

***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<sub>ura3</sub>, pTZ57R/T-ΔP<sub>plys5</sub>, 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), аспаргатовой (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  $\alpha$ -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).

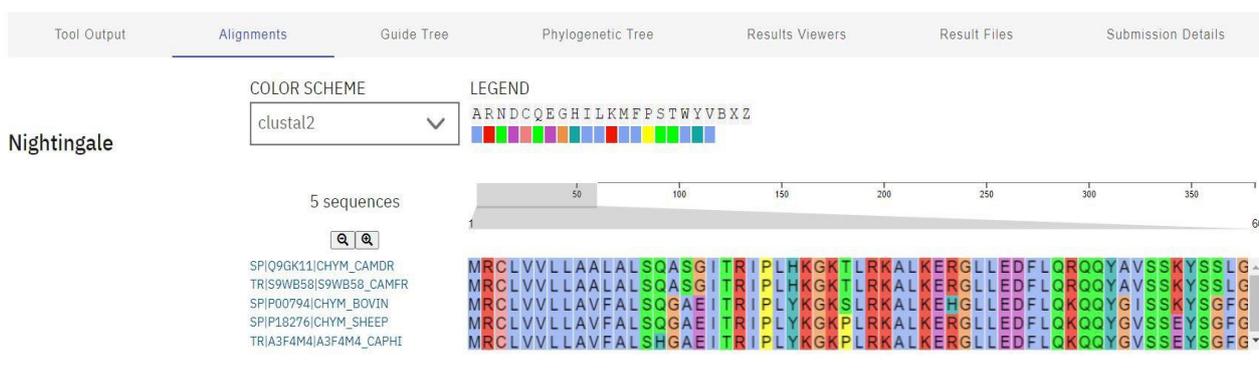


Рис. 1. Последовательности химозинов *Bos Taurus*, *Capra hircus*, *Ovis aries*, *Camelus bactrianus* (<https://www.ebi.ac.uk>)

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-ΔPpura3 и pTZ57R/T-ΔPplys5 (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<sup>+</sup> с генами AOX1 и AOX2 в своих хромосомах; штаммы Mut<sup>S</sup> только с геном AOX2 и штаммы Mut<sup>-</sup> 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.

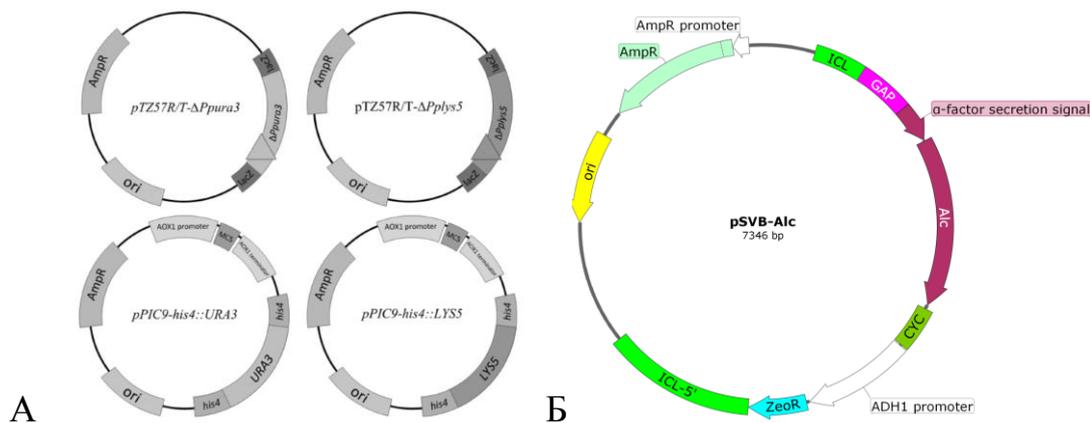


Рис. 2. А – Плазмиды: pTZ57R/T-ΔPpura3, pTZ57R/T-ΔPplys5, pPIC9-his4::URA3 и pPIC9-his4::LYS5 [2]. Б – Генетическая карта плазмидного вектора *Pichia pastoris* GS115/pGAPZαA/ProchymCB [44]

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.