

## КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА ЛОСЯ (ALCES ALCES), ПОЛУЧЕННОГО В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАХ ЭКСПРЕССИИ

Д.В. Балабова<sup>1</sup>, В.Ю. Чиркова<sup>1</sup>, Е.А. Шарлаева<sup>1</sup>, Д.Н. Щербаков<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия<sup>2</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Химозины (ЕС 3.4.23.4) – представители семейства аспарагиновых пепсиноподобных протеаз, способные к специфичному гидролизу каппа-казеина в желудке млекопитающих в период раннего постнатального развития. Натуральный химозин, прежде всего, коровьего происхождения – молокосвертывающий фермент, традиционно используемый в сыроделии. Начиная с 90-х гг. XX века в производстве сыров стали применять генно-инженерный химозин коровы (*Bos taurus*), а позднее рекомбинантный химозин (рХн) одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*). Для каждого нового рекомбинантного фермента важно определить кинетические показатели, которые необходимы для более глубокой биохимической характеристики. Целью данной работы было установить параметры кинетики Михаэлиса-Ментен для рекомбинантного химозина лося (рХн-Alc), полученного в двух системах экспрессии – *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis*.

Показатели кинетики Михаэлиса-Ментен определяли с помощью планшетного флуориметра-спектрофотометра CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия). Субстратом служил синтетический пептид следующего состава: Dabcyl-NRHPHLSF-MAIPK (5-FAM) KK-NH<sub>2</sub> (Dabcyl = 4-(dimethylaminoazo) benzene-4-carboxylic acid, 5-FAM = 5-carboxyfluorescein) («CPC Scientific», США), соответствующий химозин-чувствительному участку к-казеина коровы. В качестве препарата сравнения использовали коммерческий рХн коровы (рХн-Bos) («Chr. Hansen», Дания).

Из данных представленных в таблице 1 видно, что кинетические параметры рХн лося, полученного в бактериальном и дрожжевом продуценте, отличались, как между собой, так и от контрольного препарата рХн.

Таблица 1 Параметры кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантных химозинов

Препарат	K <sub>m</sub> , мкМ	k <sub>cat</sub> , с <sup>-1</sup>	k <sub>cat</sub> / K <sub>m</sub> , мкМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
рХн-Bos	2,12±0,09	252,24±2,79	119,58±4,74
рХн-Alc (E. coli)	10,00±2,24	6,54±0,53	0,65±0,03
рХн-Alc (K. lactis)	4,69±0,27	98,69±4,55	21,11±0

Константа Михаэлиса (K<sub>m</sub>) рХн лося, полученного в разных системах экспрессии, существенно отличалась. Так рХн-Alc полученный в E. coli связывался с субстратом в 2 раза медленнее, чем рХн-Alc из K. lactis. Аффинность к субстрату этих ферментов уступала по данному показателю для рХн-Bos в 2,1 и 4,7 раза, соответственно.

Значение каталитической константы скорости (k<sub>cat</sub>) рХн лося, полученного в прокариотической системе экспрессии, в 15,1 раза уступало соответствующему показателю для химозина лося, полученного в эукариотической системе. Но данный показатель у рХн коровы оказался существенно выше, что указывает на более быстрое освобождение его от продуктов реакции. Значение каталитической эффективности фермента (k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>) было также выше у химозина лося, полученного в системе K. lactis (в 32,5 раза). Коммерческий химозин коровы по данному показателю превосходил рХн лося.

Таким образом, кинетические параметры рХн-Alc зависят от системы экспрессии, в которой он получен. Как известно, у про- и эукариотов фолдинг и посттрансляционный процессинг синтезируемых de novo рекомбинантных белков протекает по-разному. Именно этим могут быть обусловлены наблюдаемые различия в кинетике между рекомбинантным химозином лося, полученным в эукариотической системе (K. lactis) и ферментом, продуцированным прокариотической системой (E. coli).

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ PAENIBACILLUS POLYMYXA

А.Б. Балханова, С.В. Гомбоева

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия

Силикатные бактерии широко распространены в природе. Это обусловлено тем, что они синтезируют свою биомассу, усваивая углерод и азот из атмосферы, а фосфор и кремний – из соответствующих минералов, т. е. из источников питания, недоступных для других микроорганизмов [1]. *Paenibacillus polymyxa* представляет собой эндоспорообразующие силикатные бактерии, которые распространены в природе, имеют большое значение для сельского хозяйства. [3]

Микроорганизмы чувствительны к составу питательных сред. В процессе роста культуры состав среды меняется, что оказывает влияние на ее развитие и биосинтетическую способность. На сегодняшний день для культивирования силикатных бактерий используется алюмосиликат как источник кремния. Использование альтернативных источников кремния позволит расширить сырье в питательной среде для культивирования силикатных бактерий [2].

В связи с этим, целью исследования является определение влияния источника кремния на рост силикатных бактерий.

В качестве объекта исследования использовали культуры микроорганизмов *P. polymyxa*, штаммы ВСГУТУ 1 (RU 2 784 088 C1) и ВСГУТУ 2 (RU 2 782 953 C1), выделенные на кафедре «Биотехнология» ФГБОУ ВО ВСГУТУ.

Для культивирования *P. polymyxa* использовали селективную жидкую питательную среду Зака, в состав которой входит источник кремния – алюмосиликат, который меняли на жидкое стекло и глину (пересчет рецептуры проводили по количеству кремния). В качестве контроля использовали чистую среду без кремния. Культивирование силикатных бактерий проводилось при температуре  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , при постоянном перемешивании 100 об/мин, продолжительностью 5 суток. Статистическая обработка в программе Microsoft Excel.

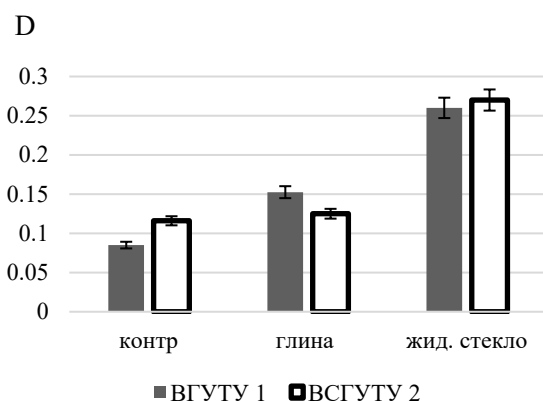


Рис. 1. Показатели роста силикатных бактерий

Результаты исследования показали, что источник кремния влияет на рост силикатных бактерий (рисунок 1). Наибольшее количество клеток было выявлено с жидким стеклом. Можно отметить наибольший показатель роста культуры ВСГУТУ 1 достиг на среде с жидким стеклом, а наименьший на среде без источника кремния. Наибольший показатель роста культура ВСГУТУ 2 достиг на среде с жидким стеклом, а показатели на среде с глиной сравним с контролем.

Выявлен рост силикатных бактерий на питательных средах с разным источником кремния. Наибольшее количество клеток накапливается у силикатных бактерий, культивируемых на питательной среде с жидким стеклом.

## Литература

1. Норбоева Б.Д., Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж. Исследование физиолого-биохимических свойств фосфатмобилизирующих и силикатных бактерий // Биотехнология: Сб. науч. трудов. Вып.20. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГУТУ, 2013. – с. 14–19.
2. Микробиология культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студентов биологических специальных вузов / И.И Концевая; Министерство образования РБ, Гомельский государственный университет им Ф. Скорины – Черников: Десна Полиграф, 2017. – 44 с.
3. Padda, K.P., Puri, A., Chanway, C.P. (2017). *Paenibacillus polymyxa*.