

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-56

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА ТУПАЙИ****DETERMINATION OF KINETIC CHARACTERISTICS OF RECOMBINANT TUPAYA CHYMOSIN**

Е. А. Белаш, Д. Н. Щербаков

*Алтайский государственный университет, Барнаул**Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

E.A. Belash, D.N. Shcherbakov

*Altai State University, Barnaul**State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*

✉ ekaterina.belash1@gmail.com

Аннотация

Исследованы кинетические параметры химозинов на синтетических субстратах. Химозин верблюда наиболее эффективен для гидролиза коровьего и верблюжьего субстратов ($k_{cat}/K_m = 159,4/11,1 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$), тогда как химозин тупайи демонстрирует максимальную каталитическую эффективность в отношении субстрата тупайи ($k_{cat}/K_m = 27,6 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$). Высокое сродство химозина тупайи к коровьему κ -казеину ($K_m = 0,1 \text{ мкМ}$) указывает на его потенциал для сыроделия.

Abstract

The kinetic parameters of chymosins were studied using synthetic substrates. Camel chymosin showed the highest catalytic efficiency for bovine and camel substrates ($k_{cat}/K_m = 159.4/11.1 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), while tupai chymosin exhibited maximum efficiency toward the tupai substrate ($k_{cat}/K_m = 27.6 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). The high affinity of tupai chymosin for bovine κ -casein ($K_m = 0.1 \text{ }\mu\text{M}$) suggests its potential for cheese production.

Кинетические характеристики являются неотъемлемой частью полной биохимической оценки химозинов, используемых в сыроделии. Рекombинантный химозин тупайи (*Tupaia belangeri chinensis*) представляет потенциальный интерес для сыроделия, так как обладает способностью коагулировать молоко коровы и характеризуется низкой термостабильностью.

Цель данной работы заключалась в определении кинетических параметров рекомбинантного химозина тупайи при использовании синтетических пептидов, имитирующих κ -казеины коровы, верблюда и тупайи.

Кинетику Михаэлиса — Ментен исследовали методом флуоресцентной спектроскопии с использованием микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Измерения проводили в режиме кинетического считывания. Длины волн возбуждения и эмиссии составляли 480 и 530 нм соответственно, ширина полосы пропускания — 12 нм. Количество считываний — 15, с интервалом 20 секунд. Параметры определяли в трех повторностях. Реакционные смеси готовили в 384-луночной планшете. В каждую лунку вносили субстрат в концентрации от 0 до 20 мкМ в 50 мМ Na-ацетатном буфере (pH 5,8). Реакцию инициировали добавлением раствора рекомбинантного химозина. Конечная концентрация фермента составляла 5 нМ. В качестве препаратов сравнения использовали рекомбинантный химозин коровы (pXн-Bos) и верблюда (pXн-Cam), в качестве исследуемого — рекомбинантный химозин тупайи (pXн-Tup). Были определены следующие параметры: константа Михаэлиса (K_m , мкМ), максимальная скорость реакции (V_{max} , нм/с), константа каталитической активности фермента (k_{cat} , с^{-1}) и каталитическая эффективность фермента (k_{cat}/K_m , $\text{мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$). В качестве субстратов использовались синтетические пептиды, имитирующие участок κ -казеина коровы, верблюда и тупайи. Результаты определения кинетических параметров приведены в таблице.

Наиболее эффективным ферментом для гидролиза субстратов, имитирующих κ -казеин коровы и верблюда, является pXн-Cam. Это подтверждается его высокой каталитической эффективностью ($k_{cat}/K_m = 159,4 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ для субстрата, имитирующего κ -казеин коровы и $11,1 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ для субстрата верблюда). pXн-Tup показывает наибольшую эффективность при гидролизе субстрата, имитирующего κ -казеин тупайи ($k_{cat}/K_m = 27,6 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$). Однако для других субстратов он уступает pXн-Cam, несмотря на высокое сродство к субстрату, имитирующему κ -казеин коровы ($K_m = 0,1 \text{ мкМ}$). pXн-Bos демонстрирует наименьшую каталитическую эффективность для всех

субстратов ($k_{cat}/K_m = 24,7 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ для субстрата к-казеина коровы, $2,1 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ для субстрата к-казеина верблюда и $1,0 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ для тупайи).

Кинетические параметры рекомбинантных химозинов при гидролизе синтетических субстратов

| Препарат рХн | рХн-Bos | рХн-Cam | рХн-Tup |
|--|--|------------------|------------------|
| Кинетические параметры | Субстрат, имитирующий участок к-казеина коровы | | |
| K_m (мкМ) | $2,2 \pm 0,9$ | $1,4 \pm 0,7$ | $0,1 \pm 0,05$ |
| V_{max} (нм/с) | $256,8 \pm 89,4$ | $174,9 \pm 9,3$ | $84,2 \pm 27,6$ |
| k_{cat} (с^{-1}) | $50,3 \pm 6,9$ | $177,4 \pm 11,4$ | $16,8 \pm 5,5$ |
| k_{cat}/K_m ($\text{мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$) | $24,7 \pm 6,5$ | $159,4 \pm 55,6$ | $125,1 \pm 39,2$ |
| Кинетические параметры | Субстрат, имитирующий участок к-казеина верблюда | | |
| K_m (мкМ) | $1,4 \pm 0,1$ | $0,7 \pm 0,3$ | $1,0 \pm 0,5$ |
| V_{max} (нм/с) | $16,9 \pm 0,7$ | $36,8 \pm 3,0$ | $17,1 \pm 6,7$ |
| k_{cat} (с^{-1}) | $2,9 \pm 0,1$ | $7,4 \pm 0,6$ | $3,4 \pm 1,3$ |
| k_{cat}/K_m ($\text{мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$) | $2,1 \pm 0,1$ | $11,1 \pm 3,3$ | $3,9 \pm 1,4$ |
| Кинетические параметры | Субстрат, имитирующий участок к-казеина тупайи | | |
| K_m (мкМ) | $3,8 \pm 2,0$ | $4,2 \pm 1,8$ | $2,1 \pm 0,6$ |
| V_{max} (нм/с) | $15,5 \pm 6,5$ | $36,0 \pm 8,7$ | $284,5 \pm 35,7$ |
| k_{cat} (с^{-1}) | $3,2 \pm 1,3$ | $7,2 \pm 1,7$ | $56,9 \pm 7,1$ |
| k_{cat}/K_m ($\text{мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$) | $1,0 \pm 0,4$ | $2,0 \pm 1,2$ | $27,6 \pm 6,1$ |

В работе [1] было показано, что рХн тупайи продемонстрировал самые низкие значения K_m (6,3 мкМ) на субстрате, имитирующем участок к-казеина коровы, по сравнению со стандартами — рХн коровы (12,0 мкМ) и верблюда (20,3 мкМ). Следует отметить, что различия в данной характеристике между результатами, полученными в настоящей работе, составляют 45 раз, хотя общая закономерность более высокой аффинности химозина тупайи к субстрату, имитирующему чувствительный участок к-казеина коровы, подтверждается в обоих исследованиях. Таким образом, разнообразие методик, используемых для определения кинетических свойств, а также зависимость результатов от условий эксперимента и используемых субстратов затрудняют сравнительную оценку свойств ферментов, полученных различными научными группами, что актуализирует важность составления стандартизированной методики.

В ходе исследования все исследуемые химозины продемонстрировали наилучшие кинетические характеристики при использовании в качестве субстрата к-казеина коровы. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования рХн-Тур в качестве альтернативного коагулирующего фермента в сыроделии, особенно для переработки коровьего молока.

Литература

1. Балабова Д. В., Беленькая С. В., Балабова Д. В. и др. Может ли рекомбинантный химозин тупайи (*Tupaia belangeri chinensis*) коагулировать молоко коровы (*Bos taurus*)? // Прикладная биохимия и микробиология. 2022. Т. 58, № 6. С. 607–618.