

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА ТУПАЙИ

DETERMINATION OF KINETIC CHARACTERISTICS OF RECOMBINANT TUPAYA CHYMOGIN

Е. А. Белащ, 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 катализическую 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 ($k_{cat}/K_m = 159.4/11.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), while tupai chymosin exhibited maximum efficiency toward the tupai substrate ($k_{cat}/K_m = 27.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). The high affinity of tupai chymosin for bovine κ -casein ($K_m = 0.1 \mu\text{M}$) suggests its potential for cheese production.

Кинетические характеристики являются неотъемлемой частью полной биохимической оценки химозинов, используемых в сыроделии. Рекомбинантный 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-луночном планшете. В каждую лунку вносили субстрат в концентрации от 0 до 20 мкМ в 50 мМ Na-ацетатном буфере (рН 5,8). Реакцию инициировали добавлением раствора рекомбинантного химозина. Конечная концентрация фермента составляла 5 нМ. В качестве препаратов сравнения использовали рекомбинантный химозин коровы (рХн-Bos) и верблюда (рХн-Cam), в качестве исследуемого — рекомбинантный химозин тупайи (рХн-Tup). Были определены следующие параметры: константа Михаэлиса (K_m , мкМ), максимальная скорость реакции (V_{max} , нм/с), константа катализической активности фермента (k_{cat} , с^{-1}) и катализическая 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 рХн-Cam. Это подтверждается его высокой катализической 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). рХн-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 рХн-Cam, несмотря на высокое сродство к субстрату, имитирующему κ -казеин коровы ($K_m = 0,1 \text{ мкМ}$). рХн-Bos демонстрирует наименьшую катализическую эффективность для всех

субстратов ($k_{cat}/K_m = 24,7 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ для субстрата κ -казеина коровы, $2,1 \text{ мкМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ для субстрата κ -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-Сам	рХн-Тир
Кинетические параметры	Субстрат, имитирующий участок κ -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 (мкМ ⁻¹ с ⁻¹)	$24,7 \pm 6,5$	$159,4 \pm 55,6$	$125,1 \pm 39,2$
Кинетические параметры	Субстрат, имитирующий участок κ -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 (мкМ ⁻¹ с ⁻¹)	$2,1 \pm 0,1$	$11,1 \pm 3,3$	$3,9 \pm 1,4$
Кинетические параметры	Субстрат, имитирующий участок κ -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 (мкМ ⁻¹ 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 κ -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 κ -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 κ -казеина коровы. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования рХн-Тир в качестве альтернативного коагулирующего фермента в сыроделии, особенно для переработки коровьего молока.

Литература

- 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.