

Владимир Александрович Пушкарев^{1, 2}, младший научный сотрудник, аспирант
 Ольга Николаевна Мусина^{1, 2}, д-р техн. наук, главный научный сотрудник, доцент
 Светлана Валерьевна Беленькая^{3, 4}, канд. биол. наук, научный сотрудник
 Дмитрий Николаевич Щербаков^{3, 4}, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник
 Анатолий Дмитриевич Коваль¹, канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник
 Александр Николаевич Белов¹, канд. техн. наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник
 Вадим Валентинович Ельчанинов¹, канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник

¹Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул

²Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова, Барнаул

³Алтайский государственный университет, Барнаул

⁴Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово

УДК 637.334.2:577.151.6

DOI: 10.31515/2073-4018-2023-3-42-44

Термостабильность и параметры кинетики Михаэлиса-Ментен инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*)

Изучена термостабильность и параметры кинетики Михаэлиса-Ментен инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*) с точечной аминокислотной заменой Lys53→Glu. Значения порога термоинактивации исследуемого фермента и коммерческого рекомбинантного химозина коровы совпали и составили 50 °С. Инженерный фермент северного оленя проявлял наибольшую аффинность к использованному хромогенному субстрату, его константа Михаэлиса (K_m) была в 1,5–4,7 раза ниже, чем у коммерческих рекомбинантных химозинов. Каталитические константы скорости (k_{cat}) инженерного варианта химозина оленя и рекомбинантного химозина верблюда были сопоставимы. По специфичности (k_{cat}/K_m) химозины северного оленя и коровы превосходили генно-инженерный аналог химозина одnogорбого верблюда в 1,7 раза.

Ключевые слова: химозин, северный олень, инженерный вариант рекомбинантного химозина, термостабильность, параметры кинетики Михаэлиса-Ментен.

Pushkarev V. A.^{1, 2}, Musina O. N.^{1, 2}, Belenkaya S. V.^{3, 4}, Shcherbakov D. N.^{3, 4}, Koval A. D.¹, Belov A. N.¹, Elchaninov V. V.¹ Thermal stability and Michaelis-Menten kinetics parameters of engineered variant of recombinant reindeer chymosin (*Rangifer tarandus*)

¹Federal Altai Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul

²Polzunov Altai State Technical University, Barnaul

³Altai State University, Barnaul

⁴State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rosпотребнадзор, Novosibirsk region, Koltsovo

The thermal stability and parameters of the Michaelis-Menten kinetics of engineered variant of recombinant reindeer chymosin (*Rangifer tarandus*) with a point amino acid substitution Lys53→Glu were studied. The values of the threshold of thermal inactivation of the studied enzyme and commercial recombinant cow chymosin coincided and amounted to 50 °C. The engineered reindeer enzyme showed the greatest affinity to the used chromogenic substrate, its Michaelis constant (K_m) was 1,5–4,7 times lower than the same indicator of commercial recombinant chymosins. The catalytic rate constants (k_{cat}) of the engineered variant of deer chymosin and recombinant camel chymosin were comparable. In terms of specificity (k_{cat}/K_m), the chymosins of reindeer and cow surpassed the genetically engineered analogue of the chymosin of the single-humped camel by 1,7 times.

Key words: chymosin, reindeer, engineered variant of recombinant chymosin, thermal stability, parameters of Michaelis-Menten kinetics.

Термостабильность (ТС) является значимым свойством любого промышленного молокосвертывающего ферментного препарата. В зависимости от

технологических параметров и природы молокосвертывающего фермента (МФ) в сырном зерне может оставаться до 50 % от внесенного в молоко коагулянта [1, 2]. При выработке сыров с высокой температурой второго нагревания и длительными сроками созревания и хранения термостабильный МФ может не полностью инактивироваться на стадии тепловой обработки и, оставаясь в сырной массе, проявлять протеолитическую активность (ПА), негативно влияющую на качество конечной продукции. Показано, что химозин (Хн) вносит заметный и не всегда позитивный вклад в «протеолитическое созревание» таких сыров, как «Parmigiano Reggiano» [3], «Grana Padano» [4], «Camembert» [5], «Beyaz Peynir» [6], «Maasdam» [7]. Информация о ТС коагулянтов молока позволяет регулировать степень протеолиза в сырах путем варьирования температуры обработки сырного зерна и (или) за счет применения МФ с различной термоустойчивостью [7].

Для полной биохимической характеристики и сравнения эффективности различных ферментов важно определение основных параметров кинетики Михаэлиса-Ментен: константы Михаэлиса (K_m), каталитической константы скорости (k_{cat}) и константы специфичности (k_{cat}/K_m) [8–10].

Ранее авторами исследована молокосвертывающая и протеолитическая активность, а также влияние pH и концентрации Ca^{2+} на коагуляционную способность инженерного варианта рекомбинантного химозина (pХн) северного оленя (*Rangifer tarandus*) с точечной аминокислотной заменой Lys53→Glu (pХн-Rta-K53E) [11, 12].

Данная работа ставила перед собой две задачи: определение ТС pХн-Rta-K53E и сравнение полученных ре-

зультатов с показателями натурального МФ из сычугов северного оленя [13]; сравнение показателей кинетики Михаэлиса-Ментен рХн-Rta-K53E и коммерческих рекомбинантных химозинов.

Материалы и методы

Так же, как и в работах [11, 12], в качестве ферментов сравнения использовали рХн коровы (рХн-Bos) и рХн одnogорбого верблюда (рХн-Cam), от компании Chr. Hansen (Дания). Молокосвертывающую активность ферментов сравнения нормировали по активности препарата рХн-Rta-K53E.

Молокосвертывающую активность определяли по методике [11].

Термостабильность. Аликвоты МФ прогревали на водяной бане при 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 °С в течение 30 мин, быстро охлаждали до комнатной температуры и определяли их МА. Коагуляционную активность образцов прогретых при 30 °С принимали за 100 %. Строили график зависимости МА от температуры прогревания. Порогом термоинактивации МФ считали температуру, при которой его исходная МА снижалась более чем на 20 %.

Определение параметров кинетики Михаэлиса-Ментен. Кинетику Михаэлиса-Ментен исследовали методом флуоресцентной спектроскопии в соответствии с методикой, описанной в работе [14].

Для определения предельной скорости ферментативной реакции и расчета констант использовали программное обеспечение MARS Data Analysis (BMG LABTECH, Германия). Константу Михаэлиса (K_m) определяли по уравнению Михаэлиса-Ментен [15], каталитическую константу скорости реакции гидролиза или число оборотов фермента рассчитывали по формуле:

$$k_{cat} = V_{max}/[E],$$

где k_{cat} — каталитическая константа скорости реакции гидролиза субстрата; V_{max} — предельная скорость реакции; $[E]$ — концентрация исследуемого рХн.

Каталитическую эффективность (константу специфичности) определяли, как соотношение k_{cat}/K_m .

Все измерения, выполненные с использованием коммерческих рХн, повторяли не менее трех раз ($n \geq 3$). Поскольку объем препарата рХн-Rta-K53E был ограничен, измерения проводили в двух повторностях.

Результаты и их обсуждение

Термостабильность. Порогом ТС считали температуру, при которой МФ сохраняет не менее 80 % от исходной МА. Согласно этому критерию, порог ТС для молокосвертывающего фермента северного оленя (МФСО) и отраслевого контрольного образца сычужного фермента (ОКО СФ) составлял 55 °С. Для говяжьего пепсина (ГП) этот показатель был равен 60 °С (рисунок А). Можно заметить, что при 60 °С происходила полная инактивация МФСО, тогда как ОКО СФ и ГП сохраняли при этой температуре ≈ 4 и ≈ 60 % от исходной МА. По критерию ТС ферменты, исследованные в работе [13], можно ранжировать следующим образом: ГП > ОКО СФ \approx МФСО.

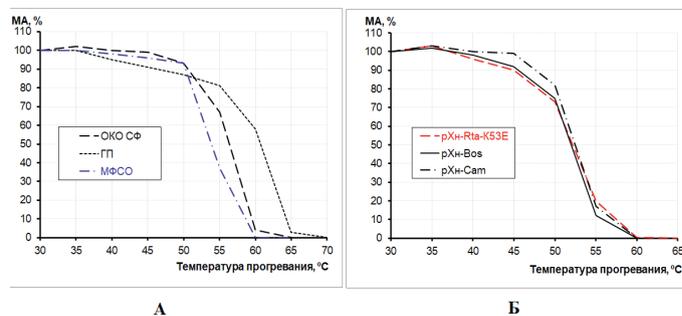
Графики, представленные на рисунке Б, свидетельствуют, что пороги термоинактивации рХн-Rta-K53E и рХн-Bos равнялись 50 °С. В отличие от них ТС рХн-Cam была выше и фермент терял более 20 % от исходной МА при 55 °С.

На рисунке Б заметна интересная особенность: при температуре прогревания более 60 °С рХн-Bos и рХн-Cam полностью утрачивали МА, а коагуляционная способность рХн-Rta-K53E в этих условиях сохранялась хоть и на очень низком (0,4 %), но надежно регистрируемом уровне. Возможно растянутый диапазон термоинактивации, с «хвостом» остаточной МА при температуре более 60 °С обусловлен молекулярной микрогетерогенностью препарата рХн-Rta-K53E, который мог содержать смесь конформеров фермента с различной степенью формирования корректной третичной структуры и различными порогами ТС. При этом основная часть коагуляционно активных молекул инактивировалась при 55 °С, а минорная проявляла более высокую ТС, что и давало остаточную МА после прогревания при 60 °С.

Графики наглядно показывают, что по динамике термоинактивации в диапазоне температур 30–50 °С рХн-Rta-K53E приближается к рХн-Bos и лишь на небольшом отрезке 55–60 °С ведет себя как рХн-Cam (рисунок Б). Так же, как и в случае с ОКО СФ и МФСО [13], рХн-Rta-K53E и рХн-Bos имеют похожую динамику термоинактивации. По критерию ТС исследованные ферменты можно выстроить в следующий ряд: рХн-Cam > рХн-Bos \approx рХн-Rta-K53E.

Таким образом установлено, что инженерный вариант рХн северного оленя не уступает эталонным генно-инженерным коагулянтам коровьего молока по ТС и по данному технологическому параметру может быть отнесен к высококачественным универсальным МФ.

Исследование параметров кинетики Михаэлиса-Ментен. Параметры ферментативной кинетики в работе [13] не исследовались. Результаты определения показателей кинетики Михаэлиса-Ментен рХн-Rta-K53E и коммерческих рХн представлены в таблице.



Термостабильность молокосвертывающего фермента из сычугов северных оленей (А, по данным [13]) и инженерного варианта рХн северного оленя (Б). Условные обозначения: (А) ОКО СФ – отраслевой контрольный образец сычужного фермента; ГП – говяжий пепсин; МФСО – молокосвертывающий фермент из сычугов северных оленей; (Б) рХн-Rta-K53E – инженерный вариант рХн северного оленя; рХн-Bos – рХн коровы; рХн-Cam – рХн одnogорбого верблюда

Параметры кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантных химозинов

Параметр	рХн-Rta-K53E	рХн-Cam	рХн-Bos
K_m (мкМ)	0,85*	1,28±0,14	3,97±0,34
k_{cat} (с ⁻¹)	3,57*	3,66±0,09	16,9±0,21
k_{cat}/K_m (мкМ ⁻¹ с ⁻¹)	4,20*	2,45±0,16	4,26±0,52

*Усредненные результаты двух измерений.

В математическом смысле K_m соответствует концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной. Ее биологический смысл заключается в характеристике сродства (аффинности) фермента к субстрату, а именно: увеличение K_m означает снижение аффинности. Судя по значениям K_m , сродство рХн-Rta-K53E к пептиду, имитирующему Хн-чувствительный участок к-КЗ коровы, было в 1,5 и 4,7 раза выше, чем у рХн-Cam и рХн-Bos.

При полном насыщении фермента субстратом константа k_{cat} указывает на количество молекул субстрата, которое превращается в продукты реакции в единицу времени. По-видимому, повышенная аффинность оленьего фермента к субстрату препятствует его быстрому освобождению от продуктов реакции и за низкую K_m рХн-Rta-K53E приходится «расплачиваться» снижением числа оборотов фермента (k_{cat}). Из данных таблицы видно, что по сравнению с рХн-Bos каталитическая константа скорости рХн-Rta-K53E и рХн-Cam, оказалась в 4,6–4,7 раза ниже.

Необходимо заметить, что низкие значения k_{cat} , полученные на изолированном синтетическом пептидном субстрате, не обязательно отражают низкую эффективность рХн при гидролизе мицеллярного к-КЗ. В качестве примера можно привести данные [8], согласно которым число оборотов рХн одnogорбого верблюда, полученное на синтетическом аналоге Хн-чувствительного участка коровьего к-КЗ, было в 4 раза ниже, чем у коровьего рХн. Однако на молочном субстрате специфическая (коагуляционная) активность рХн верблюда оказалась на 70 % выше, чем у рХн коровы. На данное противоречие указывали и авторы работы [16], посвященной обзору основных биохимических свойств рХн. По их мнению, наиболее подходящим искусственным субстратом для изучения кинетики Михаэлиса-Ментен рХн мог бы стать не изолированный синтетический пептид, а С-терминальный фрагмент к-КЗ коровы (например, к f96–169), закрепленный N-концевым участком на поверхности белковых (α -, β -казеиновых) мицелл или связанный с искусственной гидрофобной поверхностью.

Соотношение k_{cat}/K_m используют для оценки каталитической специфичности фермента. Чем больше величина k_{cat}/K_m , тем выше специфическая активность фермента. Константы специфичности инженерного варианта рХн северного оленя и рХн коровы практически совпадают и превосходят соотношение k_{cat}/K_m , полученное для рХн одnogорбого верблюда, в 1,7 раза.

В целом показатели ферментативной кинетики указывают на высокую продуктивность рХн-Rta-K53E.

Таким образом, исследования показали, что по ТС инженерный вариант рХн северного оленя сопоставим с высококачественными коммерческими генно-инженерными коагулянтами коровьего молока. Анализ параметров ферментативной кинетики показал, что по аффинности к синтетическому аналогу Хн-чувствительного участка к-КЗ коровы рХн-Rta-K53E превосходит коммерческие рХн. По каталитической специфичности инженерный вариант рХн северного оленя похож на рХн коровы, а по числу оборотов фермента — на рХн верблюда. Совокупность показателей кинетики Михаэлиса-Ментен позволяет предполагать, что рХн-Rta-K53E может быть эффективен в качестве технологического коагулянта коровьего молока.

Список литературы

1. Bansal, N. Factors affecting the retention of rennet in cheese curd/N. Bansal, P. F. Fox, P. L. McSweeney // J. Agric. Food. Chem. 2007. V. 55 (22). P. 9219–9225.
2. Bansal, N. Comparison of the level of residual coagulant activity in different cheese varieties/N. Bansal, P. F. Fox, P. L. McSweeney // J. Dairy Res. 2009. V. 76. P. 290–293.
3. D'Incecco, P. Impact of Extending Hard-Cheese Ripening: A Multiparameter Characterization of Parmigiano Reggiano Cheese Ripened up to 50 Months/P. D'Incecco [et al.] // Foods. 2020. V. 9. P. 268.
4. Masotti, F. Proteolysis indices related to cheese ripening and typicalness in PDO Grana Padano cheese/F. Masotti [et al.] // Int. Dairy J. 2010. V. 20. №5. P. 352–359.
5. Mane, A. Proteolysis in Irish farmhouse Camembert cheese during ripening/A. Mane, P. L. H. McSweeney // J. Food Biochem. 2020. V. 44. №1.
6. Gumus, P. Effects of blends of camel and calf chymosin on proteolysis, residual coagulant activity, microstructure, and sensory characteristics of Beyaz peynir/P. Gumus, A. A. Hayaloglu // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. N. 7. P. 5945–5956.
7. Lamichhane, P. Microstructure and fracture properties of semi-hard cheese: Differentiating the effects of primary proteolysis and calcium solubilization/P. Lamichhane [et al.] // Food Res Int. 2019. V. 125. P. 108–125.
8. Kappeler, S. R. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk/S. R. Kappeler [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2006. V. 2. N. 342. P. 647–654.
9. Vallejo, J. A. Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins/J. A. Vallejo [et al.] // J. Dairy Sci. 2012. V. 95 (2). P. 609–613.
10. Jensen, J. L. The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay/J. L. Jensen [et al.] // J. Dairy Sci. 2015. V. 98. P. 2853–2860.
11. Пушкарев, В. А. Молокосвертывающая и общая протеолитическая активность инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*)/В. А. Пушкарев [и др.] // Сыроделие и маслоделие. 2023. № 1. С. 22–25.
12. Пушкарев, В. А. Влияние концентрации ионов кальция и pH на молокоосвертывающую активность инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*)/В. А. Пушкарев [и др.] // Сыроделие и маслоделие. 2023. № 2. С. 31.
13. Ельчанинов, В. В. Исследование молокоосвертывающего фермента из сычугов северных оленей: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04: защищена 23.01.06; утв. 07.04.06/Ельчанинов Вадим Валентинович. — Кемерово, 2006. — 172 с. — Библиогр.: С. 121–147.
14. Belenkaya, S. V. Characterization of the Altai Maral Chymosin Gene, Production of a Chymosin Recombinant Analog in the Prokaryotic Expression System, and Analysis of Its Several Biochemical Properties/S. V. Belenkaya [et al.] // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. №7. P. 781–791.
15. Johnson, K. A. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis — Menten paper/K. A. Johnson, R. S. Goody // Biochemistry. 2011. V. 50 (39). P. 8264–8269.
16. Belenkaya, S. V. Basic Biochemical Properties of Recombinant Chymosins (Review)/S. V. Belenkaya [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 4. P. 363–372.