

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ,
СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 577.15

ПАРАМЕТРЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ
РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА АЛТАЙСКОГО МАРАЛА
(*Cervus elaphus sibiricus*), ПОЛУЧЕННОГО
В ПРО- И ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМАХ ЭКСПРЕССИИ

© 2022 г. С. В. Беленькая^{1, 2}, В. Ю. Чиркова^{1, *},
Е. А. Шарлаева¹, В. В. Ельчанинов³, Д. Н. Щербаков^{1, 2}

¹ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул 656049 Россия

²ГНЦ Вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, 630559 Россия

³Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий,
Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул, 656016 Россия

*e-mail: varvara.chirkova@gmail.com

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 13.07.2022 г.

Принята к публикации 17.08.2022 г.

Важной задачей биотехнологии является получение новых рекомбинантных молокосвертывающих ферментов для сыроделия с улучшенными биохимическими свойствами. Проведен сравнительный анализ параметров кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантного химозина алтайского марала (*Cervus elaphus sibiricus*), синтезированного в прокариотической (*Escherichia coli*) и эукариотической (*Kluyveromyces lactis*) системах экспрессии. Показано, что система продукции не влияет на неспецифическую протеолитическую активность и аффинность генно-инженерного химозина к синтетическому пептидному субстрату, имитирующему химозин-чувствительный участок каппа-казеина коровы, о чем свидетельствует отсутствие достоверных отличий между значениями K_m анализируемых образцов. В то же время каталитическая константа скорости (k_{cat}) и константа специфичности (k_{cat}/K_m) рекомбинантного химозина марала, полученного в системе экспрессии *K. lactis* были соответственно в 1.8 и 1.7 раза выше, чем показатели фермента, синтезированного в *E. coli*.

Ключевые слова: рекомбинантный химозин марала, система экспрессии, константа Михаэлиса, каталитическая эффективность, число оборотов фермента

DOI: 10.56304/S0234275822050027

Получение и исследование новых молокосвертывающих аспартатных протеиназ связано с решением актуальной биотехнологической задачи: нахождением и внедрением в практику сыроделия генно-инженерного коагулянта молока, превосходящего по своим биохимическим и технологическим характеристикам эталонные молокосвертывающие ферменты (МФ) – рекомбинантные химозины (рХн) коровы и одногорбого верблюда [1].

Ранее в прокариотической системе экспрессии нами получен и охарактеризован рХн алтайского марала (*Cervus elaphus sibiricus*) [2, 3]. Показано, что по термостабильности, удельной молокосвер-

тывающей активности (МА), неспецифической (общей) протеолитической активности (ПА) и соотношению МА/ПА рХн марала, полученный в системе экспрессии *Escherichia coli* (рХн-Сег-*E. coli*), уступает коммерческим эталонным МФ, что ограничивает сферу его применения производством сыров с короткими сроками созревания и хранения. Было выдвинуто предположение, что использование, вместо системы экспрессии *E. coli*, эукариотической системы продукции, которая обеспечивает посттрансляционный процессинг гетерологичных рекомбинантных белков, позволит улучшить ферментативные, а значит и технологические свойства рХн марала. С целью проверки данного предположения был разработан продуцент гетерологичных белков на основе молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis* и получен рХн марала, синтезированный в эукариотической системе экспрессии (рХн-Сег-*K. lactis*) [4].

Список сокращений: МА – молокосвертывающая активность; МФ – молокосвертывающие ферменты; ПА – протеолитическая активность; рХн – рекомбинантные химозины; рХн-Сег – рекомбинантный химозин марала; Хн – химозин; E – концентрация фермента; K_m – константа Михаэлиса; k_{cat} – число оборотов фермента; V_{max} – максимальная скорость реакции.

Для полной биохимической характеристики любых новых ферментов важно определение основных параметров кинетики Михаэлиса-Ментен: максимальной скорости ферментативной реакции (V_{max}), константы Михаэлиса (K_m), числа оборотов фермента (k_{cat}), каталитической эффективности или константы специфичности (k_{cat}/K_m) [5–7].

Цель данного исследования – определение и сравнительный анализ параметров ферментативной кинетики рХн марала полученного в про- и эукариотической системах экспрессии.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы

Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, изо-пропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), глюкоза, сахароза, трис, ЭДТА, тритон X-100, глицерин были получены от компании “Диа-М” (Россия). Соли и другие реагенты от фирмы “Хеликон” (Россия). Все реактивы отечественного производства имели квалификацию “чда”.

Штаммы и среды

Для наработки рХн марала в эукариотической системе использовали штамм *K. lactis* CerB1 [4]. Культивирование эукариотического продуцента проводили в среде YEP (состав, г/л: дрожжевой экстракт – 10, пептон – 20, KH_2PO_4 – 1, глюкоза – 30, K_2HPO_4 – 0.75, кальция пантотенат – 0.0045, pH 5.6–5.8).

Для получения рХн марала в прокариотической системе использовали штамм *E. coli* T7Cer [2]. Синтез белка осуществляли в среде LB (состав, г/л: дрожжевой экстракт – 5, триптон – 10, NaCl – 10, pH 7.2–7.6).

Культивирование рекомбинантного штамма *K. lactis* CerB1

Индивидуальные колонии клеток рекомбинантного штамма *K. lactis* CerB1 вносили в жидкую питательную среду YEP. Культивирование проводили при температуре $30 \pm 1^\circ C$ в течение 24 ч и 225 об./мин на шейкер-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия). Инокулят в соотношении 1 : 100 переносили в колбу Эрленмейера, содержащую среду YEP и инкубировали в течение 48 ч при $30^\circ C$ и 225 об./мин. Уровень глюкозы в среде измеряли с использованием глюкометра Diacont (OK Biotech, Тайвань). После истощения среды по глюкозе процесс продолжали в течение 96 ч при $22^\circ C$ и 225 об./мин. Затем отделяли культуральную жидкость, содержащую рекомбинантный прохимолин (рПроХн) марала, синтезированный в *K. lactis* (рПроХн-Cer-*K. lactis*), от биомассы клеток путем

центрифугирования в течение 20 мин при 5000 g (Avanti J -30I, США) и $4^\circ C$ [4].

Культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* T7Cer

Индивидуальные колонии клеток рекомбинантного штамма *E. coli* T7Cer вносили в жидкую питательную среду LB. Культивирование проводили при температуре $37 \pm 1^\circ C$ в течение ночи и 180 об./мин на шейкер-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия). Инокулят в соотношении 1 : 100 переносили в колбы Эрленмейера, содержащие свежую среду LB и растили до оптической плотности 0.8 ($\lambda = 600$ нм). В инокулят вносили ИПТГ до конечной концентрации 0.1 мМ и дополнительно инкубировали штамм-продуцент на шейкере (180 об./мин) в течение 6 ч при $37^\circ C$. После завершения культивирования из биомассы клеток продуцента выделяли тельца включения, содержавшие рПроХн марала, синтезированный в *E. coli* (рПроХн-Cer-*E. coli*). Для этого биомассу осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин при $4^\circ C$. Полученный осадок ресуспендировали в буфере STET (содержавшем 8% сахарозы, 50 мМ трис, 20 мМ ЭДТА, 5% тритона X-100, pH 8.0), из расчета 20 мл на 1 грамм биомассы и инкубировали в течение ночи при $4^\circ C$. После окончания инкубации клетки подвергали ультразвуковому (УЗ) воздействию (2000 Вт/литр и 283 Вт/см²) в течение 1 мин с использованием УЗ гомогенизатора Soniprep 150 Plus (MSE, КНР), затем смесь охлаждали до $4^\circ C$. Процедуру повторяли трижды. Тельца включения осаждали центрифугированием при 20000 g (Avanti J -30I) в течение 20 мин при $4^\circ C$. Солюбилизацию телец включения и последующий рефолдинг целевого белка проводили по методу [7] с небольшими модификациями. Осажденные тельца включения солюбилизировали в буфере А (50 мМ KH_2PO_4 , 150 мМ NaCl, pH 10.7) в который добавляли мочевины до конечной концентрации 8 М, инкубировали 24 ч при $15^\circ C$ и центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. В полученном супернатанте определяли концентрацию белка. Для ренатурации полученного рПроХн супернатант разбавляли буфером А до конечной концентрации белка 0.7 мг/мл и оставляли на 12 ч при $15^\circ C$. Затем в раствор вносили 1.0 М HCl до pH 8.0, выдерживали смесь 60 мин при $15^\circ C$ и диализовали против буфера В, содержавшего 50 мМ трис и 150 мМ NaCl (pH 8.0), в течение ночи при $4^\circ C$. По завершении диализа получали препарат ренатурированного рПроХн-Cer-*E. coli*.

Активация рПроХн марала

Зимогены рПроХн-Cer-*E. coli* и рПроХн-Cer-*K. lactis* активировали методом ступенчатого изменения pH. В образцы, содержащие рПроХн-Cer,

при постоянном перемешивании вносили 2.0 М HCl до pH 3.0 и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем pH образца доводили до 5.8, используя 0.5 М NaOH. В результате активации получали препараты рХн марала, синтезированного в системе продукции *E. coli* (рХн-Сег-*E. coli*) и *K. lactis* (рХн-Сег-*K. lactis*).

Определение активности ферментов

Общую молокосвертывающую активность (МА) и неспецифическую протеолитическую активность (ПА) экспериментальных препаратов рХн определяли по ранее опубликованным методикам [2]. Общую МА рХн-Сег-*E. coli* и рХн-Сег-*K. lactis* выражали в условных единицах на миллилитр (УЕ/мл). Для определения неспецифической ПА использовали единицы поглощения раствора при длине волны 280 нм (A_{280}). Для сравнения ПА препаратов рХн использовали значения A_{280} , полученные после инкубации фермент-субстратных смесей при 35°C в течение 180 мин. Неспецифическую ПА рХн-Сег-*E. coli* и рХн-Сег-*K. lactis* сравнивали с ПА коммерческого рХн коровы (СНУ-МАХ® Powder Extra) производства компании Chr. Hansen (Дания), которую принимали за 100%.

Для концентрирования препаратов рХн методом ультрафильтрации применяли устройства Ultracel®-10K Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore, США) с мембраной из регенерированной целлюлозы (отсечка по молекулярной массе (ММ) – 10 кДа). Продукцию рекомбинантного белка анализировали методом электрофореза по Лэммли [8]. В качестве маркеров ММ использовали смеси белков PageRuler™ Unstained Protein Ladder и Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение параметров кинетики Михаэлиса-Ментен.

Оценку специфической активности препаратов рХн марала и определение параметров кинетики Михаэлиса-Ментен проводили методом флуоресцентной спектрофотометрии [3]. Для изучения кинетических параметров в качестве субстрата использовали синтетический пептид Dabcyl-NRHPHLSFMAIPK(5FAM)KK-NH₂ (CPC Scientific, USA), соответствующий Хн-чувствительному участку к-казеина коровы. Все измерения проводили на планшетном флуориметре CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия). Длины волн возбуждения – 495 нм, эмиссии – 520 нм. Реакционные смеси готовили во льду в 384 луночном планшете: 1 мкл субстрата (исходная концентрация 400 нМ) добавляли в первую лунку планшета, содержащую 9 мкл реакционного буфера (50 мМ Na-ацетатный pH 5.8). Далее проводили последовательное разведение субстрата реакционным бу-

фером с шагом 1/2. В каждую лунку добавляли по 5 мкл рХн, разведенного буфером до концентрации 100 нМ. Прибор калибровали по раствору пептида, подвергнутого полному гидролизу (значение флуоресценции данной смеси принимали за 80%). Измерения проводили в режиме кинетического сканирования при 25°C в трехкратной повторности. Для расчета констант использовали сопутствующее программное обеспечение MARS Data Analysis (BMG LABTECH, Германия). За максимальную скорость ферментативной реакции принимали скорость увеличения флуоресценции, регистрируемую прибором. Константу Михаэлиса (K_m) определяли по уравнению Михаэлиса-Ментен. Используя значения V_{max} и K_m рассчитывали каталитическую константу скорости реакции гидролиза или число оборотов фермента ($k_{cat} = V_{max}/[E]$) и константу специфичности или каталитическую эффективность (k_{cat}/K_m).

Статистическую обработку данных проводили с использованием Microsoft Office Excel 2007. Рассчитывали средние значения показателей и их стандартную ошибку. Оценку достоверности различий средних величин проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение препаратов рХн марала в про- и эукариотических системах экспрессии

Для получения целевого белка в системе *E. coli* использовали стандартный протокол, включающий внесение индуктора ИПТГ. Нарботка рекомбинантного ПроХн марала с помощью аутоиндуцибельного рекомбинантного штамма рХн-Сег-*K. lactis* осуществлялась в течение 92 ч [4].

Для оценки эффективности синтеза и локализации рекомбинантного проХн марала был проведен электрофоретический анализ белковых препаратов, полученных из различных фракций обработки клеток штаммов-продуцентов (рис. 1).

Система продукции рекомбинантных белков на основе *E. coli* позволяет получать за относительно короткий промежуток времени целевой продукт в количествах достаточных для первичной биохимической характеристики. На долю белка, молекулярная масса которого была близка к расчетной для рПроХн марала (41 кДа), приходило не менее 30% от общего количества белков биомассы *E. coli* (рис. 1, дорожка 1). Растворимая часть биомассы клеток рекомбинантного штамма *E. coli* Т7Сег не содержала целевой белок (рис. 1, дорожка 2), в то время как фракция телец включения более чем на 95% состояла из рПроХн (рис. 1, дорожка 3). Препарат рХн-Сег-*E. coli*, полученный после ренатурации и активации зимогена,

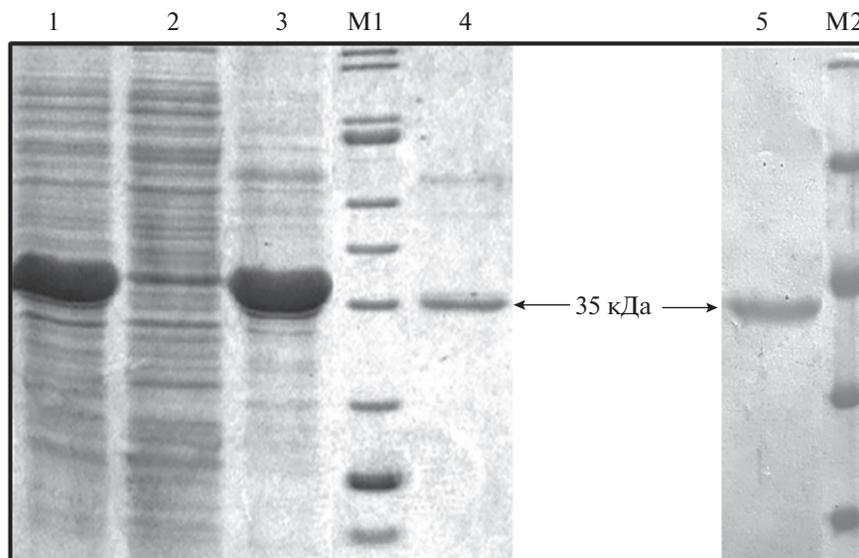


Рис. 1. Электрофоретический анализ в 12%-ном ПААГ препаратов рХн, полученных при помощи штаммов-продуцентов: 1 – биомасса клеток рекомбинантного штамма *E. coli* T7Cer через 6 ч после добавления индуктора; 2 – растворимая фракция рекомбинантного штамма *E. coli* T7Cer после обработки биомассы клеток лизирующим буфером (цитоплазма); 3 – нерастворимая фракция биомассы клеток рекомбинантного штамма *E. coli* T7Cer после обработки 8 М мочевиной (тельца включения); M1, M2 – маркеры молекулярных масс; 4 – препарат рХн-Cer-*E. coli* после активации; 5 – сконцентрированный в 10 раз препарат культуральной жидкости рекомбинантного штамма *K. lactis* CerB1 после активации.

Fig. 1. Electrophoretic analysis in 12% PAAG of rChn preparations, obtained using producer strains: 1—cell biomass of the recombinant *E. coli* strain T7Cer 6 hours after adding the inductor; 2—soluble fraction of recombinant *E. coli* strain T7Cer after treatment of cell biomass with lysis buffer (cytoplasm); 3—insoluble fraction of cell biomass of the recombinant *E. coli* strain T7Cer after treatment with 8 M urea (inclusion bodies); M1, M2—markers of molecular weights; 4—preparation of rChn-Cer-*E. coli* after activation; 5—concentrated 10 times culture liquid of the recombinant strain *K. lactis* CerB1 after activation.

содержал лишь незначительное количество балластных белковых примесей (рис. 1, дорожка 4).

В результате культивирования прокариотического продуцента рПроХн марала накапливается в тельцах включения. Для получения зимогена в растворимой форме, готовой для активации, требуется многостадийная процедура, включающая в себя выделение и солюбилизацию телец включения с последующей ренатурацией рПроХн. Это приводит к увеличению продолжительности процесса получения целевого белка и снижению его выхода (рис. 1, дорожка 4). Напротив, система продукции *K. lactis*, после окончания культивирования, позволяет получить растворимый рПроХн марала, который сразу может быть активирован (рис. 1, дорожка 5).

На данном этапе, недостатком использованного дрожжевого продуцента рПроХн марала следует считать относительно низкий выход целевого белка. В настоящее время нами ведется работа по повышению продуктивности рекомбинантного штамма дрожжей *K. lactis*, который содержит экспрессионную кассету SVB-Cer, работающую под контролем гибридного промотора P₃₅₀.

Общая молокосвертывающая активность. После активации зимогенов были получены препа-

раты рХн-Cer-*E. coli* и рХн-Cer-*K. lactis* с общей МА 1406 ± 39 и 152 ± 10 УЕ/мл соответственно. Разница в МА почти на порядок может объясняться тем, что рХн-Cer-*E. coli* получали из концентрированных препаратов телец включения, а рХн-Cer-*K. lactis* – непосредственно из культуральной жидкости. Для исследования ПА и определения кинетических констант исходный препарат рХн-Cer-*K. lactis* был сконцентрирован методом ультрафильтрации в 10 раз, до общей МА 1434 ± 61 УЕ/мл.

Неспецифическая протеолитическая активность. Неспецифическая ПА коммерческого рХн коровы, рХн-Cer-*E. coli* и рХн-Cer-*K. lactis* составляла 0.70 ± 0.02 (100%), 0.81 ± 0.02 (116%) и 0.83 ± 0.01 (119%), соответственно. Показатели ПА рХн-Cer-*E. coli* и рХн-Cer-*K. lactis*, достоверно не различались ($p < 0.05$). Соотношение неспецифической ПА рХн марала, синтезированного в *E. coli* и коммерческого рХн коровы, хорошо согласуются с данными, полученными ранее [2]. Таким образом, смена прокариотической системы экспрессии (*E. coli*) на эукариотическую (*K. lactis*), не приводит к значимому изменению неспецифической ПА рХн марала.

Таблица 1. Параметры кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантных химозин марала, полученных в про- и эукариотической системах экспрессии
Table 1. Parameters of Michaelis-Menten kinetics of recombinant maral chymosins obtained in pro- and eukaryotic expression systems

Кинетический параметр	Препарат рХн	
	рХн-Cer- <i>E. coli</i>	рХн-Cer- <i>K. lactis</i>
V_{\max} , мкМ с ⁻¹	177.4 ± 11.69	317.78 ± 20.35*
K_m , мкМ	2.3 ± 0.3	2.5 ± 0.1
k_{cat} , с ⁻¹	3.6 ± 0.2	6.4 ± 0.4*
k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ с ⁻¹	1.5 ± 0.2	2.7 ± 0.2*

Примечание: * – достоверно выше, чем у препарата рХн-Cer-*E. coli*, $p < 0.05$.

Note: * – significantly higher than that of the preparation rChn-Cer-*E. coli*, $p < 0.05$.

Анализ параметров кинетики Михаэлиса-Ментен

Результаты определения основных параметров кинетики Михаэлиса-Ментен рХн-Cer-*E. coli* и рХн-Cer-*K. lactis* представлены в табл. 1. Достоверных различий между K_m рХн-Cer-*E. coli* и рХн-Cer-*K. lactis* не выявлено. Следовательно, в случае рХн марала, система экспрессии не оказывает существенного влияния на сродство фермента к синтетическому хромогенному субстрату, имитирующему Хн-чувствительную область каппа-казеина коровы.

В то же время, максимальная скорость ферментативной реакции в случае рХн-Cer-*K. lactis* оказалась почти в два раза выше, чем для рХн-Cer-*E. coli*, что должно было найти свое отражение в показателях ферментативной эффективности и специфичности. Действительно, k_{cat} и k_{cat}/K_m рХн-Cer-*K. lactis* были соответственно в 1.8 и 1.7 раза выше, чем у рХн марала, синтезированного в системе продукции *E. coli* (табл. 1).

Таким образом, использование системы экспрессии дрожжей (*K. lactis*), вместо прокариотического продуцента (*E. coli*), позволило получить рХн марала с улучшенными показателями каталитической эффективности и специфичности, не изменив при этом неспецифическую протеолитическую активность и аффинность фермента к синтетическому субстрату, имитирующему каппа-казеин коровы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (номер темы FZMW-2020-0002, “Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Uniacke-Lowe T., Fox P.F., Cheese: chemistry, physics and microbiology, 4th edn. Oxford, UK: Elsevier, Academic Press, 2017, 69–113.
2. Бельнская С.В., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Ельчанинов В.В. Получение рекомбинантного химозина марала (*Cervus elaphus sibiricus* Severtzov) в прокариотической системе экспрессии и изучение комплекса его биохимических свойств, важных для сыроделия. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2020, 56(6), 561–570. <https://doi.org/10.31857/S0555109920060033>
3. Бельнская С.В., Бондарь А.А., Кургина Т.А., Ельчанинов В.В., Бакулина А.Ю., Рухлова Е.А., Лаврик О.И., Ильичев А.А., Щербаков Д.Н. Идентификация гена химозина алтайского марала [*Cervus Elaphus Sibiricus* (Severtzov, 1873)], наработка его рекомбинантного аналога в прокариотической системе экспрессии и анализ некоторых биохимических свойств полученного фермента. *Биохимия*, 2020, 85(7), 916–928. <https://doi.org/10.31857/S0320972520070064>
4. Бельнская С.В., Ельчанинов В.В., Щербаков Д.Н. Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis*. *Биотехнология*, 2021, 37(5), 20–27. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-20-27>
5. Kappeler S.R., van den Brink H.(J.)M., Rahbek-Nielsen H., Faraha Z., Puhana Z., Hansen E.B., Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 2(342), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014>
6. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins. *J. Dairy Sci.*, 2012, 95(2), 609–613. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4445>
7. Jensen J.L., Jacobsen J., Moss M.L., Rasmussen F., Qvist K.B., Larsen S., van den Brink J. The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay. *J. Dairy Sci.*, 2015, 98(5), 2853–2860. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8672>
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Parameters of Enzymatic Kinetics of Recombinant Altai Maral (*Cervus elaphus sibiricus*) Chymosin Produced in Pro- and Eukaryotic Expression Systems

S. V. Belenkaya^{a, b}, V. Yu. Chirkova^{a, #}, E. A. Sharlaeva^a,
V. V. Elchaninov^c, and D. N. Shcherbakov^{a, b}

^aAltai State University, Barnaul, 656049 Russia

^bState Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Oblast, 630559 Russia

^cFederal Altay Scientific Center of Agrobiotechnologies, Siberian Institute of Cheese Making, Barnaul, 656016 Russia

[#]e-mail: varvara.chirkova@gmail.com

Abstract—An important task of biotechnology is to obtain new recombinant milk-clotting enzymes for cheese making with improved biochemical properties. A comparative analysis of the parameters of the Michaelis-Menten kinetics of recombinant Altai maral (*Cervus elaphus sibiricus*) chymosin synthesized in prokaryotic (*Escherichia coli*) and eukaryotic (*Kluyveromyces lactis*) expression systems has been carried out. It was shown that the production system does not affect the nonspecific proteolytic activity and affinity of genetically engineered chymosin towards a synthetic peptide substrate that mimics the chymosin-sensitive site of bovine kappa-casein, as evidenced by the absence of significant differences between the K_m values of the analyzed samples. At the same time, the catalytic rate constant (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of the recombinant maral chymosin obtained in the *K. lactis* expression system were 1.8 and 1.7 times higher, respectively, than the corresponding characteristics of the enzyme synthesized in *E. coli*.

Keywords: recombinant maral chymosin, expression system, Michaelis constant, catalytic efficiency, enzyme turnover number