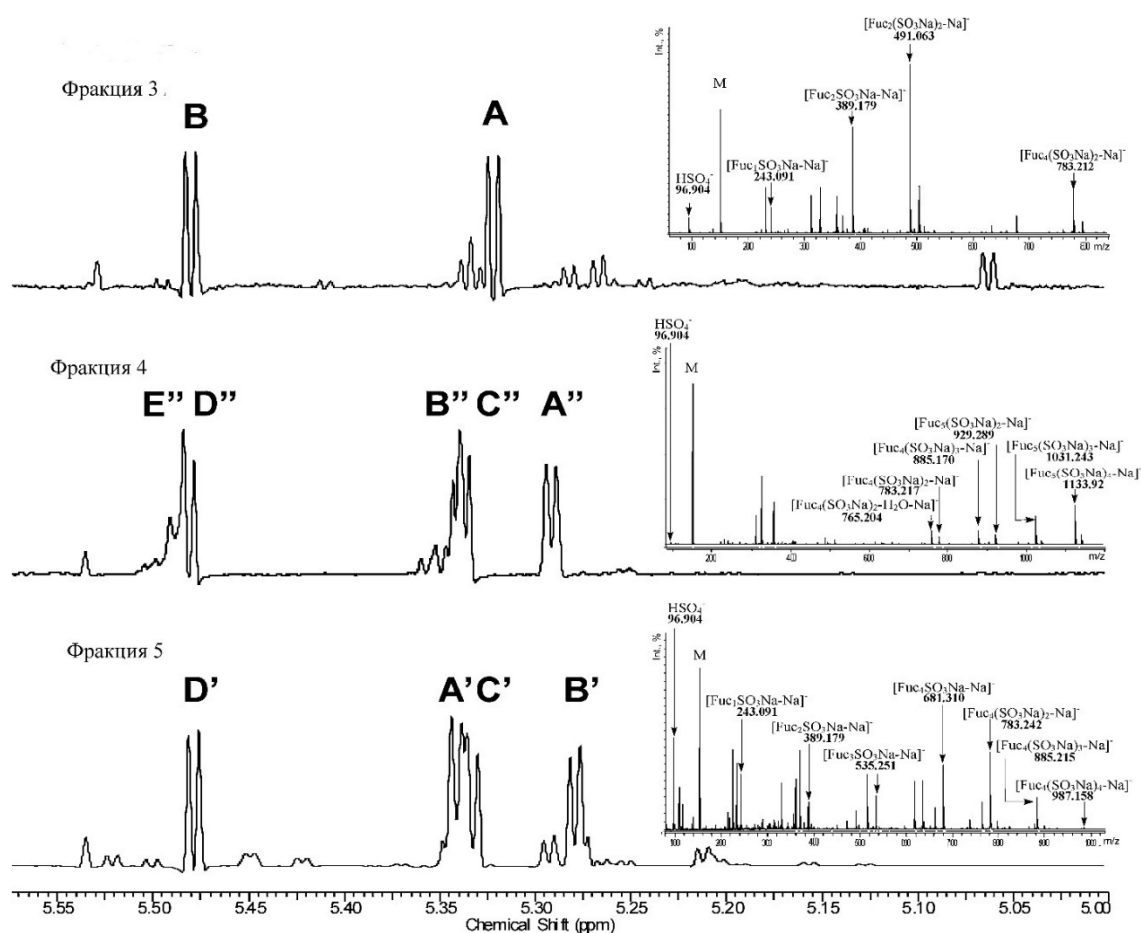


Рисунок 4.38 – ¹H ЯМР-спектры и масс-спектры фракций 3, 4 и 5.

Факт наличия свободных сульфатных групп свидетельствует о том, что, несмотря на «мягкий» способ ионизации, сульфатные группы отщепляются от олигосахаридов в условиях масс-спектрометрического анализа.

Установить N-концевую аминокислотную последовательность гомогенной фукоиданазы методом Эдмана не удалось, поскольку NH₂-группа N-концевой аминокислоты оказалась заблокированной. Методом MALDI масс-спектрометрии были установлены аминокислотные последовательности внутренних пептидов фукоиданазы, полученных при действии трипсина. Поскольку пептиды оказались короткими (табл. 4.24), создать специфические праймеры для поиска гена, кодирующего фукоиданазу в *Lambis* sp., не удалось. Работа по установлению первичной структуры фукоиданазы из *Lambis* sp. будет продолжена.

Таблица 4.24 – Результаты секвенирования *de novo* пептидов фукоиданазы из *Lambis* sp.

№	Аминокислотная последовательность	Достоверность, %
1	FHWNPVHK	94
	FHWNP	95
	FHWN	100
2	FGTVEVGLK	98
	TVEVGLK	98
	EVGLK	100

4.2.4 Фукоиданаза из морской бактерии *Formosa algae*

На основе результатов скрининга бактериальный штамм КММ 3553 из коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН был выбран в качестве источника фукоиданазы [263], штамм был идентифицирован как *F. algae* [264]. Фукоиданаза из морской бактерии *F. algae* является внутриклеточным ферментом с относительно низким уровнем активности. Традиционные методы обнаружения

активности О-гликозид гидролаз, такие как определение количества восстанавливающих сахаров в реакционной смеси, для регистрации активности этой фукоиданазы оказались непригодными. Поэтому для обнаружения сульфатированных олигосахаридов, которые образовывались в ходе ферментативного гидролиза фукоидана, был использован электрофорез в полиакриламидном геле (С-PAGE) [208].

В качестве субстрата использовали фукоидан из *F. evanescens*. Активность фермента была обнаружена только в микробной массе, а в культуральной среде она полностью отсутствовала. Была изучена скорость биосинтеза фукоиданазы. Для этого исследовали рост биомассы и накопление продуктов ферментативной реакции (рис. 4.39).

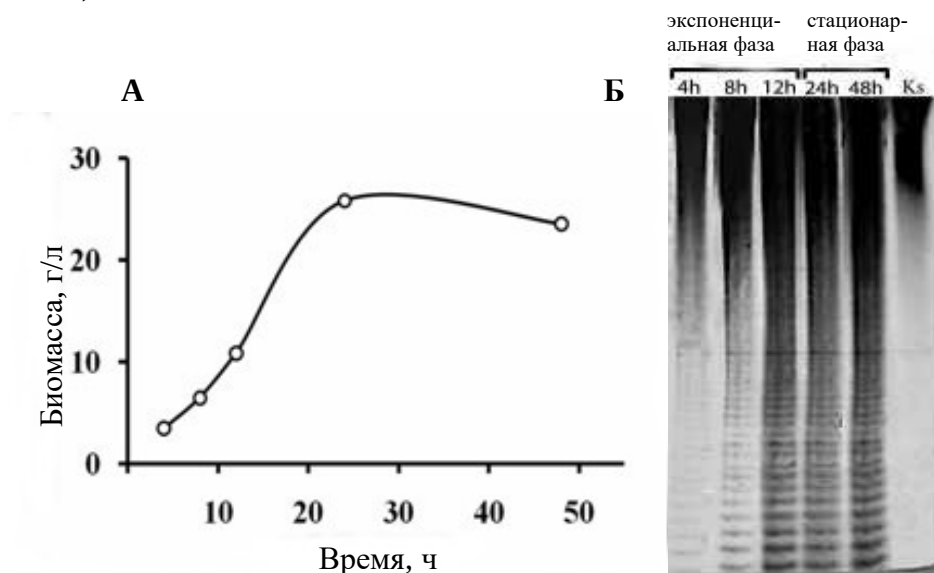


Рисунок 4.39 – Рост биомассы (А), накопление продуктов реакции гидролиза фукоидана фукоиданазой из *F. algae* КММ 3553 (Б). **Ks** – нативный фукоидан из *F. evanescens*.

Наибольшее количество биомассы наблюдалось после 24 часов роста. Появление продуктов гидролиза фукоидана было зафиксировано через 4 часа роста бактерий. Максимальная фукоиданазная активность обнаружена после 12 часов роста бактерий (рис. 4.39). Морская бактерия *F. algae* является продуцентом ферментов, катализирующих трансформацию поли- и олигосахаридов (табл. 4.25). Интересно отметить отсутствие в экстракте широко распространенных ферментов: амилазы, целлюлазы и фукозидазы.

Таблица 4.25 - Уровень активности О-гликозид гидролаз в клеточном экстракте *F. algae*

Субстрат	Удельная активность, ед./мг белка
Альгиновая кислота (М = Г)	6,4
Амилопектин	0
КМ-целлюлоза	0
Ламинаран	10,6
Пустулан	1,8
*Фукоидан	+
<i>n</i> -Нр-N-ацетил- β -D-глюкозаминид	20,7
<i>n</i> -Нр- β -D-галактопиранозид	0
<i>n</i> -Нр- β -D-глюкопиранозид	9,5
<i>n</i> -Нр- β -D-маннопиранозид	0
<i>n</i> -Нр- β -D-фукопиранозид	0

*По данным электрофореза

Для очистки фукоиданазы (FFA) была разработана схема выделения, включающая ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию. Фермент был выделен в гомогенном состоянии. По результатам SDS электрофореза его молекулярная масса составила 96 ± 1 кДа (рис. 4.40).

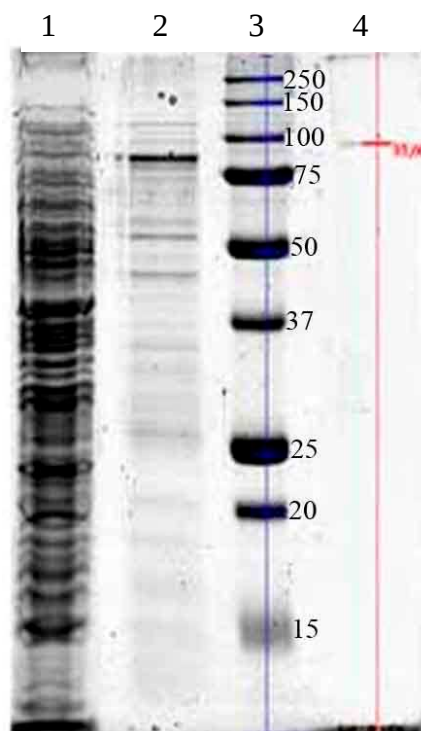


Рисунок 4.40 – SDS электрофорез фракций белков из клеточного экстракта *F. algae*.

1 – Клеточный экстракт *F. algae*, **2** – фракция белков после очистки экстракта на DEAE-MacroPrep, **3** - маркеры молекулярной массы белков, **4** – очищенная фукоиданаза из *F. algae*.

Выход фермента (по белку) составил 0,0003 % от исходного содержания растворимых белков в клетке *F. algae*.

Исследование основных физико-химических свойств FFA показало, что фермент проявляет максимальную активность в диапазоне pH от 6,5 до 9,1 (рис. 4.41 А), что является типичным для гликаназ из морских бактерий.

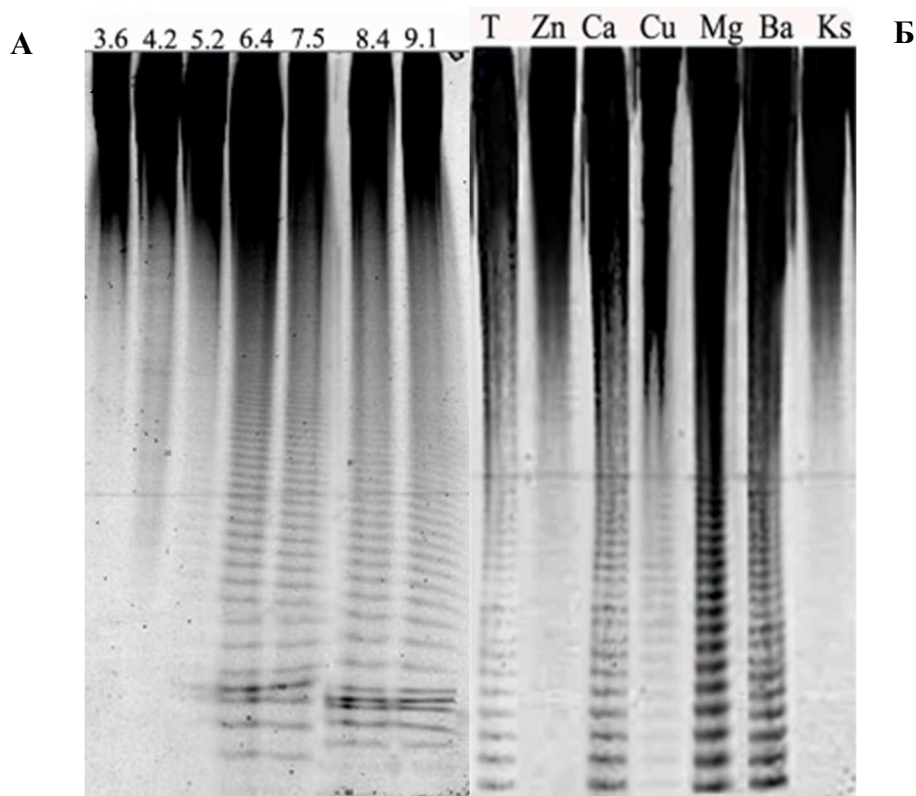


Рисунок 4.41 – Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана, полученных с помощью FFA при разных значениях pH (А) и при добавлении различных солей двухвалентных металлов (Б). Т – продукты реакции, полученные без добавления солей. Ks – нативный фукоидан.

Было показано, что FFA активируется в присутствии катионов Ca^{2+} , Ba^{2+} , и Mg^{2+} , а катионы Cu^{2+} уменьшают активность фермента. Полная инактивация фермента наблюдалась в присутствии катионов Zn^{2+} (рис. 4.41 Б). Ранее было показано, что ионы двухвалентных металлов оказывают влияние на активность фукоиданаз. Так, фукоиданаза, выделенная из морской бактерии “*Fucophilus fucoidanolyticus*” SI-1234, активировалась Co^{2+} , а ионы Zn^{2+} , Cu^{2+} и Hg^{2+} оказывали ингибирующее действие.

Была изучена кинетика гидролиза фукоидана из *F. evanescens* частично очищенной фукоиданазой. Образование сульфатированных олигосахаридов было заметным на электрофореграмме спустя 12 ч инкубирования реакционной смеси, максимальный выход продуктов ферментативного гидролиза фукоидана наблюдался через 48 ч (рис. 4.42).



Рисунок 4.42 - Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана, образующихся под действием FFA. Цифры над дорожками обозначают время инкубации в часах, **Ks** – нативный фукоидан.

FFA обладала большей термостабильностью, чем фукоиданаза, выделенная из морского моллюска *Haliotis* sp. [192], но меньшей по сравнению с ферментом, выделенным из бактерии *Vibrio* sp. N-5 [189]. Было показано, что активность FFA значительно уменьшается при длительной инкубации (60 мин) раствора фермента при 45 °C. FFA полностью инактивировалась за 40 мин при 55°C (рис. 4.43).

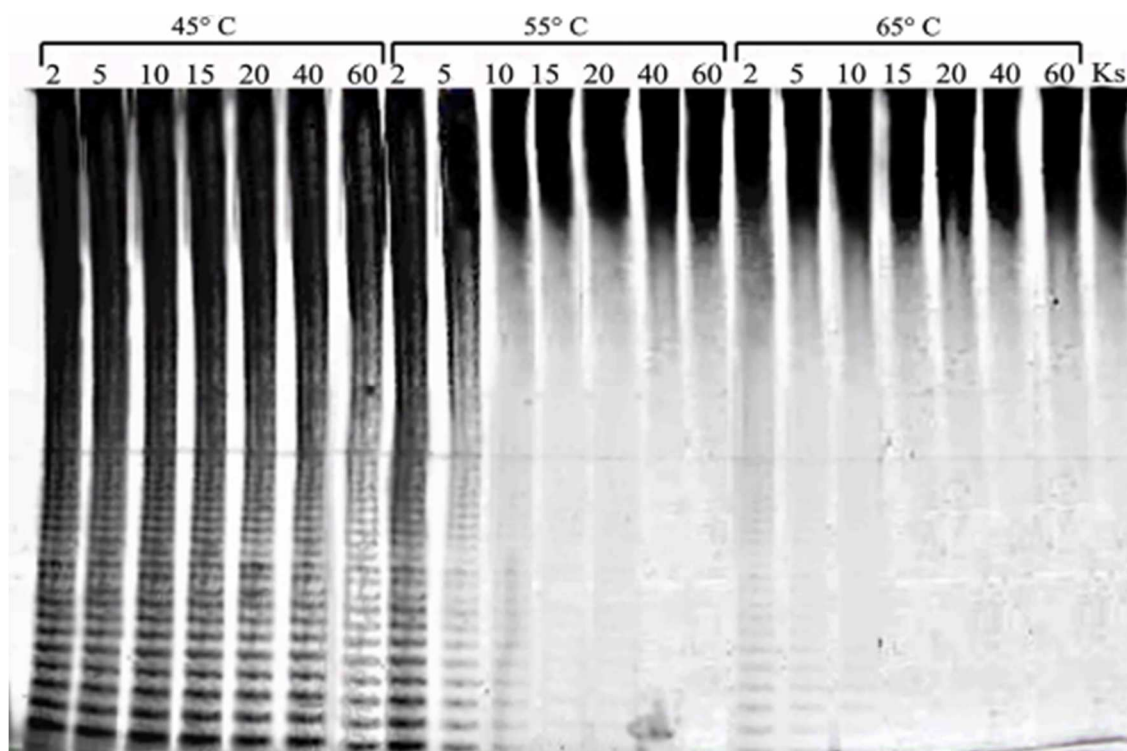


Рисунок 4.43 – Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана фукоиданазой FFA в зависимости от температуры. Цифры над дорожками указывают время в минутах. **Ks** – нативный фукоидан.

Фукоиданаза FFA катализировала гидролиз фукоиданов из *F. evanescens* и *F. vesiculosus*, состоящих из чередующихся α -1 $\rightarrow$ 3- и α -1 $\rightarrow$ 4-связанных остатков сульфатированной L-фукозы, но не фукоидана *S. cichorioides*, построенного из α -1 $\rightarrow$ 3-связанных остатков сульфатированной L-фукозы (табл. 4.26). Необходимо отметить, что нативный и десульфатированный фукоидан из *F. evanescens* плохо подвергался действию фермента, в отличие от дезацетилированного производного (табл. 4.26).

Таблица 4.26 – Специфичность фукоиданазы FFA из *F. algae* KMM 3553

Субстрат	Выход продуктов, %
Фукоидан из <i>F. evanescens</i>	7
Дезацетилированный фукоидан из <i>F. evanescens</i>	9,4
Десульфатированный фукоидан из <i>F. evanescens</i>	0,8
Фукоидан из <i>F. vesiculosus</i>	5,6
Каррагинан	0
Фукоидан из <i>S. cichorioides</i>	0

Для детального исследования специфичности фукоиданазы в качестве субстрата был использован фукоидан из *F. evanescens*, который имеет преимущественно линейную структуру, построенную из повторяющихся 1→3- и 1→4-связанных остатков α-L-фукопиранозы, сульфатированных по второму положению. Добавочный сульфат занимает в нем 4 положение в 1→3-связанных остатках α-L-фукозы [92]. Этот фукоидан состоит преимущественно из остатков сульфатированной фукозы, молярное соотношение Fuc:Gal:Xyl:OSO₃⁻ составило 1:0,03:0,01:1,2, соответственно. Высокомолекулярные продукты реакции (ВМФ) были отделены от низкомолекулярных продуктов (НМФ) осаждением первых 75% водным этанолом. Выход НМФ составил 49%. Для определения типа расщепляемой связи нами был использован подход, ранее описанный Daniel с соавторами [75]. Для этого оценивали интегральную интенсивность сигналов в области 1,24-1,32 м.д. и 1,38-1,41 м.д., соответствующих 1→3 и 1→4 связанным остаткам фукозы. Соотношение указанных сигналов в исходном полисахариде было одинаковым, в то время как после ферментативной реакции соотношение составило 3:1. Сигнал Н4 при 4,9 м.д., соответствующий фрагменту [→3)-Fuc(2,4OSO₃⁻)-(1→] отсутствовал в спектре НМФ (рис. 4.44). Указанные факты свидетельствуют о том, что фукоиданаза FFA расщепляет 1→4 гликозидные связи в следующем фрагменте молекулы фукоидана: [→3)-Fuc(2,4OSO₃⁻)-(1→4)-Fuc(2OSO₃⁻)-(1→].

С помощью гель-фильтрации на биогеле Р-2 из низкомолекулярной фракции продуктов ферментативного расщепления фукоидана был выделен один продукт, структура которого была исследована с помощью ЯМР-спектроскопии. Выход продукта составил 8,3% от НМФ.

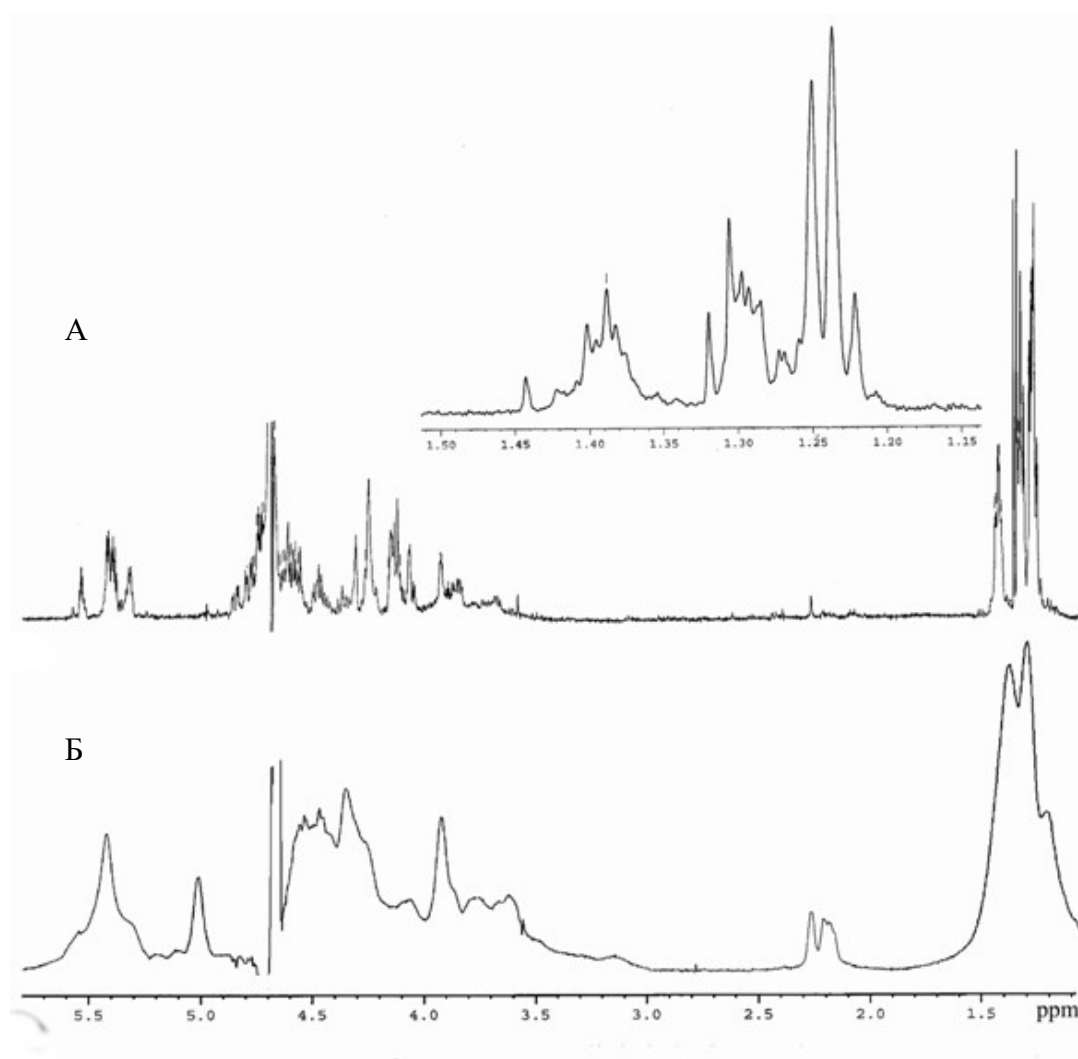


Рисунок 4.44 – ^1H ЯМР-спектр продуктов гидролиза фукоидана фукоиданазой FFA (А), ^1H ЯМР-спектр исходного фукоидана из *F. evanescens* (Б).

Анализ ^1H , ^{13}C , COSY и HSQC ЯМР-спектров этого продукта показал наличие четырех остатков α -L-фукопиранозы (А, В, С и D). Отнесение сигналов приведено в таблице 4.27. Сигналы H2 имели сдвиг в слабое поле $\Delta\delta = 0,7$ м.д., что свидетельствует о наличии сульфатных групп при C2. В одном из остатков фукозы (С) был идентифицирован сигнал с химическим сдвигом 4,7 м.д., указывающий на замещение гидроксильных групп в остатках фукозы (С) сульфатными группами в положении C3. Кросс-пик в спектрах HMBC между аномерным протоном (5,32 м.д.) остатка фукозы А и C3 (73,9 м.д.) остатка В, а также H1 (5,34 м.д.) остатка С и C3 (75,2 м.д.) остатка D, указывают на наличие 1 $\rightarrow$ 3-О-гликозидных связей между остатками фукозы. Отношение интегральной интенсивности протонов H1 остатков А и С составило 1:0,5.

Таблица 4.27 – Химические сдвиги (м.д.) в ЯМР-спектрах фракции продуктов расщепления фукоидана из *F. evanescens* фукоиданазой FFA

Остатки фукозы	¹ H/ ¹³ C химические сдвиги (м.д.)					
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
A α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→3	5,32/95,3	4,45/76,4	4,08/69,9	3,88/73,3	4,22/67,1	1,23/16,0
B →3)- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)	5,48/91,7	4,50/74,6	4,02/73,9	4,06/68,6	4,47/67,9	1,22/16,1
C α -L-Fucp(2,3OSO ₃ ⁻)-(1→3	5,34/96,4	4,56/73,6	4,70/76,2	4,21/71,7	4,53/67,8	1,24/16,3
D →3)- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)	5,50/91,7	4,51/74,6	4,03/75,2	4,08/70,5	4,48/67,8	1,23/16,2

Таким образом, выделенный нами продукт представлял собой смесь дисахаридов следующей структуры: α -L-Fucp(2OSO₃⁻)-(1→3)- α -L-Fucp(2OSO₃⁻) и α -L-Fucp(2,3OSO₃⁻)-(1→3)- α -L-Fucp(2OSO₃⁻) в молярном соотношении 2:1 соответственно (рис. 4.45).

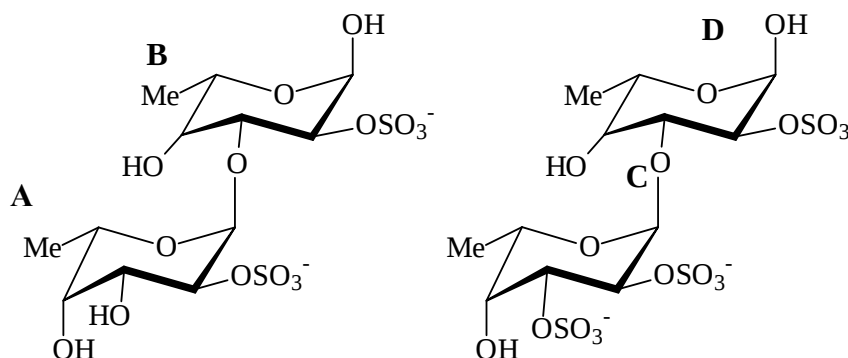


Рисунок 4.45 – Структуры продуктов расщепления фукоидана под действием фукоиданазы FFA.

4.2.5 Рекомбинантные фукоиданазы из морской бактерии *Formosa algae*

Геном типового штамма бактерии *F. algae* KMM 3553^T был секвенирован для поиска генов, кодирующих фукоиданазы, гомологичные известным фукоиданазам из морской бактерии *M. fucanivorans* - FcnA (GenBank CAI47003.1), из *Alteromonas* sp. SN-1009 - Fda1 (GenBank AAO00508.1) и Fda2 (GenBank AAO00509.1) и из *Shewanella violacea* DSS12 - SVI_0379 (GenBank BAJ00350.1), что позволило обнаружить гены *ffa1* (WP_057784217.1) и *ffa2* (WP_057784219.1).

Расчетные массы продуктов генов *ffa1* и *ffa2* составили 111 кДа (1008 а.о.) и 97,9 кДа (890 а.о.) соответственно. Множественное выравнивание полученных аминокислотных последовательностей FFA1 и FFA2 было проведено при помощи сервиса Clustal Omega EMBL-EBI и показало 57 % их идентичности. Анализ аминокислотных последовательностей FFA1 и FFA2 показал высокую степень идентичности с уже известной фукоиданазой FcnA из морской бактерии *M. fucanivorans* (GenBank номер CAI47003.1), которая составила 67% и 57% соответственно. Меньшая идентичность FFA1 и FFA2 наблюдалась при их сравнении с аминокислотными последовательностями других известных фукоиданаз: из *Alteromonas* sp. SN-1009 (Fda1 (GenBank AAO00508.1) и Fda2 (GenBank AAO00509.1)) и из *Shewanella violacea* DSS12 (SVI_0379 (GenBank BAJ00350.1)). Гипотетическая последовательность последней была установлена при прогнозировании функции генов по гомологии нуклеотидных последовательностей (табл. 4.28).

Анализ аминокислотных последовательностей FFA1, FFA2 и других известных фукоиданаз выявил общие для этих ферментов консервативные участки, что позволило отнести FFA1 и FFA2 к 107 семейству гликозид гидролаз (CAZy), в которое входят четыре фукоиданазы.

Таблица 4.28 – Идентичность аминокислотных последовательностей фукоиданаз FFA1, FFA2, FcnA, Fda1, Fda2, SVI_0379

Фукоиданаза (источник)	Степень идентичности, %					
	FFA1	FFA2	FcnA	SVI_03937	Fda1	Fda2
FFA1 (<i>F. algae</i> KMM 3553)	100	57,05	56,26	21,05	18,45	19,39
FFA2 (<i>F. algae</i> KMM 3553)	57,05	100	66,77	20,30	18,22	20,00
FcnA (<i>M. fucanivorans</i> SW-5)	56,26	66,77	100	21,40	19,76	21,00
SVI_03937 (<i>S. violacea</i> DSS12)	21,05	20,30	21,40	100	31,65	30,76
Fda1 (<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009)	18,4	18,22	19,76	31,65	100	71,18
Fda2 (<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009)	19,39	20,00	21,00	30,76	71,18	100

В некоторых консервативных участках фукоиданаз нами были обнаружены точечные замены аминокислотных остатков. В одном из консервативных участков фукоиданаз FFA1, FFA2 и FcnA были выявлены остатки аминокислот Ala308 и Cys310, в то время как в последовательностях Fda1, Fda2 и SVI_03739 содержались Gly308 и Trp310 (рис. 4.46). Известно, что фукоиданазы FFA1, FFA2 и FcnA катализируют гидролиз α -1→4-О-гликозидных связей, в то время как Fda1, Fda2 и, вероятно, SVI_03739 расщепляют α -1→3-О-гликозидные связи в молекулах фукоиданов. Возможно, эти замены связаны со специфичностью фукоиданаз либо к α -1→4-, либо к α -1→3-О-гликозидным связям.

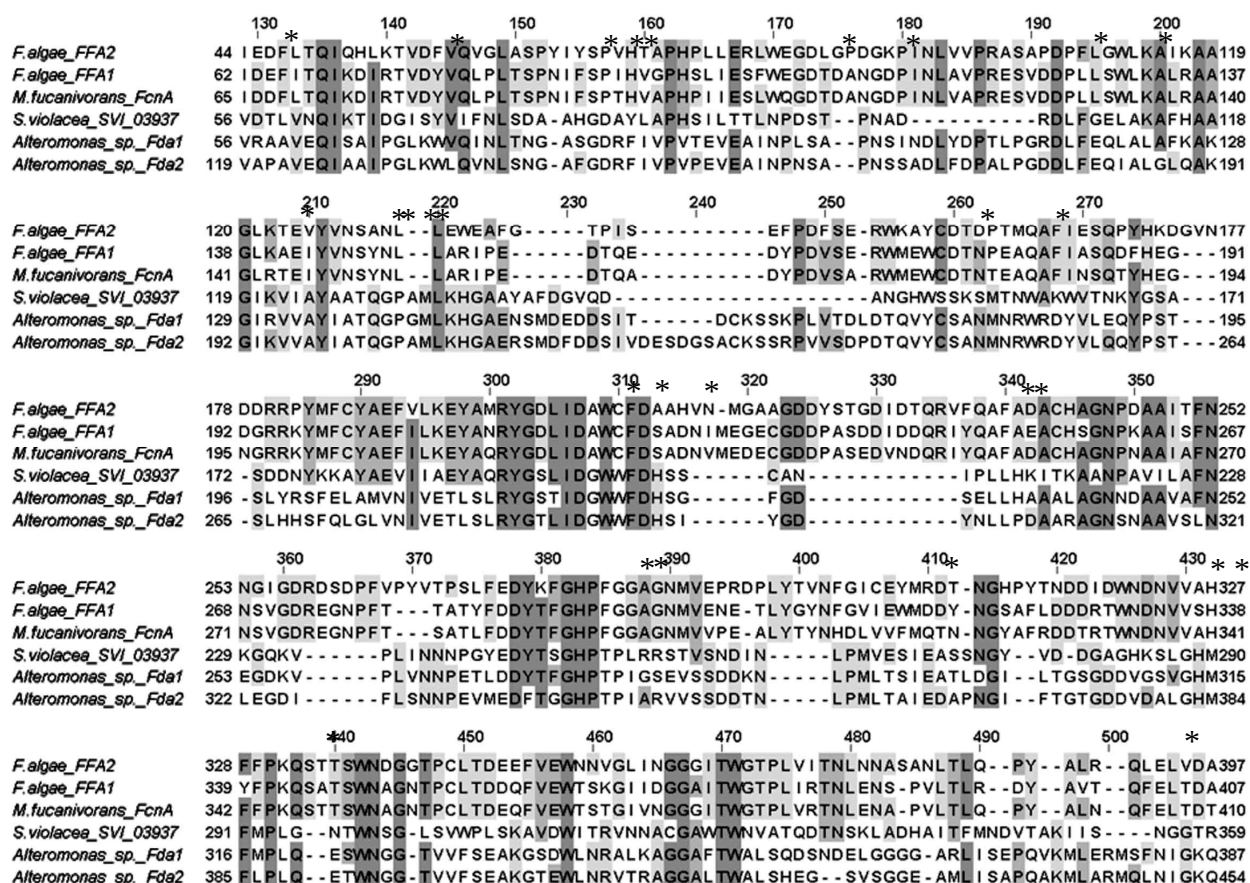


Рисунок 4.46 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей фукоиданаз из *F. algae* KMM 3553 (FFA1, FFA2), *M. fucanivorans* SW5 (FcnA), *Alteromonas* sp. SN-1009 (Fda1 и Fda2), *Shewanella violacea* DSS12 (SVI_03739); * - точечные замены а.о. в консервативных участках

При помощи сервиса InterProScan обнаружена сигнальная последовательность у FFA1 (Met1-Gln26), которая характерна для внеклеточных белков, в то время как у FFA2 такая последовательность отсутствовала.

Для подтверждения прогнозируемой функции генов *ffa1* и *ffa2* были получены рекомбинантные продукты этих генов. Генетические конструкции содержали нуклеотидные последовательности, кодирующие полноразмерные фукоиданазы FFA1 (Ile27 – Asn1008) и FFA2 (Val9 – Asn890), а также последовательность, кодирующую полигистидиновый участок (6×His) и участок для расщепления Tev-протеазой.

В качестве систем для экспрессии генов *ffa1* и *ffa2* были использованы различные коммерческие штаммы *E. coli*: BL21 star (DE3)pLysS, Rosetta-gami (DE3)pLysS, BL21 (DE3)GroEL. Все рекомбинантные белки экспрессировались только в растворимой форме. Наилучшим штаммом-продуцентом рекомбинантных фукоиданаз оказался штамм *E. coli* BL21 star (DE3)pLysS. Наибольшее содержание целевых рекомбинантных белков для всех исследованных штаммов наблюдалось при температуре культивирования +20° С (рис. 4.47).

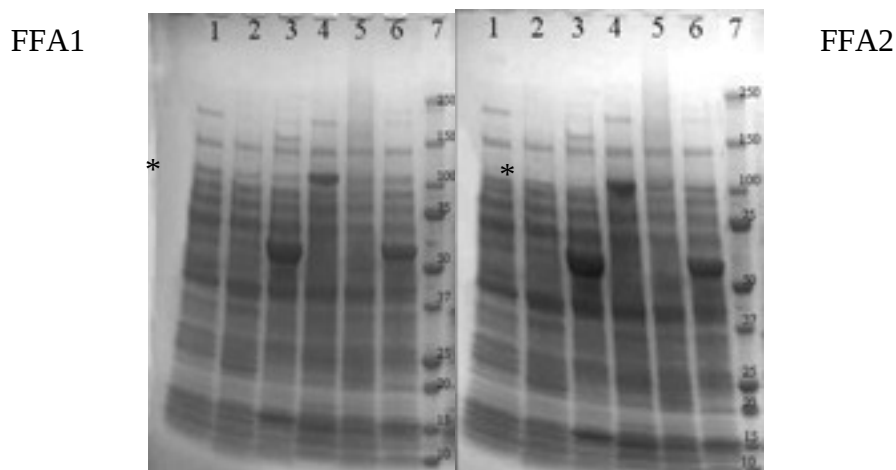


Рисунок 4.47 – SDS электрофорез растворимых фракций экстрактов штаммов BL21 star (DE3)pLysS (1, 4), Rosetta-gami (DE3)pLysS (2,5), BL21 (DE3)GroEL (3, 6) при различных температурах культивирования (1-3 – +37 °С; 4-6 – +20 °С), содержащих вектора pCold-TevII со вставками нуклеотидных последовательностей, кодирующих FFA1 и FFA2. 7 – Маркеры молекулярных масс белков (кДа).

4.2.5.1 Рекомбинантная фукоиданаза FFA2

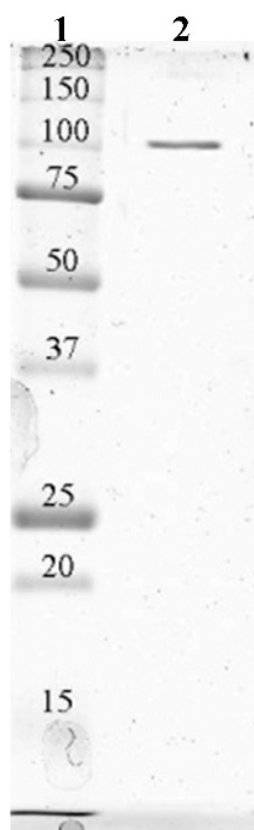


Рисунок 4.48 – SDS-электрофорез очищенной фукоиданазы FFA2 в 12 % ПААГ.
1 – Маркеры молекулярной массы белков, 2 – фукоиданаза FFA2.

Фукоиданаза FFA2 была очищена до гомогенного состояния (рис. 4.48) [265]. Молекулярная масса по данным электрофореза составила 100 кДа. Теоретически полученная молекулярная масса, исходя из нуклеотидной последовательности – 101,2 кДа.

В качестве субстрата был использован фукоидан, выделенный из бурой водоросли *F. evanescens* (О его структуре см. раздел 2.4). FFA2 проявляла активность в широком диапазоне pH от 6,5 до 9, и при температуре от 25 до 37 °C. FFA2 активировалась ионами Ca^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} (рис. 4.49 А), ионы Al^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} и Fe^{3+} оказывали ингибирующее действие. Необходимо отметить, что FFA2 проявляла активность только в

присутствии ионов Ca^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} , добавление ЭДТА и последующее обессоливание приводило к полной инаktivации фукоиданазы FFA2. Как и нативная фукоиданаза из *F. algae*, рекомбинантная FFA2 катализировала расщепление фукоидана из *F. evanescens* и не действовала на фукоиданы, выделенные из *S. cichorioides* и *U. pinnatifida* (рис. 4.49 Б).

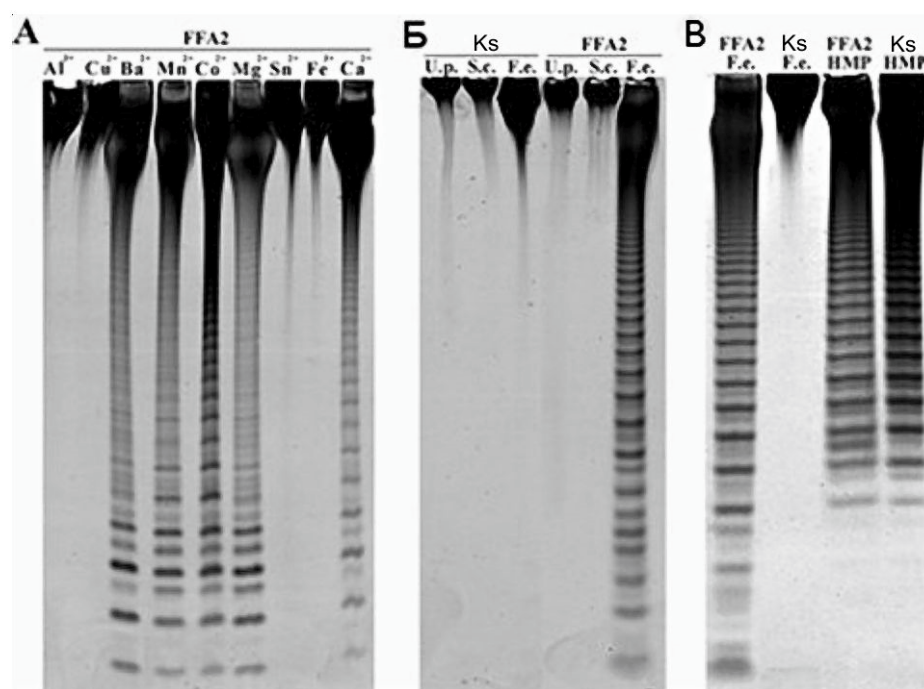


Рисунок 4.49 – Влияние различных ионов на активность фукоиданазы FFA2 (А), электрофореграмма продуктов гидролиза фукоиданов из *F. evanescens* (F.e.), *S. cichorioides* (S.c.), *U. pinnatifida* (U.p.) (Б), электрофореграмма высокомолекулярных продуктов реакции FFA2 с фукоиданом из *F. evanescens* и высокомолекулярной фракцией продуктов (В), Ks – нативный субстрат.

Как и при исследовании других фукоиданаз, высокомолекулярные продукты реакции (ВМФ) отделяли от низкомолекулярных (НМФ) осаждением 75% водным этанолом.

HSQC спектр ВМФ показал наличие двух типов остатков L-фукопираноз А и В (рис. 4.50). α -Конфигурация гликозидных связей подтверждается характерным значением константы $J_{1,2}$ - 3,4-3,5 Hz. HMBC спектр ВМФ показал, что остаток фукозы А связан с О-3 остатка В (корреляционный пик Н1 (А)/С3 (В) при 5,39/74,0 м.д.), а остаток В связан с О-4 остатка А (корреляционный пик Н1 (В)/С4 (А) при 5,35/83,5 м.д.) (рис. 4.51).

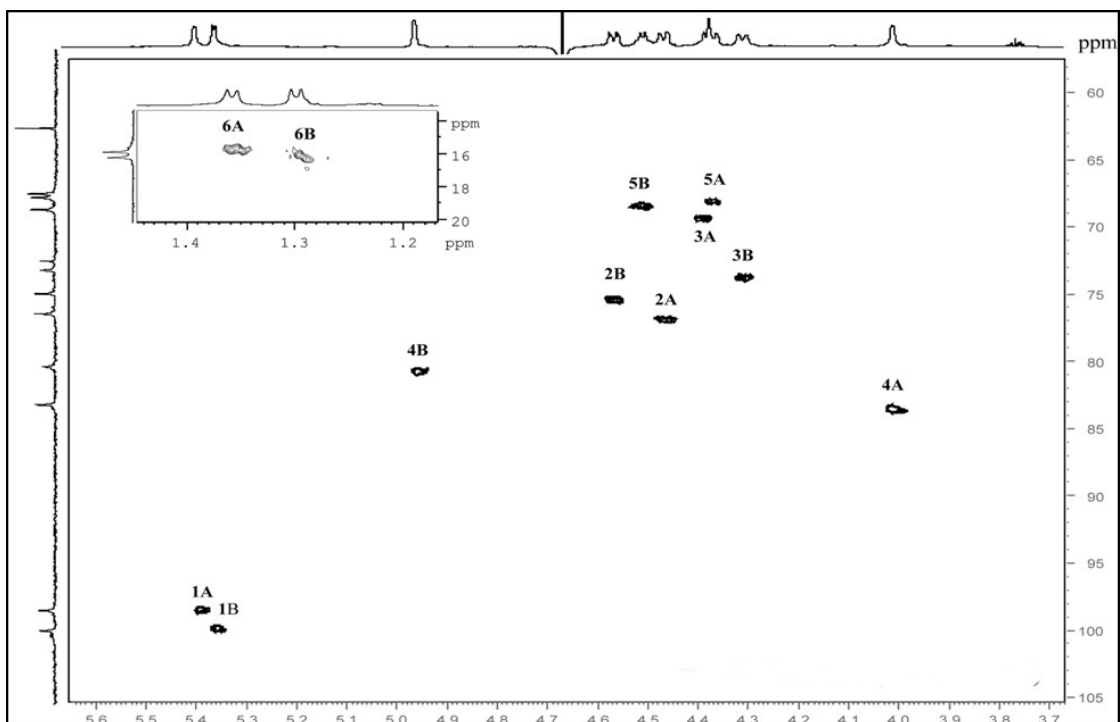


Рисунок 4.50 – HSQC спектр ВМФ, полученной действием FFA2 на фукоидан из *F. evanescens*.

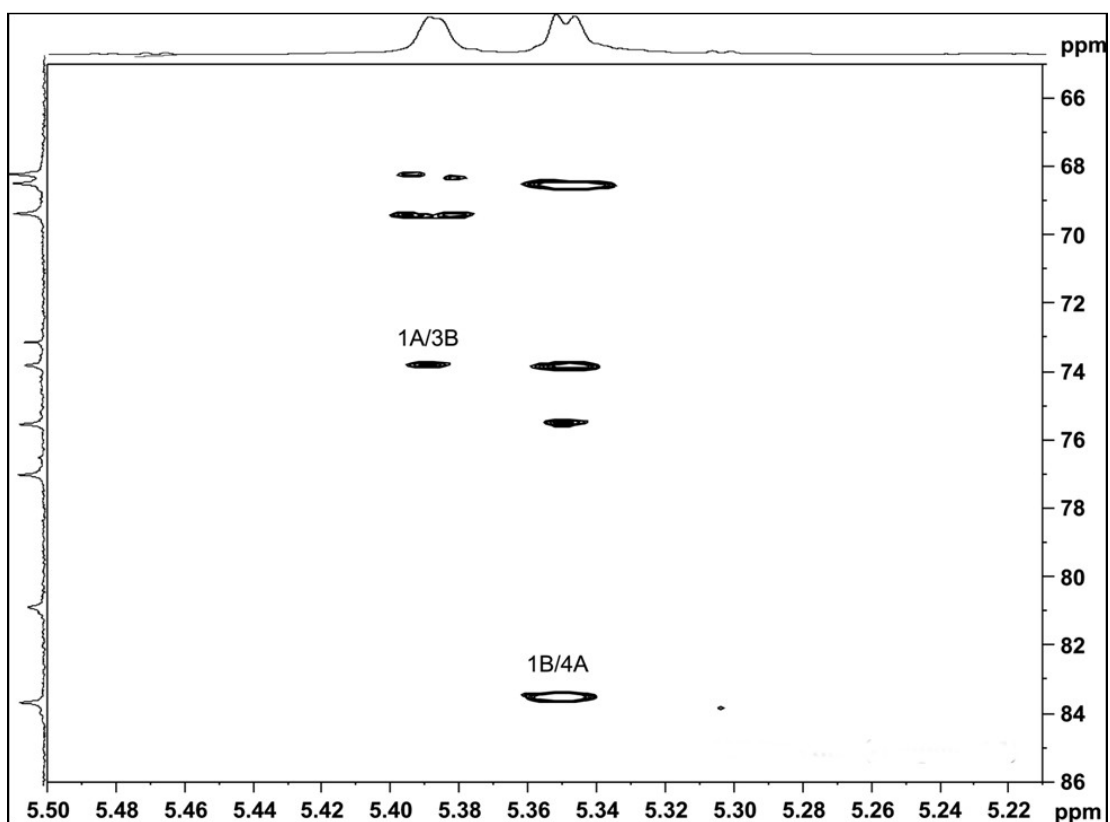


Рисунок 4.51 – HMBC спектр ВМФ, полученной действием FFA2 на фукоидан из *F. evanescens*.

Позиция сульфатных групп была определена при анализе COSY спектров. Сдвиг сигналов H2 в низкое поле (δ 4,46 м.д.) свидетельствует о наличии сульфатной группы при C2 остатка фукозы **A**, остаток фукозы **B** сульфатирован по двум положениям C2 и C4 (δ H2 4,55 м.д., δ H4 4,95 м.д.). Степень полимеризации составила 40 моносахаридных остатков и была определена путем сравнения интенсивности сигналов аномерных протонов остатков **A** и **B** и восстанавливающих концов молекулы в спектре ЯМР ^1H . Химические сдвиги ВМФ приведены в таблице 4.29. Таким образом, ВМФ представляет собой регулярный сульфатированный полисахарид, фрагмент структуры которого изображен на рисунке 4.52.

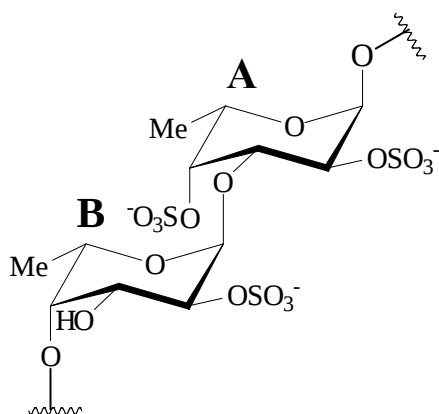


Рисунок 4.52 – Структура высокомолекулярной фракции, полученной действием FFA2 на фукоидан из *F. evanescens*.

Высокомолекулярная фракция была устойчива к действию FFA2: добавление новых порций фермента и увеличение времени инкубации не приводили к образованию каких-либо продуктов реакции. Образование такой фракции свидетельствует о наличии в молекуле фукоидана из *F. evanescens* фрагмента, построенного из 2,4-ди-О-сульфатированных-(1→3)- и 2-О-сульфатированных-(1→4)-связанных остатков фукозы. Вероятно, 2,4-ди-О-сульфатированные остатки фукозы делают недоступными для действия фермента соседние 1→4 гликозидные связи. Идентификация таких блоков в молекуле фукоидана была бы практически невозможна без применения фермента, а полученная информация о структуре была

бы неполной. Таким образом, использование фукоиданазы позволило получить новую информацию о структуре фукоидана из *F. evanescens*.

Таблица 4.29 – Химические сдвиги (м.д.) в ЯМР-спектрах фракций продуктов расщепления фукоидана из *F. evanescens* фукоиданазой FFA2

Фракция/фрагмент структуры	¹ H/ ¹³ C химические сдвиги (м.д.)					
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
ВМФ						
A →4)- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→	5,39/98,6	4,46/77,1	4,36/68,4	4,01/83,5	4,39/69,7	1,38/16,8
B →3)- α -L-Fucp(2,4OSO ₃ ⁻)-(1→	5,35/99,6	4,55/75,7	4,30/74,0	4,95/81,0	4,50/68,7	1,32/17,1
фракция FFA2p1						
A' α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→	5,35/95,0	4,47/76,6	4,11/68,8	3,89/73,2	4,51/68,0	1,25/16,8
B' →3)- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→	5,29/100,6	4,60/74,7	4,18/73,5	4,12/70,0	4,41/68,6	1,26/16,5
C' →4)- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→	5,34/95,3	4,49/76,7	4,19/69,0	4,00/83,8	4,52/68,9	1,39/16,6
D' →3)- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)	5,49/91,8	4,52/74,7	4,05/73,9	4,08/69,9	4,23/67,1	1,24/16,7

Выход НМФ составил 55%. Увеличение времени инкубирования и добавление новых порций фермента не приводило к увеличению выхода низкомолекулярных продуктов. Низкомолекулярную фракцию продуктов разделяли с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-MacroPrep, в результате чего была получена одна основная фракция (FFA2p1). Выход составил 12,9 % от общего содержания сахаров в НМФ. Структуру полученных продуктов анализировали с помощью ЯМР-спектроскопии. HSQC-спектр фракции FFA2p1 содержал в аномерной области четыре корреляционных пика, соответствующих разным остаткам α -фукопиранозы **A'**, **B'**, **C'** и **D'** (рис. 4.53).

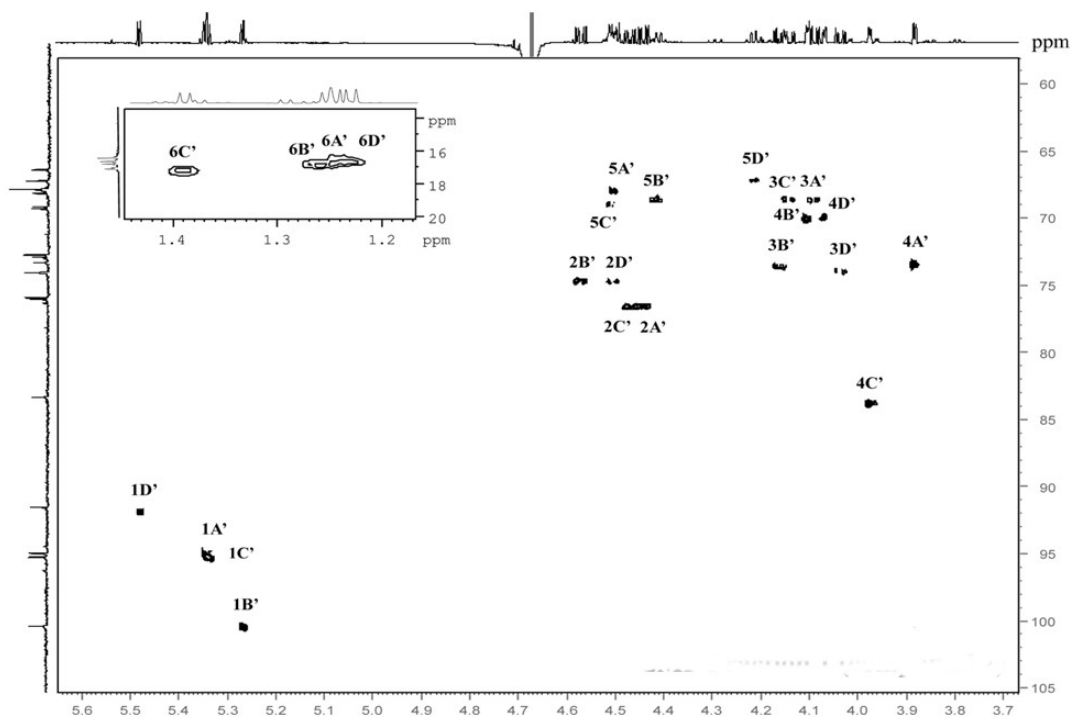


Рисунок 4.53 – HSQC спектр фракции FFA2p1, полученной под действием FFA2 на фукоидан из *F. evanescens*.

Три корреляционных пика в HMBC спектре свидетельствовали о наличии связей между остатками фукозы: Н 1(A')/C3 (B') при 5,35/73, м.д., Н1 (B')/C4 (C') при 5,29/83,8 м.д. и Н1 (C')/C3 (D) при 5,34/73,9 м.д. (рис. 4.54).

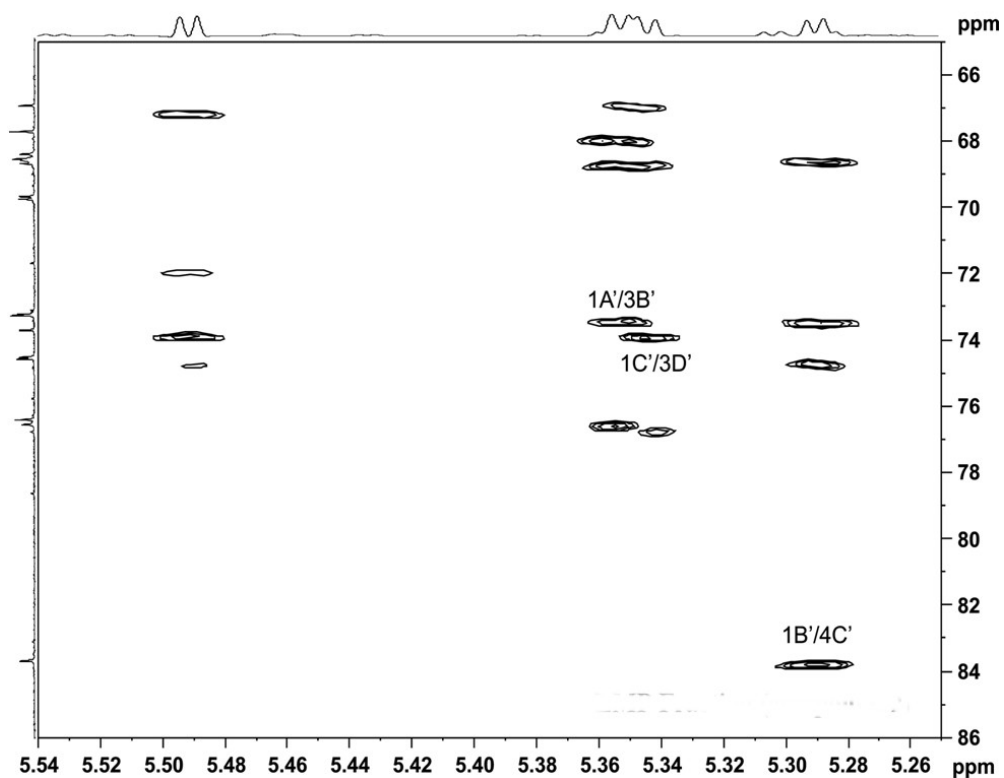


Рисунок 4.54 – HMBC спектр фракции FFA2p1, полученной под действием FFA2 на фукоидан из *F. evanescens*.

Анализ COSY спектра показал наличие сульфатных групп при C2 всех остатков фукопираноз (δ_{H2} –4,47; 4,60; 4,49; 4,52 м.д. для остатка **A'**, **B'**, **C'** и **D'** соответственно). Отнесение всех сигналов представлено в таблице 4.32. Таким образом, фракция FFA2p1 представляет собой линейный тетрасахарид, состоящий из остатков α -L-фукопираноз, сульфатированных при C2 и соединенных между собой чередующимися 1→3 и 1→4 гликозидными связями (рис. 4.55).

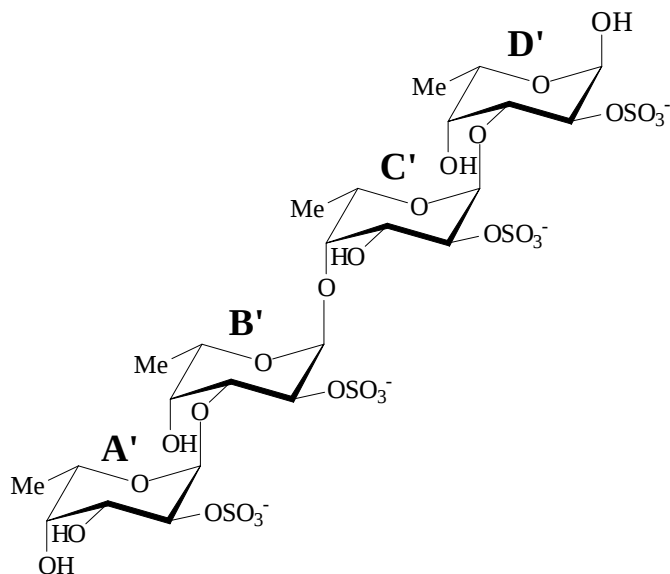


Рисунок 4.55 – Структура продукта FFA2p1 полученного из фукоидана из *F. evanescens* под действием FFA2.

Анализ кинетики гидролиза фукоидана из *F. evanescens* рекомбинантной фукоиданазой FFA2 был проведён с помощью методов гель-фильтрации, С-PAGE и ТСХ. Было показано, что FFA2 катализирует гидролиз фукоидана с образованием на ранних стадиях ферментативного процесса широкого набора поли- и олигосахаридов различной степени полимеризации (рис. 4.56). Появление низкомолекулярных продуктов реакции (НМФ) с молекулярной массой 3,8-4,6 кДа было зафиксировано через 45 минут после начала реакции (рис. 4.56 А). С помощью электрофореза продуктов реакции было показано, что широкий набор сульфатированных фрагментов фукоидана образуется всего через несколько минут начала реакции (рис. 4.56 Б). Увеличение времени инкубации привело к перераспределению продуктов ферментативного расщепления фукоидана и образованию низкомолекулярных продуктов вплоть до дисахаридов. Конечными

продуктами расщепления фукоидана являются сульфатированные тетра- и дисахариды, образование которых было зафиксировано через 15 минут и 3 ч соответственно (рис. 4.56 Б, В).

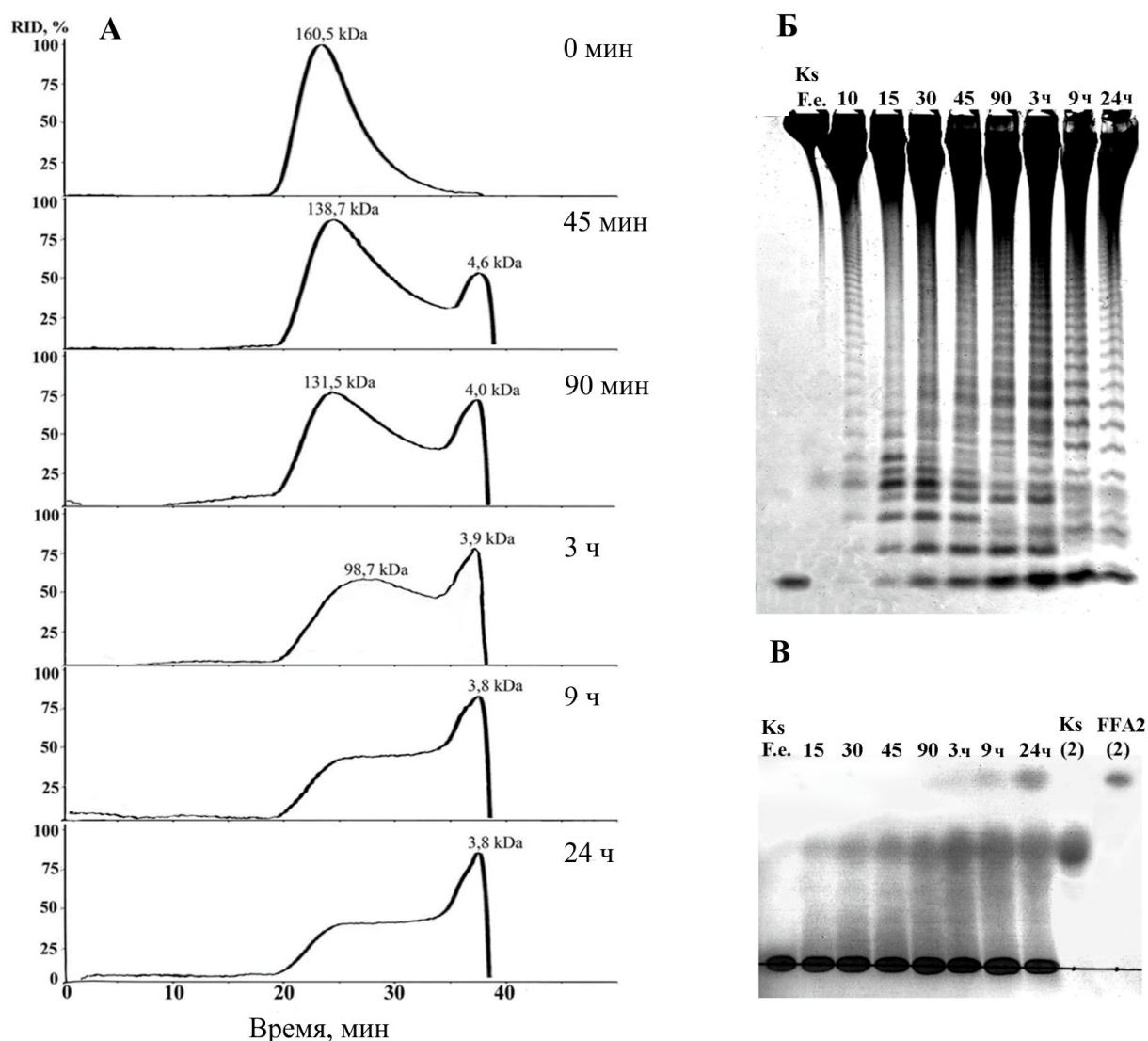


Рисунок 4.56 – Гидролиз фукоидана из *F. evanescens* рекомбинантной фукоиданазой FFA2. Анализ продуктов ферментативного расщепления фукоидана методом гель-фильтрации (А), электрофореза (Б), ТСХ (В).

KsF.e. – контроль субстрат; 1 – тетрасахарид (далее соединение 1); 2 – дисахарид (далее соединение 7) – продукт действия FFA2 на тетрасахарид

Для установления тонкой субстратной специфичности фукоиданазы FFA2 были использованы синтетические сульфатированные фукоолигосахариды 2, 3, 6, 8, 10 (рис. 4.57, 4.58), соответствующие фрагментам фукоидана из *F. evanescens*.

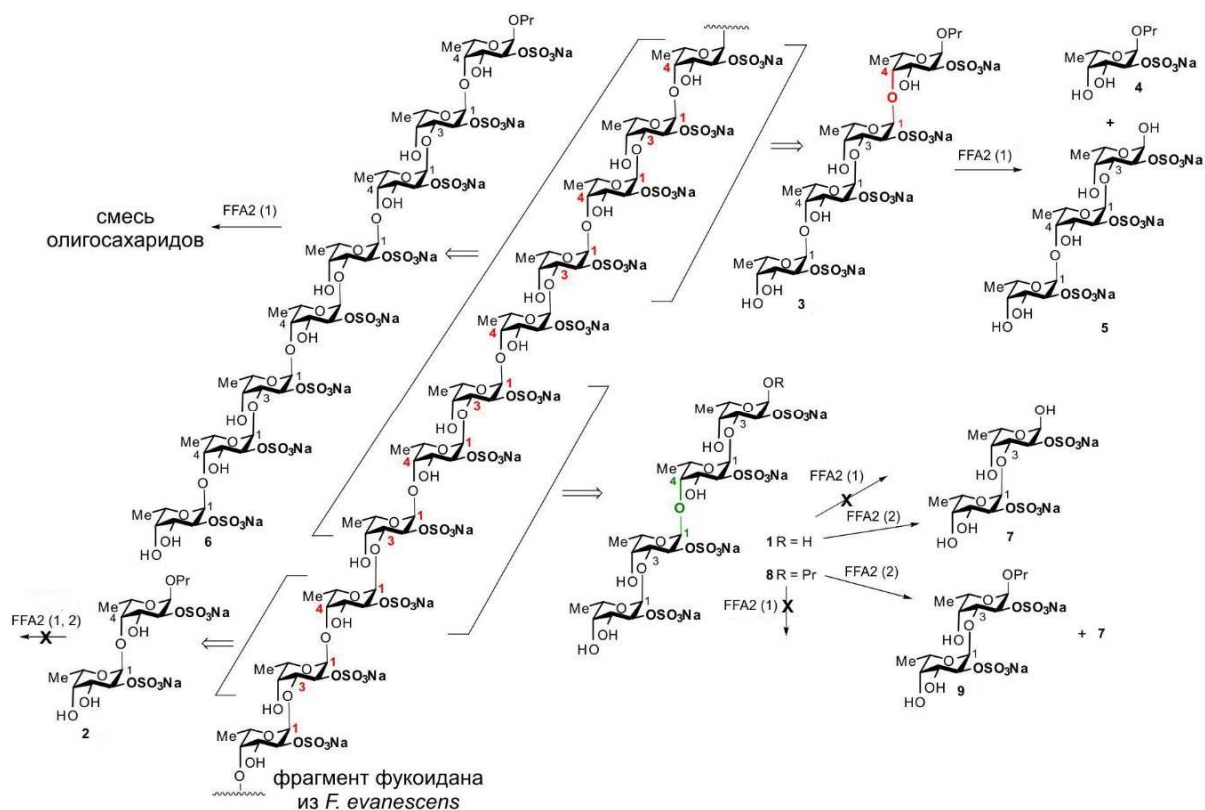


Рисунок 4.57 – Трансформация синтетических олигосахаридов под действием фукоиданазы FFA2 в концентрации 0,01 (1) и 0,05 (2) мг/мл.

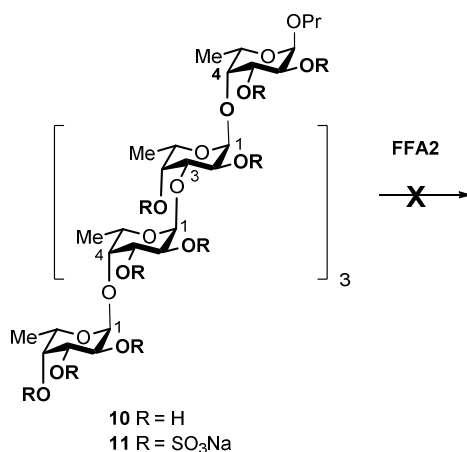


Рисунок 4.58 – Действие FFA2 на октасахариды 10 и 11.

Анализ продуктов ферментативной реакции с помощью тонкослойной хроматографии показал, что 1→4-связанный дисахарид 2 не подвергался действию

FFA2 (рис. 4.59). Синтетический тетрасахарид **3** подвергался действию фермента и через 24 ч образовывалась смесь, содержащая эквимольные количества моносахарида **4** и трисахарида **5**. Эти продукты были идентифицированы с помощью ЯМР-спектроскопии (рис. 4.60).

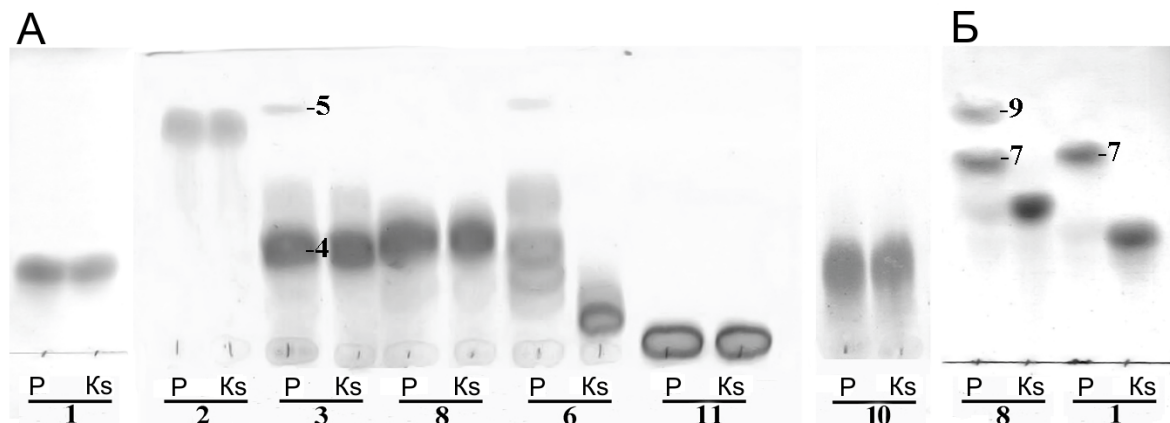


Рисунок 4.59 – ТСХ продуктов деградации синтетических фукоолигосахаридов разной концентрации (А) – 0,01 мг/мл, (Б) – 0,05 мг/мл фукоиданазой FFA2. **P** – реакция, **Ks** – контроль субстрат. Номера соединений соответствуют соединениям на рисунках 4.57 и 4.58.

Несульфатированные и пер-О-сульфатированные октасахариды **10** и **11** соответственно, не подвергались действию фермента, в то время как октасахарид **6**, построенный из остатков сульфатированной по С2 α -L-фукозы, связанных чередующимися 1→3- и 1→4 гликозидными связями расщеплялся с образованием смеси моно- и олигосахаридов (рис. 4.57). Следует отметить, что скорость гидролиза октасахарида **6** была значительно выше, чем тетрасахарида **3**. Возможно активный центр вмещает пять и более моносахаридных остатка фукозы.

Примечательно, что скорость ферментативного гидролиза тетрасахарида **1** и синтетического сульфатированного тетрасахарида **8** была значительно ниже, чем тетрасахарида **3**. Тетрасахариды **1** и **8** подвергались действию FFA2 только при увеличении концентрации фермента в пять раз и увеличении времени инкубации до 72 часов. В этом случае, в качестве продуктов образовывались сульфатированные дисахариды **9** и **7** (рис. 4.57).

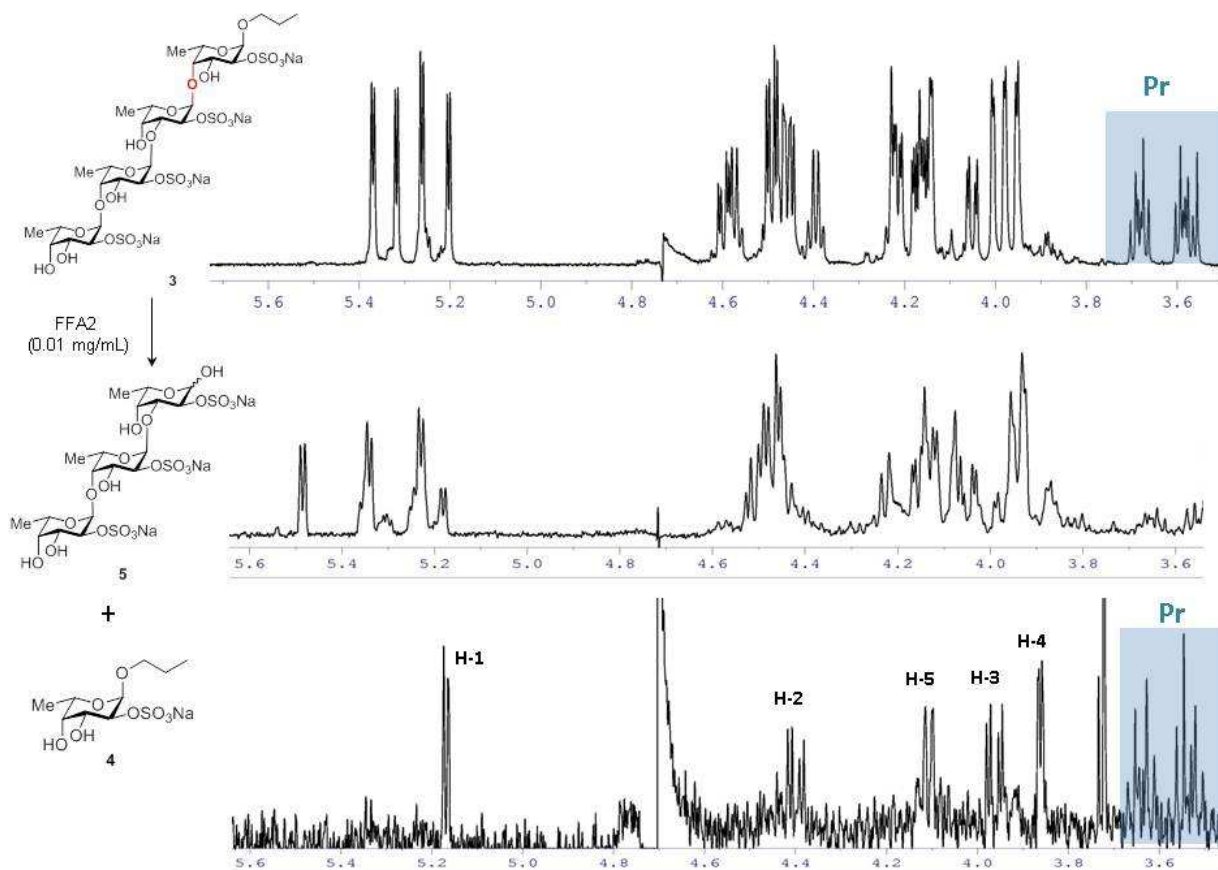


Рисунок 4.60 – ^1H ЯМР-спектр тетрасахарида **3** и продуктов его ферментативного гидролиза **4** и **5**.

Таким образом, наименьшим продуктом гидролиза являются сульфатированные дисахариды, что отличает FFA2 от внеклеточной фукоиданазы FcpA, выделенной из морской бактерии *M. fucanivorans*, при действии которой наименьшие продукты - сульфатированные тетрасахариды [185].

Несульфатированные и сполна сульфатированные олигосахариды не подвергались действию фукоиданазы FFA2, что говорит о важности 2-О-сульфатированных остатков фукозы для образования фермент-субстратного комплекса. Интересно отметить, что при гидролизе синтетических олигосахаридов среди продуктов реакции была обнаружена О-пропил-2-сульфо- α -L-фукопираноза, в то время как сульфатированная фукоза отсутствовала. Вероятно, FFA2 атакует субстрат ближе к восстанавливающему концу молекулы. Следует отметить, что скорость ферментативного гидролиза зависит от степени полимеризации: октасахарид **7** расщеплялся гораздо быстрее, чем тетрасахарид **4**. Такая

особенность характерна для полисахарид-гидролаз: скорость реакции возрастает с увеличением степени полимеризации субстрата. Порядок гликозидных связей также оказывает влияние на скорость реакции: тетрасахариды **2** и **9** подвергались действию фермента значительно хуже, чем тетрасахарид **4**, имеющий другой порядок гликозидных связей.

Таким образом, рекомбинантная фукоиданаза FFA2 является ферментом эндотипа действия и катализирует расщепление α -1 $\rightarrow$ 4- гликозидных связей в молекуле фукоидана из *F. evanescens* внутри фрагмента следующей структуры: [$\rightarrow$ 3)- α -L-Fucp2OSO₃-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Fucp(2OSO₃)-(1 $\rightarrow$)]_n, в то время как α -1 $\rightarrow$ 4- гликозидные связи во фрагменте [$\rightarrow$ 3)- α -L-Fucp(2,4OSO₃)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Fucp(2OSO₃)-(1 $\rightarrow$)] не подвергались действию фермента.

4.2.5.2 Рекомбинантная фукоиданаза FFA1

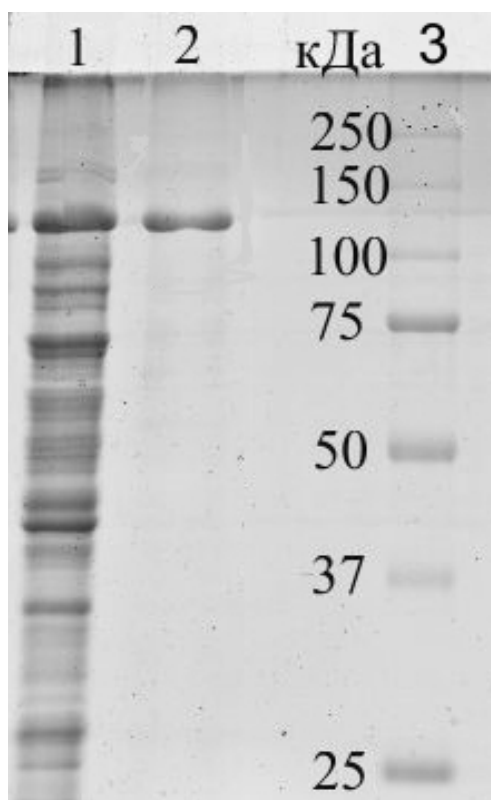


Рисунок 4.61 – SDS-Электрофорез очищенной фукоиданазы FFA1 в 12 % ПААГ. **1** – Экстракт, **2** – фукоиданаза FFA1, **3** – маркеры молекулярной массы белков.

Фукоиданаза FFA1 была очищена до гомогенного состояния (рис. 4.61). По результатам электрофореза молекулярная масса составила 120 кДа, расчётная, исходя из нуклеотидной последовательности гена – 111 кДа.

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов на ферментативную активность фукоиданазы FFA1 показало, что наиболее эффективными активаторами для FFA1 служили ионы Ca²⁺ и Ba²⁺, ионы Mg²⁺ активировали фукоиданазу в меньшей степени (рис. 4.62). Ионы Zn²⁺ и Cu²⁺ не активировали фукоиданазу.



Рисунок 4.62 – Влияние ионов металлов на активность рекомбинантной фукоиданазы FFA1



Рисунок 4.63 – Электрофореграмма продуктов расщепления фукоиданов различной структуры фукоиданазой FFA1.

Ks – контроль субстрат, U.p. – фукоидан из *U. pinnatifida*, F.e. – фукоидан из *F. evanescens*, S.c. – фукоидан из *S. cichorioides*.

Следует отметить, что ионы Co^{2+} и Mn^{2+} , которые являлись активаторами фукоиданазы FFA2, не активировали FFA1. pH- Оптимум фукоиданазы FFA1 лежал в области 6,5 – 8, что характерно для ферментов морского происхождения.

Специфичность рекомбинантной фукоиданазы FFA1 была изучена на серии фукоиданов различной структуры (рис. 4.63). Фермент с высокой скоростью гидролизировал фукоидан из *F. evanescens*, цепь которого построена из чередующихся α -1 $\rightarrow$ 3- и α -1 $\rightarrow$ 4-связанных остатков сульфатированной фукозы, а также фукоидан из *Sargassum horneri*. Фукоиданы из *S. cichorioides* и *U. pinnatifida*, содержащие в своем составе только α -1 $\rightarrow$ 3-связанные остатки сульфатированной фукозы, ферментативному гидролизу не подвергались.

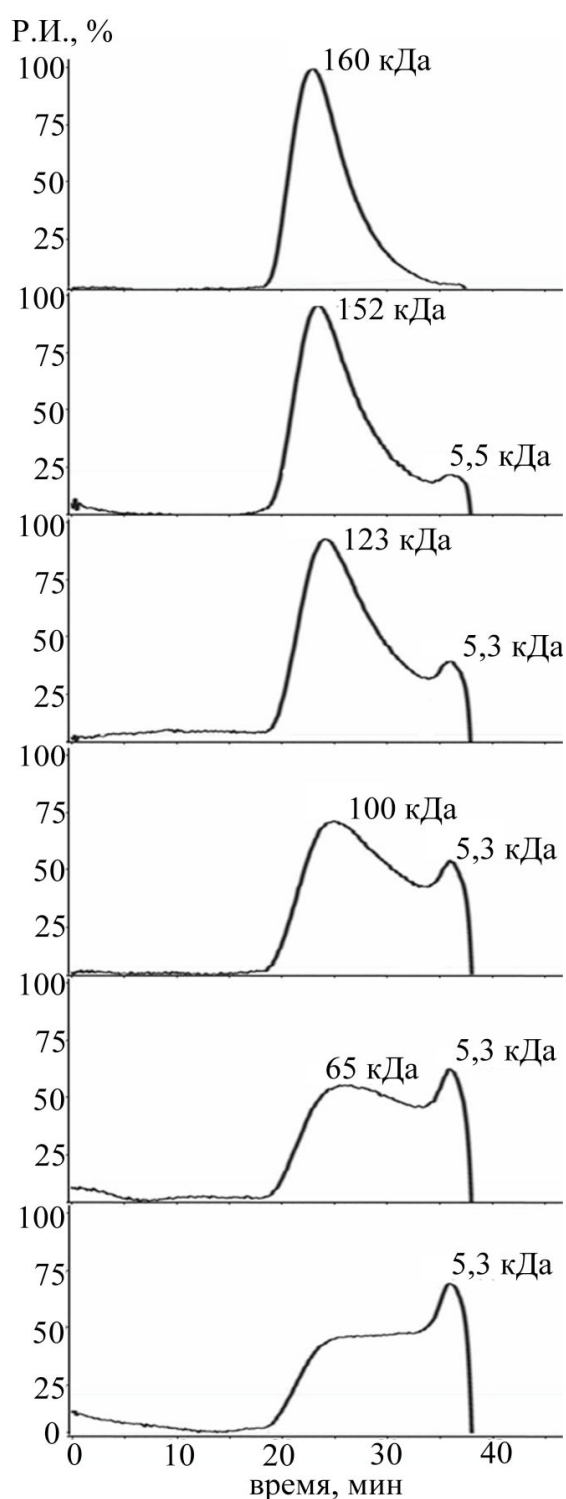


Рисунок 4.64 – Гель-фильтрация продуктов расщепления фукоидана из *F. evanescens* фукоиданазой FFA1.

Анализ кинетики расщепления фукоидана из *F. evanescens* рекомбинантной фукоиданазой FFA1 с помощью гель-фильтрации (рис. 4.64), показал значительное уменьшение молекулярной массы фукоидана в ходе ферментативной реакции. При действии FFA1 на фукоидан образуется набор сульфатированных фукоолигосахаридов, имеющих различные молекулярные массы (рис. 4.63). Молекулярно-массовое распределение имеет довольно широкий диапазон, однако в результате реакции пик, соответствующий нативному фукоидану, практически исчезает (рис. 4.64). Сульфатированная фукоза в продуктах не была обнаружена. Таким образом, FFA1 является ферментом эндо-типа действия.

Исследование структуры высокомолекулярных продуктов реакции, полученных способом, который использовался при изучении фукоиданазы FFA2, показал, что в результате реакции образуется фрагмент фукоидана, идентичный полученному в реакции с FFA2. ЯМР-спектры ВМФ, полученной в результате действия FFA1 на фукоидан из *F.*

evanescens, позволили сделать вывод, что ВМФ имеет структуру, которая изображена на рис. 4.52.

Среди низкомолекулярных продуктов реакции основным оказался сульфатированный тетрасахарид, идентичный полученному в реакции фукоидана из *F. evanescens* с фукоиданазой FFA2.

Известно, что фукоиданы, выделенные из бурых водорослей рода Саргассум, отличаются чрезвычайной гетерогенностью, что усложняет и без того непростую задачу установления их структуры. Нами было обнаружено, что фукоиданаза FFA1 катализировала расщепление фукоидана из *S. horneri*. Были получены продукты ферментативного расщепления. Высокомолекулярные продукты ферментативного гидролиза, как и в случае с другими ферментами, отделялись от низкомолекулярных осаждением 75% этанолом. Выход низкомолекулярной фракции составил 56%. Далее низкомолекулярные продукты реакции были разделены с помощью ионообменной хроматографии. Основными низкомолекулярными продуктами оказались тетра- и гексасахариды. Их структура была установлена с помощью ЯМР-спектроскопии.

¹H-спектр тетрасахарида содержал сигналы, принадлежащие по разному замещённым остаткам α-L-фукопиранозы: A, B, C и D (табл. 4.30). С помощью спектров TOCSY и COSY были идентифицированы все сигналы, соответствующие протонам каждого моносахаридного остатка. На спектрах ROESY были выявлены корреляционные пики, указывающие на взаимодействие H1 остатка **D** и H4 остатка **C**, H1 остатка **C** и H3 остатка **C**, H1 остатка **B**, H3 и H4 остатка **D**. В спектре HMBC наблюдались корреляционные пики между C1 остатка **D** и H4 остатка **C**, C1 остатка **C** и H3 остатка **A**, C1 остатка **B** и H3 и остатка **D**. Аналогично протоны H1 остатков **D**, **C** и **B** коррелировали с атомами углерода C4 остатка **C**, C3 остатка **A** и C3 остатка **D** соответственно. На основании этого был сделан вывод, что олигосахарид имеет углеродный скелет α-L-Fucp-1→3-α-L-Fucp-1→4-α-L-Fucp-1→3-α-L-Fucp. Смещения H2 и H3 в слабое поле на 0,8-1 ppm относительно фукозы и C2 – на 4-6 ppm относительно α-метил-L-фукопиранозиды, говорит о том, что сульфатные группы находились в положении 2 и 3 остатков фукозы (рис. 4.65).

Таблица 4.30 – Химические сдвиги (м.д.) тетрасахарида, полученного из фукоидана *S. horneri*

Фрагмент структуры	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ химические сдвиги (м.д.)					
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
A $\rightarrow 3)$ - α -L-Fucp(2 OSO ₃ ⁻)	5,50/91,74	4,54/74,62	4,06/74,99	4,09/70,40	4,24/67,12	1,24/16,65
B α -L-Fucp(2,3OSO ₃ ⁻)-(1 $\rightarrow$	5,39/95,86	4,58/73,61	4,72/76,33	4,22/71,81	4,59/67,74	1,26/16,44
C $\rightarrow 4)$ - α -L-Fucp(2,3OSO ₃ ⁻)-(1 $\rightarrow$	5,37/96,32	4,65/73,68	4,76/75,16	4,27/80,54	4,57/69,07	1,41/16,85
D $\rightarrow 3)$ - α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1 $\rightarrow$	5,3099,93/	4,59/74,62	4,20/74,49	4,12/70,62	4,44/68,28	1,30/16,51

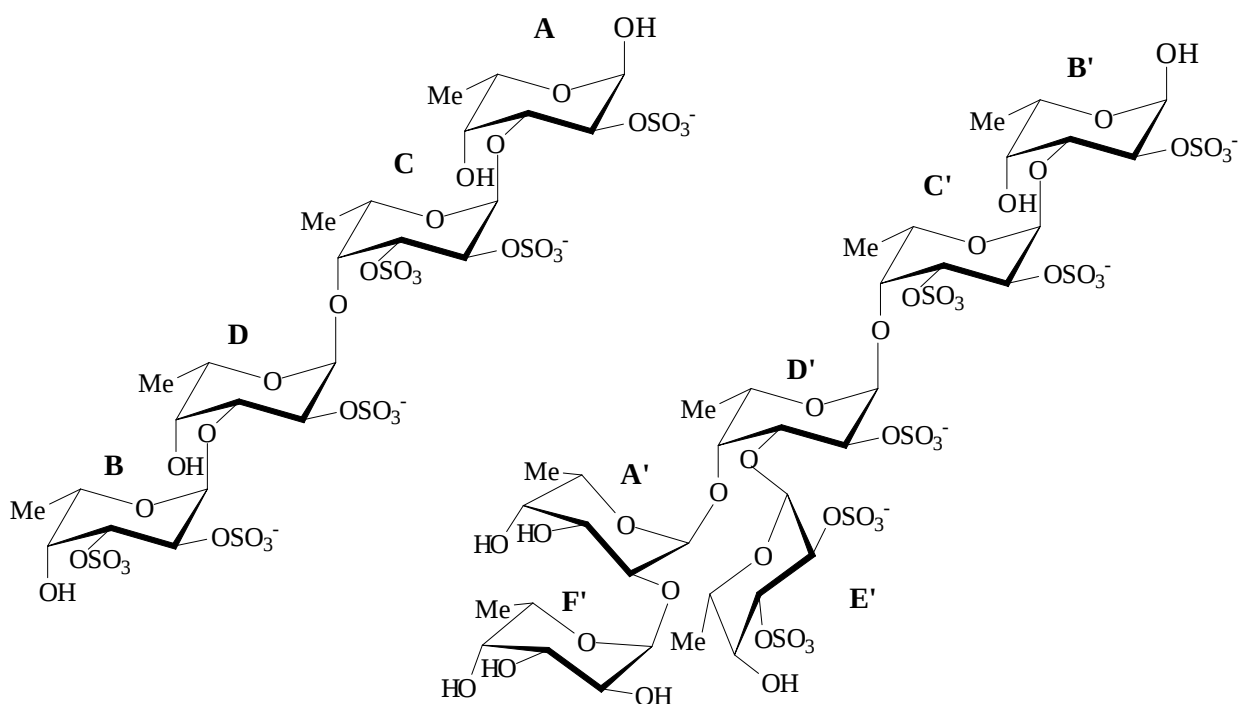


Рисунок 4.65 – Структура олигосахаридов – продуктов действия фукоиданазы FFA1 на фукоидан из *S. horneri*.

^1H -спектр гексасахарида показал наличие шести разных остатков α -L-фукопиранозы. Спектры TOXY, COSY и HSQC позволили отнести сигналы протонов и атомов углерода всех остатков фукозы (табл. 4.31).

На спектре ROESY наблюдалась корреляция между H1 остатка **A'** и H4 остатка **D'**, H1 остатка **E'** и H3 остатка **D'**, H1 остатка **D'** и H4 остатка **C'**, H1 остатка **C'** и H3 остатка **B'**, H1 остатка **F'** и H2 остатка **A'**. В спектре HMBC атомы углерода C1 остатков **A'**, **D'**, **E'**, **F'**, **C'** коррелируют с H4 остатков **D'** и **C'**, H3 остатка **D'**, H2 остатка **A'** и H3 остатка **B'** соответственно, а протоны H1 остатков

A', E', F', D' – с атомами углерода C4 и C3 остатка **D'**, C2 остатка **A'**, C4 остатка **C'** соответственно. Смещение сигналов H2 и H3 в слабое поле на 0,8-1 ppm относительно фукозы и C2 – на 4-6 ppm относительно α -метил-L-фукопиранозид, говорит о том, что сульфатные группы находились в положении 2 и 3 остатков **B', C', D', E'** фукозы. Полученные данные позволяют сделать заключение, что гексасахарид имеет разветвленную структуру, изображенную на рисунке 4.65.

Таблица 4.31 - Химические сдвиги (м.д.) гексасахарид, полученного из фукоидана *S. horneri*

Фрагмент структуры	¹ H/ ¹³ C химические сдвиги (м.д.)					
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
A' →2)- α -L-Fucp-(1→	5,58/98,57	3,74/79,84	4,13/69,64	3,86/73,90	4,33/68,41	1,26/16,71
B' →3)- α -L-Fucp(2 OSO ₃ ⁻)	5,50/91,75	4,54/74,61	4,05/74,86	4,09/70,31	4,23/67,10	1,24/16,66
C' →4)- α -L-Fucp(2,3OSO ₃ ⁻)-(1→	5,38/96,20	4,64/73,75	4,75/75,30	4,29/80,70	4,56/69,13	1,41/17,03
D' →3,4)- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-(1→	5,37/100,14	4,70/75,41	4,20/77,54	4,44/79,16	4,43/70,00	1,41/17,36
E' α -L-Fucp(2,3OSO ₃ ⁻)-(1→	5,34/98,28	4,58/73,88	4,83/76,43	4,24/71,81	4,61/67,70	1,25/16,55
F' α -L-Fucp-(1→	5,11/100,67	3,83/69,33	3,91/70,36	3,80/73,20	4,32/67,99	1,20/16,49

Необходимо отметить, что фукоиданаза FFA2 не действовала на фукоидан из *S. horneri*. Вероятно, фукоиданаза FFA1 имеет более широкую специфичность, поскольку катализирует трансформацию не только фукоидана из *F. evanescens*, остатки фукозы которого сульфатированы при C2 и C4, но и фукоидана из *S. horneri*, сульфатные группы в котором занимают положения C2 и C3.

Таким образом, основная часть фукоидана из *S. horneri* представляет собой разветвленный сульфатированный полисахарид, основная цепь которого построена из остатков сульфатированной при C2 и C3 остатков α -L-фукопиранозы, разветвления состоят из остатков несulfатированной фукозы.

Заключение

Полисахариды являются природными биополимерами, обнаруженными практически во всех живых организмах. Некоторые из полисахаридов широко используются в промышленности в качестве продуктов питания, клеев, косметических средств и фармацевтических препаратов. Во многих случаях практическое применение полисахаридов в фармацевтике ограничено из-за их гетерогенности и большой молекулярной массы. В этом контексте, химическая или ферментативная модификация их структуры с тем, чтобы улучшить свойства, и, таким образом, расширить область возможного применения является перспективным направлением. Принимая во внимание необходимость снижения затрат энергии и минимизации воздействия на окружающую среду, а также из-за высокой специфичности и избирательности ферментативные биопроцессы являются весьма привлекательными в качестве альтернативы токсичным и неспецифическим химическим подходам.

Нами было проведено комплексное исследование различных ферментов морского происхождения, катализирующих трансформацию полисахаридов бурых водорослей. Были получены четыре гомогенных $1\rightarrow3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканазы из морских беспозвоночных: *P. viridis*, *T. literata*, *M. yessoensis* и *L. sitkana*, а также $1\rightarrow3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканаза из неоплодотворённых яйцеклеток морского ежа *S. intermedius*. Новые $1\rightarrow3\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканазы моллюсков имели близкую специфичность. Они расщепляли β - $1\rightarrow3$ -связи в смешанных $1\rightarrow3$; $1\rightarrow6\text{-}\beta\text{-D}$ -глюканах: с высокой скоростью гидролизировали – ламинаран и транслам, слабо - дрожжевой глюкан, практически не гидролизировали высокомолекулярные и/или плохо растворимые глюканы – пахиман и аубазидан. Глюканы с другим типом связи - пстулан, амилопектин и КМ-целлюлоза - гидролизу не подвергались. Все ферменты осуществляли гидролиз по эндо-типу действия с сохранением конфигурации расщепляемой связи, и основными продуктами гидролиза ламинарана являлись глюкоза и олигосахариды. Степень полимеризации основного продукта различалась (например, $n=3$ у глюканазы из *P. sacchalinensis*, $n=4$ у глюканазы из *P. viridis*), что вероятно связано с различной локализацией каталитических аминокислотных остатков или протяженностью активных центров ферментов. Отличительной особенностью всех глюканаз явилось высокое содержание в продуктах реакции глюкозы. Все эти

ферменты обладали способностью к реакции трансгликозилирования, которую катализировали с различной эффективностью в сравнении с реакцией гидролиза. Для исследования реакции трансгликозилирования использовали различные доноры и акцепторы. Лучшим донором в реакции трансгликозилирования, так же, как и лучшим субстратом при гидролизе оказался ламинаран из *L. cichorioides* содержание β -1 $\rightarrow$ 6-связей в нем оптимально. Лучшим акцептором оказался глицерин. Интересно отметить, что нами получено около 86 % всей информации, известной в мире о глюканазах морских беспозвоночных (по данным базы BRENDA Enzymes).

Систематическое исследование фукоиданаз в мире фактически только начинается. Разработанный нами новый экспресс-метод обнаружения фукоиданаз позволяет осуществлять широкомасштабный поиск этих редких ферментов, катализирующих расщепление фукоиданов различной структуры.

Для получения фрагментов фукоидана нами применялись разные подходы – от использования высокоочищенных препаратов ферментов до гомогенных и рекомбинантных фукоиданаз. В результате были получены как высокомолекулярные фрагменты с регулярной структурой, так и сульфатированные фукоолигосахариды. Фукоиданазы FFA1 и FFA2 являются второй и третьей рекомбинантными фукоиданазами в мире и первыми, субстратная специфичность которых была установлена настолько подробно. Впервые для установления специфичности фукоиданаз нами был использован широкий набор фукоиданов различной структуры и синтетических олигосахаридов. Исследование тонкой специфичности полученных фукоиданаз показало, что положение сульфатных групп сильно влияет на активность ферментов. Атака ферментом осуществляется ближе к восстанавливающему концу молекулы субстрата.

Полученные нами фукоиданазы заметно отличались своей специфичностью. Фукоиданазы из *L. sitkana* катализировали расщепление α -1 $\rightarrow$ 3-О-гликозидных связей, а фукоиданазы из *Lambis* sp. и *F. algae* катализировали расщепление α -1 $\rightarrow$ 4-О-гликозидных связей. Фукоиданазы из морского моллюска *L. sitkana* являются узкоспецифичными, поскольку катализируют расщепление связей в фукоидане из *F. evanescens*, а на фукоидан из *S. cichorioides*, состоящий из сульфатированных остатков фукозы, связанных исключительно α -1 $\rightarrow$ 3-О-

гликозидными связями, не действует. Возможно это связано с высокой степенью сульфатирования фукоидана из *S. cichorioides*. Фукоиданаза, выделенная из морского моллюска *Lambis* sp. катализировала расщепление десульфатированного фукоидана, в то время как фукоиданазы из морской бактерии (FFA1 и FFA2) были неактивны по отношению к такому субстрату. Фукоиданаза FFA1 имела широкую субстратную специфичность. Она действовала и на фукоидан из *S. horneri*, сульфатные группы в котором были локализованы при C2 и C3, и на фукоидан из *F. evanescens* с сульфатными группами при C2 и C4. Фукоиданаза FFA2 катализировала расщепление фукоидана, сульфатированного только при C2 и C4.

Ни одна из исследованных нами фукоиданаз не расщепляла фукоиданы полностью до низших олигосахаридов. Всегда оставалась довольно значительная полимерная часть. По аналогии с целлюлолитическими комплексами, возможно, что для полного расщепления фукоиданов требуется комплекс ферментов, действующих параллельно или последовательно на молекулу фукоидана. Работы по изучению механизмов трансформации фукоиданов находятся в самом начале пути. Исследование редких ферментов – фукоиданаз – открывает перспективы их использования не только как инструментов для изучения структуры фукоиданов, но и для получения фрагментов фукоидана, которые возможно, могут быть использованы в качестве основы новых лекарственных средств.

Выводы

1. Из морских моллюсков *P. viridis*, *T. literata*, *M. yessoensis* и *L. sitkana* впервые выделены и охарактеризованы новые глюкан эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы. Установлены аминокислотные последовательности исследуемых ферментов, анализ которых позволил отнести их к 16 структурному семейству гликозид гидролаз CAZy.
2. изучена специфичность новых ферментов. Показано, что глюкан эндо-1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы катализируют гидролиз β -1 $\rightarrow$ 3 гликозидных связей в молекулах растворимых 1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6- β -D-глюканов с сохранением конфигурации расщепляемой связи и обладают трансгликозилирующей способностью.
3. Структура продуктов реакции трансгликозилирования и скорость их накопления зависела как от структуры агликоновой части исследуемого акцептора, так и от природы фермента.
4. Ревизия данных о типе действия 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканазы из неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа показала, что исследуемый фермент обладает эндо-типом действия, а не экзо, как ранее считалось.
5. Несмотря на высокую структурную гомологию, особенно в области активных центров, механизмы действия и специфичность 1 $\rightarrow$ 3- β -D-глюканаз значительно различаются. Возможно, эти различия связаны с величиной активных центров и структурой акцепторных участков этих ферментов.
6. Разработан экспресс-метод обнаружения фукоиданаз в бактериях, который применим для масштабного поиска продуцентов этих ферментов, специфичных к фукоиданам, имеющим различные структуры.
7. Из морского моллюска *L. sitkana* были изолированы две формы фукоиданаз – кислая и щелочная. Эти фукоиданазы катализируют расщепление α -1 $\rightarrow$ 3-О-гликозидных связей между остатками L-фукозы в молекулах фукоиданов. Наибольший выход низкомолекулярных продуктов реакции был получен при использовании в качестве субстрата фукоидана из *L. cichorioides* и кислой формы фукоиданазы.
8. В морском моллюске *Lambis* sp. была обнаружена фукоиданаза. Установлено, что она является ферментом эндо-типа действия и катализирует расщепление α -1 $\rightarrow$ 4-О-гликозидных связей между остатками L-фукозы в молекуле фукоидана из *F. evanescens*. Фермент обладает способностью катализировать расщепление десульфатированного и дезацетилированного фукоидана.
9. Внутриклеточная фукоиданаза FFA, выделенная из морской бактерии *F. algae* КММ 3553Т обладает эндо-типом действия и катализирует расщепление α -1 $\rightarrow$ 4-О-гликозидных связей между остатками L-фукозы в молекуле фукоидана из

F. evanescens. Для осуществления каталитического процесса необходимо наличие в молекуле субстрата сульфатных групп при C2 остатков фукозы.

10. Получена рекомбинантная фукоиданаза FFA1, являющаяся ферментом эндо-типа действия и катализирующая расщепление α -1 $\rightarrow$ 4-О-гликозидных связей между остатками L-фукозы в молекулах структурно различающихся фукоиданов из *F. evanescens* и *S. horneri*.

11. Получена рекомбинантная фукоиданаза FFA2, которая катализирует расщепление α -1 $\rightarrow$ 4-О-гликозидных связей между остатками L-фукозы в фукоидане из *F. evanescens* и в молекулах сульфатированных фукоолигосахаридов. Было показано, что активность фермента снижается с уменьшением степени полимеризации субстрата. Атака ферментом осуществляется ближе к восстанавливающему концу молекулы субстрата.

12. Фукоиданазы FFA1 и FFA2 относятся к 107 структурному семейству О – гликозид гидролаз. Фукоиданаза FFA1 отличается более широкой субстратной специфичностью.

13. Фукоиданазы были использованы для анализа структуры некоторых фукоиданов. С помощью фукоиданаз в фукоиданах из *F. evanescens* и *S. horneri* были обнаружены фрагменты структуры, которые были недоступны для детектирования химическими и спектроскопическими методами анализа.

Список литературы

1. Kylin H. Zur Biochemie der Meeresalgen. // Z. Physiol. Chem. 1913. V. 83. P. 171-197.
2. Беседнова Н.Н., Звягинцева Т.Н.// Фукоиданы - сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства. Владивосток: Дальнаука - 380 с. 2014.
3. Репина О.И., Муравьева Е.А., А.В. П. Химический состав промысловых бурых водорослей Белого моря. //Тр. ВНИРО: Прикладная биохимия и технология гидробионтов 2004. V. 143. P. 93-99.
4. Skriptsova A.V., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Imbs T.I. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta). // J. Appl. Phycol. 2010. V. 22. P. 79-86.
5. Имбс Т.И., Шевченко Н.М., Суховерхов С.В., Семенова Т.Л., Скрипцова А.В., Звягинцева Т.Н. Сезонные изменения состава и структурные характеристики полисахаридов бурой водоросли *Costaria costata*. // Химия природ. соедин. 2009. Т. 45. С. 661-665.
6. Rioux L.E., Turgeon S.L., Beaulieu M. Effect of season on the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. // Phytochemistry 2009. V. 70. P. 1069-1075.
7. McCully M.E. Histological studies on the genus *Fucus*. II. Histology of the reproductive tissues. // Protoplasma 1968. V. 66. P. 205–230.
8. Speransky V.V., Brawley S.H., McCully M.E. Ion fluxes and modification of the extracellular matrix during gamete release in fucoid algae. // J. Phycol. 2001. V. 37. P. 555–573.
9. Mizuno M., Nishitani Y., Tanoue T., Matoba Y., Ojima T., Hashimoto T., Kanazawa K. Quantification and localisation of fucoidan in *Laminaria japonica* using a novel antibody. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009. V. 73. P. 335-338.
10. Chollet L., Saboural P., Chauvierre C., Villemin J.N., Letourneur D., Chaubet F. Fucoidans in Nanomedicine. // Mar. Drugs 2015. V. 14. P. 145-169.
11. Mabeau S., Kloareg B., Joseleau J.P. Fractionation and analysis of fucans from brown algae. // Phytochemistry 1990. V. 29. P. 2441–2445.

12. Holtkamp A. Isolation, Characterization, Modification and Application of Fucoidan from *Fucus vesiculosus*. // PhD Thesis. Von der Fakultät für Lebenswissenschaften der Technischen Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig zur Erlangung des Grades einer, Germany. 2009.
13. Kusaykin M., Bakunina I., Sova V., Ermakova S., Kuznetsova T., Besednova N., Zaporozhets T., Zvyagintseva T. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. // Biotechnol. J. 2008. V. 3. P. 904-915.
14. Nardella A., Chaubet F., Boisson-Vidal C., Blondin C., Durand P., Jozefonvicz J. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. // Carbohydr. Res. 1996. V. 289. P. 201-208.
15. Pomin V.H. Fucanomics and galactanomics: current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. // Biochim. Biophys. Acta 2012. V. 1820. P. 1971-1979.
16. Zaporozhets T., Besednova N. Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system: review. // Pharm. Biol. 2016. V. P. 1-10.
17. Blondin C., Fischer E., Boisson-Vidal C., Kazatchkine M.D., Jozefonvicz J. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. // Mol. Immunol. 1994. V. 31. P. 247-253.
18. Tissot B., Daniel R. Biological properties of sulfated fucans: the potent inhibiting activity of algal fucoidan against the human complement system. // Glycobiology 2003. V. 13. P. 29G-30G.
19. Bachelet L., Bertholon I., Lavigne D., Vassy R., Jandrot-Perrus M., Chaubet F., Letourneur D. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets. // Biochim. Biophys. Acta 2009. V. 1790. P. 141-146.
20. Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinari N., Morozevich G.E., Berman A.E., Bilan M.I., Usov A.I., Ustuzhanina N.E., Sanderson C.J., Kelly M., Rabinovich G.A., Iacobelli S.,

- Nifantiev N.E. A comparative study of the antiinflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. // *Glycobiology* 2007. V. 17. P.541-552
21. Granert C., Raud J., Waage A., Lindquist L. Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit. // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. P. 2071-2074.
 22. Kubes P., Jutila M., Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. // *J. Clin. Invest.* 1995. V. 95. P. 2510-2519.
 23. Lasky L.A. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. // *Annu. Rev. Biochem.* 1995. V. 64. P. 113-139.
 24. Myers S.P., O'Connor J., Fitton J.H., Brooks L., Rolfe M., Connellan P., Wohlmuth H., Cheras P.A., Morris C A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis. // *Biologics* 2010. V. 4. P. 33-44.
 25. Omata M., Matsui N., Inomata N., Ohno T. Protective effects of polysaccharide fucoidin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1997. V. 30. P. 717-724.
 26. Wen Z.S., Xiang X.W., Jin H.X., Guo X.Y., Liu L.J., Huang Y.N., OuYang X.K., Qu Y.L. Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophages. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. V. 88. P. 403-413.
 27. Wu G.-J., Shiu S.-M., Hsieh M.-C., Tsai G.-J. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaeifolium*. // *Food Hydrocolloids* 2016. V. 53. P. 16-23.
 28. Boisson-Vidal C., Zemani F., Caligiuri G., Galy-Fauroux I., Collic-Jouault S., Helley D., Fischer A.M. Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: effect of fucoidan from marine algae. // *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 2007. V. 5. P. 67-77.
 29. Bouvard C., Galy-Fauroux I., Grelac F., Carpentier W., Lokajczyk A., Gandrille S., Collic-Jouault S., Fischer A.M., Helley D. Low-Molecular-Weight Fucoidan Induces Endothelial Cell Migration via the PI3K/AKT Pathway and Modulates the

- Transcription of Genes Involved in Angiogenesis. // *Mar. Drugs* 2015. V. 13. P. 7446-7462.
30. Chabut D., Fischer A.M., Collic-Jouault S., Laurendeau I., Matou S., Le Bonniec B., Helley D. Low molecular weight fucoidan and heparin enhance the basic fibroblast growth factor-induced tube formation of endothelial cells through heparan sulfate-dependent alpha 6 overexpression. // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 64. P. 696-702.
 31. Giraux J.L., Matou S., Bros A., Tapon-Brethaudiere J., Letourneur D., Fischer A.M. Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidan and heparin. // *Eur. J. Cell. Biol.* 1998. V. 77. P. 352-359.
 32. Haddad O., Guyot E., Marinval N., Chevalier F., Maillard L., Gadi L., Laguillier-Morizot C., Oudar O., Sutton A., Charnaux N., Hlawaty H. Heparanase and Syndecan-4 Are Involved in Low Molecular Weight Fucoidan-Induced Angiogenesis. // *Mar. Drugs* 2015. V. 13. P. 6588-6608.
 33. Koyanagi S., Tanigawa N., Nakagawa H., Soeda S., Shimeno H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. // *Biochem. Pharmacol.* 2003. V. 65. P. 173-179.
 34. Liu F., Wang J., Chang A.K., Liu B., Yang L., Li Q., Wang P., Zou X. Fucoidan extract derived from *Undaria pinnatifida* inhibits angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells. // *Phytomedicine*. 2012. V. 19. P. 797-803.
 35. Luyt C.E., Meddahi-Pelle A., Ho-Tin-Noe B., Collic-Jouault S., Guezennec J., Louedec L., Prats H., Jacob M.P., Osborne-Pellegrin M., Letourneur D., Michel J.B. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. V. 305. P. 24-30.
 36. Matou S., Helley D., Chabut D., Bros A., Fischer A.M. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis *in vitro*. // *Thromb. Res.* 2002. V. 106. P. 213-221.
 37. Purnama A., Aid-Launais R., Haddad O., Maire M., Mantovani D., Letourneur D., Hlawaty H., Le Visage C. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. // *Drug Deliv. Transl. Res.* 2015. V. 5. P. 187-197.

38. Soeda S., Kozako T., Iwata K., Shimeno H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. // Biochim. Biophys. Acta 2000. V. 1497. P. 127-134.
39. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Ushakova N.A., Usov A.I., Kiselevskiy M.V., Nifantiev N.E. Fucoidans: pro- or antiangiogenic agents? // Glycobiology 2014. V. 24. P. 1265-1274.
40. Atashrazm F., Lowenthal R.M., Woods G.M., Holloway A.F., Dickinson J.L. Fucoidan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential. // Mar. Drugs 2015. V. 13. P. 2327-2346.
41. Azuma K., Ishihara T., Nakamoto H., Amaha T., Osaki T., Tsuka T., Imagawa T., Minami S., Takashima O., Ifuku S., Morimoto M., Saimoto H., Kawamoto H., Okamoto Y. Effects of oral administration of fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* on tumor growth and survival time in a tumor-bearing mouse model. // Mar. Drugs 2012. V. 10. P. 2337-2348.
42. Boo H.J., Hong J.Y., Kim S.C., Kang J.I., Kim M.K., Kim E.J., Hyun J.W., Koh Y.S., Yoo E.S., Kwon J.M., Kang H.K. The anticancer effect of fucoidan in PC-3 prostate cancer cells. // Mar. Drugs 2013. V. 11. P. 2982-2999.
43. Boo H.J., Hyun J.H., Kim S.C., Kang J.I., Kim M.K., Kim S.Y., Cho H., Yoo E.S., Kang H.K. Fucoidan from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. // Phytother. Res. 2011. V. 25. P. 1082-1086.
44. Chen M.C., Hsu W.L., Hwang P.A., Chou T.C. Low Molecular Weight Fucoidan Inhibits Tumor Angiogenesis through Downregulation of HIF-1/VEGF Signaling under Hypoxia. // Mar. Drugs 2015. V. 13. P. 4436-4451.
45. Cho M.L., Lee B.Y., You S.G. Relationship between oversulfation and conformation of low and high molecular weight fucoidans and evaluation of their *in vitro* anticancer activity. // Molecules 2012. V. 16. P. 291-297.
46. Cho Y., Yoon J.H., Yoo J.J., Lee M., Lee D.H., Cho E.J., Lee J.H., Yu S.J., Kim Y.J., Kim C.Y. Fucoidan protects hepatocytes from apoptosis and inhibits invasion of hepatocellular carcinoma by up-regulating p42/44 MAPK-dependent NDRG-1/CAP43. // Acta Pharm. Sin. B. 2015. V. 5. P. 544-553.

47. Han Y.S., Lee J.H., Lee S.H. Antitumor Effects of Fucoidan on Human Colon Cancer // Cells via Activation of Akt Signaling. *Biomol. Ther.* (Seoul) 2015. V. 23. P. 225-232.
48. Jin J.O., Song M.G., Kim Y.N., Park J.I., Kwak J.Y. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide. // *Mol. Carcinog.* 2010. V. 49. P. 771-782.
49. Kwak J.-Y. Fucoidan as a Marine Anticancer Agent in Preclinical Development. // *Mar. Drugs* 2014. V. 12. P. 851-870.
50. Li J., Chen K., Li S., Feng J., Liu T., Wang F., Zhang R., Xu S., Zhou Y., Zhou S., Xia Y., Lu J., Zhou Y., Guo C. Protective effect of fucoidan from *Fucus vesiculosus* on liver fibrosis via the TGF-beta1/Smad pathway-mediated inhibition of extracellular matrix and autophagy. // *Drug Des. Devel. Ther.* 2016. V. 10. P. 619-630.
51. Mulloy B., Ribeiro A.C., Alves A.P., Vieira R.P., Mourao P.A. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 22113-22123.
52. Park H.S., Hwang H.J., Kim G.Y., Cha H.J., Kim W.J., Kim N.D., Yoo Y.H., Choi Y.H. Induction of apoptosis by fucoidan in human leukemia U937 cells through activation of p38 MAPK and modulation of Bcl-2 family. // *Mar. Drugs* 2013. V. 11. P. 2347-2364.
53. Park H.S., Kim G.Y., Nam T.J., Deuk Kim N., Hyun Choi Y. Antiproliferative activity of fucoidan was associated with the induction of apoptosis and autophagy in AGS human gastric cancer cells. // *J. Food Sci.* 2011. V. 76. P. T77-83.
54. Shu Z., Shi X., Nie D., Guan B. Low-Molecular-Weight Fucoidan Inhibits the Viability and Invasiveness and Triggers Apoptosis in IL-1beta-Treated Human Rheumatoid Arthritis Fibroblast Synoviocytes. // *Inflammation* 2015. V. 38. P. 1777-1786.
55. Wei C., Xiao Q., Kuang X., Zhang T., Yang Z., Wang L. Fucoidan inhibits proliferation of the SKM-1 acute myeloid leukaemia cell line via the activation of apoptotic pathways and production of reactive oxygen species. // *Mol. Med. Rep.* 2015. V. 12. P. 6649-6655.

56. Yang C., Chung D., Shin I.S., Lee H., Kim J., Lee Y., You S. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. // Int. J. Biol. Macromol. 2008. V. 43. P. 433-437.
57. Yang L., Wang P., Wang H., Li Q., Teng H., Liu Z., Yang W., Hou L., Zou X. Fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via the ROS-mediated mitochondrial pathway. // Mar. Drugs 2013. V. 11. P. 1961-1976.
58. Zhang S.M., Xie Z.P., Xu M.L., Shi L.F. Cardioprotective effects of fucoidan against hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells. // Pharm. Biol. 2015. V. 53. P. 1352-1357.
59. Zhang Z., Teruya K., Yoshida T., Eto H., Shirahata S. Fucoidan extract enhances the anti-cancer activity of chemotherapeutic agents in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. // Mar. Drugs 2013. V. 11. P. 81-98.
60. Abu R., Jiang Z., Ueno M., Isaka S., Nakazono S., Okimura T., Cho K., Yamaguchi K., Kim D., Oda T. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015. V. 458. P. 727-732.
61. Chen J., Cui W., Zhang Q., Jia Y., Sun Y., Weng L., Luo D., Zhou H., Yang B. Low molecular weight fucoidan ameliorates diabetic nephropathy via inhibiting epithelial-mesenchymal transition and fibrotic processes. // Am. J. Transl. Res. 2015. V. 7. P. 1553-1563.
62. Heeba G.H., Morsy M.A. Fucoidan ameliorates steatohepatitis and insulin resistance by suppressing oxidative stress and inflammatory cytokines in experimental non-alcoholic fatty liver disease. // Environ.Toxicol. Pharmacol. 2015. V. 40. P. 907-914.
63. Kim K.-T., Rioux L.-E., Turgeon S.L. Molecular weight and sulfate content modulate the inhibition of α -amylase by fucoidan relevant for type 2 diabetes management. // Pharma Nutrition 2015. V. 3. P. 108-114.
64. Liu B., Kongstad K.T., Wiese S., Jager A.K., Staerk D. Edible seaweed as future functional food: Identification of α -glucosidase inhibitors by combined use of

- high-resolution alpha-glucosidase inhibition profiling and HPLC-HRMS-SPE-NMR. // Food Chem. 2016. V. 203. P. 16-22.
65. Shan X., Liu X., Hao J., Cai C., Fan F., Dun Y., Zhao X., Liu X., Li C., Yu G. *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. // Int. J. Biol. Macromol. 2015. V. 82. P. 249-255.
 66. Vinoth Kumar T., Lakshmanasenthil S., Geetharamani D., Marudhupandi T., Suja G., Suganya P. Fucoidan--a alpha-D-glucosidase inhibitor from *Sargassum wightii* with relevance to type 2 diabetes mellitus therapy. // Int. J. Biol. Macromol. 2015. V. 72. P. 1044-1047.
 67. Wang J., Hu S., Jiang W., Song W., Cai L., Wang J. Fucoidan from sea cucumber may improve hepatic inflammatory response and insulin resistance in mice. // Int. Immunopharmacol. 2015. V. 31. P. 15-23.
 68. Wang Y., Wang J., Zhao Y., Hu S., Shi D., Xue C. Fucoidan from sea cucumber *Cucumaria frondosa* exhibits anti-hyperglycemic effects in insulin resistant mice via activating the PI3K/PKB pathway and GLUT4. // J. Biosci. Bioeng. 2016. V. 121. P. 36-42.
 69. Hu Y., Cheng S.C., Chan K.T., Ke Y., Xue B., Sin F.W., Zeng C., Xie Y. Fucoidin enhances dendritic cell-mediated T-cell cytotoxicity against NY-ESO-1 expressing human cancer cells. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 392. P. 329-334.
 70. Isnansetyo A., Fikriyah A., Kasanah N., Murwantoko A. Non-specific immune potentiating activity of fucoidan from a tropical brown algae (Phaeophyceae), *Sargassum cristaefolium* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). // Aquaculture International 2016. V. 24. P. 465-477.
 71. Thelen T., Hao Y., Medeiros A.I., Curtis J.L., Serezani C.H., Kobzik L., Harris L.H., Aronoff D.M. The class A scavenger receptor, macrophage receptor with collagenous structure, is the major phagocytic receptor for *Clostridium sordellii* expressed by human decidual macrophages. // J. Immunol. 2010. V. 185. P. 4328-4335.
 72. Yang M., Ma C., Sun J., Shao Q., Gao W., Zhang Y., Li Z., Xie Q., Dong Z., Qu X. Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells. // Int. Immunopharmacol. 2008. V. 8. P. 1754-1760.

73. Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams R.L., Clark G.F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 21770-21776.
74. Chevolot L., Mulloy B., Ratiskol J., Foucault A., Collic-Jouault S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. // Carbohydr. Res. 2001. V. 330. P. 529-535.
75. Daniel R., Berteau O., Jozefonvicz J., Goasdoue N. Degradation of algal (*Ascophyllum nodosum*) fucoidan by an enzymatic activity contained in digestive glands of the marine mollusc *Pecten maximus*. // Carbohydr. Res. 1999. V. 322. P. 291-297.
76. Prokofjeva M.M., Imbs T.I., Shevchenko N.M., Spirin P.V., Horn S., Fehse B., Zvyagintseva T.N., Prassolov V.S. Fucoidans as Potential Inhibitors of HIV-1. // Mar. Drugs 2013. V. 11. P. 3000-3014.
77. Daniel R., Berteau O., Chevolot L., Varenne A., Gareil P., Goasdoue N. Regioselective desulfation of sulfated L-fucopyranoside by a new sulfoesterase from the marine mollusk *Pecten maximus*: application to the structural study of algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*). // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. P. 5617-5626.
78. Senni K., Gueniche F., Foucault-Bertaud A., Igondjo-Tchen S., Fioretti F., Collic-Jouault S., Durand P., Guezennec J., Godeau G., Letourneur D. Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis. // Arch. Biochem. Biophys. 2006. V. 445. P. 56-64.
79. Li B., Wei X.J., Sun J.L., Xu S.Y. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. // Carbohydr. Res. 2006. V. 341. P. 1135-1146.
80. Suppiramaniam V., Vaithianathan T., Manivannan K., Dhanasekaran M., Parameshwaran K., Bahr B.A. Modulatory effects of dextran sulfate and fucoidan on binding and channel properties of AMPA receptors isolated from rat brain. // Synapse 2006. V. 60. P. 456-464.
81. Ruperez P., Ahrazem O., Leal J.A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. P. 840-845.

82. Zhang Q., Li N., Zhao T., Qi H., Xu Z., Li Z. Fucoidan inhibits the development of proteinuria in active *Heymann nephritis*. // *Phytother. Res.* 2005. V. 19. P. 50-53.
83. Sakai T., Ishizuka K., Kato I. Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterium. // *Mar. Biotechnol. (NY)* 2003. V. 5. P. 409-416.
84. Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Haslam S.M., McDowell R.A., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Khatuntseva E.A., Usov A.I. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. // *Carbohydr. Res.* 1999. V. 320. P. 108-119.
85. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Kelly M., Sanderson C.J., Nifantiev N.E., Usov A.I. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*. // *Carbohydr. Res.* 2010. V. 345. P. 2038-2047.
86. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O., Krupnova T.N., Sundukova E.V.I., V.V. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2003. V. 294. P. 1-13.
87. Chandia N.P., Matsuhira B. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2008. V. 42. P. 235-240.
88. Bilan M., Zakharova A., Grachev A., Shashkov A., Nifantiev N., Usov A. Polysaccharides of algae: 60. Fucoidan from the pacific brown alga; *Anelopus japonicus* (Harv.) winne (Ectocarpales, Scytosiphonaceae). // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2007. V. 33. P. 38-46.
89. Nagaoka M., Shibata H., Kimura-Takagi I., Hashimoto S., Kimura K., Makino T., Aiyama R., Ueyama S., Yokokura T. Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA. // *Glycoconj. J.* 1999. V. 16. P. 19-26.
90. Sakai T., Ishizuka K., Shimanaka K., Ikai K., Kato I. Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes. // *Mar. Biotechnol. (NY)* 2003. V. 5. P. 536-544.
91. Bilan M.I., Vinogradova E.V., Tsvetkova E.A., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. A sulfated glucuronofucan containing both fucofuranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis*. // *Carbohydr. Res.* 2008. V. 343. P. 2605-2612.

92. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 719-730.
93. Kusaykin, Chizhov, Grachev, Alekseeva, Bakunina, Nedashkovskaya, Sova, Zvyagintseva. A comparative study of specificity of fucoidanases from marine microorganisms and invertebrates. // J. Appl. Phycol. 2006. V. 18. P. 369-373.
94. Imbs T.I., Ermakova S.P., Malyarenko (Vishchuk) O.S., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N. Structural elucidation of polysaccharide fractions from the brown alga *Coccophora langsdorfii* and in vitro investigation of their anticancer activity. // Carbohydr. Polym. 2016. V. 135. P. 162-168.
95. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. // Carbohydr. Res. 2004. V. 339. P. 511-517.
96. Xue C.-H., Fang Y., Lin H., Chen L., Li Z.-J., Deng D., Lu C.-X. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* // J. Appl. Phycol. 2001. V. 13. P. 67-70.
97. Шевченко Н.М., Анастюк С.Д., Герасименко Н.И., Дмитренко П.С., Исаков В.В., Звягинцева Т.Н. Полисахаридный и липидный состав бурой водоросли *Laminaria gurjanovae*. // Биоорган. химия. 2007. V. 33. P. 96-107.
98. Zhu W., Ooi V.E., Chan P.K., Ang P.O., Jr. Isolation and characterization of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* and determination of its anti-herpes activity. // Biochem. Cell. Biol. 2003. V. 81. P. 25-33.
99. Усов А.И., Смирнова Г.П., Ключкова Н.Г. Полисахариды водорослей. Сообщение 58. Полисахаридный состав тихоокеанской бурой водоросли *Alaria fistulosa* P.et R. (Alariaceae, Laminariales) // Изв. А. Н. Сер. хим. 2005. V. P. 1245-1249.
100. Lee J.B., Hayashi K., Hashimoto M., Nakano T., Hayashi T. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 2004. V. 52. P. 1091-1094.
101. Kim W.J., Koo Y.K., Jung M.K., Moon H.R., Kim S.M., Synytsya A., Yun-Choi H.S., Kim Y.S., Park J.K., Park Y.I. Anticoagulating activities of low-molecular weight fuco-oligosaccharides prepared by enzymatic digestion of fucoidan from the

- sporophyll of Korean *Undaria pinnatifida*. // Arch. Pharm. Res. 2010. V. 33. P. 125-131.
102. Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Zhang H., Nju X. Structural studies on a novel fucogalactan sulfate extracted from the brown seaweed *Laminaria japonica* // Int. J. Biol. Macromol. 2010. V. 47. P. 126 – 131.
 103. Kloareg B., Demarty M., Mabeau S. Polyanionic characteristic of purified sulphated homofucans from brown algae. // Int. J. Biol. Macromol. 1986. V. 8. P. 380-386.
 104. Duarte M.E., Cardoso M.A., Nosedá M.D., Cerezo A.S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. // Carbohydr. Res. 2001. V. 333. P. 281-293.
 105. Abdel-Fattah A.F., Hussein M.M., Salem H.M. Studies of the purification and some properties of sargassan, a sulphated heteropolysaccharides from *Sargassum linifolium* // Carbohydr. Res. 1974. V. 33. P. 9-17.
 106. Hu P., Li Z., Chen M., Sun Z., Ling Y., Jiang J., Huang C. Structural elucidation and protective role of a polysaccharide from *Sargassum fusiforme* on ameliorating learning and memory deficiencies in mice. // Carbohydr. Polym. 2016. V. 139. P. 150-158.
 107. Sakai T., Kimura H., Kojima K., Shimanaka K., Ikai K., Kato I. Marine bacterial sulfated fucoglucuronomannan (SFGM) lyase digests brown algal SFGM into trisaccharides. // Mar. Biotechnol. (NY) 2003. V. 5. P. 70-78.
 108. Nishino T., Takabe Y., Nagumo T. Isolation and partial characterization of a novel β -D-galactan sulfate from the brown seaweed *Laminaria angustata* var. *longissima*. // Carbohydr. Polym. 1994. V. 23. P. 165-173.
 109. Dillon T., Kristensen K., O'hEochdha C. Seed mucilage of *Ascophyllum nodosum* // I. Proc. R. Irish. Acad. 1953. V. 558. P. 189-194.
 110. Leite E.L., Medeiros M.G.L., Rocha H.A., Farias G.G.M., da Silva L.F., Chavante S.F., de Abreu L.D., Dietrich C.P., Nader H.B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schoederii* // Plant Sci. 1998. V. 132. P. 215-228.
 111. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L., Stortz C.A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. // Carbohydr. Res. 2003. V. 338. P. 153-165.

112. Ozawa T., Yamamoto J., Yamagishi T., Yamazaki N., Nishizawa M. Two fucoidans in the holdfast of cultivated *Laminaria japonica*. // J. Nat. Med. 2006. V. 60. P. 236-239.
113. Silva T.M., Alves L.G., de Queiroz K.C., Santos M.G., Marques C.T., Chavante S.F., Rocha H.A., Leite E.L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. // Braz. J. Med. Biol. Res. 2005. V. 38. P. 523-533.
114. Karmakar P., Ghosh T., Sinha S., Saha S., Mandal P., Ghosal P.K., Ray B. Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastratica*: Characterization of a sulfated fucan. // Carbohydr. Polym. 2009. V. 78. P. 416-421.
115. Kloareg B., Quatrano R.S. Structure of cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides // Oceanography and Marine Biology. New York. 1988. V. 26. P. 259-315.
116. Vilela-Silva A.C.E.S., Castro M.O., Valente A.P., Biermann C.H., Mourao P.A.S. Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 379-387.
117. Alves A.P., Mulloy B., Diniz J.A., Mourao P.A. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 6965-6971.
118. Pomin V.H., Valente A.P., Pereira M.S., Mourao P.A. Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: a selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides. // Glycobiology 2005. V. 15. P. 1376-1385.
119. Ribeiro A.C., Vieira R.P., Mourao P.A., Mulloy B. A sulfated alpha-L-fucan from sea cucumber. // Carbohydr. Res. 1994. V. 255. P. 225-240.
120. Chen S., Hu Y., Ye X., Li G., Yu G., Xue C., Chai W. Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1820. P. 989-1000.

121. Yu L., Ge L., Xue C., Chang Y., Zhang C., Xu X., Wang Y. Structural study of fucoidan from sea cucumber *Acaudina molpadioides*: a fucoidan containing novel tetrafucose repeating unit. // Food Chem. 2014. V. 142. P. 197-200.
122. Yu L., Xue C., Chang Y., Hu Y., Xu X., Ge L., Liu G. Structure and rheological characteristics of fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. // Food Chem. 2015. V. 180. P. 71-76.
123. Yu L., Xue C., Chang Y., Xu X., Ge L., Liu G., Wang Y. Structure elucidation of fucoidan composed of a novel tetrafucose repeating unit from sea cucumber *Thelenota ananas*. // Food Chem. 2014. V. 146. P. 113-119.
124. Hu Y., Li S., Li J., Ye X., Ding T., Liu D., Chen J., Ge Z., Chen S. Identification of a highly sulfated fucoidan from sea cucumber *Pearsonothuria graeffei* with well-repeated tetrasaccharides units. // Carbohydr. Polym. 2015. V. 134. P. 808-816.
125. Chang Y., Hu Y., Yu L., McClements D.J., Xu X., Liu G., Xue C. Primary structure and chain conformation of fucoidan extracted from sea cucumber *Holothuria tubulosa*. // Carbohydr. Polym. 2016. V. 136. P. 1091-1097.
126. Schimideberg J.E.O. Gesellschaft deutscher Naturforschung and Lrzte. // Leipzig, Tageblatt der Versammlung 1885. V. 58. P. 427.
127. Maeda M., Nisizawa K. Fine structure of laminaran of *Eisenia bicyclis*. // J. Biochem. 1968. V. 63. P. 199-206.
128. Chattopadhyay N., Ghosh T., Sinha S., Chattopadhyay K., Karmakar P., Ray B. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity. // Food Chemistry 2010. V. 118. P. 823-829.
129. Nelson T.E., Lewis B.A. Separation and characterization of the soluble and insoluble components of insoluble laminaran. // Carbohydr. Res. 1974. V. 33. P. 63-74.
130. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarova I.V., Scobun A.S., Luk'yanov P.A., Elyakova L.A. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. // Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2000. V. 126. P. 209-215.
131. Usui T., Toriyama T., Mizuno T. Structural Investigation of Laminaran of *Eisenia bicyclis*. // Agricul. Biol. Chem. 1979. V. 43. P. 603-611.

132. Menshova R.V., Ermakova S.P., Anastyuk S.D., Isakov V.V., Dubrovskaya Y.V., Kusaykin M.I., Um B.H., Zvyagintseva T.N. Structure, enzymatic transformation and anticancer activity of branched high molecular weight laminaran from brown alga *Eisenia bicyclis*. // Carbohydr. Polym. 2014. V. 99. P. 101-109.
133. Maeda M., Nisizawa K. Laminaran of *Ishige okamurai*. // Carbohydr. Res. 1968. V. 7. P. 97-99.
134. Усов А.И., Чижов А.О. Полисахариды водорослей. XL. Углеводный состав бурой водоросли *Chorda filum*. // Биоорг. химия. 1989. V. 15. P. 208-216.
135. Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н., Елякова Л.А. Структура и иммунотропное действие 1,3;1,6- β -D-глюканов. Владивосток: (Дальнаука). 2002. 159 с. 2002. V. P.
136. Shin H.J., Oh S.J., Kim S.I., Kim H.W., Son J.H. Conformational characteristics of beta-glucan in laminarin probed by terahertz spectroscopy. // Appl. Phys. Lett. 2009. V. 94. P.
137. Mackay R.M., Baird S., Dove M.J., Erratt J.A., Gines M., Moranelli F., Nasim A., Willick G.E., Yaguchi M., Seligy V.L. Glucanase gene diversity in prokaryotic and eukaryotic organisms. // Biosystems 1985. V. 18. P. 279-292.
138. Сова В.В., Песенцева М.С., Захаренко А.М., Ковальчук С.Н., Звягинцева Т.Н. Гликозидазы морских организмов. // Биохимия 2013. V. 78. P. 962-976.
139. Sun L., Gurnon J.R., Adams B.J., Graves M.V., Van Etten J.L. Characterization of a beta-1,3-glucanase encoded by chlorella virus PBCV-1. // Virology 2000. V. 276. P. 27-36.
140. Manners D.J., Masson A.J., Patterson J.C. The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls. // Biochem. J. 1973. V. 135. P. 19-30.
141. Manners D.J., Wilson G. Studies on beta-glucanases. Some properties of a bacterial endo-beta-(1 leads to 3)-glucanase system. // Biochem. J. 1973. V. 135. P. 11-18.
142. Nagasaki S., Nishioka Y., Mori H., Yamamoto S. Purification and properties of lytic beta-1,3-glucanase from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. // Agric. Biol. Chem. 1976. V. 40. P. 1059-1067.
143. Pang Z., Otaka K., Suzuki Y., Goto K., Ohnishi M. Purification and characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Arthrobacter* sp. // J. Biol. Macromol. 2004. V. 4. P. 57-66.

144. Hong T.Y., Meng M.// Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3-beta-glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 61. P. 472-478.
145. van Lieshout J., Faijes M., Nieto J., van der Oost J., Planas A. Hydrolase and glycosynthase activity of endo-1,3-beta-glucanase from the thermophile *Pyrococcus furiosus*. // Archaea 2004. V. 1. P. 285-292.
146. Burtseva Y.V., Sova V.V., Pivkin M.V., Zvyagintseva T.N. Enzymes of carbohydrate metabolism of mycelial fungi from marine environments. beta-1,3-glucanase of the marine fungus *Chaetomium indicum*. // Biochemistry (Mosc) 2000. V. 65. P. 1175-1183.
147. Keen N.T., Yoshikawa M. beta-1,3-Endoglucanase from Soybean Releases Elicitor-Active Carbohydrates from Fungus Cell Walls. //Plant. Physiol. 1983. V. 71. P. 460-465.
148. Hoj P.B., Fincher G.B. Molecular evolution of plant beta-glucan endohydrolases. // Plant. J. 1995. V. 7. P. 367-379.
149. Sova V.V., Elyakova L.A., Vaskovsky V.E. Purification and some properties of β -1,3-glucan glucanohydrolase from the crystalline style of bivalvia, *Spisula sachalinensis*. // Biochim. Biophys. Acta 1970. V. 212. P. 111-115.
150. Takeuchi K. Purification and characterization of exo-beta-1,3-glucanase from a hatching supernatant of *Strongylocentrotus intermedius*. // Can. J. Biochem. Cell. Biol. 1983. V. 61. P. 54-62.
151. Talbot C.F., Vacquier V.D. The purification and characterization of an exo-beta (1 going to 3)-glucanohydrolase from sea urchin eggs. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 742-746.
152. Gebler J.C., Trimbur D.E., Warren A.J., Aebersold R., Namchuk M., Withers S.G. Substrate-induced inactivation of a crippled beta-glucosidase mutant: identification of the labeled amino acid and mutagenic analysis of its role. // Biochemistry 1995. V. 34. P. 14547-14553.
153. Henrissat B., Callebaut I., Fabrega S., Lehn P., Mornon J.P., Davies G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. // Proc Natl Acad Sci U S A 1995. V. 92. P. 7090-7094.

154. Kikuchi T., Shibuya H., Jones J.T. Molecular and biochemical characterization of an endo-beta-1,3-glucanase from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* acquired by horizontal gene transfer from bacteria. // Biochem. J. 2005. V. 389. P. 117-125.
155. Kovalchuk S.N., Bakunina I.Y., Burtseva Y.V., Emelyanenko V.I., Kim N.Y., Guzev K.V., Kozhemyako V.B., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N. An endo-(1-->3)-beta-D-glucanase from the scallop *Chlamys albidus*: catalytic properties, cDNA cloning and secondary-structure characterization. // Carbohydr. Res. 2009. V. 344. P. 191-197.
156. Cheng Y.M., Hong T.Y., Liu C.C., Meng M. Cloning and functional characterization of a complex endo-beta-1,3-glucanase from *Paenibacillus* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 81. P. 1051-1061.
157. Martin K., McDougall B.M., McIlroy S., Chen J., Seviour R.J. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal beta-(1,3)- and beta-(1,6)-glucanases. // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. P. 168-192.
158. Fontaine T., Hartland R.P., Beauvais A., Diaquin M., Latge J.P. Purification and characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Aspergillus fumigatus*. // Eur. J. Biochem. 1997. V. 243. P. 315-321.
159. Pitson S.M., Seviour R.J., McDougall B.M., Woodward J.R., Stone B.A. Purification and characterization of three extracellular (1-->3)-beta-D-glucan glucohydrolases from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*. // Biochem. J. 1995. V. 308 (Pt 3). P. 733-741.
160. Burtseva Iu V., Verigina N.S., Sova V.V., Pivkin M.V., Zviagintseva T.N. [O-glycosylhydrolases of marine filamentous fungi. beta-1,3-Glucanases of *Trichoderma aureviride*]. // Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 2003. V. 39. P. 542-548.
161. Fontaine T., Hartland R.P., Diaquin M., Simenel C., Latge J.P. Differential patterns of activity displayed by two exo-beta-1,3-glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 3154-3163.
162. Stubbs H.J., Brasch D.J., Emerson G.W., Sullivan P.A. Hydrolase and transferase activities of the β -1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 263. P. 889-895.

163. de la Cruz J., Pintor-Toro J.A., Benitez T., Llobell A., Romero L.C. A novel endo-beta-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 6937-6945.
164. Molina M., Cenamor R., Sanchez M., Nombela C. Purification and some properties of *Candida albicans* exo-1,3- β -glucanase. // J. Gen. Microbiol. 1989. V. 135. P. 309-314.
165. Bezukladnikov P.W., Elyakova L.A. Transglycosylation and Multiple Attack of Endo-(1-3)-Beta-D-Glucanase-L-Iv from *Spisula sachalinensis* - a New Approach to the Evaluation of the Degree of Multiple Attack on Polysaccharides. // Carbohydr. Res. 1990. V. 203. P. 119-127.
166. Borris R., Krah M., Brumer H., Kerzhner M.A., Ivanen D.R., Eneyskaya E.V., Elyakova L.A., Shishlyannikov S.M., Shabalin K.A., Neustroev K.N. Enzymatic synthesis of 4-methylumbelliferyl (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucooligosaccharides - new substrates for beta-1,3-1,4-D-glucanase. // Carbohydr. Res. 2003. V. 338. P. 1455-1467.
167. Favorov V.V., Vozhova E.I., Denisenko V.A., Elyakova L.A. A study of the reaction catalysed by alginate lyase VI from the sea mollusc, *Littorina* sp. // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 569. P. 259-266.
168. Giordano A., Andreotti G., Mollo E., Trincone A. Transglycosylation reactions performed by glycosyl hydrolases from the marine anaspidean *Aplysia fasciata*. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2004. V. 30. P. 51-59.
169. Kumagai Y., Inoue A., Tanaka H., Ojima T. Preparation of beta-1,3-glucanase from scallop mid-gut gland drips and its use for production of novel heterooligosaccharides. // Fisheries Science 2008. V. 74. P. 1127-1136.
170. Sova V.V., Elyakova L.A. Some aspects of the specificity and action pattern of β -1,3-glucan glucanohydrolase from *Spisula sachalinensis*. // Biochim. Biophys. Acta 1972. V. 258. P. 219-227.
171. Zvyagintseva T.N., Elyakova L.A., Isakov V.V. The enzymatic transformations of laminarans in 1,3;1,6- β -D-glucans with immunostimulating activity. // Bioorgan. Khim. 1995. V. 21. P. 218-225.

172. Kumagai Y., Ojima T. Enzymatic properties and the primary structure of a beta-1,3-glucanase from the digestive fluid of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. // Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol. 2009. V. 154. P. 113-120.
173. Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А. Механизм действия и специфичность эндо-1→3-β-D-глюканаз морских моллюсков. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 453-474.
174. Назарова Н.И., Елякова Л.А. Исследование трансгликозилирующей способности эндо-1,3-бета-глюканаз. IV. Акцепторная специфичность активных центров ферментов из морских беспозвоночных (в реакциях с арилгликозидами). //Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 1215-1223.
175. Trincone. Marine Enzymes for Biocatalysis: Sources, Biocatalytic Characteristics and Bioprocesses of Marine Enzymes. / Marine Enzymes for Biocatalysis: Sources, Biocatalytic Characteristics and Bioprocesses of Marine Enzymes 2013. V. P. 1-514.
176. de Marco J.L., Felix C.R. Purification and characterization of a beta-glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. // Braz. Arch. Biol. Technol. 2007. V. 50. P. 21-29.
177. Villettaz J.C., Steiner D., Trogus H. The Use of a Beta-Glucanase as an Enzyme in Wine Clarification and Filtration.// Am. J. Enol. Vitic. 1984. V. 35. P. 253-256.
178. Jose D., Jayesh P., Gopinath P., Mohandas A., Singh I.S.B. Potential application of beta-1, 3 glucanase from an environmental isolate of *Pseudomonas aeruginosa* MCCB 123 in fungal DNA extraction.// Ind. J. Exp. Biol. 2014. V. 52. P. 89-96.
179. Musoni M., Destain J., Thonart P., Bahama J.B., Delvigne F. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems. // Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement. 2015. V. 19. P. 430-442.
180. Musiychuk K.A., Goldenkova I.V., Abdeev R.M., Kobets N.S., Piruzian E.S. Preparation and properties of *Clostridium thermocellum* lichenase deletion variants and their use for construction of bifunctional hybrid proteins. // Biochemistry (Mosc). 2000. V. 65. P. 1397-1402.

181. Furtado G.P., Ribeiro L.F., Lourenzoni M.R., Ward R.J. A designed bifunctional laccase/beta-1,3-1,4-glucanase enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse. // Protein Eng. Des. Sel. 2013. V. 26. P. 15-23.
182. Liu W.C., Lin Y.S., Jeng W.Y., Chen J.H., Wang A.H.J., Shyr L.F. Engineering of dual-functional hybrid glucanases. // Protein Eng. Des. Sel. 2012. V. 25. P. 771-780.
183. Miyanishi N., Inaba Y., Okuma H., Imada C., Watanabe E. Amperometric determination of laminarin using immobilized beta-1,3-glucanase. // Biosens. Bioelectron. 2004. V. 19. P. 557-562.
184. Percival E., McDowell R.H. // Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. N. Y. 1967. V. P. 157-175.
185. Colin S., Deniaud E., Jam M., Descamps V., Chevolot Y., Kervarec N., Yvin J.C., Barbeyron T., Michel G., Kloareg B. Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans. // Glycobiology. 2006. V. 16. P. 1021-1032.
186. Takayama M., Koyama N., Sakai T., Kato I. Enzymes capable of degrading a sulfated-fucose-containing polysaccharide and their encoding genes. USA Patent 6489155 2002.
187. Bakunina I.Y., Shevchenko L.S., Nedashkovskaya O.I., Shevchenko N.M., Alekseeva S.A., Mikhailov V.V., Zvyagintseva T.N. Screening of marine bacteria for fucoidanases. // Microbiology. 2000. V. 69. P. 303-308.
188. Kusaykin M.I., Burtseva Y.V., Svetasheva T.G., Sova V.V., Zvyagintseva T.N. Distribution of O-glycosylhydrolases in marine invertebrates. Enzymes of the marine mollusk *Littorina kurila* that catalyze fucoidan transformation. // Biochemistry (Mosc). 2003. V. 68. P. 317-324.
189. Furukawa S., Fujikawa T., Koga D., Ide A. Purification and Some Properties of Exo-Type Fucoidanases from *Vibrio* sp. N-5. // Biosci. Biotech. Biochem. 1992. V. 56. P. 1829-1834.
190. Sakai T., Kimura H., Kato I. A marine strain of Flavobacteriaceae utilizes brown seaweed fucoidan. // Mar. Biotechnol. (NY) 2002. V. 4. P. 399-405.
191. Bakunina I., Nedashkovskaia O.I., Alekseeva S.A., Ivanova E.P., Romanenko L.A., Gorshkova N.M., Isakov V.V., Zviagintseva T.N., Mikhailov V.V. [Degradation of

- fucoidan by the marine proteobacterium *Pseudoalteromonas citrea*]. // Mikrobiologiya. 2002. V. 71. P. 49-55.
192. Thanassi N.M., Nakada H.I. Enzymatic degradation of fucoidan by enzymes from the hepatopancreas of abalone *Haliotis species*. // Arch. Biochem. Biophys. 1967. V. 118. P. 172-177.
 193. Kitamura K., Matsuo M., Yasui T. Enzymatic degradation of fucoidan by fucoidanase from the hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis*. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1992. V. 56. P. 490-494.
 194. Sasaki K., Sakai T., Kojima K., Nakayama S., Nakanishi Y., Kato I. Partial purification and characterization of an enzyme releasing 2-sulfo-alpha-L-fucopyranose from 2-sulfo-alpha-L-fucopyranosyl-(1->2) pyridylaminated fucose from a sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1996. V. 60. P. 666-668.
 195. Elyakova L.A., Sova V.V., Vaskovsky V.E. Cellulase of marine mollusk *Littorina* sp. // Biochem. Biophys. Acta. 1968. V. 167. P. 462-464.
 196. Alexander C.G., Cutler R.L., Yellowless D. Studies on the comparison and enzyme content of the crystalline style of *Telescopium telescopium* (L.) (Gastropoda) // Comp. Biochem. Physiol. 1979. V. 64B. P. 83-89.
 197. Kusaykin M.I., Silchenko A.S., Zakharenko A.M., Zvyagintseva T.N. Fucoidanases. // Glycobiology 2016. V. 26. P.
 198. Lemesle-Varloot L., Henrissat B., Gaboriaud C., Bissery V., Morgat A., Mornon J.P. Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. // Biochimie. 1990. V. 72. P. 555-574.
 199. Heger A., Holm L. Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences. // Proteins. 2000. V. 41. P. 224-237.
 200. Bateman A., Coin L., Durbin R., Finn R.D., Hollich V., Griffiths-Jones S., Khanna A., Marshall M., Moxon S., Sonnhammer E.L., Studholme D.J., Yeats C., Eddy S.R. The Pfam protein families database. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. D138-141.
 201. Tepass U., Truong K., Godt D., Ikura M., Peifer M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2000. V. 1. P. 91-100.

202. Cao L., Yan X., Borysenko C.W., Blair H.C., Wu C., Yu L. CHDL: a cadherin-like domain in Proteobacteria and Cyanobacteria. // FEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 251. P. 203-209.
203. Fraiberg M., Borovok I., Weiner R.M., Lamed R. Discovery and characterization of cadherin domains in *Saccharophagus degradans* 2-40. // J. Bacteriol. 2010. V. 192. P. 1066-1074.
204. Wu Q.Q., Ma S., Xiao H.R., Zhang M., Cai J.M. Purification and the Secondary Structure of Fucoidanase from *Fusarium* sp LD8. // Evid. Based Comp. Alternat. Med. 2011.
205. Qianqian W., Shuang M., Hourong X., Min Z., Jingmin C. Purification and the secondary structure of fucoidanase from *Fusarium* sp. LD8. // Evid. Based Complement Alternat. Med. 2011. V. 2011. P. 196190.
206. Wu Q.Q., Zhang M., Wu K., Liu B., Cai J.M., Pan R.R. Purification and characteristics of fucoidanase obtained from *Dendryphiella arenaria* TM94. // J. Appl. Phycol. 2011. V. 23. P. 197-203.
207. Sakai T., Kimura H., Kato I. Purification of sulfated fucoglucuronomannan lyase from bacterial strain of *Fucobacter marina* and study of appropriate conditions for its enzyme digestion. // Mar. Biotechnol. (NY) 2003. V. 5. P. 380-387.
208. Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Kurilenko V.V., Zakharenko A.M., Isakov V.V., Zaporozhets T.S., Gazha A.K., Zvyagintseva T.N. Hydrolysis of fucoidan by fucoidanase isolated from the marine bacterium, *Formosa algae*. // Mar. Drugs 2013. V. 11. P. 2413-2430.
209. Sakai T., Kawai T., Kato I. Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterial strain and its fucoidanase. // Mar. Biotechnol. (NY) 2004. V. 6. P. 335-346.
210. Woo-Jung K., Kim S.M., Lee Y.H., Kim H.G., Kim H.K., Moon S.H., Suh H.H., Jang K.H., Park Y.I. Isolation and characterization of marine bacterial strain degrading fucoidan from Korean *Undaria pinnatifida* sporophylls. // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 18. P. 616-623.
211. Descamps V., Colin S., Lahaye M., Jam M., Richard C., Potin P., Barbeyron T., Yvin J.C., Kloareg B. Isolation and culture of a marine bacterium degrading the

- sulfated fucans from marine brown algae. // Mar. Biotechnol. (NY) 2006. V. 8. P. 27-39.
212. Berteau O., McCort I., Goasdoue N., Tissot B., Daniel R. Characterization of a new alpha-L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of alpha-L-fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*). // Glycobiology 2002. V. 12. P. 273-282.
 213. Bilan M.I., Kusaykin M.I., Grachev A.A., Tsvetkova E.A., Zvyagintseva T.N., Nifantiev N.E., Usov A.I. Effect of enzyme preparation from the marine mollusk *Littorina kurila* on fucoidan from the brown alga *Fucus distichus*. // Biochemistry (Mosc) 2005. V. 70. P. 1321-1326.
 214. Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Zakharenko A.M., Menshova R.V., Khanh H.H.N., Dmitrenok P.S., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N. Endo-1,4-fucoidanase from Vietnamese marine mollusk *Lambis* sp. which producing, sulphated fucooligosaccharides. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2014. V. 102. P. 154-160.
 215. Chang Y., Xue C., Tang Q., Li D., Wu X., Wang J. Isolation and characterization of a sea cucumber fucoidan-utilizing marine bacterium. // Lett. Appl. Microbiol. 2010. V. 50. P. 301-307.
 216. Yu L., Xu X., Xue C., Chang Y., Ge L., Wang Y., Zhang C., Liu G., He C. Enzymatic preparation and structural determination of oligosaccharides derived from sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) fucoidan. // Food Chem. 2013. V. 139. P. 702-709.
 217. Ohshiro T., Ohmoto Y., Ono Y., Ohkita R., Miki Y., Kawamoto H., Izumi Y. Isolation and characterization of a novel fucoidan-degrading microorganism. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010. V. 74. P. 1729-1732.
 218. Sakai T., Takeshi S., Kimura A., Hitomi H., Kojima D., Kaoru S., Ikai B., Katsushige K., Akiyoshi N., Sumiko S., Nakanishi K., Kato I., Ikunoshin R.// Patent No. 6277616. USA. 2001. V. P.
 219. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B., Isakov V.V., Scobun A.S., Sundukova E.V., Elyakova L.A. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. // Carbohydr. Res. 1999. V. 322. P. 32-39.

220. Nelson T.E., Scaletti J.V., Smith F., Kirkwood S. The use of enzymes in structural studies on polysaccharides: I. The mode of attack of a β -D-(1,3)-glucanase on laminarin. // Can. J. Chem. 1963. V. 41. P. 1671-1678.
221. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248-254.
222. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. P. 375-380.
223. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. // Analyt. Chem. 1956. V. 28. P. 350-356.
224. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature 1970. V. 227. P. 680-685.
225. Silchenko A.S., Khanh H.H.N., Hang C.T.T., Kurilenko V.V., Zakharenko A.M., Zueva A.O., Ly B.M., Kusaykin M.I. A Simple Plate Method for the Screening and Detection of Fucoidanases. // Achiev. Life Sci. 2016. V. 9. P. 104-106.
226. Dodgson K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. // Biochem. J. 1961. V. 78. P. 312-319.
227. Захаренко А.М., Кусайкин М.И., Буи Минь Ли, Фам Ван Хуэн, Хьюнь Хоанг Кхань, Сова В.В., Звягинцева Т.Н. Каталитические свойства эндо-1,3- β -D-глюканазы из вьетнамской мидии *Perna viridis*. // Биоорган. химия. 2009. V. 35. P. 62-69.
228. Zakharenko A.M., Kusaykin M.I., Kovalchuk S.N., Anastyuk S.D., Ly B.M., Sova V.V., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N. Enzymatic and molecular characterization of an endo-1,3- β -D-glucanase from the crystalline styles of the mussel *Perna viridis*. // Carbohydr. Res. 2011. V. 346. P. 243-252.
229. Бурцева Ю.В., Веригина Н.С., Сова В.В., Пивкин М.В., Звягинцева Т.Н. О-гликозилгидролазы морских мицелиальных грибов. β -1,3-Глюканазы морского гриба *Trichoderma aureviride*. // Прикл. биохим. и микробиол. 2003. Т. 39. С. 542-548.

230. Kovalchuk S.N., Sundukova E.V., Kusaykin M.I., Guzev K.V., Anastiuk S.D., Likhatskaya G.N., Trifonov E.V., Nurminski E.A., Kozhemyako V.B., Zvyagintseva T.N., Rasskazov V.A. Purification, cDNA cloning and homology modeling of endo-1,3-beta-D-glucanase from scallop *Mizuhopecten yessoensis*. // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2006. V. 143. P. 473-485.
231. Sinnott M.L. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. // Chem. Rev. 1990. V. 90. P. 1171-1202.
232. Звягинцева Т.Н., Макарьева Т.Н., Ермакова С.П., Елякова Л.А. Получение п-нитрофенил-ламинариолигозидов реакцией трансгликозилирования, катализируемой эндо-1,3-β-D-глюканазой из морского моллюска. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 219-223.
233. Звягинцева Т.Н., Назарова Н.И., Елякова Л.А. Исследование трансгликозилирующей способности эндо-β-1,3-глюканаз. II. Кинетические особенности реакций гидролиза и трансгликозилирования, катализируемых эндо-β-1,3-глюканазами морских моллюсков // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. С. 1342-1346.
234. Безукладников П.В., Елякова Л.А., Звягинцева Т.Н., Миргородская О.А. Исследование трансгликозилирующей способности эндо-1,3-β-глюканаз. V. Специфичность реакции трансгликозилирования, катализируемой эндо-1,3-β-глюканазой ЛЮ из *Chlamys albidus*, с использованием в качестве акцептора глицерина. // Химия природных соединений. 1989. Т. 15. С. 1318-1325.
235. Pesentseva M.S., Kusaykin M.I., Anastyuk S.D., Sova V.V., Zvyagintseva T.N. Catalytic properties and mode of action of endo-(1-->3)-beta-D-glucanase and beta-D-glucosidase from the marine mollusk *Littorina kurila*. // Carbohydr. Res. 2008. V. 343. P. 2393-2400.
236. Tang L., Kebarle P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. // Anal. Chem. 1993. V. 65. P. 3654-3668.
237. Bonnin E., Vigouroux J., Thibault J.F. Kinetic parameters of hydrolysis and transglycosylation catalyzed by an exo-β-(1,4)-galactanase. // Enzyme Microb. Technol. 1997. V. 20. P. 516-522.

238. Elyakova L.A., Zvyagintseva T.N. A study of the laminarins of some far-eastern, brown seaweeds. // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. P. 241-248.
239. Sritunyalucksana K., Söderhäll K. The proPO and clotting system in crustaceans. // Aquaculture 2000. V. 191. P. 53-69.
240. Lee S.Y., Wang R., Soderhall K. A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 1337-1343.
241. Gueguen Y., Voorhorst W.G., van der Oost J., de Vos W.M. Molecular and biochemical characterization of an endo-beta-1,3- glucanase of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*.// J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 31258-31264.
242. Krah M., Misselwitz R., Politz O., Thomsen K.K., Welfle H., Borriss R. The laminarinase from thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus* conformation, stability, and identification of active site carboxylic residues by site-directed mutagenesis. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 257. P. 101-111.
243. Ebel J. Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. // Bioessays 1998. V. 20. P. 569-576.
244. Mithofer A., Fliegmann J., Neuhaus-Url G., Schwarz H., Ebel J. The hepta-beta-glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family.// Biol. Chem. 2000. V. 381. P. 705-713.
245. Umemoto N., Kakitani M., Iwamatsu A., Yoshikawa M., Yamaoka N., Ishida I.// The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997. V. 94. P. 1029-1034.
246. Kozhemyako V.B., Rebrikov D.V., Lukyanov S.A., Bogdanova E.A., Marin A., Mazur A.K., Kovalchuk S.N., Agafonova E.V., Sova V.V., Elyakova L.A., Rasskazov V.A. Molecular cloning and characterization of an endo-1,3-beta-D-glucanase from the mollusk *Spisula sachalinensis*. // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2004. V. 137. P. 169-178.
247. Zakharenko A.M., Kusaykin M.I., Kovalchuk S.N., Sova V.V., Silchenko A.S., Belik A.A., Anastyuk S.D., Ly B.M., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N Catalytic

- properties and amino acid sequence of endo-1 $\rightarrow$ 3-beta-D-glucanase from the marine mollusk *Tapes literata*. // Biochemistry (Mosc) 2012. V. 77. P. 878-888.
248. Pesentseva M.S., Kovalchuk S.N., Anastyuk S.D., Kusaykin M.I., Sova V.V., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N. Endo-(1,3)-beta-D-glucanase GI from marine mollusk *Littorina sitkana*: Amino acid sequence and ESIMS/MS-estimated features of transglycosylation and hydrolysis reactions in comparison to analogous enzyme LIV from *Pseudocardium sachalinensis*. // J. Mol.Cat. B: Enzym. 2012. V. 75. P. 73-79.
 249. Song J.M., Nam K., Sun Y.U., Kang M.H., Kim C.G., Kwon S.T., Lee J., Lee Y.H. Molecular and biochemical characterizations of a novel arthropod endo-beta-1,3-glucanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*, horizontally acquired from bacteria.// Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2010. V. 155. P. 403-412.
 250. Ferrer P., Halkier T., Hedegaard L., Savva D., Diers I., Asenjo J.A. Nucleotide sequence of a beta-1,3-glucanase isoenzyme IIA gene of *Oerskovia xanthineolytica* LL G109 (*Cellulomonas cellulans*) and initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 4751-4757.
 251. Schultz J., Copley R.R., Doerks T., Ponting C.P., Bork P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 231-234.
 252. Muchmore A.V., Epel D., Weaver A.M., Schimke R.T. Purification and properties of an exo- β -D-1,3-glucanase from sea urchin eggs. // Biochim. Biophys. Acta. 1969. V. 178. P. 551-560.
 253. Широкова Н.И., Елякова Л.А. Экзо-бета-1,3-глюканаза из улитки *Eulota maakii* // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 1656-1662.
 254. Sova V.V., Shirokova N.I., Kusaykin M.I., Scobun A.S., Elyakova L.A., Zvyagintseva T.N. Beta-1,3-glucanase from unfertilized eggs of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. Comparison with beta-1,3-glucanases of marine and terrestrial mollusks. // Biochemistry (Mosc) 2003. V. 68. P. 529-533.
 255. Heinz F., Beushausen T.W. A new enzymatic method for the determination of glucose. // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1981. V. 19. P. 977-978.

256. Burtseva Y.V., Verigina N., Sova V.V., Pivkin M.V., Zvyagintseva T.N. Comparative characterization of laminarinases from the filamentous marine fungi *Chaetomium indicum* Corda and *Trichoderma aureviride* Rifai. // J. Appl. Phycol. 2006. V. 18. P. 375-380.
257. Lepagnol-Descamps V., Richard C., Lahaye M., Potin P., Yvin J.C., Kloareg B. Purification and determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* laminarinase. // Carbohydr. Res. 1998. V. 310. P. 283-289.
258. Privalova N.M., Elyakova L.A. Purification and some properties of endo-beta-(1-3)-glucanase from the marine bivalve *Chlamys abbidus*. // Comp. Biochem. Physiol. B 1978. V. 60. P. 225-228.
259. Miller G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. // Anal. Chem. 1959. V. 31. P. 426-428.
260. Doner L.W., Irwin P.L. Assay of reducing end-groups in oligosaccharide homologues with 2,2'-bicinchoninate. // Anal. Biochem. 1992. V. 202. P. 50-53.
261. Cole S.W. The determination of reducing sugars by titration of ferricyanide. // Biochem. J. 1933. V. 27. P. 723-726.
262. Nishino T., Nishioka C., Ura H., Nagumo T. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. // Carbohydr. Res. 1994. V. 255. P. 213-224.
263. Ermakova S.P., Ivanova E.P., Bakunina I., Mikhailov V.V., Zviagintseva T.N. [Brown algae metabolites influence on o-glycoside hydrolases synthesis of bacteria degrading *Fucus evanescens* tallom]. // Mikrobiologiya 2012. V. 81. P. 396-402.
264. Ivanova E.P., Alexeeva Y.V., Flavier S., Wright J.P., Zhukova N.V., Gorshkova N.M., Mikhailov V.V., Nicolau D.V., Christen R. *Formosa algae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 705-711.
265. Silchenko A.S., Ustyuzhanina N.E., Kusaykin M.I., Krylov V.B., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Usoltseva R.V., Zueva A.O., Nifantiev N.E., Zvyagintseva T.N. Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from *Formosa algae* // Glycobiology 2017. V. 27. P. 1-10.