

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Аббязова Алсу Нафисовна

лаборант-исследователь

Фирсова Наталья Викторовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Ачилов Атабег Батырович

магистрант, младший научный сотрудник

Викторов Денис Александрович

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

Ленгесова Наталья Анатольевна

канд. биол. наук, доцент, заведующая кафедрой,

старший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный

педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-112097

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ КАК ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА

Аннотация: в статье рассматриваются аспекты развития производства сыров на основе генно-инженерных аналогов химозина как альтернатива традиционному процессу получения сычужного химозина.

Ключевые слова: сычужный фермент, химозин, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, pTZ57R/T-ΔP_{ura3}, pTZ57R/T-ΔP_{plys5}, двугорбый верблюд *Camelus bactrianus*.

Производство сыра – одна из древнейших биотехнологий. Исследование остатков керамики эпохи неолита на территории современной Польши позволило

получить доказательства того, что уже в V тысячелетии до нашей эры люди перерабатывали молоко, делая сыр. Совершенствование технологий сыроделия требует поиска новых, более эффективных молокосвертывающих ферментов. Поэтому одной из актуальных задач биотехнологии является получение молокосвертывающих протеиназ с высокими ферментативными свойствами [5].

Растущий потребительский спрос на сыры сопровождался поиском продуктов с высокими органолептическими свойствами, что определило повышенный интерес к поиску альтернативных коагулянтов молока. Основными требованиями к ферментам являются оптимальные показатели протеолитической и молокосвертывающей активности, используемой в процессе сыроделия. Наиболее широкое применение в пищевой промышленности, особенно в сыроделии, нашли растительные протеазы, относящиеся к цистеиновой (папаин, бромелайн, фицин), аспаргатной (цинараза, кардозин) и сериновой (кукумизин, лейцин) группе протеаз.

При производстве молочной продукции используется молоко в большей части коров (84%), молоко остальных животных используется в производстве сыра в значительно меньших объемах (буйвол 12,1%, козы 2%, овцы 0,2%, верблюды 0,2%, лошадей, ослов и других животные 0,4%).

Мировой рынок сыра демонстрирует стабильный рост. Основными игроками на этом рынке являются США и страны Евросоюза. Наряду с США и странами Европы основными производителями сыров являются Россия, Бразилия, Аргентина, Канада и Новая Зеландия. Кроме того, аналитики отметили перспективы рынка сыра в Китае. Наибольший прирост производства сыра и творога показали Россия и Белоруссия. Так, в 2022 году совокупный объем производства сыра в странах СНГ достиг 1718 тыс. тонн.

Одним из ключевых компонентов сычужного фермента является химозин Chn (ренин) – фермент класса гидролаз, представляет собой аспарагиновую протеазу, катализирующий гидролиз пептидных связей, образованных преимущественно остатками гидрофобных аминокислот, относится к эндопептидазам [20; 29]. На молекулярном уровне Chn специфически воздействует на пептидную

связь j-казеина между Phe105 и Met106, что приводит к образованию дестабилизированных мицелл казеина и последующему свертыванию молока. Проявляет высокую специфичность по отношению к одинарной пептидной связи в молекула каппа-казеина и низкую общую протеолитическую активность, способствует его полноценной ассимиляции в желудочно-кишечном тракте новорожденных [19]. Низкая общая протеолитическая активность предотвращает повреждение антигенов и других белков, содержащихся в материнском молоке, которые обладают антибактериальными и противовирусными свойствами. У видов, детеныши которых рождаются уже с развитым иммунитетом, ген *Chn* не экспрессируется [22]. Под действием химозина происходит первичная протеолитическая реакция, которая вызывает коагуляцию казеина молока, заключительной стадией которой является превращение всех компонентов молочного сгустка во вкусовые и ароматические соединения. Благодаря своим уникальным ферментативным и биохимическим свойствам *Chn* млекопитающих, в отличие от других источников фермента, широко востребован в изготовлении сыра и обеспечивает высокое качество производимых сыров [17].

Ген бычьего химозина кодирует препрохимозин (381aa) и секретируется в форме неактивного предшественника прохимозина (365aa). В кислых условиях неактивный прохимозин превращается в активную форму (323aa) путем автокаталитического расщепления пропоследовательности [15]. Химозин существует в двух аллельных формах: химозин А и В. Разницу между этими формами составляет 286-я аминокислота (в химозине А – аспаргат, в химозине В – глицин). Форма А химозина более специфична к к-казеину, но менее стабильна, чем форма В. У разных видов животных химозин имеет разное количество изоформ (по базе данных NCBI): корова – 3, бизон – 3, свинья – 2, овца – 1, верблюд – 2, коза – 3, марал – 2, северный олень – 1, лось – 1.

Традиционный способ получения химозина – сычуг молочных телят, молочного вскармливания, убой которых проводится в большом количестве и вызывает этические проблемы [17; 18; 20; 32]. Однако во второй половине XIX века объемы производства сычужного фермента были недостаточны для удовлетворения

потребностей промышленности, а ее генно-инженерные аналоги заменили натуральные Chn [5; 18]. С 2001 года получены и охарактеризованы следующие рекомбинантные химозины (rChn): овца (*Ovis aries*) [27], коза (*Capra hircus*), буйвол (*Bubalus arnee bubalis*) [30], як (*Bos grunniens*) [15], альпака (*Vicugna pacos*), алтайский марал (*Cervus elaphus sibiricus*) [10–13], кролик (*Oryctolagus cuniculus*) [4], белуха (*Delphinapterus leucas*), двугорбый верблюд (*Camelus bactrianus*) [2; 3], тупайя (*Tupaia belangeri chinensis*) [6] и лося (*Alces alces*) [7]. Все эти животные относятся к отряду Парнокопытные [9].

Получение коровьего (*Bos taurus*) rChn генетически модифицированными микроорганизмами и его внедрение в сыроделие было одним из первых успешных применений рекомбинантных ДНК-технологии в пищевой промышленности. Позже появились rChn одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*), превосходящего коровий фермент по удельной молокосвертывающей активности и специфичности [5]. Генетически сконструированные rChn *Bos taurus* и *Camelus dromedarius* являются высококачественной альтернативой сычужному ферменту и в настоящее время широко представлены на рынке промышленных коагулянтов молока.

Активная экспрессия химозина яка (*Bos grunniens*) была достигнута в супернатанте с помощью α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* под контролем индуцируемого метанолом промотора АОХI в системе экспрессии *Pichia Pastoris*. Проведены исследования реконструкции последовательности мРНК препрохимозин марала, разработан экспрессионный вектор, который обеспечивает наработку рекомбинантного фермента, полученного в системе экспрессии *Escherichia coli* (штамм BL21(DE3)) [9].

Интеграционный вектор rIP1 использовали для конструирования плазмиды rIP1-Car с целью экспрессии рекомбинантного гена прохимозина косули в клетках CHO-K1 [24].

Перспективным сычужным ферментом выступает верблюжий Chn (*Camelus bactrianus*), который обладает на 70% большей молокосвертывающей активностью, более термостабильный, в отличие от Chn коровы [8; 16]. Chn верблюда

состоит из 381 аминокислот, первые 16 препептиды, которые обеспечивают секрецию фермента, 42 аминокислоты последовательно блокируют протеолитическое действия фермента, 323 аминокислоты начиная с Gly59, кодируют сам химозин в изоформе Б, которая более активна чем изоформа А. Полученный рекомбинантный химозин был успешно экспрессирован в мицелиальных грибах *Aspergillus niger* и в дрожжах *Pichia pastoris* [16]. Однако другие исследования показали, трудность сверхэкспрессии Chn в экспрессионной системе *Aspergillus niger*. Полноразмерный ген верблюжьего прохимозина был введен в *Pichia pastoris* GS115 с использованием плазмиды pPIC9K, экспрессия гена регулируется промотором АОХ1, индуцируемый метанолом [32]. Сравнение аминокислотной последовательностей Chn *Bos taurus*, *Capra hircus*, *Ovis aries* и *Camelus bactrianus* показывает достаточно высокую консервативность (рис. 1).

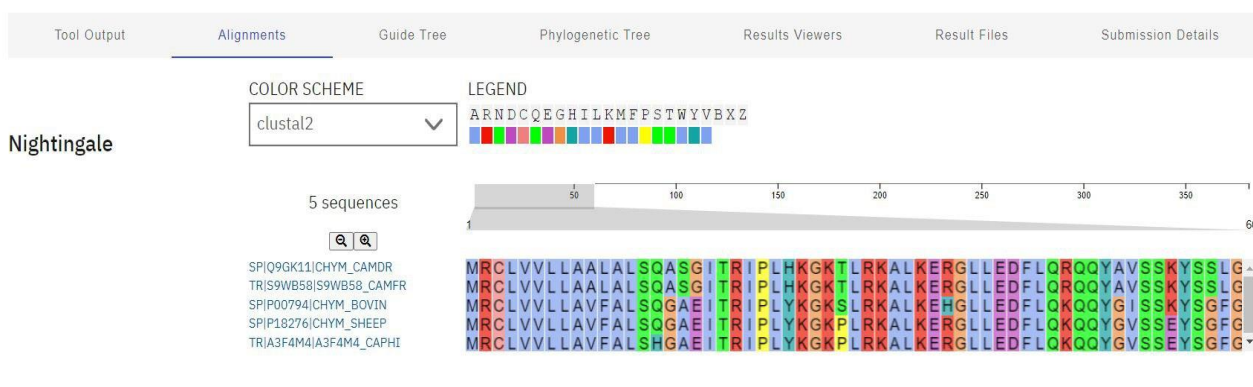


Рис. 1. Последовательности химозинов *Bos Taurus*, *Capra hircus*, *Ovis aries*, *Camelus bactrianus* (<https://www.ebi.ac.uk>)

Гены химозина могут экспрессироваться различными эукариотическими продуцентами: растениями, грибами и клетками млекопитающих [5; 9; 20; 21]. Системы экспрессии одноклеточных грибов (дрожжей) характеризуются простотой генетических манипуляций, стабильной геномной интеграции экспрессионных кассет, отсутствием вирусных инфекций, токсинов, пирогенов и патогенов, способностью осуществлять посттрансляционные модификации, секрецию целевых белков [26]. Использование системы экспрессии *E.coli* имеет ряд преимуществ за счет короткого периода ферментации и совместимость с многочисленными

ными векторными системами. Однако, с другой стороны, использование этой системы экспрессии не подходит для наработки активной формы бычьего химозина, и требуется процесс рефолдинга. В частности, для экспрессии rChn быка использовали экспрессионную систему дрожжей [25], *E.coli* и грибов [14]. Среди дрожжей широко используется *Kluyveromyces Lactis* в связи с простотой масштабирования, культивирования на простых питательных средах, а также в связи с наличием высокоэффективных промоторов [28], для получения гетерологичных рекомбинантных белков как в лабораторных, так и в промышленных масштабах [28; 31].

Экспрессия гена rChn верблюда проводили в экспрессионной системе *Pichia pastoris*. Полноразмерный ген верблюжьего прохимозина был синтезирован и клонирован в вектор pPIC9K, который был затем встраивали в штамм дрожжей *P.Pastoris* GS115. Экспрессия гена химозина у дрожжей находится под контролем индуцируемого промотора AOX1 [32]. Экспрессионная система *P.Pastoris* имеет ряд преимуществ перед нитевидными грибами в отношении промышленной ферментации [23].

В биотехнологии при работе с дрожжами самой сложной задачей является достижение оптимального баланса между уровнем синтеза целевого белка и жизнеспособностью штаммов-продуцентов. В частности, использование метанола в качестве единственного источника углерода в системе экспрессии *P.pastoris* является ключевым аспектом метаболизма химозина. Этот микроорганизм характеризуется высокой устойчивостью к окислению, высоким уровнем продуктивности и имеет эффективную систему секреции, позволяющую вырабатывать и выделять синтезируемые белки в культуральную среду.

Существует два пути повышения синтеза целевого белка: получение штаммов *P.pastoris*, несущих множественные копии чужеродного гена и коэкспрессия генов, кодирующих различные вспомогательные факторы. Для успешного применения этих подходов необходимо создание коллекции плазмид, позволяющих осуществлять множественную интеграцию чужеродных генов в геном *P.pastoris*,

а также получение множественно-маркированных штаммов-продуцентов. Векторы pTZ57R/T-URA3 и pTZ57R/T-LYS5, которые включают последовательности генов *PpURA3* и *PpLYS5*, подвергаются действию рестриктаз BsrGI (для pTZ57R/T-URA3), ClaI и BsrGI (для pTZ57R/T-LYS5), в результате чего вырезается фрагмент размером в 418 п.о. Полученные фрагменты обрабатываются Pfu-полимеразой и подвергаются самолигированию [1]. Полученные плазмиды pTZ57R/T- Δ Ppura3 и pTZ57R/T- Δ Pplys5 (рис. 2 А, Б) применяются для создания ауксотрофных штаммов *P.pastoris* по урацилу и лизину, соответственно. Эти фрагменты затем трансформируются в штамм X-33 дрожжей *P.pastoris*. Для эффективной селекции трансформантов применяется негативная селекция. После трансформации клетки дрожжей культивируются в среде, содержащей определенные питательные вещества и индукторы экспрессии (обычно метанол). В зависимости от использования метанола штаммы *P.pastoris* делятся на три фенотипа: Штаммы Mut⁺ с генами AOX1 и AOX2 в своих хромосомах; штаммы Mut^S только с геном AOX2 и штаммы Mut⁻ мутантов без каких-либо генов AOX. Следовательно, скорость роста различных штаммов зависит от их мутантных форм. Высокие уровни метанола токсичны для клеток, что приводит к накоплению формальдегида и перекиси водорода и, как следствие, к гибели клеток.

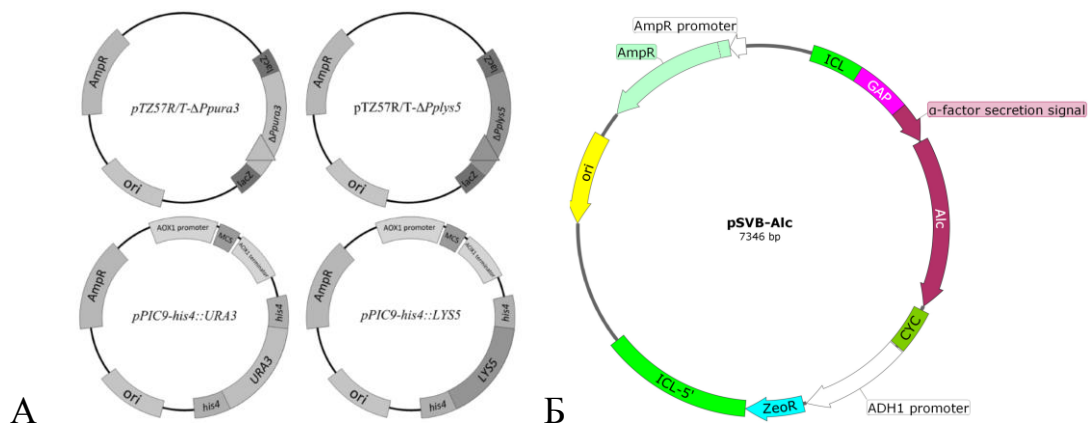


Рис. 2. А – Плазмиды: pTZ57R/T- Δ Ppura3, pTZ57R/T- Δ Pplys5, pPIC9-his4::URA3 и pPIC9-his4::LYS5 [2]. Б – Генетическая карта плазмидного вектора *Pichia pastoris* GS115/pGAPZ α A/ProchymCB [44]

Плазмиды и ауксотрофные штаммы позволяют осуществлять внедрение чужеродных генов в геном *P.pastoris*. Дальнейшее их применение позволит ещё больше расширить коллекцию селективных маркеров и ауксотрофных мутантов дрожжей *P.pastoris* [1].

Таким образом, в результате анализа литературных и биоинформационных данных наиболее оптимальным организмом для синтеза фермента химозин является верблюжий Chn (*Camelus bactrianus*), а экспрессионной системой *P.pastoris*.

Статья написана и доклад выполнен в рамках Дополнительного соглашения №073-03-2024-060/1 от 13.02.2024 к Соглашению о предоставлении субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнения работ) №073-03-2024-060 от 18.01.2024, заключенным между ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова» и Министерством просвещения Российской Федерации.

Список литературы

1. Музаев Д.М. Новые штаммы дрожжей *Pichia pastoris* – продуценты гетерологичных белков / Д.М. Музаев, А.М. Румянцев, Е.В. Самбук [и др.] // Экологическая генетика. – 2015. – №1. – EDN RTHLCE
2. Akishev Z., Aktayeva S., Kiribayeva A. [et al.] Obtaining of recombinant camel chymosin and testing its milk-clotting activity on cow's, goat's, ewes', camel's and mare's milk. *Biology* 2022, 11, 1545. DOI 10.3390/biology11111545. EDN POXPTL
3. Akishev Z., Kiribayeva A., Mussakhmetov A. [et al.] Constitutive expression of *Camelus bactrianus* prochymosin B in *Pichia pastoris*. *Heliyon*. 2021, 7, e07137. DOI 10.1016/j.heliyon.2021.e07137. EDN WMGQNQ
4. Alihanoglu S., Ektiren D., Karaaslan M. Recombinant expression and characterization of *Oryctolagus cuniculus* chymosin in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Protein Expr. Purif.* 2021, 183, 105874. DOI 10.1016/j.pep.2021.105874. EDN ZGLTBS
5. Balabova D.V., Belash E.A., Belenkaya S.V. [et al.] Biochemical properties of a promising milk-clotting enzyme, moose (*Alces alces*) recombinant chymosin. *Foods* 2023, 12, 3772. DOI 10.3390/foods12203772. EDN VIANDW

6. Balabova D.V., Belenkaya S.V., Volosnikova E.A. [et al.] Can recombinant tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) chymosin coagulate cow (*Bos taurus*) milk? *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022, 58, 763–772. DOI 10.1134/s0003683822060023. EDN GEMIZM

7. Balabova D.V., Rudometov A.P., Belenkaya S.V. [et al.] Biochemical and technological properties of moose (*Alces alces*) recombinant chymosin. *Vavilovskii Zhurnal Genet. I Sel. (Vavilov. J. Genet. Breed.)* 2022, 26, 240–249.

8. Bekele B., Hansen E.B., Eshetu M. [et al.] Effect of starter cultures on properties of soft white cheese made from camel (*Camelus dromedarius*) milk // *J Dairy Sci.* 2019. 102 (2). P. 1108–1115. DOI 10.3168/jds.2018-15084. EDN RFPKBD

9. Belenkaya S.V., Balabova D.V., Belov A.N. [et al.] Basic biochemical properties of recombinant chymosins (Review) // *Applied biochemistry and microbiology.* 2020. 56 (4). P. 315–326.

10. Belenkaya S.V., Bondar A.A., Kurgina T.A. [et al.] 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.* 2020, 85. P. 781–791.

11. Belenkaya S.V., Chirkova V.Y., Sharlaeva E.A. [et al.] Parameters of enzymatic kinetics of recombinant chymosin of the Altai red deer (*Cervus elaphus sibiricus*) obtained in pro- and eukaryotic expression systems. *Biotechnology* 2022, 38, 11–16.

12. Belenkaya S.V., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N. Development of a producer of recombinant maral chymosin based on the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology* 2021, 37. P. 20–27.

13. Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Balabova D.V. [et al.] Production of maral (*Cervus elaphus sibiricus* Severtzov) recombinant chymosin in the prokaryotic expression system and the study of the aggregate of its biochemical properties relevant for the cheese-making industry. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020, 56. P. 647–656. DOI 10.1134/S0003683820060034. EDN GZDDPE

14. Cardoza R.E., Gutierrez S., Ortega N. [et al.] Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene in *Aspergillus awamori* from constitutive and pH-regulated

promoters and secretion using two different pre-pro sequences. *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003). P. 249–259.

15. Fatma Ersöz, Mehmet İnan. Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 2019:154. P. 126–133.

16. Jensen J.L., Jacobsen J., Moss M.L. [et al.] The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay. 2015.

17. Jiang X-P., Yin M.-L., Chen P., Yang Q. Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28. 2012. P. 2087–2093. DOI 10.1007/s11274-012-1012-7. EDN RUQJNF

18. Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. The production, action and application of rennet and coagulants. In *Technology of Cheesemaking*; Law, B.A., Tamime, A.Y., Eds. Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2010; Chapter 3; P. 98–129.

19. Holt C., Carver J.A., Ecroyd H., Thorn D.C. Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *J. Dairy Sci.* 2013, 96. P. 6127–6146. DOI 10.3168/jds.2013-6831. EDN RJHQLJ

20. Kumar A., Grover S., Sharma J., Batish V.K., Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions, *Crit. Rev. Biotechnol.* 30 (2010) 243–258. DOI 10.3109/07388551.2010.483459. EDN OKQDSD

21. Liu W.-G., Wang Y.-P., Zhang Z.-J. [et al.] Generation and characterization of caprine chymosin in corn seed. *Protein Expr. Purif.* 2017, 135, 78–82.

22. Lopes-Marques, M.; Ruivo, R.; Fonseca, E. [et al.] Unusual loss of chymosin in mammalian lineages parallels neo-natal immune transfer strategies. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2017, 116, 78–86. DOI 10.1016/j.ympev.2017.08.014. EDN YIZRJO

23. Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., Harvey L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, *Yeast* 22 (2005) 249–270.

24. Murashkin D.E., Belenkaya S.V., Bondar A.A. [et al.] Analysis of some biochemical properties of recombinant siberian roe Deer (*Capreolus pygargus*) Chymosin

Obtained in the Mammalian Cell Culture (CHO-K1). *Biochemistry (Mosc)*. 2023 Sep; 88 (9): 1284–1295. DOI 10.1134/s0006297923090080. EDN PMORRM

25. Nosedá D.G., Blasco M., Ortiz G.E., Galvagno M.A. Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter. *Protein Expression Purif.* 92 (2013) 235–244.

26. Patra P., Das M., Kundu P., Ghosh A. Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts. *Biotechnol. Adv.* 2021, 47, 107695. DOI 10.1016/j.biotechadv.2021.107695. EDN BKKTJP

27. Rogelj I., Perko B., Francky A., Penca V., Purgenčar J. Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production. *J. Dairy Sci.* 2001, 84, 1020–1026.

28. Sakhtah H., Behler J., Ali-Reynolds A. [et al.] C.H. Novel Regulated Hybrid Promoter That Permits Autoinduction of Heterologous Protein Expression in *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019, 85, e00542–19.

29. Uniacke-Lowe T., Fox P.F. Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: Structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties. In *Cheese*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., Cotter, P.D., Fox, P.F., Everett, D.W., Eds.; Elsevier Academic Press: Oxford, UK, 2017; pp. 69–113. DOI 10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1. EDN XOYMVA

30. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in *Pichia pastoris*. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 10606–10610. DOI 10.1021/jf802339e. EDN LOMBBF

31. Van den Dungen M.W., Boer R., Wilms L.C. [et al.] The safety of a *Kluyveromyces lactis* strain lineage for enzyme production. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2021, 126, 105027.

32. Wang N., Wang K.Y., Li G.Q. [et al.] Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 111 (2015) 75–81.