

УДК 577.151.4

ХАРАКТЕРИСТИКА СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЫСОКОСТАБИЛЬНОЙ β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ИЗ *DESULFUROCOCCLUS AMYLOLITICUS***В.Р. Сергеев^{1,2}, Ю.В. Киль^{1,3}, Ибатуллин Ф.М.¹, Г.Н. Рычков^{1,2,3}**¹ *Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*² *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*³ *Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия*

Термофильные микроорганизмы являются важными источниками ферментов, обладающих высокой температурной стабильностью и потенциалом промышленного применения. Одним из таких ферментов является бета-галактозидаза, которая применяется, например, для получения глюкозо-галактозной патоки из лактозы, производства безлактозной молочной продукции, синтеза пребиотиков-галактоолигосахаридов. Основным недостатком многих термостабильных ферментов является низкая каталитическая активность. В настоящее время развиваются подходы, позволяющие оптимизировать соотношение активность / стабильность фермента и корректировать субстратную специфичность и механизм реакции, ориентируясь на конкретные биотехнологические процессы (1–2).

Мы клонировали, секвенировали и экспрессировали в клетках *E. coli* ген β -галактозидазы из гипертермофильной археи *Desulfurococcus amylophilus*. Очищенный до практической гомогенности фермент обладает следующими ферментативными активностями: расщепляет лактозу, орто- и паранитрофенил- β -галактозиды, и с меньшей эффективностью β -D-паранитрофенил-глюкозид. Паранитрофенил-маннозид, пара-нитрофенил-тиогалактозид и β -N-фенил-галактозид не расщеплялись ферментом. Анализ влияния различных ионов на ферментативную активность показал, что основные «пищевые» ионы (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- и др.) не оказывают заметного влияния на активность. В то же время катионы Cu^{+2} в миллимолярных концентрациях сильно инактивируют фермент. Активаторы фермента обнаружены не были. Обработка фермента пара-хлор-ртути-бензоатом приводила лишь к 30 % потере активности. Фермент характеризуется высокой термостабильностью: для реакции гидролиза лактозы при pH=5 температурный оптимум составляет примерно 100°C.

Методом ТСХ на силикагеле установили, что при концентрациях субстратов $\leq K_M$ основной реакцией является гидролиз. При повышении концентрации исходных субстратов и при введении в реакцию смесь альтернативных воде низкомолекулярных акцепторов галактозильной группы, таких как спирты, полиолы и углеводы, наблюдали дополнительные продукты реакции трансгликозилирования. Качественный анализ методом ТСХ показал, что предпочтительными акцепторами являются низкомолекулярные спирты (метанол, этанол, изопропанол, бутанол), тогда как сами углеводы и альдиты являются значительно худшими акцепторами галактозильной группы при расщеплении субстрата. К хорошим акцепторам также можно отнести субстраты пара- β -нитрофенил и орто- β -нитрофенил галактозиды: их расщепление при концентрациях порядка $5K_M$ сопровождается значительным образованием димеров и тримеров, являющихся продуктами, которые, в конечном итоге, расщепляются до галактозы и нитрофенола. Показали, что метил- и глицерол-галактозиды, образующиеся в результате трансгликозилирования в присутствии альтернативных акцепторов галактозильной группы также расщепляются ферментом. Поэтому реакция гидролиза будет основной при умеренных начальных концентрациях субстратов и продолжительных временах инкубации. При высоких концентрациях субстратов реакция ингибируется увеличивающимися концентрациями галактозы, которая является сильным конкурентным ингибитором.

ЛИТЕРАТУРА

1. Li, Y., & Cirino, P.C. (2014). Recent advances in engineering proteins for biocatalysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(7), 1273–1287.
2. Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018). Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL bioengineering*, 2(1), 011501.