УДК 602.3:579.8

https://doi.org/10.21603/1019-8946-2024-6-17

# РЕКОМБИНАНТНЫЙ ХИМОЗИН *CAMELUS DROMEDARIUS* В ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЕ *PICHIA PASTORIS*: ОЧИСТКА И АНАЛИЗ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СВОЙСТВ*

Источник изображения: freepik.com

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

**Елена Ивановна Антонова**, д-р биол. наук, профессор, директор
E-mail: antonov_67@mail.ru
**Наталья Викторовна Фирсова**, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий
**Наталья Анатольевна Ленгесова**, канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории морфологии
**Денис Александрович Викторов**, канд. биол. наук, старший научный сотрудник
**Атабег Батырович Ачилов**, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
**Павел Сергеевич Торутанов**, лабрант-исследователь
Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ульяновский государственный педагогический университет им. И. Н. Ульянова», г. Ульяновск

Выделение природного химозина сопряжено с этическими проблемами и высокими экономическими затратами. В связи с этим цель нашего исследования – очистка рекомбинантного химозина *Camelus dromedarius* (rChn-Cam), полученного в экспрессионной системе *Pichia pastoris*, с оптимизацией к росту клеточных колоний к различным питательным средам в присутствии различных концентраций зеоцина и анализ ферментативной активности. Последовательность гена прохимозина получена из NCBI BLAST. В качестве штамма-продуцента использовали GS115/*his4 P. pastoris*. Для конструирования экспрессионной кассеты использовали вектор pPICZ(alpha)B с промотором AOXI. В работе применяли генно-инженерные методы; культивирование штамма; выделение рекомбинантных His-Tag-меченных белков методом металл-аффинной хроматографии, ПААГ-электрофореза и Western-blot анализ. Молекулярную массу определяли методом MALDI-TOF MS, концентрацию – спектрофотометрически. После разработки челночной экспрессионной плазмиды pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT отмечено, что наращивание клеточной массы *P. pastoris* GS115/his*4* (фенотип $Mut^+$) целесообразнее проводить с предварительным внесением 0,5 % метанола. После трансформации *P. pastoris* GS115/hi*s4* и получения штамма-продуцента *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT отмечена сопряженность между скоростью прироста клеточной массы и концентрациями зеоцина в среде YPD («не обогащенная» с 50, 100 и 200 мкг/мл зеоцина) и YPD («обогащенная», биотин 0,00004 % и 1 % глицерина, с 50, 100 и 200 мкг/мл зеоцина), согласно которой штамм-продуцент целесообразно выращивать в «обогащенной» среде с концентрацией зеоцина 50 мкг/мл. После выделения и очистки масса rChn-Cam составила 35,673 кДа. При повышении pH субстрата с 5,0 до 6,5 коагуляционная активность снижалась на 24 %. Порог термической инактивации rChn-Cam составил 40–45 °C. Единица активности свертываемости снижается при увеличении концентрации зеоцина. Выявлена противоположная зависимость концентрации rChn-Cam от времени начала свертывания субстрата. Таким образом, полученный нами rChn-Cam в экспрессионной системе *P. pastoris* является хорошей альтернативой rChn, который используется при производстве сыров.

**Ключевые слова**: генетическая конструкция, рекомбинантный химозин, *Camelus dromedarius*, вектор, плазмида, дрожжи *Pichia pastoris*, молокосвертывающая активность, термостабильность, очистка химозина

**Для цитирования**: Рекомбинантный химозин *Camelus dromedarius* в экспрессионной системе *Pichia pastoris*: очистка и анализ ферментативных свойств / Е. И. Антонова, Н. В. Фирсова, Н. А. Ленгесова [и др.] // Молочная промышленность. 2024. № 6. С. 82–92. https://doi.org/10.21603/1019-8946-2024-6-17

* Работа подготовлена в рамках выполнения государственного задания «Разработка способа очистки ферментов, как продукта генетически сконструированной экспрессионной системы». Дополнительное соглашение №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. Регистрационный номер 124102300757-8.

## ВВЕДЕНИЕ

Химозин (EC 3.4.23.4; Chn) представляет собой аспарагиновую протеазу группы эндопептидаз, продуцируемую железистыми клетками сычуга новорожденных млекопитающих, способный к гидролизу внутримолекулярных пептидных связей [1–8]. Натуральный Chn, получаемый из желудков новорожденных сельскохозяйственных животных, а также его генно-инженерные аналоги широко используются при производстве сыров. Выделение природного химозина из желудка новорожденных животных ограничено этическими проблемами и сопряжено с высокими экономическими затратами. Одновременно с ежегодным ростом производства сыра повышается спрос на этот фермент.

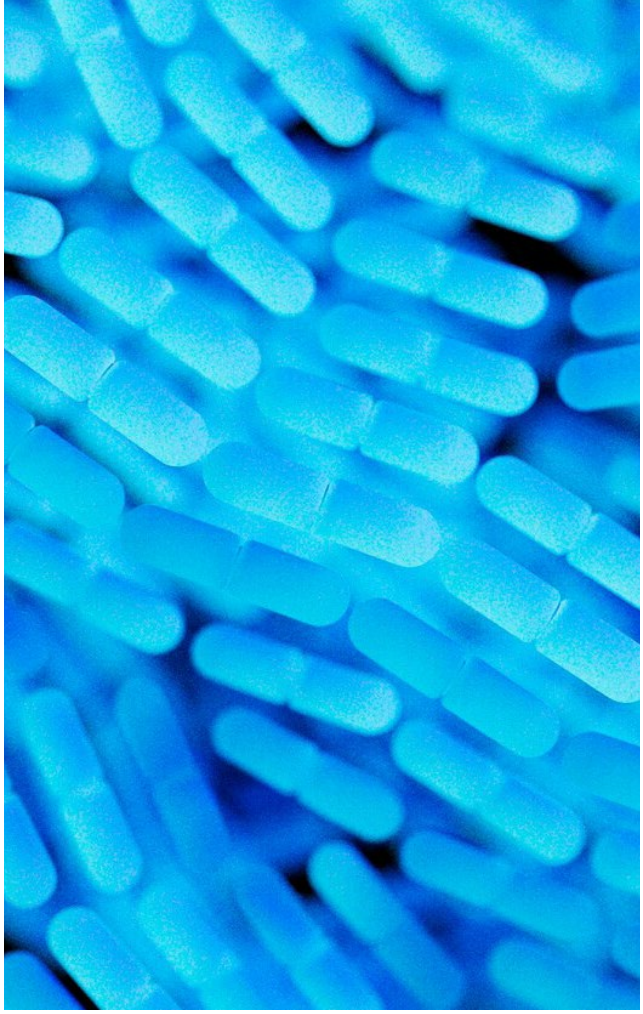
Активный центр Chn несет два остатка аспарагиновой аминокислоты в положениях 34 и 216 [8, 9]. Фермент отличается необычным сочетанием ферментативных свойств – проявляет высокую специфичность к пептидной связи в молекуле каппа-казеина (*к*-CN) и низкую общую протеолитическую активность, что определяет его биологические функции. Chn эффективно свертывает молоко, что способствует его полному усвоению в желудочно-кишечном тракте новорожденных [10]. В свою очередь, низкий общий уровень протеолитической активности химозина предотвращает повреждение антител и других белков, содержащихся в материнском молоке, которые обладают антибактериальными и противовирусными свойствами. В результате новорожденные тех млекопитающих, у которых к постнатальному периоду не сформировалась собственная иммунная система, обеспечиваются материнскими факторами пассивного иммунитета. У видов, детеныши которых рождаются с уже развитым иммунитетом, ген Chn не экспрессируется [11]. Chn, в частности, воздействует на *к*-CN пептидную связь между Phe105 и Met106, вызывая образование дестабилизированных мицелл казеина, свертывание молока и разделение молока на творог и сыворотку [2, 12].

Chn является одним из самых ранних биотехнологических применений ферментов для производства сыра. Во второй половине XX века объемов производства сычужного фермента было недостаточно для удовлетворения потребностей сыродельной промышленности, и его генно-инженерные аналоги заменили натуральный, используя рекомбинантные технологии в микроорганизмах, эукариотах [13–16] и растениях [7, 17–20]. Экспрессия химозина в грибах и дрожжах очень эффективна, поскольку ферментация в биореакторах позволяет производить большое количество фермента за короткий период [21]. Экспрессионные системы одноклеточных грибов (дрожжей) характеризуются простотой генетических манипуляций и стабильной геномной интеграцией экспрессионных кассет, способностью осуществлять посттрансляционные модификации, отсутствием вирусных инфекций, токсинов, пирогенов и патогенов. К преимуществам также можно отнести короткий цикл роста, относительно простой состав питательной среды, способность к биосинтезу как одного (преобладающего) фермента, так и мультиферментных систем[1] [22–24].

Chn был первым рекомбинантным ферментом, одобренным FDA [13]. Производство коровьего (*Bos taurus*) Chn в генетически модифицированных микроорганизмах и его внедрение в производство сыра стало одним из первых успешных применений технологий рекомбинантной ДНК в пищевой промышленности. Позже появился рекомбинантный Chn (rChn) одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*), который превосходит коровий фермент по удельной активности, способствующей свертыванию молока и специфичности [25]. На сегодняшний день официально применяются два генно-инженерных химозина – коровы и одногорбого верблюда, синтезируемые в системах экспрессии *Aspergillus niger* var. *awamori* и *Kluyveromyces lactis*. Генно-инженерные сычужные ферменты коров и верблюдов являются высококачественной альтернативой сычужному ферменту и в настоящее время широко представлены на рынке промышленных молочных коагулянтов [7, 26]. К настоящему времени проведены исследования биохимических свойств rChn парнокопытных и других млекопитающих, полученные в экспрессионных системах микроорганизмов, растений, эукариот и прокариот [4, 8, 12, 15, 21, 27–30].

Верблюжий химозин может быть использован для производства сыра из коровьего [28] и верблюжьего молока [29], и является более многообещающим [2, 4, 28, 29], так как обладает более высокой термостабильностью по сравнению с бычьим

[1]Антонова, Е. И. Генетические конструкции как источник получения рекомбинантного химозина / Е. И. Антонова, А. Н. Аббязова, Н. В. Фирсова [и др.] // Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии: Сборник материалов VII Всероссийской научно-практической конференции. – Чебоксары: ИД «Среда», 2024. – С. 49–55. https://doi.org/10.31483/r-112097; https://elibrary.ru/bboeyl



Источник изображения: freepik.com

химозином и на 70 % с более высокой активностью свертывания молока [4, 6], что делает его привлекательным для коммерческого производства сыра.

Для оценки биохимических свойств молокосвертывающих протеиназ используют: коагуляционную или молокосвертывающую активность, общую протеолитическую активность, специфичность, термостабильность, зависимость молокосвертывающей активности от pH и концентрации ионов кальция. Хорошо известен «парадокс» – Chn коровы не коагулирует верблюжье молоко (или коагулирует, но очень медленно) или Chn коровы не способен коагулировать молоко лошади и одного из представителей инфракласса сумчатых млекопитающих – лисьего кузу (*Trichosurus vulpecula*), намного медленнее свертывает молоко крысы и кролика, чем молоко коровы, козы и северного оленя. Поэтому изучение любого нового молокосвертывающего фермента для перспективы использования в сыроделии начинается с определения его молокосвертывающей активности по отношению к коровьему молоку, которое является основным сырьем для производства сыров.

Протеолитическая активность молокосвертывающего фермента выражается в двух формах. Первая – это специфическая молокосвертывающая активность, равная степени протеолиза в отношении расщепления связи Phe105-Met106 в молекуле каппа-казеина в единицах IMCU (International MilkClotting Units). Вторая – общая протеолитическая активность, равная степени неспецифического протеолиза в отношении расщепления любых пептидных связей в казеинах молока [25]. Критерием, определяющим пригодность молокосвертывающего фермента для свертывания молока в сыроделии, является соотношение его молокосвертывающей активности к общей протеолитической активности. Соотношение выражает долю «полезной» активности фермента, повышение соотношения обеспечивает высокую скорость свертывания молока, повышается выход сыра, устраняются пороки сыра (избыточный протеолиз – горький вкус) и увеличивается срок хранения сыра [5].

Термостабильность – это диапазон температур, при которых молокосвертывающий фермент проявляет высокую (≥ 80 %) молокосвертывающую активность. В результате гидролиза казеинов образуются пептиды и аминокислоты, а также продукты их деградации и биохимической модификации, которые влияют на формирование физико-химических и органолептических показателей сыра. Поэтому данные о термостабильности коагулянта молока позволяют регулировать степень протеолиза и сроки созревания сыров путем варьирования температуры обработки сырного зерна [27]. Верблюжий rChn имеет более высокий порог термоинактивации, чем rChn коровы, а общая протеолитическая активность этих ферментов возрастает при повышении температуры. Пороги полной температурной инактивации для rChn верблюда, синтезированного в системах высших плесневых грибов (*Aspergillus niger*) и дрожжей (*Pichia pastoris*), различаются на 10 °C. Термостабильность известных рекомбинантных химозинов может варьировать в зависимости от метода и условий определения этого технологического параметра, вида источника гена и системы экспрессии, в которой получен молокосвертывающий фермент.

Технология производства большинства сыров – в исходное цельное молоко с pH ≈ 6,7, добавляют концентрат молочнокислых бактерий и инкубируют полученную смесь в течение 30–40 мин при 32–35 °C. Развивающаяся микрофлора закваски приводит к снижению pH молока. Как правило, для получения сгустка фермент вносится в молочную смесь при pH 6,5–6,6. В связи с этим, одним из основных требований к молокосвертывающему ферменту является способность эффективно коагулировать молоко при слабокислом pH.

**Цель работы** – очистка верблюжьего рекомбинантного химозина *Camelus dromedarius*, полученного в экспрессионной системе *Pichia pastoris*, трансформированной челночной плазмидой pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT, с оптимизацией к росту клеточных колоний на различных питательных средах в присутствии различных концентраций зеоцина и анализ ферментативной активности.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для конструирования экспрессионной кассеты использовали вектор pPICZ(alpha)B с промотором AOXI (Invitrogen, США). Ген был синтезирован компанией ООО «Евроген» (Россия). Ген прохимозина был клонирован в вектор pPICZ(alpha)B в сайтах Eco XhoI/XbaI, в результате чего была получена челночная плазмида pPICZ(alpha) B-proCYM_camel_pp_IDT. Кодируемый белок прохимозина несет N-концевой сигнальный пептид *α*-фактора для секреции в культуре дрожжей. Нуклеотидная последовательность гена прохимозина *C. dromedarius* (NP_001290503.1) была получена из базы данных NCBI BLAST. Ген состоит из 9 экзонов и 8 интронов и кодирует белок из 381 аминокислотного остатка. Коммерческий штамм GS115/*his4 P. pastoris* (Invitrogen, США) служил в качестве штамма-продуцента.

**Для наработки плазмидной ДНК** использовали *Escherichia coli* (*E.coli*) штамм *XL1-Blue* (Евроген, Россия). Культуру растили при 37 °C в среде LB (состав, г/л: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5), при необходимости добавляли зеоцин.

**Наработка культуры *P. pastoris*.** Коммерческий штамм GS115/*his4 P. pastoris* культивировали в термошейкере (LabTech, Италия) 48 ч, 30 °C, 200 об/мин в колбе Эрленмейера объемом 2 л на жидкой питательной среде YPD (состав, г/л: пептон – 20; дрожжевой экстракт – 15; глюкоза – 20) в объеме 200 мл. Для достижения оптимального баланса между составом питательных сред и жизнеспособностью штаммов-продуцентов *P. pastoris* моделировали две экспериментальные модели:

- первая группа – наработка культуры *P. pastoris* в «не обогащенной» питательной среде YPD (без дополнительного внесения биотина и глицерина) в присутствии 0,5 % метанола;
- вторая группа – наработка культуры *P. pastoris* в «обогащенной» питательной среде YPD (дополнительное внесения 0,00004 % биотина и 1 % глицерина) в присутствии 0,5 % метанола.

Метанол добавляли к культуре каждые 24 часа. Через 3 дня культивирования культуру центрифугировали при 1800*g* в течение 10 минут на центрифуге Microfuge 22R (Beckman-Coulter, США). Предполагается, что содержание метанола в питательной среде существенно влияет на плотность дрожжевой культуры, который быстро потребляется растущими клетками в качестве источника углерода [12].

**Трансформация клеток *P. pastoris* и получение штамма-продуцента.** Процедуру трансформации GS115/*his4 P. pastoris* методом электропорации проводили согласно руководству EasySelect Pichia Expression Kit (Invitrogen, Россия). Полученные устойчивые к зеоцину колонии *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT инокулировали в 2 мл жидкой среды YPD, а также пересевали на чашки Петри с плотной селективной средой (YPD: 1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона, 2 % декстрозы, 1,5 % агара) с различным содержанием зеоцина – 50, 100 и 200 мкг/мл. Наличие гена подтверждали методом ПЦР с образцами ДНК, выделенными из колоний или суспензии клеток, на термоциклере CFX96 в режиме «реального времени» (BioRad, США). Серии экспериментов проводили в трех повторностях.

Видовую принадлежность полученных колоний клеток проводили с использованием программно-аппаратного комплекса MALDI-TOF времяпролетной масс-спектрометрии серии FLEX (MALDI-TOF MS) с применением панели MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, Германия). Концентрацию плазмидной ДНК (нг/мкл), оптическую плотность (McF/Мак-Фарланда), клеточной массы определяли на спектрофотометре Micro Spectrophotometer Nano-500 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., Китай) при длине волны 260–280 нм.

**Отбор супернатанта для анализа рекомбинантного белка.** На 3 сутки суспензию с трансформированной *P. pastoris* центрифугировали в пробирках объемом 50 мл 5000*g* в течение 10 минут на центрифуге Microfuge 22R, супернатанты оставляли для анализа.

**Выделение и очистка рекомбинантного химозина. Электрофорез в ПААГ и Western-blot.** Электрофорез проводили по Лэммли [31]. Готовили концентрирующий (2,7 мл воды; 0,67 мл акриламидной смеси; 0,5 мл 1М Tris-HCl с pH 6,8; 40 мкл 10 % ДСН; 40 мкл 10 % персульфата аммония; 4 мкл темеда) и разделяющий (2,3 мл воды; 5 мл акриламидной смеси; 2,5 мл 1,5М Tris-HCl с pH 8.8; 100 мкл 10 % ДСН; 100 мкл 10 % персульфата аммония; 4 мкл темеда) гели.

В систему для вертикального электрофореза заливали разделяющий гель, далее наслаивали 200 мкл воды, для выравнивания поверхности геля. После его полимеризации остатки воды убирали и заливали концентрирующий гель. Образцы смешивали 1/1 с 2× буфером для образцов (ДСН – 0,5 г; 1М Tris-HCl с pH 6,8 – 5 мл; глицерин – 2 мл; меркаптоэтанол – 1 мл; вода – 2 мл), нагревали до 95 °C в течение 10 мин.

Электрофорез проводили в буфере TGB при силе тока 18 мА (= 180В). При необходимости гель окрашивали Coomassie Briliant Blue R-250 (Servicebio, Китай). Для фиксации 10 минут инкубировали в растворе, содержащем 10 % уксусной кислоты и 40 % этанола. Затем гель окрашивали 20 минут в растворе, содержащем 4 % Coomassie Briliant Blue R250, 10 % уксусной кислоты и 40 % этанола, далее отмывали в растворе 10 % уксусной кислоты. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили полусухим методом – на смоченный водой анод помещали 8 слоев фильтровальной бумаги, смоченной буфером TGB с 20 % этанолом (буфер для переноса). Сверху помещали смоченную буфером для переноса нитроцеллюлозную мембрану, на которую заливают гель. Затем сверху помещали 8 слоев фильтровальной бумаги, смоченной буфером для переноса. Перенос проводили 40 мин при силе тока 75 мА.

**Выделение рекомбинантных His-Tag – меченных белков на Ni-NTA сефарозе (металл-аффинная хроматография).** Методика выделения основана на руководстве The QIAexpressionist (Qiagen). Для выделения рекомбинантных белков, содержащих His-Tag на Ni-NTA сефарозе, предварительно проводили концентрирование культуральной жидкости на концентраторах Vivaspin 20 (Sartorius Biotech). Затем полученный концентрат разводили в 10 раз буфером для нанесения на колонку (50 mM фосфата натрия с pH 8,0; 300 mM хлорида натрия; 10 mM имидазола). В полученную смесь вносили 2 мл уравновешенной Ni-NTA агарозы (Ni-NTA Agarose 30210, QIAGEN), инкубировали на шейкере 1 ч и наносили на колонку. Колонку промывали буфером для нанесения и промывочным буфером (50 mM фосфата натрия с pH 8,0; 300 mM хлорида натрия; 20 mM имидазола). Целевой белок элюировали элюирующим буфером (50 mM фосфата натрия с pH 8,0; 300 mM хлорида натрия, 250 mM имидазола). Наличие белков проверяли смешиванием с 5 мкл буфера, выходящего из колонки с Bradford solution. Анализировали фракции элюции с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях.

**Измерение оптимального pH субстрата для активности свертывания молока.** Сухое обезжиренное молоко растворяли в 50 mM Tris-HCl буфере (pH 7,0–8,0). Молочные растворы помещали в качестве субстрата в пробирки объемом 2 мл [32]. Максимальная активность фермента определялась как 100 % активность, остальные образцы оценивались на основании этого.

**Определение концентрации белка.** Концентрацию белка в препаратах rChn определяли спектрофотометрически в соответствии с Варбургом и Кристианом[2] на спектрофотометре Micro Spectrophotometer Nano-500 для оптической плотности при длине волны 280 нм.

**Анализ свертываемости молока.** Сухое коровье обезжиренное молоко разводили до 12 % в 0,025 М натриево-ацетатном буфере с pH 6,0 в качестве субстрата. Ферментативные реакции для отбора клонов проводили в трех повторностях при 40 °C в пробирках с 20 мкл раствора фермента и 1 мл субстрата. Сгустки молока визуализировали, переворачивая пробирки вверх дном [35]. Единицу активности свертывания молока (А) определяли, как количество фермента, необходимое для свертывания 1 мл коровьего обезжиренного молока за 40 мин при 40 °C по формуле:

$$A = \frac{V_{milk}}{V_{chymosin}} \times \frac{2400}{T_{mc}},$$

где $V_{milk}$ – объем молока, мл; $V_{chymosin}$ – объем добавленного химозина, мл; $T_{mc}$ – время свертывания молока, с.

**Определение оптимальной температуры для активности свертывания молока.** Активность свертывания молока измеряли в диапазоне температур 35–50 °C в 200 mM натрий-ацетатном буфере (pH 5,0). 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.

**Статистическая обработка** полученных данных проводилась с использованием пакета программного обеспечения Prism 8.0.1 (Graphpad, USA). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Оценка достоверности различий выборок проведена с использованием Т-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

[2]Warburg, O. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase / O. Warburg, W. Christian // Naturwissenschaften. 1941. Vol. 29. P. 589–590. https://doi.org/10.1007/BF01482279

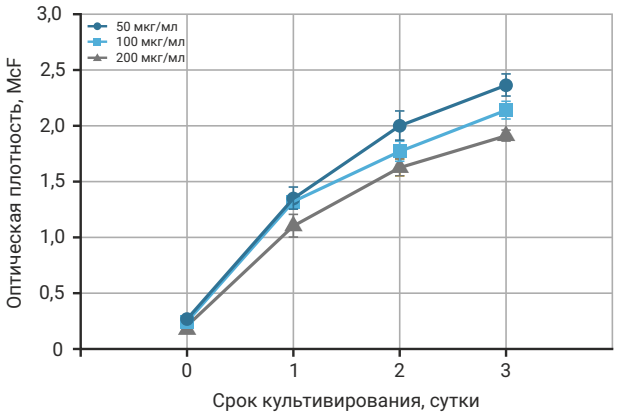
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Наработка культуры *P. pastoris*.** Коммерческий штамм GS115/*his4 P. pastoris* (чистая линия, которая служила контролем) культивировали в двух пробирках в объеме 10 мл жидкой питательной среды YPD (dd $H_2O$ – 200 мл, бульон LB по Miller (Диаэм, Россия) – 40 г/л, дрожжевой экстракт тип Б – 1 г, пептон (Диаэм, Россия) – 2 г). В первой пробирке к питательной среде добавляли 0,5 % метанола, во второй – клетки росли без метанола. Обе модели эксперимента культивировали в термошейкере 30 °C, 200 об/мин с дополнительным внесением в первую модель через 24 часа 0,5 % метанола в течение 4 суток. Отмечено, что показатель оптической плотности культур, которые росли на среде без добавления метанола, за первые сутки культивирования увеличился в 6 раз, ко вторым суткам – на 13 %, к третьим – на 40 %, к четвертым – на 6 %. Показатель оптической плотности культуры клеток, которые росли на среде с добавлением метанола, за первые сутки культивирования увеличился в 14 раз, ко вторым суткам – на 33 %, к третьим – на 18 %, к четвертым – на 6 %. Дисперсионный анализ выявил достоверно значимое влияние метанола как фактора на вариабельность оптической плотности ($F$ = 27,98, $p$ < 0,0001). Штамм *P. pastoris* GS115/*his4*, который мы используем в работе, признан как $Mut^+$-фенотип утилизации метанола [34], и клеточная линия с дополнительным внесением метанола показала более высокие значения плотности культуры, используя метанол в качестве источника углерода.

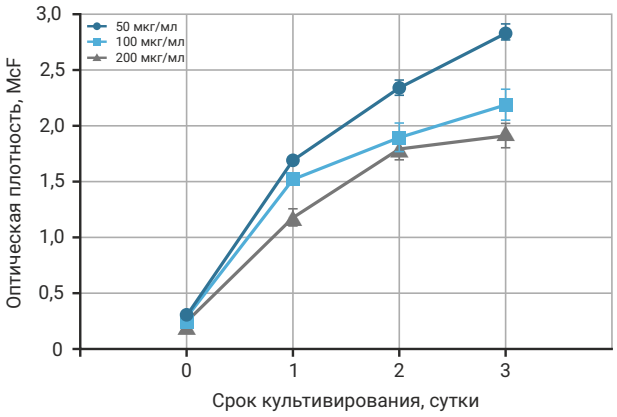
**Трансформация клеток *P. pastoris* и получение штамма-продуцента.** Процедуру трансформации GS115/*his4 P. pastoris* двух экспериментальных моделей методом электропорации проводили согласно руководству EasySelect Pichia Expression Kit. Эффективность трансформации контролировали методом Real-time ПЦР с колоний. Далее *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT колонии инокулировали по 200 мкл суспензии клеток в чашки Петри со средами, содержащими зеоцин (500–2000 мкг/мл): первая среда YPD, «не обогащенная» глицерином и биотином, и вторая YPD, «обогащенная» 0,00004 % биотином и 1 % глицерином. Колонии, выращенные в двух экспериментальных моделях, были отобраны и подвергнуты скринингу на плотной и жидкой селективной среде (YPD: 1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона, 2 % декстрозы, 1,5 % агара) с зеоцином в концентрациях 50, 100 и 200 мкг/мл, в качестве антибиотика, для отбора трансформированных клеток под контролем промотора pAOX1. Культивировали колонии клеток в течение трех суток.

В ходе исследования в сравнительном аспекте выявлено (рис. 1), что оптическая плотность клеточной культуры трансформированного штамма *P. pastoris*, выращенной на «не обогащенной» среде с 50 мкг/мл зеоцина (группа 1), увеличивается в 8,2 раза ($p$ = 0,0011), тогда как на «обогащенной» среде (группа 4) – в 9,1 раз ($p$ = 0,00004). Таким образом, оптическая плотность на третьи сутки культивирования составляет в первой группе 2,37 ± 0,09 McF, в четвертой 2,85 ± 0,07 McF, что на 20 % выше относительно группы 1 ($p$ = 0,03).

Оптическая плотность клеточной культуры, выращенной на «не обогащенной» среде с 100 мкг/мл зеоцина (группа 2), увеличивается в 6,8 раз ($p$ = 0,0005), что составляет 2,147 ± 0,08 McF. Оптическая плотность клеточной культуры, выращенной на «обогащенной» среде (группа 5) увеличилась в 7,2 раз ($p$ = 0,00006) и составляет 2,2 ± 0,14 McF. Статистически значимых различий между второй и пятой группой не выявлено.




а




б

Рисунок 1. Оптическая плотность клеточной культуры трансформированного штамма *P. pastoris* при разных концентрациях зеоцина с ежедневным добавлением метанола: а) «не обогащенная» среда; б) «обогащенная» среда

Оптическая плотность клеточной культуры, выращенной на «не обогащенной» среде на третьи сутки с 200 мкг/мл зеоцина (группа 3), составляет 1,924 ± 0,037 McF и увеличивается в 5,9 раз ($p$ = 0,0005). Оптическая плотность клеточной культуры, выращенной на «обогащенной» среде (группа 6) увеличилась в 6,1 раз ($p$ = 0,00006) и составляет 2,027 ± 0,06 McF. Статистически значимых различий не выявлено.

Таким образом, с целью увеличения наращивания биомассы трансформированного штамма GS115/*his4 P. pastoris* целесообразно использовать «обогащенную» среду с концентрацией зеоцина 50 мкг/мл.

Трансформированные *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT более динамично наращивают плотность биомассы при культивировании на «обогащенной» среде, особенно в первые сутки после посева, вне зависимости от концентрации зеоцина. В то же время необходимо отметить, что нами выявлена разнонаправленная динамика прироста клеточной массы на твердой и жидкой селективной среде. Так, в частности, при культивировании на твердой селективной среде с разной концентрацией зеоцина хорошо видна разница в количестве колоний – чем больше концентрация зеоцина, тем меньше колоний. Тогда как в жидкой селективной среде такой закономерности не выявлено.

После выделения и очистки рекомбинантных His-Tag – меченных рекомбинантных белков химозина *C. dromedarius* (rChn-Cam) на Ni-NTA сефарозе (металлаффинная хроматография) в полиакриламидном геле (ПААГ) стало возможным сконцентрировать рекомбинантный rChn-Cam и выявить его наличие в сравнении с контрольным образцом (рис. 2а). Наличие rChn-Cam также было подтверждено по массе на MALDI-TOF времяпролетном масс-спектрометре серии FLEX (MALDI-TOF MS) с применением панели MALDI BioTyper (рис. 2б).

**Зависимость активности свертывания молока от pH.** Как известно, оптимум молокосвертывающей активности лежит в кислом диапазоне pH. Реакция исследуемых ферментов на повышение pH субстрата была различной (рис. 3а, 4). Так, при повышении pH с 5,0 до 6,5 коагуляционная активность rChn-Cam снижалась на 24 % во всех исследуемых группах. С точки зрения технологии производства сыра это означает, что при том же общем МА при pH = 5,0 (pH молока, в которое был добавлен коагулянт) расход на rChn-Cam для свертывания единицы объема молока будет максимальным. Что соотносится с литературными данным по молокосвертывающей активности для рекомбинантного химозина *C. dromedarius*, экспрессируемого в дрожжах *P. pastoris* [2, 4]. С повышением pH молокосвертывающая активности уменьшалась (рис. 3а, 4). При pH 6,5 отмечено снижение во всех группах. При более низких значениях pH во всех группах коагуляции не наблюдалось. Эти данные показали, что верблюжий химозин, как и другие химозины, обладает максимальной активностью в кислых условиях. Эти данные подразумевают, что на активность химозина влияют такие факторы, как происхождение фермента, система экспрессии и степень его очистки. Таким образом динамика зависимости молокосвертывающей активности от различных значений pH

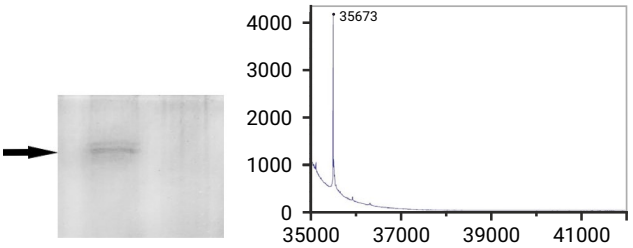
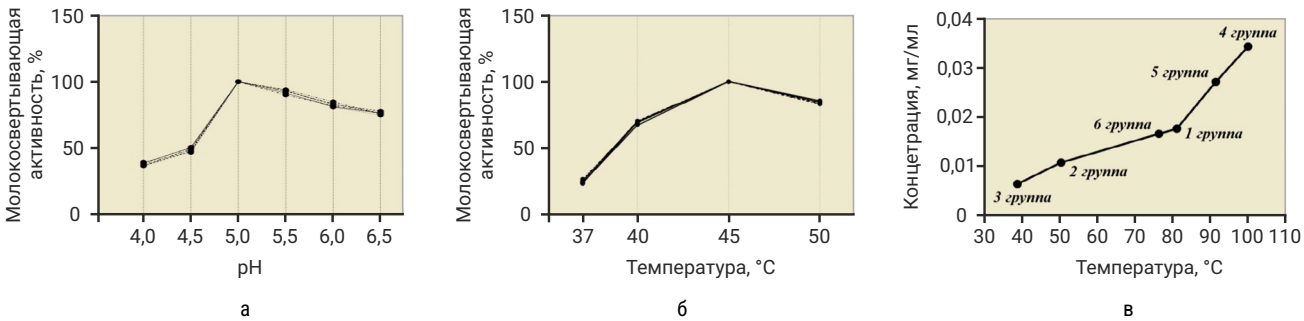



Рисунок 2. Очистка рекомбинантного химозина *C. dromedarius* в полиакриламидном геле – а; масса рекомбинантного химозина *C. dromedarius* на MALDI-TOF времяпролетном масс-спектрометре серии FLEX (MALDI-TOF MS) с применением панели MALDI BioTyper – б




а б в

Рисунок 3. Молокосвертывающая активность рекомбинантного химозина *C. dromedarius*: а) в пересчете на продолжительность свертывания при различных значениях pH (4,0–6,5) молочного субстрата; б) в отношении свертывания молока при различных температурах субстрата (37–50 °C); в) в зависимости от концентрации рекомбинантного химозина *C. dromedarius*

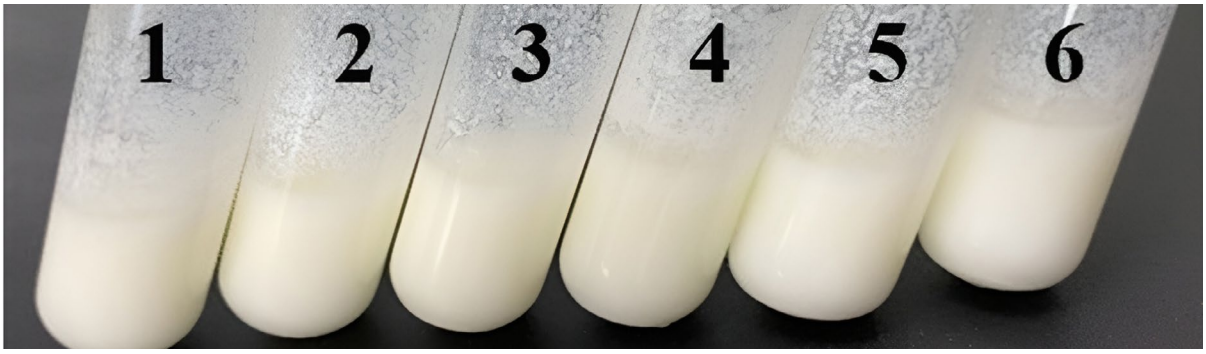



Рисунок 4. Молокосвертывающая активность рекомбинантного химозина *C. dromedarius*. Коагулированный субстрат различных групп двух экспериментальных моделей

была схожей во всех группах двух экспериментальных моделей. Максимальная активность фермента в каждой экспериментальной группе определялась как 100 %, и на основе этого оценивались другие образцы. Тесты проводились в 3 повторениях.

**Термостабильность.** На активность рекомбинантного химозина, который способствует свертыванию молока, влияет температура.

Зависимость молокосвертывающей активности rChn-Cam от температуры субстрата имеет характерную особенность: активность постепенно увеличивается в диапазоне 37–45 °C. Нами отмечено, что при 37 °C свертывание не отмечается, при 40 °C увеличивается на 55 %. Разница между молокосвертывающей активностью при температуре 40 и 45 °C составляет 30 %, при температуре 45 и 50 °C – 15 % (рис. 3б). Далее снижается. Таким образом, в нашем исследовании оптимальная температура для свертывания субстрата находится в диапазоне 40–45 °C. При более высоких и низких температурах активность rChn-Cam в коровьем молоке снижается. Различные значения оптимальной температуры для коровьего молока мы связываем с различными механизмами действия верблюжьего химозина. В коровьем молоке основным субстратом для химозина является *κ*-CN, который обеспечивает стабильность мицелл *κ*-CN.

Максимальный уровень молоксвертывающей активности среди всех проанализированных экспериментальных групп принимали за 100 %. Выявлена прямая зависимость этого показателя от концентрации белка (рис. 3в, 4). Так, в четвертой группе с самой высокой концентрацией белка, обнаружен и самый высокий показатель единицы активности свертывания молока (А = 0,4), значение данной группы принято за 100 %. В пятой группе также прослеживается зависимость высокого содержания белка и высокой единицы активности свертывания составляет 91,5 % (А = 0,37) относительно максимального значения. Во второй и третьей группе, с самой низкой концентрацией белка, отмечается обратная тенденция — молокосвертывающая активность составляет всего 50,75 (А = 0,20) и 39,25 % (А = 0,15), соответственно. Таким образом нами выявлено, что единица активности свертываемости rChn-Cam в клеточных культурах трансформированного штамма *P. pastoris* при выращивании на различных средах проявляет одинаковую тенденцию в зависимости от концентрации зеоцина – единица активности фермента снижается при увеличении концентрации зеоцина.

С другой стороны (рис. 5), выявлена противоположная зависимость показателей концентрации rChn-Cam от времени начала свертывания субстрата. Наиболее ярко эта зависимость проявляется в третьей группе, в которой самый низкий показатель концентрации белка (0,007 ± 0,002 мг/мл), и, соответственно, максимальный показатель времени начала свертывания (305,3 ± 5,03 с). Обратная, но также наиболее ярко выраженная, зависимость выявлена в четвер-

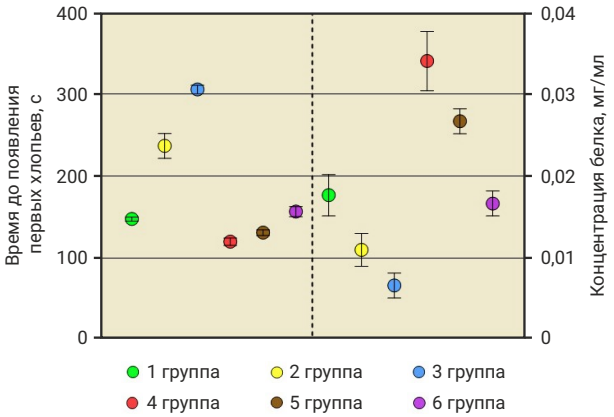
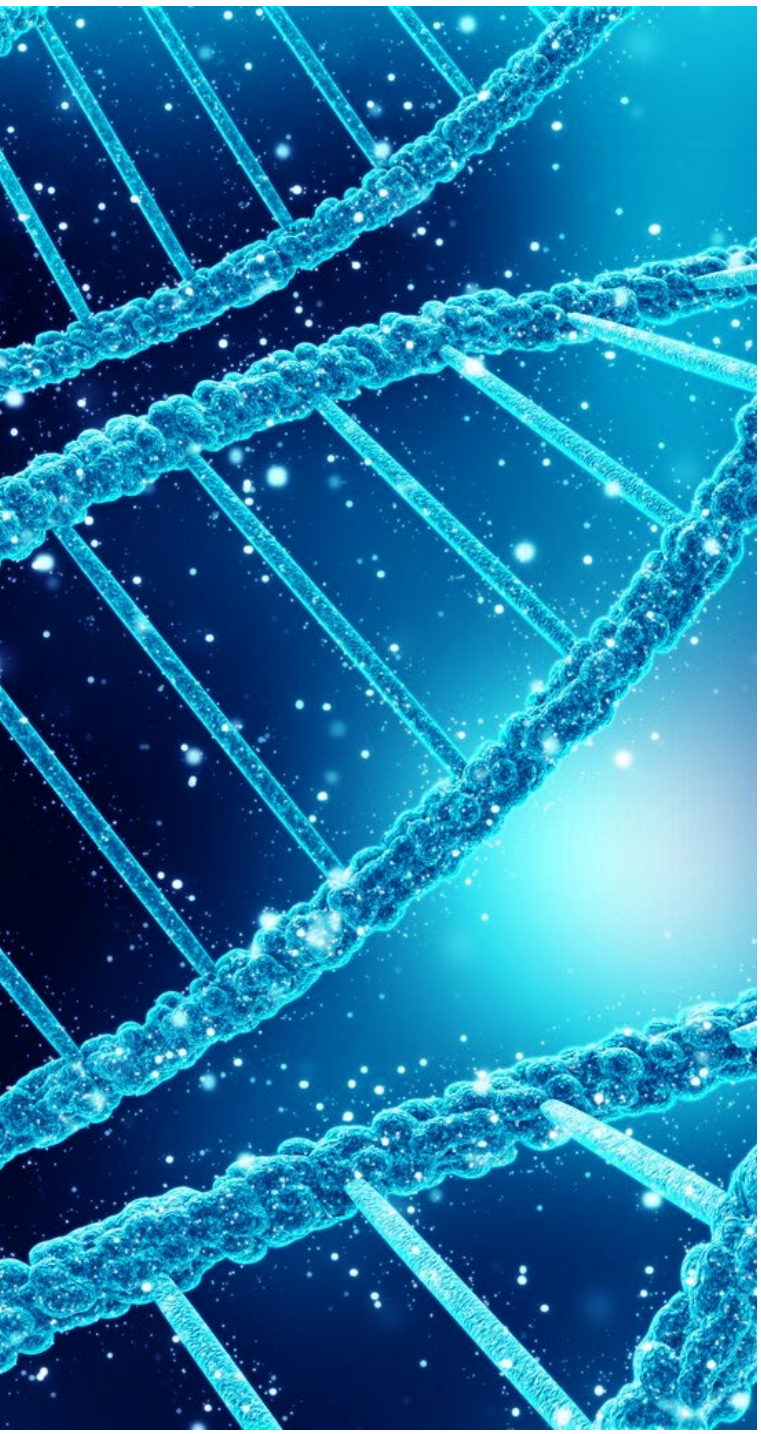



Рисунок 5. Корреляция концентрации рекомбинантного химозина *C. dromedarius* и времени начала свертывания субстрата в разных группах двух экспериментальных моделей

той группе, в данной группе самый высокий показатель концентрации rChn-Cam (0,034 ± 0,004 мг/мл) наряду с самым низким значением времени начала свертывания субстрата (120,0 ± 4,4 с). Во второй и пятой группе выявлена схожая динамика с третьей и четвертой, соответственно. В первой и шестой группе отмечаются схожие показатели концентрации rChn-Cam и времени свертывания субстрата: 1 группа – 0,018 ± 0,003 мг/мл, 147,7 ± 2,52 с; 6 группа – 0,017 ± 0,002 мг/мл, 156,7 ± 6,11 с.



Источник изображения: freepik.com

## ВЫВОДЫ

Таким образом, нами успешно разработана челночная экспрессионная плазмида pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT, которая включала в себя вектор pPICZ(alpha)B с промотором AOXI, ген прохимозина *C. dromedarius*.

Наращивание клеточной массы штамма-продуцента *P. pastoris* GS115/*his4* целесообразнее проводить с предварительным внесением 0,5 % метанола в качестве источника углерода для активации метаболического пути MUT (methanol utilization) и фермента алкогольоксидаза (AOX, КФ 1.1.3.13). Так как в целом штамм GS115/*his4* относится к фенотипу $Mut^+$, который характеризуется высоким темпом роста и более высокой производительностью, то существует необходимость дополнительного внесения метанола.

С позиции анализа экспрессионной кассеты Chn в системе экспрессии *P. pastoris*, по достижению оптимального баланса между составом питательных сред и жизнеспособностью штаммов-продуцентов на основе источника углерода и устойчивости к зеоцину, после трансформации *P. pastoris* GS115/*his4* и получения штамма-продуцента *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT, выявлена сопряженность между скоростью прироста клеточной массы и концентрациями зеоцина в среде YPD («не обогащенная» глицерином и биотином) и YPD («обогащенная», биотин 0,00004 % и 1 % глицерина). По результатам наших исследований, штамм-продуцент *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT целесообразно выращивать в «обогащенной» среде с концентрацией зеоцина 50 мкг/мл.

В то же время трансформированные *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT более динамично наращивают плотность биомассы при культивировании на «обогащенной» среде, особенно в первые сутки после посева, вне зависимости от концентрации зеоцина. При культивировании на твердой селективной среде с разной концентрацией зеоцина хорошо видна разница в количестве колоний – чем больше концентрация зеоцина, тем меньше колоний. Тогда как в жидкой селективной среде такой закономерности не выявлено.

После выделения рекомбинантных His-Tag – меченных белков на Ni-NTA сефарозе (металл-аффинная хроматография) масса rChn-Cam по результатам исследований на MALDI-TOF времяпролетном масс-спектрометре серии FLEX (MALDI-TOF MS) с применением панели MALDI BioTyper, составила 35,673кДа.

В шести экспериментальных группах при повышении pH субстрата с 5,0 до 6,5 коагуляционная активность rChn-Cam снижалась на 24 %.

Порог термической инактивации rChn-Cam составил 40–45 °C. После нагревания при 50 °C молокосвертывающая активность фермента снижается.

Единица активности свертываемости rChn-Cam в клеточных культурах трансформированного штамма *P. pastoris* GS115/*his4* при выращивании на различных средах проявляет одинаковую тенденцию в зависимости от концентрации зеоцина – единица активности фермента снижается при увеличении концентрации зеоцина.

Выявлена противоположная зависимость показателей концентрации rChn-Cam от времени начала свертывания субстрата. Наиболее ярко эта зависимость проявляется в третьей группе (клеточные культуры, выращенные на «не обогащенной» среде с концентрацией зеоцина 200 мкг/мл) с самым низким показателем концентрации белка и наибольшим показателем времени начала появления первых хлопьев. Обратная, но также наиболее ярко выраженная, зависимость выявлена в четвертой группе (клеточные культуры, выращенные на «обогащенной» среде с концентрацией зеоцина 50 мкг/мл).

Наше исследование по оптимизации состава питательной среды на фоне различных концентраций зеоцина позволило выявить условия для производства rChn-Cam под контролем конститутивного промотора AOXI в экспрессионной системе *P. pastoris* GS115/*his4*, который является хорошей альтернативой rChn, которые в настоящее время используются в промышленности по производству сыров. ■

## RECOMBINANT CHYMOSIN OF CAMELUS DROMEDARIUS IN PICHIA PASTORIS EXPRESSION SYSTEM: PURIFICATION AND ENZYMATIC PROFILE

**Elena I. Antonova, Natalia V. Firsova, Natalia A. Lengesova, Denis A. Victorov, Atabeg B. Achilo, Pavel S. Torutanov**
Research Centre for Fundamental and Applied Bioecology and Biotechnology, Ulyanov State Pedagogical University, Ulyanovsk

ORIGINAL ARTICLE

Natural chymosin production is an expensive and complex process associated with ethical issues. The article introduces recombinant chymosin *Camelus dromedarius* (rChn-Cam) isolated from a *P. pastoris* expression system and optimized for different nutrient media at different zeocin concentrations. The sequence of prochymosin gene was obtained from NCBI BLAST. GS115/*his4 P.rastoris* served as a producer strain. The pPICZ(alpha) B vector with the AOXI promoter made it possible to construct the expression cassette. The experiment involved methods of genetical engineering and strain cultivation. The recombinant His-Tag-labelled proteins were isolated by the method of metal-affinity chromatography and analyzed using PAG electrophoresis and Western-blot analysis. The molecular weight was determined by MALDI-TOF MS while the concentration was defined spectrophotometrically. The shuttle expression plasmid pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT revealed that the cell mass expansion of *P. pastoris* GS115/*his4* ($Mut^+$) should be performed with a preliminary introduction of 0.5% methanol. After the transformation of *P. pastoris* GS115/*his4* and obtaining a strain-producer of *P. pastoris*/pPICZ(alpha)B/proCYM_camel_pp_IDT, the rate of cell mass gain started to correlate with the zeocin concentrations in two different media. Medium YPD was not fornified and contained 50, 100, and 200 µg/mL zeocin. MediumYPD was fortified with 0.00004% biotin and 1% glycerol and included 50, 100, and 200 µg/mL zeocin. The strain-producer grew better in the medium with a zeocin concentration of 50 µg/mL. The mass of rChn-Cam was 35.673 kDa after isolation and purification. When the pH of the substrate rose from 5.0 to 6.5, the coagulation activity decreased by 24%. The thermal inactivation threshold of rChn-Cam was 40–45°C. The unit of coagulation activity decreased as the zeocin concentration went up. The rChn-Cam concentration was in inverse correlation with the substrate coagulation time. In this research, the rChn-Cam obtained in the expression system of *P. prastoris* proved to be a good alternative to rChn used in the cheese industry.

**Keywords**: genetic construct, recombinant chymosin, *Camelus dromedarius*, vector, plasmid, yeast *Pichia pastoris*, milk-setting activity, thermostability, chymosin purification

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Foltmann, B.** Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin) / B. Foltmann // Biochemical Journal. 1969. № 115. P. 3–4. https://doi.org/10.1042/bj1150003p
2. **Wang, N.** Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris* / N. Wang [et al.] // Protein Expression and Purification. 2015. № 111. P. 75–81. https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.03.012
3. **Uniacke-Lowe, T.** Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: Structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties // Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology / T. Uniacke-Lowe, P. F. Fox. – UK: Academic Press, 2017. – P. 69–113. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1
4. **Akishev, Z.** Obtaining of recombinant camel chymosin and testing its milk-clotting activity on cow's, goat's, ewes', camel's and mare's milk / Z. Akishev, S. Aktayeva, A. Kiribayeva // Biology. 2022. № 11. e1545. https://10.3390/biology11111545
5. **Мягконосов, Д. С.** Протеолитическая активность молокосвертывающих ферментов разного происхождения / Д. С. Мягконосов, Д. В. Абрамов, И. Н. Делицкая, Е. Г. Овчинникова // Пищевые системы. 2022. Т. 5, № 1. С. 47–54. https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54; https://elibrary.ru/fkaojb
6. **Akishev, Zh.** Milk-clotting activity of recombinant bovine and camel chymosin for cow's, goat's and ewes' milk / Zh. Akishev [et al.] // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. 2023. № 2. P. 61–68. https://doi.org/10.11134/btp.2.2023.8; https://elibrary.ru/ukhqoj

7. **Balabova, D. V.** Biochemical properties of a promising milk-clotting enzyme, Moose (*Alces alces*) recombinant chymosin / D. V. Balabova [et al.] // Foods. 2023. Vol. 12. № 20. e3772. https://doi.org/10.3390/foods12203772
8. **Мурашкин, Д. Е.** Анализ некоторых биохимических свойств рекомбинантного химозина сибирской косули (*Capreolus pygargus*), полученного в культуре клеток млекопитающих (CHO-K1) / Д. Е. Мурашкин, С. В. Беленькая, А. А. Бондарь [и др.] // Биохимия. 2023. Т. 88. Вып. 9. С. 1556–1569. https://doi.org/10.31857/S0320972523090087; https://elibrary.ru/wwnnwk
9. **Gilliland, G. L.** The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution / G. L. Gilliland [et al.] // Proteins. 1990. № 8. P. 82–101. https://doi.org/10.1002/prot.340080110
10. **Holt, C.** Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods // C. Holt [et al.] // Journal of Dairy Science. 2013. № 96. P. 6127–6146. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6831
11. **Lopes-Marques, M.** Unusual loss of chymosin in mammalian lineages parallels neo-natal immune transfer strategies / M. Lopes-Marques, R. Ruivo, E. Fonseca // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2017. № 116. P. 78–86. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.08.014
12. **Akishev, Z.** Constitutive expression of Camelus bactrianus prochymosin B in *Pichia pastoris* / Z. Akishev [et al.] // Heliyon. 2021. Vol. 7(5). e07137. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07137
13. **Flamm, E. L.** How FDA approved chymosin: A case history / E. L. Flamm // BioTechnology. 1991. № 9. P. 349–351. https://doi.org/10.1038/nbt0491-349
14. **Johnson, M. E.** A 100-Year Review: Cheese production and quality / M. E. Johnson // Journal of Dairy Science. 2017. № 100. P. 9952–9965. https://doi.org/10.3168/jds.2017-12979
15. **Balabova, D. V.** Biochemical and technological properties of moose (*Alces alces*) recombinant chymosin / D. V. Balabova, A. P. Rudometov, S. V. Belenkaya // Journal of Genetics and Breeding. 2022. Vol. 26, № 3. P. 240–249. https://doi.org/10.18699/VJGB-22-31; https://elibrary.ru/wnatqw
16. **da Silva, R. R.** Evaluation of the milk clotting properties of an aspartic peptidase secreted by *Rhizopus microspores* // R. R. da Silva [et al.] // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2020.Vol. 50(3). P. 226-233. https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1683861
17. **Bansal, N.** Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese / N. Bansal [et al.] // International Dairy Journal. 2009. Vol. 19 (9). P. 510–517. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.010
18. **Moynihan, A. C.** Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese / A. C. Moynihan // Journal of Dairy Science. 2014. Vol. 97(1). P. 85–96. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7081
19. **González-Velázquez, D. A.** Exploring the milk-clotting and proteolytic activities in different tissues of Vallesia glabra: a new source of plant proteolytic enzymes / D. A. González-Velázquez [et al.] // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2021. Vol. 193. P. 389–404. https://doi.org/10.1007/s12010-020-03432-5
20. **Sbhatu, D. B.** Ficus palmata FORSKÅL (BELES ADGI) as a source of milk clotting agent: a preliminary research / D. B. Sbhatu, H. T. Tekle, K. H. Tesfamariam // BMC Research Notes. 2020. Vol. 13. P. 446. https://doi.org/10.1186/s13104-020-05293-x
21. **Беленькая, С. В.** Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis* / С. В. Беленькая, В. В. Ельчанинов, Д. Н. Щербаков // Биотехнология. 2021. Т. 37, № 5. С. 20–27. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-20-27; https://elibrary.ru/qzyxec
22. **Синицын, А. П.** Получение промышленно важных ферментов на основе экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum* / А. П. Синицын, О. А. Синицына, А. М. Рожкова // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 6. С. 17–34. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-17-34; https://elibrary.ru/qyxxah
23. **Baghban, R.** Yeast expression systems: overview and recent advances / R. Baghban [et al.] // Molecular Biotechnology. 2019. Vol. 61(5). P. 365–384. https://doi.org/10.1007/s12033-019-00164-8
24. **Patra, P.** Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts / P. Patra [et al.] // Biotechnology Advances. 2021. № 47. e107695. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107695
25. **Jensen, J. L.** Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties / J. L. Jensen [et al.] // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2013. Vol. 69. P. 901–913. https://doi.org/10.1107/S0907444913003260
26. **Fox, P. F.** Enzymatic coagulation of milk // Fundamentals of Cheese Science / P. F. Fox [et al.]. New York: Springer, 2017. – P. 185–229. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_7
27. **Беленькая, С. В.** Основные биохимические свойства рекомбинантных химозинов (обзор) / С. В. Беленькая, Д. В. Балабова, А. Н. Белов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56, № 4. С. 315–326. https://doi.org/10.31857/S0555109920040030; https://elibrary.ru/ahzlih
28. **Gumus, P.** Effects of blends of camel and calf chymosin on proteolysis, residual coagulant activity, microstructure, and sensory characteristics of *Beyaz peynir* / P. Gumus, A. A. Hayaloglu // Journal of Dairy Science. 2019. Vol. 102(7). P. 5945–5956. https://doi.org/10.3168/jds.2018-15671
29. **Al-Zoreky, N. S.** Using recombinant camel chymosin to make white soft cheese from camel milk // N. S. Al-Zoreky, F. S. Almathen // Food Chemistry. 2021. № 337. e127994. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127994
30. **Беленькая, С. В.** Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis* / С. В. Беленькая, В. В. Ельчанинов, Д. Н. Щербаков // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 5. С. 20–27. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-20-27; https://elibrary.ru/qzyxec
31. **Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. 1970. Vol. 227(5259). P. 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0
32. **Рудометов, А. П.** Исследование ферментативной стабильности жидких препаратов рекомбинантного химозина коровы (*Bos taurus taurus L.*) / А. П. Рудометов, С. В. Беленькая, Д. Н. Щербаков [et al.] // Сыроделие и маслоделие. 2017. № 6. С. 40–43. https:// elibrary.ru/zudmcr
33. **Ageitos, J. M.** Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13 / J. M. Ageitos [et al.] // Journal of Applied Microbiology. 2007. № 103(6). P. 2205–2213. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03460.x
34. **Malik, A.** A review on Pichia pastoris: A successful tool for expression of recombinant proteins / A. Malik, A. Gupta, S. Dahiya [et al.] // The Pharma Innovation Journal. 2021. Vol. 10(11). P. 550–556.