

Субстратна специфічність α -галактозидаз мікроміцетів

α -Галактозидаза [КФ 3.2.1.49] — глікозил-гідролаза, що каталізує відщеплення D-галактози від полі-, олігосахаридів та глікокон'югатів. З медичної точки зору ензим представляє інтерес як інструмент біо-трансформації еритроцитів крові групи В(III) в універсальні донорські еритроцити, а також як терапевтичний засіб для лікування хвороби Фабрі. У харчовій промисловості α -галактозидазу можна використовувати для покращення якості соєвих продуктів завдяки її здатності деградувати важкозасвоювані галактоолігосахариди родини рафінози.

Із культур *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium canescens* та *Aspergillus niger* виділено та очищено α -галактозидази, які близькі за своїми фізико-хімічними властивостями (Мм, термо- та рН-оптимумом, УФ-резистентністю, стійкістю до дії протеаз), проте відрізняються субстратною специфічністю. Так, α -галактозидаза *A. niger* мала вузький спектр активності: очищений препарат гідролізував *n*-нітрофеніл- α -D-галактопіранозид (*n*-НФГ), $V_{\max} = 25$ мкмоль/хв/мг, $K_m = 1,19$ мМ та *n*-нітрофеніл- α -N-ацетилгалактопіранозид. Ензим *P. canescens* крім *n*-НФГ ($V_{\max} = 333$ мкмоль/хв/мг, $K_m = 1$ мМ), гідролізував галактоолігосахариди мелібіозу, рафінозу та стахіозу (K_m 4,0; 5,7 і 3,5 відповідно) та α -1,3-дигалактозид групи крові В(III). Найширший спектр активності відзначений у α -галактозидази *C. cladosporioides*: крім галактоолігосахаридів та *n*-НФГ ензим гідролізував *n*-НФ- β -N-ацетилгалактопіранозид, *n*-НФ- β -N-ацетилглюкопіранозид і *n*-НФ- α -глюкопіранозид. До синтетичних субстратів ензим мав більшу спорідненість, ніж до природних. Так, K_m для *n*-НФГ була 0,76 мМ, для *n*-НФ- β -N-ацетилгалактопіранозиду — 1,1 мМ, для *n*-НФ- β -N-ацетилглюкопіранозиду — 0,85 мМ та для *n*-НФ- α -глюкопіранозиду — 0,91 мМ. Однак саме ця галактозидаза найбільш ефективно розщеплювала природні субстрати мелібіозу (K_m 1,7 мМ), рафінозу (K_m 2,2 мМ) та стахіозу (K_m 1,8 мМ). Значення k_0 для мелібіози, рафінози, стахіози та *n*-НФГ α -галактозидази *P. canescens* склали відповідно 66,7; 48,2; 60,7 та 2220 с^{-1} . Значення k_0 для мелібіози, рафінози, стахіози та *n*-НФГ α -галактозидази *C. cladosporioides* склали відповідно 10,6; 22,1; 16,7 та 226 с^{-1} . Обчисливши швидкісні параметри (K_m , k_0 і k_0/K_m) для серії галактоолігосахаридів, на основі теорії субсайтів розраховували спорідненість дочірніх сайтів до субстратів у каталітичному центрі ензимів. Показники спорідненості дочірніх сайтів *P. canescens* (A_i , $i = 1 - 4$) склали $A_1 = 27,5$; $A_2 = 1,73$; $A_3 = -0,42$ і $A_4 = 0,45$ ккал/мол, константа істинної швидкості гідролізу глікозидного зв'язку k_{int} складала 54,5 с^{-1} . Провели розрахунок показників спорідненості для сайтів зв'язування

α -галактозидази *C. cladosporioides*, які склали $A_1 = 0,75$; $A_2 = 1,124$; $A_3 = 0,298$ і $A_4 = -0,05$ ккал/мол, $k_{\text{int}} = 26,3 \text{ с}^{-1}$. В обох випадках каталітичний сайт розташовується між субсайтами A_1 та A_2 .

Таким чином, досліджені кінетичні параметри та субстратна специфічність α -галактозидаз мікроміцетів до природних та синтетичних субстратів створюють базис для розробки ефективних технологій біо-трансформації для медицини та харчової промисловості.