

МРНТИ 34.15.25;62.39.51;65.63.39

<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.04>**Ж.Д. Акишев** ^{1,2}, **А.Е. Турсунбекова** ³, **Б.Б. Хасенов** ^{1*}¹Национальный центр биотехнологии, Казахстан, г. Нур-Султан²Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Нур-Султан³Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Казахстан, г. Нур-Султан*e-mail: khasenov@biocenter.kz

МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ВЕРБЛЮЖЬЕГО ХИМОЗИНА

Одним из самых ранних биотехнологических применений ферментов является производство сыра. Высокая специфическая молокосвертывающая активность химозина обеспечивает его преимущество перед другими протеазами в сыроделии. Действие химозина основано на гидролизе связи между аминокислотными остатками Phe¹⁰⁵ и Met¹⁰⁶ в молекуле κ-казеина, что вызывает дестабилизацию казеиновых мицелл, свертывание молока и разделение его на сгусток и сыворотку. С помощью дрожжевого штамма-продуцента *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB получен рекомбинантный химозин двугорбого верблюда *Camelus bactrianus*. Рекомбинантный химозин был очищен с помощью ионообменной хроматографии. Изучена молокосвертывающая активность рекомбинантного верблюжьего химозина в отношении кобыльего молока в зависимости от pH и температуры. Установлено, что оптимальным значением, при котором наблюдается максимальная активность рекомбинантного верблюжьего химозина в отношении кобыльего молока pH составляет 4.0, а оптимальной температурой 70°C. Активность рекомбинантного верблюжьего химозина на кобыльем, коровьем и козьем молоке составила 123, 9605 и 4650 ед/мг, соответственно. Показано, что рекомбинантный верблюжий химозин обладает высокой коагуляционной активностью, достаточной для получения творога и сыра. Выход сырного сгустка с 6 л козьего молока составил 936 грамм. Рекомбинантный верблюжий химозин имеет перспективу применения в технологиях переработки коровьего и козьего молока и получения сыра.

Ключевые слова: химозин, молоко, рекомбинантный фермент, молокосвертывающая активность, коагуляция.

Z. Akishev^{1,2}, A.E. Tursunbekova³, B. Khasenov^{1*}¹National center for biotechnology, Kazakhstan, Nur-Sultan²L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Nur-Sultan³S.Seifullin Kazakh Agro Technical University, Kazakhstan, Nur-Sultan*e-mail: khasenov@biocenter.kz

Milk clotting activity of recombinant camel chymosin

One of the earliest biotechnological applications of enzymes is cheese production. The high specific milk-clotting activity of chymosin gives it an advantage over other proteases in the cheese industry. The action of chymosin is based on hydrolysis of the bond between the amino acid residues Phe¹⁰⁵ and Met¹⁰⁶ in the κ-casein molecule, which causes destabilisation of casein micelles, coagulation of milk and its separation into a clot and a whey. A recombinant chymosin of the camel *Camelus Bactrianus* was obtained using the yeast producer strain *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB. The recombinant chymosin was purified by ion exchange chromatography. The milk-clotting activity of recombinant camelian chymosin against mare's milk was studied as a function of pH and temperature. It was found that the optimum value at which the maximum activity of recombinant camel's chymosin with respect to mare's milk is observed is pH 4.0 and the optimum temperature is 70°C. The activity of recombinant camel chymosin on mare, cow and goat milk was 123, 9605 and 4650 units/mg, respectively. Recombinant camel chymosin was shown to have high coagulation activity, sufficient to produce curd and cheese. The yield of cheese clot from 6 l of goat milk was 936 grams. Recombinant camel chymosin has prospects for use in cow's and goat's milk processing and cheese production technologies.

Key words: chymosin, milk, recombinant enzyme, milk-clotting activity, coagulation.

Ж.Д. Акишев^{1,2}, А.Е. Турсунбекова³, Б.Б. Хасенов^{1*}

¹Национальный центр биотехнологии, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

²А.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

³С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

*e-mail: khassenov@biocenter.kz

Рекомбинантты түйе химозинінің сүт үю белсенділігі

Ферменттерді биотехнологиялық қолданудың ең алғашқы түрлерінің бірі ірімшік өндіру болып табылады. Химозиннің жоғары спецификалық сүт үю белсенділігі оның ірімшік жасаудағы басқа протеазалардан артықшылығын қамтамасыз етеді. Химозиннің әрекеті к-казеин молекуласындағы Phe¹⁰⁵ және Met¹⁰⁶ аминқышқылдарының қалдықтары арасындағы байланыстың гидролизіне негізделген, бұл казеин мицеллаларының тұрақсыздануын, сүттің коагуляциясын және оның ұйығыш пен сарысуға бөлінуін тудырады. Рекомбинантты бактриан түйе химозині *Camelus bactrianus* ашытқы штаммының *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB көмегімен алынды. Рекомбинантты химозин ион алмасу хроматографиясы арқылы тазартылды. Бие сүтіне қатысты рекомбинантты түйе химозинінің сүт үю белсенділігі рН және температураға байланысты зерттелді. Бие сүтіне қатысты рекомбинантты түйе химозинінің максималды белсенділігінің оңтайлы мәні рН 4,0, ал оңтайлы температура 70°C болатыны анықталды. Бие, сиыр және ешкі сүтіндегі рекомбинантты түйе химозинінің белсенділігі сәйкесінше 123, 9605 және 4650 бірлік/мг құрады. Рекомбинантты түйе химозинінің сүзбе мен ірімшік өндіруге жеткілікті жоғары коагуляциялық белсенділігі бар екені дәлелденді. 6 литр ешкі сүті қосылған ірімшік ұйығышының шығымы 936 грамм болды. Рекомбинантты түйе химозинін сиыр мен ешкі сүтін өңдеу және ірімшік өндіру технологияларында қолдану мүмкіндігі бар.

Түйін сөздер: химозин, сүт, рекомбинантты фермент, сүт үю белсенділігі, коагуляция.

Введение

Одним из самых ранних биотехнологических применений ферментов является производство сыра [1]. Активные ингредиенты этого процесса были идентифицированы как протеолитические ферменты пепсин и химозин, известные как «сычужный фермент» [2]. Химозин (ЕС 3.4.23.4) – аспаргиновая пептидаза, принадлежащая к семейству пепсиноподобных ферментов [3]. Действие химозина основано на гидролизе связи между аминокислотными остатками Phe¹⁰⁵ и Met¹⁰⁶ в молекуле капа-казеина, что вызывает дестабилизацию казеиновых мицелл, свертывание молока и разделение его на сгусток и сыворотку [4]. Высокая специфическая молокоосвертывающая активность химозина обеспечивает его преимущество над другими протеазами в сыроделии.

До недавнего времени технология получения химозина была основана на выделении фермента из желудка новорожденных телят, ягнят и козлят, но в настоящее время химозин, можно получать с использованием рекомбинантной технологии. Следует отметить, что рекомбинантный телячий химозин является первым ферментом, одобренным FDA к использованию в пищевой промышленности [5]. К сегодняшнему дню более 90% используемого сычужного фермента в мире является химозином, полученном путем

ферментации [6]. На рынке коммерческих ферментов для сыроварения доминирует телячий химозин, но исследования по практическому использованию проводятся и в отношении химозинов, полученных от других животных, например, яка (*Bos grunniens*) [7] и алтайского марала (*Cervus elaphus*) [8].

Перспективным сычужным ферментом выступает верблюжий химозин, который может быть использован для производства сыра из коровьего [9-12] и верблюжьего молока [13, 14]. Известно, что верблюжий химозин обладает на 70 % большей молокоосвертывающей активностью и является более термостабильным, чем телячий химозин [15, 11], что делает его привлекательным для коммерческого производства сыра. В частности, изучение химозина из одногорбого верблюда *Camelus dromedarius* позволило его рекомендовать в качестве молокоосвертывающего фермента [15, 11, 16]. Рекомбинантный химозин *Camelus dromedarius* был успешно экспрессирован в мицелиальных грибах *Aspergillus niger* [15] и в дрожжах *Pichia pastoris* [17]. Уже доступна его рекомбинантная версия в виде коммерческого продукта под названием Чу-МАХ М (Ch. Hansen). Изучены биохимические свойства химозина среднеазиатского двугорбого верблюда *Camelus bactrianus* [18], которые по ряду параметров оказались близки химозину из *Camelus dromedarius* несмотря на то, что имеют-

ся различия в двух аминокислотных заменах в положениях Val229Leu и Ser294Asn.

Наиболее известным и практически единственным молочным продуктом из кобыльего молока является кумыс. Это кисломолочный алкогольный напиток, который создается примерно с 2000 года до нашей эры. Он наиболее известен и широко потребляется в регионах Центральной Азии. Его получают из свежего сырого молока, заквашенного заквасками (в основном молочнокислыми бактериями и дрожжами) в дозе 20-30% и хранящегося в подходящей емкости или в ферментационном мешке, обычно при температуре 20-30°C [19]. Производство сыра из кобыльего молока считается нецелесообразным из-за проблем со свертываемостью [20]. Однако, сравнительно недавно было показано, что сыр может быть изготовлен из молока ослиц (относящихся как и кобылицы к роду *Equus*) при соблюдении специальных технологических подходов, таких как использование определенных видов сычужного фермента, особые условия коагуляции, обогащение другими видами молока и добавление трансглутаминазы для лучшего сшивания молочных белков [21].

Представляется интересным апробировать молокосвертывающую активность рекомбинантного верблюжьего химозина *Camelus bactrianus* в отношении коровьего, козьего и кобыльего молока, что и определило цель настоящей работы.

Материалы и методы

Векторы, штаммы, клонирующие ферменты и химикаты

Химические реактивы, использованные в данном исследовании, были молекулярно-биологического или чистого аналитического класса и приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США) и AppliChem (Дармштадт, Германия). Ферменты хранили при -20°C, а химические реактивы – в соответствии с рекомендациями производителя.

Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [22] с использованием реактива Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay Day, Мюнхен, Германия) и бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. Измерения проводились в трех независимых повторностях, при этом в качестве указанного результата приводилось среднее значение из трех повторностей.

Анализ свертываемости молока

Анализ свертываемости молока проводился в соответствии с [23]. В качестве контрольного субстрата использовали сухое коровье обезжиренное молоко и сухое, лиофильно высушенное, обезжиренное козье молоко, 12% (в/о) суспендировали в 0,025 М натрий-ацетатном буфере, pH 6,0. Ферментативные реакции проводились как минимум в трех повторностях, при 37°C в пробирках с 20 мкл раствора фермента и 1 мл субстрата. Молочные сгустки визуализировали, переворачивая пробирки вверх дном. Одна единица молокосвертывающей активности определялась как количество фермента, необходимое для свертывания 1 мл субстрата за 40 минут при 37°C. Единицы активности химозина (Ед) рассчитывали по следующему уравнению (1):

$$E_d = \frac{V_{milk}}{V_{chymosin}} \times \frac{2400}{T_{mc}} \quad (1)$$

где:

V_{milk} – объем молока (мл),

$V_{chymosin}$ – объем добавленного химозина (мл),

T_{mc} – время свертывания молока (сек).

Для анализа свертываемости молока использовали сублимированное кобылье молоко (ТОО «СаумалБиоТех», Казахстан). Сухое молоко восстанавливали на 20% в деионизированной воде, предварительно нагретой до 40°C, обезжиривали центрифугированием при 3000 × g в течение 15 мин (Eppendorf Centrifuge 5415R, Hamburg, Germany). Окончательный состав раствора субстрата был приведен к следующему: 10% кобыльего молока, 0,2М буферный раствор с соответствующим pH, 30 мМ CaCl₂. Очищенный рекомбинантный верблюжий химозин разбавляли до 50 нг/мкл для коровьего молока и до 2 мкг/мкл для кобыльего молока 10 мМ натрий-ацетатным буфером (pH 5,5) и 10 мкл фермента инкубировали с 1 мл молочного субстрата при 37°C. Для коровьего и козьего молока время свертывания в каждой пробирке измеряли по времени появления первых хлопьев, наблюдаемых при переворачивании пробирки. Для кобыльего молока реакцию в каждой временной точке (интервал 15 секунд) останавливали добавлением пепстатина А в конечной концентрации в пробирке 50 мкг. Остановленную реакцию затем центрифугировали при 3500 × g в течение 3 мин для разделения осажденного казеина. Время появления просветления надосадочной жидкости регистрировали как время свертывания.

Выделение и очистка рекомбинантного верблюжьего химозина

Рекомбинантный верблюжий химозин очищали из культуры дрожжей с помощью ионообменной хроматографии. Рекомбинантную культуру дрожжей выращивали в 200 мл среды на среде, содержащей 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 3% глюкозы, 100 мМ цитрат-фосфатный буфер pH 4,0, 10 мМ аскорбиновой кислоты, 5% сорбитола, 10 г/л свекловичной мелассы в колбах в течение 120 часов при 28°C и 250 об/мин. Клетки собирали центрифугированием при 3500×g, +4°C в течение 15 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через 0,22 мкм и повышали pH до 4,5 с помощью 25 мМ ацетата натрия и инкубировали при комнатной температуре в течение 24 часов. Объем раствора с помощью 25 мМ ацетата натрия доводили до 600 мл, а pH понижали до 3,0 с помощью HCl. Смесь загружали в колонку с DEAE-сефарозой, уравновешенной 25 мМ NaCl в 50 мМ цитрат-натриевом буфере (pH 3,0). Образец, прошедший сквозь колонку собирали и загружали в колонку с SP-сефарозой, уравновешенной 25 мМ NaCl в 50 мМ натрий-цитратном буфере (pH 3,0). Колонку промывали 5 мл 25 мМ NaCl в 50 мМ натрий-цитратном буфере (pH 3,0) и 15 мл 50 мМ NaCl в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,5). Далее, колонку промывали 750 мМ NaCl в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,5) и элюировали белок фракционированием. Фракции проверяли на молокосвертывающую активность, положительные фракции объединяли и доводили концентрацию NaCl до 25 мМ с помощью 25 мМ натрий-ацетатным буфером (pH 5,5) и загружали в колонку с Q-сефарозой, уравновешенной 25 мМ NaCl в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,5). Колонку промывали 25 мМ NaCl в 25 мМ буфере ацетата натрия (pH 5,5) и элюировали химозин градиентом 50-2000 мМ NaCl в 25 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,5). Фракции анализировали с помощью SDS-PAGE. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Лэммли [24] в ячейке miniProtean-IV (Bio-Rad Laboratories Inc).

Измерение оптимального pH субстрата для активности свертывания молока

Для этого сухое обезжиренное молоко растворяли в 200 мМ натрий-цитратном буфере (pH 3,0-3,5), 200 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 4,0-5,5), 200 мМ имидазоловом буфере (pH 6,0-6,5) или 200 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,0-8,0).

Молочные растворы помещали в качестве субстрата в пробирки объемом 2 мл. Максимальная активность фермента определялась как 100% активность, и остальные образцы оценивались на основании этого.

Определение оптимальной температуры для активности свертывания молока

Активность свертывания молока измеряли в диапазоне температур 0-70°C (с интервалом 5°C) в 200 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,0) для кобыльего молока. Растворы субстрата и фермента предварительно нагревали до температуры реакции в течение 5 минут, после чего растворы смешивали. Максимальная активность фермента определялась как 100% активность, и остальные образцы оценивались на основании этого.

Коагуляция козьего молока

Молоко в объеме 6 литров прогревали до температуры 37 °C в сыроварне и добавляли культуру мезофильных лактобактерий, вносили сухой препарат рекомбинантного верблюжьего химозина в количестве 200 мг и инкубировали в течение 30 минут. Как только образовывался сгусток его разрезали сырным ножом на кубики размером 2×2 см и проводили отделение сыворотки от сгустка, путем вымешивания в течение 15 минут. Сырную массу наносили в форму и проводили самопрессование сыра в течение 18 часов при температуре 32°C. Сформировавшуюся сырную головку выдерживали в рассоле (1,5% NaCl) в течение 120 часов при температуре 4°C. Просоленный сыр заворачивали в пергамент и выдерживали при температуре 8°C в течение 28 суток.

Программное обеспечение и статистический анализ

Все анализы проводились в трех независимых повторностях. В количественном исследовании средние значения и стандартные отклонения были получены с помощью программного обеспечения GraphPad Prism Version 8.0.1 в данной работе. Среднее значение активности фермента было показано, другие значения были представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD; n = 3). Расчет молекулярной массы белка, изоэлектрической точки, чтение нуклеотидной последовательности и дизайн праймеров и другие манипуляции проводили с использованием программного обеспечения Vector NTI Advance 11 и SnapGene Viewer 5.2.4.

Результаты и обсуждение

Структура химозина

Химозин относится к аспаргиновым протеазам специфического действия [25]. Верблюжий химозин из *Camelus bactrianus* имеет протяженность 381 аминокислотных остатка, из которых первые 16 а.о. (MRCLVVLLAALALSQA) являются секреторным пептидом (Pre-peptide) обеспечивающим секрецию фермента в желудок. Последующие 42 а.о. (SGITRIPLHKGKTLRKALKERGLLEDLQRQQYAVSSKYSSL) являются пропептидом (Pro-peptide), функциональным действием которого является блокирование протеолитического действия фермента. Следующие 323 а.о. начиная с Gly⁵⁹ кодируют собственно сам фермент химозин в изоформе Б, которая более активна чем изоформа А [23]. Первоначально, химозин секретируется в инактивированной форме – прохимозина и затем путем автокаталитического протеолиза при низком значении рН (4,0) активируется в белок химозин с молекулярной массой 35,5 кДа. Сравнение последовательностей химозинов коровы (*Bos taurus*), козы (*Capra hircus*), овца (*Ovis aries*) и двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) показывает достаточно высокую консервативность химозина (Рисунок 1).

Идентичность относительно хорошо изученного телячьего химозина с верблюжьим химозином составляет почти 84%. Путем клонирования прохимозина в составе челночного дрожжевого вектора собрана генно-инженерная конструкция рGAPZα/ProchymCB (Рисунок 2), получение которой подробно описано в [18].

Общая протяженность вектора составляет 4202 п.о. В составе данного вектора ген прохимозина (1098 п.о.) встроен под контроль конститутивного глицероальдегид-3-фосфат дегидрагеназы (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAP) промотора. С N-конца ген прохимозина несет нуклеотидную последовательность α-пептида из *Saccharomyces cerevisiae* для секреции прохимозина в культуральную среду дрожжей. Трансформацией данным вектором компетентных клеток дрожжей *Pichia pastoris* штамма GS115 получен дрожжевой штамм-продуцент

рекомбинантного прохимозина *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB.

Получение химозина

Дрожжевой штамм *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB показал хорошую продуцирующую способность на среде с добавлением аскорбиновой кислоты и свекловичной мелассы. Выход активных единиц составил 1411 Ед/мл, что на 40% превышает при использовании известной среды YPD, обычно используемой для культивирования дрожжей. Предлагаемая компанией Invitrogen базальная солевая среда используется для получения культур высокой плотности, однако она не всегда является подходящим дополнением из-за чрезмерной ионной силы, выпадения в осадок добавок среды и несбалансированной концентрации питательных веществ [26]. Данная среда малопригодна для крупномасштабного использования недорогих биопрепаратов, так как требует добавления дорогостоящего витамина Н и смеси микроэлементов, ряд которых могут ингибировать производство рекомбинантных белков [27]. Глюкоза в среде необходима не только как источник углерода, но и для активации промотора GAP [28]. Дрожжевой экстракт и пептон являются источником амидного азота, который необходим для полноценного и устойчивого роста штамма [29]. Оптимальным рН среды для производства химозина является рН 4,0 и его поддерживали с помощью цитрат-фосфатного буфера.

Комбинация анионообменной и катионообменной хроматографии позволила очистить химозин из среды и сконцентрировать рекомбинантный белок. Путем расчета было установлено, что зрелый химозин имеет изоэлектрическую точку равной 4,87 и не связывается с DEAE-сефарозой и связывается с SP-сефарозой при рН 3,0 и с Q-сефарозой при рН 5,5 (Рисунок 3).

Как показано на рисунке 3, рекомбинантный химозин, очищенный на колонке SP-Sepharose содержит большое количество примесных белков массой ниже 30 кДа. Дальнейшая очистка на Q-сефарозе позволила сконцентрировать химозин и избавиться от других белков получая до 95%-ой степени чистоты фермент.

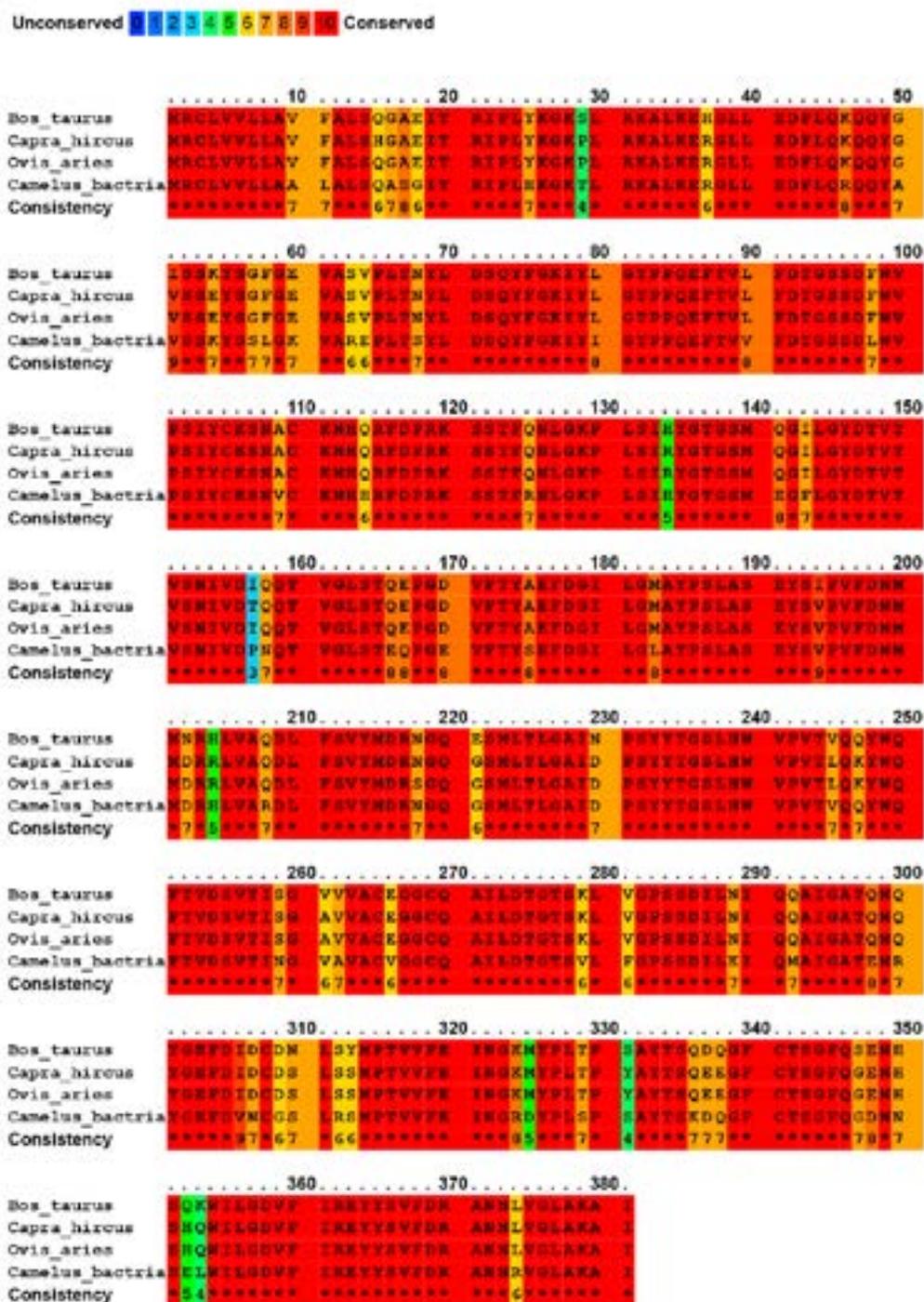


Рисунок 1 – Последовательности химозинов *Bos taurus* (NP_851337.1), *Capra hircus* (NP_001272688.1), *Ovis aries* (NP_001009804.1), *Camelus bactrianus* (XP_010946582.1)

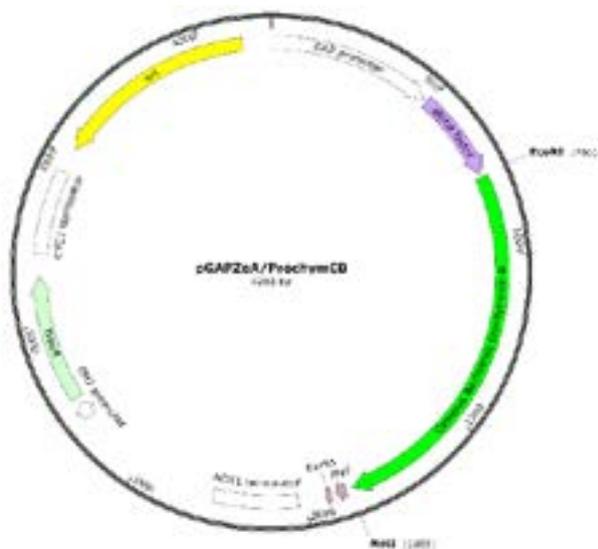
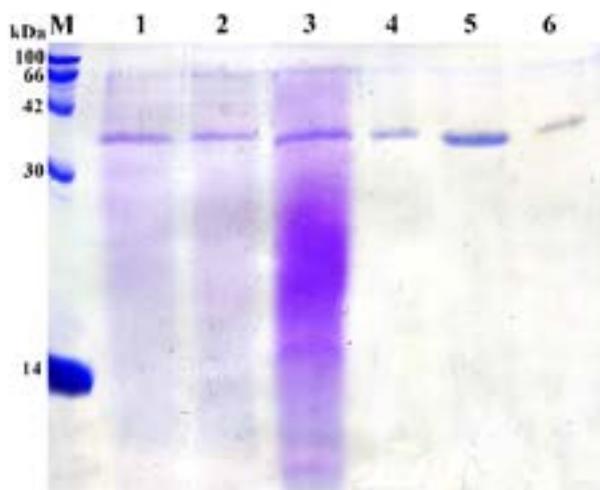


Рисунок 2 – Плазмидная карта вектора pGAPZαA/ProchymCB



М – белковый маркер; 1- Сконцентрированная культуральная жидкость; 2 – Фракция не связавшаяся с DEAE-сефарозой; 3 – элюированная фракция с SP-сефарозы; 4-6 фракции элюированные с Q-сефарозы.

Рисунок 3 – Результат очистки рекомбинантного верблюжьего химозина

Молокосвертывающая активность химозина для кобыльего молока

В кобыльем молоке активность химозина наблюдалась только в диапазоне pH 3,0-5,5. Оптимальный pH для активности рекомбинантного химозина *C. bactrianus* для кобыльего молока составил 4,0 (Рисунок 4). С повышением и уменьшением pH относительная активность

свертывания снижалась. Более низкие значения pH для молока из-за его кислотной коагуляции [20] не могли быть достигнуты, а при более высоких значениях pH коагуляция не наблюдалась. В случае же с козым молоком наивысшая активность достигается при pH 4,5. Эти данные показали, что верблюжий химозин, как и другие химозины, обладает наибольшей активностью в кислых условиях.

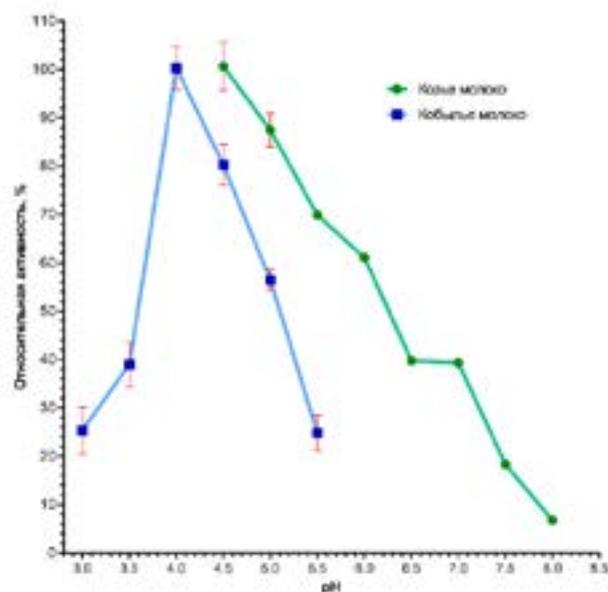


Рисунок 4 – Зависимость молокозвертывающей активности рекомбинантного химозина верблюда от pH кобыльего молока

Известно, что на молокозвертывающую активность химозина сильно влияет температура [15, 17, 30]. В нашем исследовании было установлено, что оптимальная температура для относительной активности свертывания кобыльего молока является 70°C (Рисунок 5). В данном случае скорость реакции при 70°C на кобыльем молоке увеличилась в три раза по сравнению с физиологической температурой 37°C. Для сравнения оптимальной температурой для свертывания козьего молока верблюжьим химозином составляет 60°C. При 70°C активность химозина на коровьем молоке снижается до 20%, в то время как на кобыльем молоке она достигает максимума. Различные значения оптимальной температуры для двух субстратов (козье и кобылье молоко) мы связываем с различными механизмами действия верблюжьего химозина. В козьем молоке основным субстратом для хими-

зина является каппа-казеин, который обеспечивает стабильность казеиновых мицелл [31], а для кобыльего молока, которое является альбуминовым, каппа-казеин не играет такой ключевой роли [32] и в этом случае все компоненты молока подвергаются протеолизу. Кобылье молоко имеет индуцированную химозином систему свертывания, которая, вероятно, отличается от коровьего молока.

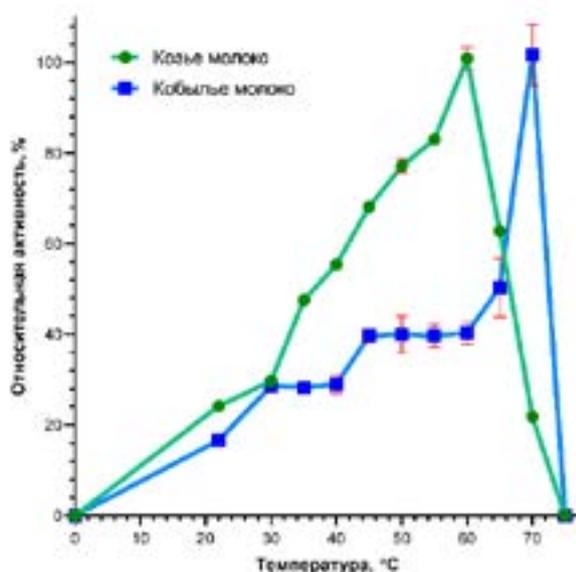


Рисунок 5 – Зависимость молокосвертывающей активности рекомбинантного химозина верблюда от температуры кобыльего молока

Кобылье молоко плохо поддается коагуляции. В частности, его совершенно невозможно свернуть с помощью телячьего химозина. Несмотря на то, что экспериментально было показано, что верблюжий химозин обладает молокосвертывающей активностью в отношении кобыльего молока для получения сырного сгустка из кобыльего молока требуются дополнительные технологические процедуры: смешивание с другими видами молока, оптимизация температуры и времени коагуляции [20].

Коагуляция коровьего и козьего молока

В отличие от кобыльего молока коровье и козье молоко гораздо лучше поддается свертыванию. Активность рекомбинантного верблюжьего химозина в отношении коровьего и козьего молока составила 9605 и 4650 ед/мг, соответственно, что в 80 и 40 раз превышает аналогичный показатель для кобыльего молока (Таблица 1).

Таблица 1 – Молокосвертывающая активность рекомбинантного верблюжьего химозина в отношении кобыльего, коровьего и козьего молока

Молоко	Активность
Кобылье	123 ед/мг
Коровье	9605 ед/мг
Козье	4650 ед/мг

В ходе экспериментальных исследований установлено, что при соблюдении следующих параметров: 30 мМ CaCl₂, рН 5.5, 37 °С эффективно протекает процесс коагуляции козьего молока. Сгусток образуется на 30 минуте (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Коагуляция козьего молока под действием рекомбинантного верблюжьего химозина

Органолептические свойства сгустка соответствовали мягким сортам сыра, что соответствует требованиям для сыроварения. Масса полученного бруска сыра составила 936 грамм,

что соответствует 15% от начальной массы молока.

Таким образом, экспериментально показано, что полученный верблюжий химозин обладает достаточной молокосвертывающей активностью в отношении коровьего и козьего молока и имеет перспективу использования для получения творога и сыра.

Заключение

Путем использования модифицированных дрожжей *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchumCB получен рекомбинантный химозин двугорбого верблюда *Camelus bactrianus*, который был очищен из культуры дрожжей методами ионнообменной хроматографии. Рекомбинант-

ный верблюжий химозин обладает молокосвертывающей активностью в отношении коровьего, козьего и кобыльего молока. На козьем молоке показана коагуляционная активность, достаточная для получения творога и сыра. Полученный рекомбинантный верблюжий химозин имеет перспективу применения в технологиях переработки коровьего и козьего молока и получения сыра.

Благодарность, конфликт интересов

Проведенные исследования были финансированы Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (BR10764998). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- 1 Szecsi, P. B. 1992. "The aspartic proteases." Scand J Clin Lab Invest Suppl no. 210:5-22.
- 2 Foltmann, B. 1966. "A review on prorennin and rennin." C R Trav Lab Carlsberg no. 35 (8):143-231.
- 3 Rawlings, Neil D., Alan J. Barrett, and Alex Bateman. 2010. "MEROPS: the peptidase database." Nucleic acids research no. 38 (Database issue):D227-D233. doi: 10.1093/nar/gkp971.
- 4 Mohanty, A. K., U. K. Mukhopadhyay, S. Grover, and V. K. Batish. 1999. "Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture." Biotechnol Adv no. 17 (2-3):205-17.
- 5 Flamm, E. L. 1991. "How FDA approved chymosin: a case history." Biotechnology (N Y) no. 9 (4):349-51.
- 6 Johnson, M. E. 2017. "A 100-Year Review: Cheese production and quality." J Dairy Sci no. 100 (12):9952-9965. doi: 10.3168/jds.2017-12979.
- 7 Ersöz, F., and M. İnan. 2019. "Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*." Protein Expr Purif no. 154:126-133. doi: 10.1016/j.pep.2018.10.007.
- 8 Belenkaya, S. V., A. A. Bondar, T. A. Kurgina, V. V. Elchaninov, A. Y. Bakulina, E. A. Rukhlova, O. I. Lavrik, A. A. Ilyichev, and D. N. Shcherbakov. 2020. "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." Biochemistry (Mosc) no. 85 (7):781-791. doi: 10.1134/s0006297920070068.
- 9 Bansal, N., M. A. Drake, P. Piraino, M. L. Broe, M. Harboe, P. F. Fox, and P. L. H. McSweeney. 2009. "Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese." International Dairy Journal no. 19 (9):510-517. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.010>.
- 10 Moynihan, A. C., S. Govindasamy-Lucey, J. J. Jaeggi, M. E. Johnson, J. A. Lucey, and P. L. McSweeney. 2014. "Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese." J Dairy Sci no. 97 (1):85-96. doi: 10.3168/jds.2013-7081.
- 11 Langholm Jensen, J., A. Mølgaard, J. C. Navarro Poulsen, M. K. Harboe, J. B. Simonsen, A. M. Lorentzen, K. Hjernø, J. M. van den Brink, K. B. Qvist, and S. Larsen. 2013. "Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr no. 69 (Pt 5):901-13. doi: 10.1107/s0907444913003260.
- 12 Gumus, P., and A. A. Hayaloglu. 2019. "Effects of blends of camel and calf chymosin on proteolysis, residual coagulant activity, microstructure, and sensory characteristics of Beyaz peynir." J Dairy Sci no. 102 (7):5945-5956. doi: 10.3168/jds.2018-15671.
- 13 Al-Zoreky, N. S., and F. S. Almathen. 2021. "Using recombinant camel chymosin to make white soft cheese from camel milk." Food Chem no. 337:127994. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127994.
- 14 Bekele, B., E. B. Hansen, M. Eshetu, R. Ipsen, and Y. Hailu. 2019. "Effect of starter cultures on properties of soft white cheese made from camel (*Camelus dromedarius*) milk." J Dairy Sci no. 102 (2):1108-1115. doi: 10.3168/jds.2018-15084.
- 15 Kappeler, S. R., H. J. van den Brink, H. Rahbek-Nielsen, Z. Farah, Z. Puhani, E. B. Hansen, and E. Johansen. 2006. "Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk." Biochem Biophys Res Commun no. 342 (2):647-54. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.014.
- 16 Jensen, J. L., J. Jacobsen, M. L. Moss, F. Rasmussen, K. B. Qvist, S. Larsen, and J. M. van den Brink. 2015. "The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay." J Dairy Sci no. 98 (5):2853-60. doi: 10.3168/jds.2014-8672.

- 17 Wang, N., K. Y. Wang, G. Li, W. Guo, and D. Liu. 2015. "Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*." *Protein Expr Purif* no. 111:75-81. doi: 10.1016/j.pep.2015.03.012.
- 18 Akishev, Z., A. Kiribayeva, A. Mussakhmetov, K. Baltin, Y. Ramankulov, and B. Khassenov. 2021. "Constitutive expression of *Camelus bactrianus* prochymosin B in *Pichia pastoris*." *Heliyon* no. 7 (5):e07137. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07137.
- 19 Küçükçetin, Ahmet, H. Yaygin, J. Hinrichs, and Ulrich Kulozik. 2003. "Adaptation of bovine milk towards mares' milk composition by means of membrane technology for koumiss manufacture." *International Dairy Journal* no. 13:945-951. doi: 10.1016/S0958-6946(03)00143-2.
- 20 Uniacke-Lowe, Therese. 2011. *Studies on Equine Milk and Comparative Studies on Equine and Bovine Milk Systems*.
- 21 Faccia, M., A. G. D'Alessandro, A. Summer, and Y. Hailu. 2020. "Milk Products from Minor Dairy Species: A Review." *Animals (Basel)* no. 10 (8). doi: 10.3390/ani10081260.
- 22 Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* no. 72:248-54.
- 23 Ageitos, J. M., J. A. Vallejo, A. B. Sestelo, M. Poza, and T. G. Villa. 2007. "Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13." *J Appl Microbiol* no. 103 (6):2205-13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03460.x.
- 24 Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* no. 227 (5259):680-5.
- 25 Visser, S., C. J. Slangen, and P. J. van Rooijen. 1987. "Peptide substrates for chymosin (rennin). Interaction sites in kappa-casein-related sequences located outside the (103-108)-hexapeptide region that fits into the enzyme's active-site cleft." *Biochem J* no. 244 (3):553-8.
- 26 Cos, O., R. Ramón, J. L. Montesinos, and F. Valero. 2006. "Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review." *Microb Cell Fact* no. 5:17. doi: 10.1186/1475-2859-5-17.
- 27 Jiang, X. P., M. L. Yin, P. Chen, and Q. Yang. 2012. "Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115." *World J Microbiol Biotechnol* no. 28 (5):2087-93. doi: 10.1007/s11274-012-1012-7.
- 28 Waterham, H. R., M. E. Digan, P. J. Koutz, S. V. Lair, and J. M. Cregg. 1997. "Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter." *Gene* no. 186 (1):37-44. doi: 10.1016/S0378-1119(96)00675-0.
- 29 Kingston, D., G. F. Novelli, P. Cerrutti, M. N. Recupero, M. Blasco, and M. A. Galvagno. 2014. "Use of grape pomaces to produce biomass of *Komagataella pastoris* strain expressing a bovine chymosin activity." *Food Sci Nutr* no. 2 (6):734-43. doi: 10.1002/fsn3.128.
- 30 Nosedá, D. G., M. N. Recupero, M. Blasco, G. E. Ortiz, and M. A. Galvagno. 2013. "Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter." *Protein Expr Purif* no. 92 (2):235-44. doi: 10.1016/j.pep.2013.08.018.
- 31 Carlson, A., C. G. Hill, Jr., and N. F. Olson. 1987. "Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation." *Biotechnol Bioeng* no. 29 (5):582-9. doi: 10.1002/bit.260290507.
- 32 Uniacke-Lowe, Therese, Thom Huppertz, and Patrick F. Fox. 2010. "Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance." *International Dairy Journal* no. 20 (9):609-629. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.007>.

References

- 1 Ageitos, J. M., J. A. Vallejo, A. B. Sestelo, M. Poza, and T. G. Villa. 2007. "Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13." *J Appl Microbiol* no. 103 (6):2205-13. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03460.x.
- 2 Akishev, Z., A. Kiribayeva, A. Mussakhmetov, K. Baltin, Y. Ramankulov, and B. Khassenov. 2021. "Constitutive expression of *Camelus bactrianus* prochymosin B in *Pichia pastoris*." *Heliyon* no. 7 (5):e07137. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07137.
- 3 Al-Zoreky, N. S., and F. S. Almathen. 2021. "Using recombinant camel chymosin to make white soft cheese from camel milk." *Food Chem* no. 337:127994. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127994.
- 4 Bansal, N., M. A. Drake, P. Piraino, M. L. Broe, M. Harboe, P. F. Fox, and P. L. H. McSweeney. 2009. "Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese." *International Dairy Journal* no. 19 (9):510-517. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.010>.
- 5 Bekele, B., E. B. Hansen, M. Eshetu, R. Ipsen, and Y. Hailu. 2019. "Effect of starter cultures on properties of soft white cheese made from camel (*Camelus dromedarius*) milk." *J Dairy Sci* no. 102 (2):1108-1115. doi: 10.3168/jds.2018-15084.
- 6 Belenkaya, S. V., A. A. Bondar, T. A. Kurgina, V. V. Elchaninov, A. Y. Bakulina, E. A. Rukhlova, O. I. Lavrik, A. A. Ilyichev, and D. N. Shcherbakov. 2020. "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." *Biochemistry (Mosc)* no. 85 (7):781-791. doi: 10.1134/S0006297920070068.
- 7 Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* no. 72:248-54.
- 8 Carlson, A., C. G. Hill, Jr., and N. F. Olson. 1987. "Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation." *Biotechnol Bioeng* no. 29 (5):582-9. doi: 10.1002/bit.260290507.
- 9 Cos, O., R. Ramón, J. L. Montesinos, and F. Valero. 2006. "Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review." *Microb Cell Fact* no. 5:17. doi: 10.1186/1475-2859-5-17.

- 10 Ersöz, F., and M. İnan. 2019. "Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*." *Protein Expr Purif* no. 154:126-133. doi: 10.1016/j.pep.2018.10.007.
- 11 Faccia, M., A. G. D'Alessandro, A. Summer, and Y. Hailu. 2020. "Milk Products from Minor Dairy Species: A Review." *Animals (Basel)* no. 10 (8). doi: 10.3390/ani10081260.
- 12 Flamm, E. L. 1991. "How FDA approved chymosin: a case history." *Biotechnology (N Y)* no. 9 (4):349-51.
- 13 Foltmann, B. 1966. "A review on prorennin and rennin." *C R Trav Lab Carlsberg* no. 35 (8):143-231.
- 14 Gumus, P., and A. A. Hayaloglu. 2019. "Effects of blends of camel and calf chymosin on proteolysis, residual coagulant activity, microstructure, and sensory characteristics of Beyaz peynir." *J Dairy Sci* no. 102 (7):5945-5956. doi: 10.3168/jds.2018-15671.
- 15 Jensen, J. L., J. Jacobsen, M. L. Moss, F. Rasmussen, K. B. Qvist, S. Larsen, and J. M. van den Brink. 2015. "The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay." *J Dairy Sci* no. 98 (5):2853-60. doi: 10.3168/jds.2014-8672.
- 16 Jiang, X. P., M. L. Yin, P. Chen, and Q. Yang. 2012. "Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115." *World J Microbiol Biotechnol* no. 28 (5):2087-93. doi: 10.1007/s11274-012-1012-7.
- 17 Johnson, M. E. 2017. "A 100-Year Review: Cheese production and quality." *J Dairy Sci* no. 100 (12):9952-9965. doi: 10.3168/jds.2017-12979.
- 18 Kappeler, S. R., H. J. van den Brink, H. Rahbek-Nielsen, Z. Farah, Z. Puhan, E. B. Hansen, and E. Johansen. 2006. "Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk." *Biochem Biophys Res Commun* no. 342 (2):647-54. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.014.
- 19 Kingston, D., G. F. Novelli, P. Cerrutti, M. N. Recupero, M. Blasco, and M. A. Galvagno. 2014. "Use of grape pomaces to produce biomass of a *Komagataella pastoris* strain expressing a bovine chymosin activity." *Food Sci Nutr* no. 2 (6):734-43. doi: 10.1002/fsn3.128.
- 20 Küçükçetin, Ahmet, H. Yaygin, J. Hinrichs, and Ulrich Kulozik. 2003. "Adaptation of bovine milk towards mares' milk composition by means of membrane technology for koumiss manufacture." *International Dairy Journal* no. 13:945-951. doi: 10.1016/S0958-6946(03)00143-2.
- 21 Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* no. 227 (5259):680-5.
- 22 Langholm Jensen, J., A. Mølgaard, J. C. Navarro Poulsen, M. K. Harboe, J. B. Simonsen, A. M. Lorentzen, K. Hjernø, J. M. van den Brink, K. B. Qvist, and S. Larsen. 2013. "Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* no. 69 (Pt 5):901-13. doi: 10.1107/s0907444913003260.
- 23 Mohanty, A. K., U. K. Mukhopadhyay, S. Grover, and V. K. Batish. 1999. "Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture." *Biotechnol Adv* no. 17 (2-3):205-17.
- 24 Moynihan, A. C., S. Govindasamy-Lucey, J. J. Jaeggi, M. E. Johnson, J. A. Lucey, and P. L. McSweeney. 2014. "Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese." *J Dairy Sci* no. 97 (1):85-96. doi: 10.3168/jds.2013-7081.
- 25 Nosedá, D. G., M. N. Recupero, M. Blasco, G. E. Ortiz, and M. A. Galvagno. 2013. "Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter." *Protein Expr Purif* no. 92 (2):235-44. doi: 10.1016/j.pep.2013.08.018.
- 26 Rawlings, Neil D., Alan J. Barrett, and Alex Bateman. 2010. "MEROPS: the peptidase database." *Nucleic acids research* no. 38 (Database issue):D227-D233. doi: 10.1093/nar/gkp971.
- 27 Szecsi, P. B. 1992. "The aspartic proteases." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* no. 210:5-22.
- 28 Uniacke-Lowe, Therese, Thom Huppertz, and Patrick F. Fox. 2010. "Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance." *International Dairy Journal* no. 20 (9):609-629. doi: https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.007.
- 29 Uniacke-Lowe, Therese. 2011. *Studies on Equine Milk and Comparative Studies on Equine and Bovine Milk Systems*.
- 30 Visser, S., C. J. Slangen, and P. J. van Rooijen. 1987. "Peptide substrates for chymosin (rennin). Interaction sites in kappa-casein-related sequences located outside the (103-108)-hexapeptide region that fits into the enzyme's active-site cleft." *Biochem J* no. 244 (3):553-8.
- 31 Wang, N., K. Y. Wang, G. Li, W. Guo, and D. Liu. 2015. "Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*." *Protein Expr Purif* no. 111:75-81. doi: 10.1016/j.pep.2015.03.012.
- 32 Waterham, H. R., M. E. Digan, P. J. Koutz, S. V. Lair, and J. M. Cregg. 1997. "Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter." *Gene* no. 186 (1):37-44. doi: 10.1016/s0378-1119(96)00675-0.