Владимир Александрович Пушкарев,[1,2] младший научный сотрудник, аспирант
Ольга Николаевна Мусина,[1,2] д-р техн. наук, главный научный сотрудник, доцент
Светлана Валерьевна Беленькая,[3,4] канд. биол. наук, научный сотрудник
Дмитрий Николаевич Щербаков,[3,4] канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник
Анатолий Дмитриевич Коваль,[1] канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник
Александр Николаевич Белов,[1] канд. техн. наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник
Вадим Валентинович Ельчанинов,[1] канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник
[1]**Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия,** Барнаул
[2]**Алтайский государственный технический университет им. И.И.Ползунова,** Барнаул
[3]**Алтайский государственный университет,** Барнаул
[4]**Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,** Новосибирская область, п. Кольцово

УДК 637.334.2:577.151.6
DOI: 10.31515/2073-4018-2023-1-22-25

Молокосвертывающая и общая протеолитическая активность инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*)

Изучена молокосвертывающая и общая протеолитическая активность инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (Rangifer tarandus) с точечной аминокислотной заменой Lys53→Glu. В качестве ферментов сравнения использовали коммерческие рекомбинантные химозины коровы и одногорбого верблюда. Показано, что общая протеолитическая активность инженерного варианта химозина северного оленя на 36 % ниже, чем у рекомбинантного химозина коровы. Инженерный вариант рекомбинантного химозина северного оленя отличался крайне низкой удельной молокосвертывающей активностью, что приводило к снижению его специфичности по сравнению с рекомбинантными химозинами коровы и верблюда в 2,4 и 9,8 раза соответственно.

Ключевые слова: *северный олень, химозин, рекомбинантный химозин, молокосвертывающая активность, протеолитическая активность, сыроделие.*

Pushkarev V.A.[1,2], Musina O.N.[1,2], Belenkaya S.V.[3,4], Shcherbakov D.N.[3,4], Koval A.D.[1], Belov A.N.[1], Elchaninov V.V.[1] Milk-clotting activity and general proteolytic activity of an engineered variant of recombinant reindeer chymosin (Rangifer tarandus)
[1]Federal Altai Scientific Centre of Agro-Bio Technologies, Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul
[2]Polzunov Altai State Technical University , Barnaul
[3]Altai State University, Barnaul
[4]State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Novosibirsk region, Koltsovo

The milk-clotting and general proteolytic activity of an engineered variant of recombinant reindeer chymosin (Rangifer tarandus) with a point amino acid replacement Lys53→Glu was studied. Commercial recombinant cow and single-humped camel chymosins were used as comparison enzymes. It is shown that the total proteolytic activity of the engineered variant of reindeer chymosin is 36 % lower than that of recombinant cow chymosin. The engineered version of recombinant reindeer chymosin was characterized by extremely low relative milk-clotting activity, which led to a decrease in its specificity, compared with recombinant cow and camel chymosins by 2,4 and 9,8 times respectively.

Key words: *reindeer, chymosin, recombinant chymosin, milk-clotting activity, proteolytic activity, cheesemaking.*

Для получения сычужного сгустка в сыроделии широко применяется молокосвертывающий фермент химозин (КФ 3.4.23.4). Химозин (Хн) с высокой специфичностью гидролизует связь F105-M106 в молекуле каппа-казеина (к-КЗ). Гидролиз связи 105–106 дестабилизирует казеиновые мицеллы, что приводит к образованию молочного сгустка.

Длительное время Хн коровы (*Bos taurus*) считался эталонным или универсальным ферментом для сыроделия [1]. Универсальность Хн коровы заключается в том, что он может применяться для выработки любых видов сычужных сыров самого высокого качества.

В 2006 г. был получен рекомбинантный химозин (рХн) одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*), который по удельной молокосвертывающей активности (МА) и специфичности — соотношению МА и общей протеолитической активности (ПА) — превосходит рХн коровы, но уступает ему по термостабильности [2]. Рекомбинантный Хн верблюда внедрен в практику сыроделия и наряду с рХн коровы успешно используется в промышленности. Фактически на сегодняшний день можно говорить о существовании двух универсальных молокосвертывающих ферментов (МФ) для сыроделия — рХн коровы и рХн одногорбого верблюда. Получение рХн одногорбого верблюда и установление факта его частичного превосходства над рХн коровы позволяет предполагать, что в природе существуют другие ферменты, еще более совершенные с технологической точки зрения. Отсюда следует актуальность получения и исследования новых рХн различных видов млекопитающих, в том числе не состоящих в тесном филогенетическом родстве с коровой или верблюдом.

В 2006 г. было показано, что общая ПА натурального МФ из сычугов северного оленя (*Rangifer tarandus*) примерно в 4 раза ниже, чем у препарата высококачественного говяжьего сычужного фермента, что с точки зрения сыроделия является важным технологическим преимуществом [3]. В то же время производство натурального МФ из сычугов северных оленей считается нецелесообразным в силу ограниченной сырьевой базы, а также существования проблем экономического и логистического

характера [4]. Получение генно-инженерного аналога Хн северного оленя с использованием современных биотехнологических методов снимает проблему сырьевой базы, а разработка высокоэффективных эукариотических продуцентов целевого фермента может сделать его производство высокорентабельным. Осуществление таких научных разработок в РФ имеет очевидную практическую значимость, поскольку связано с перспективой получения отечественного универсального генно-инженерного коагулянта молока для сыроделия и преодоления зависимости от импортных препаратов рХн.

В 2021 г. специалистами ГНЦ ВБ «Вектор» получен инженерный вариант рХн *R. tarandus* с точечной аминокислотной (а. к.) заменой Lys→Glu в положении 53 (рХн-Rta(K53E)). Замена Lys, несущего катионную R-группу, на отрицательно заряженный остаток Glu базировалась на предположении о влиянии характеристик поверхностного заряда на участке 48–63 [5] на свойства Хн. Для наработки фермента использовали систему экспрессии *Escherichia coli* (штамм SHaffle Express).

Цель данного исследования — определение МА и общей ПА инженерного варианта рХн северного оленя и сравнение полученных результатов с показателями рХн натурального МФ *R. tarandus* (по литературным данным) и коммерческих генно-инженерных коагулянтов молока.

Молокосвертывающая активность. Водный раствор (0,5 %) коммерческого рХн коровы «CHY-MAX® Powder Extra» (Chr. Hansen, Дания) с заявленной активностью 2203 IMCU/г применяли в качестве стандарта (для перевода IMCU в условные единицы (УЕ) использовали повышающий коэффициент 125). Субстратом служило сборное непастеризованное молоко, в которое вносили NaN_3 до 0,02 %, pH доводили до 6,5.

Для определения МА 2,5 мл субстрата прогревали на водяной бане при 35 °С в течение 10 мин, вносили 0,2 мл исследуемого рХн и регистрировали время образования первых хлопьев коагулята. Общую МА жидких препаратов рХн рассчитывали по формуле и выражали в условных единицах на миллилитр (УЕ/мл).

$$MA = \frac{MA_{St}}{200} \bullet \frac{T_1}{T_2},$$

где MA_{St} — заявленная МА стандарта в условных единицах (УЕ/г); 200 — фактор разведения (мл/г); T_1 — время (с) свертывания субстрата стандартом; T_2 — время (с) свертывания субстрата раствором исследуемого фермента.

Удельную МА (УЕ/мг белка) препарата рХн рассчитывали после определения в них концентрации белка по методу Брэдфорда [6].

Общая протеолитическая активность и специфичность. В качестве субстрата использовали 1,0 % раствор казеина по Гаммерстену в 20 mM Na-фосфатном буфере, pH 5,65. Аликвоты субстрата (2,0 мл) помещали в водяную баню (35 °С), прогревали в течение 15 мин и добавляли к ним 0,5 мл раствора исследуемого рХн. Фермент-субстратные смеси перемешивали и отмечали время начала инкубации. Через 30, 90 и 180 мин инкубации реакцию протеолиза останавливали, добавляя к фермент-субстратным смесям 2,5 мл 5 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Содержимое каждой пробирки тщательно перемешивали, оставляли на 30 мин при комнатной температуре и фильтровали через бумажный фильтр («белая лента»). В прозрачном фильтрате определяли оптическую плотность при длине волны 280 нм (D_{280}). В качестве контроля использовали препарат, компоненты фермент-субстратной смеси которого вносили непосредственно в 5 % ТХУ и также фильтровали через бумажный фильтр. За общую ПА принимали значение D_{280} через 180 мин инкубации. Строили график зависимости D_{280} от продолжительности инкубации.

Специфичность определяли как соотношение удельной МА и общей ПА (МА/ПА). Для оценки специфичности препаратов рХн за ПА принимали значения D_{280} образцов, инкубировавшихся в течение 180 мин.

Биохимические свойства рХн северного оленя сравнивали с коммерческими рХн коровы («CHY-MAX® Powder Extra», сухая форма, для работы готовили 0,5 % водный раствор) и одногорбого верблюда («CHY-MAX® M 1000», жидкая форма) производства компании Chr. Hansen (Дания). Данные о биохимических свойствах МФСО взяты из работ [3, 4, 7]. В ходе определения технологических свойств препараты рХн северного оленя (рХн-Rta(K53E)), рХн коровы (рХн-Bos) и рХн одногорбого верблюда (рХн-Cam) нормировали по МА.

Статистика. Статистическую обработку полученных данных проводили в вычислительной среде табличного процессора Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Для количественных переменных результаты представлены в виде среднего арифметического с указанием среднеквадратического отклонения. На графиках не указывали 95 % доверительный интервал, поскольку его значения были меньше 10 % от значений переменных.

Молокосвертывающая активность. Исходная МА рХн-Rta(K53E) составляла около 200 УЕ/мл, что было недостаточно для определения комплекса биохимических свойств, поэтому препарат был сконцентрирован методом ультрафильтрации. В результате был получен рХн-Rta(K53E) с общей МА 1622 УЕ/мл (табл. 1). По удельной

Таблица 1

Общая и удельная молокосвертывающая активность различных препаратов химозина

Препарат	Общая МА, УЕ/мл	Концентрация белка, мг/мл	Удельная МА, УЕ/мг	Удельная МА, %
рХн-Rta(K53E)	1622 ± 51	0,073 ± 0,005	22219 ± 827	27
рХн-Bos	2752 ± 88	0,033 ± 0,005	83394 ± 10203	100
рХн-Cam	129660 ± 1620	0,928 ± 0,029	139720 ± 2623	168
Натуральный МФ *R.tarandus* [3]	5020 ± 53	Нет данных	–	–

MASMTGGQQMGRGSAEITRIPLYKGKPLRKALKERGLLEDFLQKQQYGVSSKYYGL

Рис. 1. Аминокислотная последовательность про-фрагмента рХн северного оленя. Желтым фоном выделены остатки тирозина (Y)

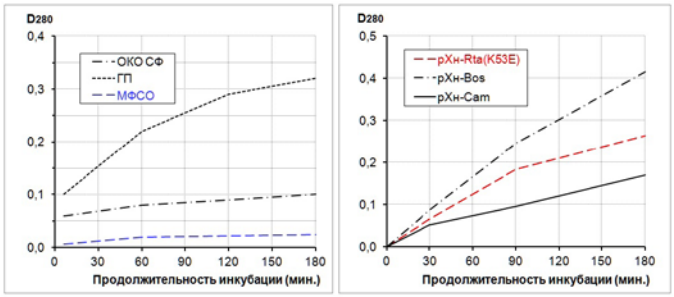
МА инженерный вариант рХн северного оленя уступал рХн коровы и одногорбого верблюда в 3,7 и 6,2 раза соответственно. Главной возможной причиной того, что рХн-Rta(K53E) «проиграл» коагулянтам сравнения по общим и относительным показателям МА, является его неполный рефолдинг. Сравнить удельную МА инженерного варианта рХн-Rta(K53E) и натурального МФ из сычугов *R. tarandus* не удалось, поскольку значения удельной коагуляционной активности природного фермента в литературных данных не обнаружены.

В процессе концентрирования был отмечен любопытный факт: D_{280} исходного и сконцентрированного приблизительно в 10 раз препарата рХн-Rta(K53E) имела очень близкие значения — 5,2 и 5,3 единиц соответственно. По-видимому, исходный препарат содержал большое количество свободных про-фрагментов (ММ=6,28 кДа) рХн, образовавшихся в процессе активации зимогена. Про-фрагменты рХн северного оленя, которые при УФ с отсечкой по ММ 10 кД отходили в пермеат, богаты тирозином (максимум поглощения ≈280 нм) (рис. 1).

В результате нарастание D_{280}, которое должно было происходить за счет концентрирования рХн, компенсировалось потерями про-фрагментов, поглощающих при длине волны 280 нм. Скорее всего, именно этим и объясняется ничтожная разница в D_{280} исходного (разбавленного) и сконцентрированного препарата рХн-Rta(K53E). Предполагаемая высокая концентрация про-пептидов в препаратах рХн Rta косвенно свидетельствует об эффективности его отщепления в процессе активации. При этом, по-видимому, лишь небольшая часть образующегося рХн-Rta(K53E) имела корректную 3-D структуру, что и приводило к низкой удельной коагуляционной активности.

Таким образом установлено, что рХн-Rta(K53E), произведенный в прокариотической системе экспрессии, способен коагулировать коровье молоко, но по удельной МА уступает эталонным коммерческим препаратам рХн. Для того чтобы конкурировать с коммерческими МФ, удельная МА рХн-Rta(K53E) должна быть увеличена в 4–6 раз.

Общая протеолитическая активность и специфичность. Одним из важных технологических параметров, используемых в сыроделии коагулянтов молока, является общая или неспецифическая ПА [8, 9]. Существует множество протеолитических ферментов, способных коагулировать молоко, которые не используются в сыроделии из-за чрезмерно высокой ПА. Поскольку МА является частным случаем ПА, для описания МФ вводится понятие специфичность, которая определяется как соотношение удельной МА и общей ПА (МА/ПА). Идеальный МФ должен проявлять максимальную МА при минимальной ПА. Высокая общая ПА может значительно ухудшить специфичность МФ, что приведет к снижению его универсальности и ограничит ассортимент сыров, вырабатываемых с его использованием [9, 10].



А Б

Рис. 2. Результаты исследования общей ПА молокосвертывающего фермента из сычугов северных оленей (А, по данным [4]) и инженерного варианта рХн северного оленя (Б). Условные обозначения: (А) ОКО СФ – отраслевой контрольный образец сычужного фермента; ГП – говяжий пепсин; МФСО – молокосвертывающий фермент из сычугов северных оленей. (Б) рХн Rta(K53E) – рХн северного оленя; рХн-Bos – рХн коровы; рХн-Cam– рХн одногорбого верблюда

Ранее [4] было показано, что ПА натурального МФ из сычугов *R. tarandus* в 13,3 и 4,2 раза ниже, чем у говяжьего пепсина (ГП) и отраслевого контрольного образца сычужного фермента (ОКО СФ) (рис. 2 А).

Соотношение неспецифической ПА ОКО СФ и натурального молокосвертывающего фермента северного оленя (МФСО) составляло 1:0,24. Необходимо отметить, что, по данным [4, 7], препарат МФСО был неоднородным и содержал множество полипептидных компонентов. Это не исключало присутствие в нем, кроме Хн, других протеиназ (пепсинов А, В, С, катепсинов) [11], которые могли вносить вклад в общую ПА. Стоит принять во внимание и то, что сравниваемый с МФСО препарат ОКО СФ также не был гомогенным и, кроме Хн коровы, содержал 8 %-ную примесь говяжьего пепсина (ГП) [4], что способствовало увеличению его общей ПА. По критерию ПА (от высокой — к низкой) натуральные МФП были ранжированы следующим образом: ГП > ОКО СФ > МФСО.

По неспецифической ПА инженерный вариант рХн северного оленя занимает промежуточное положение между рХн коровы и одногорбого верблюда (рис. 2 Б).

Если ПА рХн коровы принять за 100 %, то ПА рХн-Rta(K53E) и рХн верблюда составит соответственно ≈ 64 % и ≈ 41 %. Следовательно, по критерию низкой ПА рХн северного оленя превосходит рХн коровы, но уступает рХн одногорбого верблюда. Важно понимать, что в отличие от натуральных МФ единственными источниками ПА рХн-Rta(K53E) и коммерческих генно-инженерных коагулянтов молока являлись соответствующие Хн.

Таким образом, результаты настоящего исследования сопоставимы с данными, впервые опубликованными в работе [4], которые свидетельствовали о том, что общая ПА МФ *R. tarandus* ниже, чем у ОКО СФ, полученного из сычугов *B. taurus*.

Таблица 2

Удельная МА, общая ПА и специфичность препаратов рХн

Препарат	Удельная МА, %	Общая ПА, %	Специфичность, МА/ПА
рХн-Rta(K53E)	27	64	0,42
рХн-Bos	**100**	**100**	**1,00**
рХн-Cam	168	41	4,10

Для сравнения специфичности рХн-Rta(K53E) и коммерческих коагулянтов коровьего молока удельную МА и общую ПА рХн-Bos принимали за 100 %. Согласно данным, представленным в табл. 2, по специфичности исследованные ферменты ранжируются следующим образом: рХн-Cam > рХн-Bos > рХн-Rta(K53E).

Из-за низкой удельной МА специфичность инженерного варианта рХн северного оленя, несмотря на его низкую ПА, оказалась в 2,4 и 9,8 раза ниже, чем у рХн коровы и верблюда соответственно. Предположительно, низкая удельная коагуляционная активность рХн-Rta(K53E) может быть вызвана неполным рефолдингом зимогена, выделенного из телец включения. Известно, что низкая эффективность рефолдинга является причиной снижения МА генно-инженерных Хн, полученных в прокариотической системе экспрессии [12–15].

Соотношение ПА рХн коровы и рХн одногорбого верблюда составило 1:0,41. Ранее Kappeler et al. [2] сообщали, что ПА рХн-Bos и рХн-Cam соотносится как 1:0,25. Небольшие различия в соотношениях общей ПА могут быть связаны с вариацией биохимических и физико-химических параметров индивидуальных партий сравниваемых МФ и субстратов. Не исключено, что низкая, по сравнению с рХн коровы, общая ПА является характерным биохимическим признаком рХн Верблюдовых (*Camelidae*). Так, по данным [16], соотношение неспецифической ПА рХн коровы и еще одного представителя семейства *Camelidae* — альпака (*Vicugna pacos*) — составляет 1:0,34.

Обнаруженное нами соотношение общей ПА рХн коровы и рХн северного оленя, равное 1:0,64, указывает на то, что низкая, по сравнению с рХн коровы, неспецифическая ПА не является исключительной «визитной карточкой» семейства *Camelidae* и обнаруживается также у представителей семейства Оленевые (*Cervidae*). Это позволяет предполагать возможность нахождения высокоспецифичных вариантов Хн в других кладах класса Млекопитающие (*Mammalia*).

Таким образом, установлено, что так же, как и натуральный МФ из сычугов *R. tarandus*, его генно-инженерный вариант — рХн-Rta(K53E) обладает ценным технологическим свойством — низкой общей ПА. По критерию низкой ПА рХн-Rta(K53E) — превосходит классический универсальный МФ — рХн коровы. Однако, несмотря на низкую неспецифическую ПА, рХн-Rta(K53E) уступает рХн коровы и одногорбого верблюда по специфичности, что обусловлено его пониженной удельной МА. Предположительно, низкая удельная специфическая активность вызвана неполным рефолдингом зимогена рХн-Rta(K53E), полученного в прокариотической системе экспрессии. Возможно, использование эукариотического продуцента, обеспечивающего секрецию гетерологичных белков с корректной третичной структурой непосредственно в культуральную жидкость, позволит повысить удельную МА рХн северного оленя. Разработка такого продуцента является одной из ближайших задач нашей научной группы.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (номер темы: FZMW-2020–0002 — «Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия»).

Список литературы

1. **Cheese: chemistry, physics and microbiology.** 4th edn., Chapter 4 – Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties / T.Uniacke-Lowe, P.F.Fox.; P.L.H.McSweeney, P.F.Fox, P.D.Cotter et al., eds. – Oxford, UK: Elsevier, Academic Press. 2017. P. 69–113.

2. **Kappeler, S.R.** Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk / S.R.Kappeler [et al] // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2006. V. 2. N. 342. P. 647–654.

3. **Ельчанинов, В.В.** Молокосвертывающий фермент из сычугов северного оленя / В.В. Ельчанинов // Сыроделие и маслоделие. 2006. № 4. С. 42–44.

4. **Ельчанинов, В.В.** Исследование молокосвертывающего фермента из сычугов северных оленей: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04: защищена 23.01.06: утв. 07.04.06 / Ельчанинов Вадим Валентинович. – Кемерово, 2006. – 172 с. Библиогр.: С. 121–147.

5. **Jensen, J.L.** Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties / J.L.Jensen [et al.] // Acta Cryst. (Section D, Biol. Crystallogr.). 2013. V. 69. Pt. 5. P. 901–913.

6. **Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M.Bradford // Anal. Biochem. 1976. V. 72 (1–2). P. 248–254.

7. **Ельчанинов, В.В.** Молокосвертывающий фермент из сычугов северного оленя. 1. Выделение и краткая характеристика / В.В.Ельчанинов [и др.] // Сыроделие и маслоделие. 2005. № 4. С. 13–16.

8. **Singh, T.K.** Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective / T.K.Singh, M.A.Drake, K.R.Cadwallader // Compr. Rev. Food Sci. Food Safety. 2003. V. 2. № 4. P. 139–162.

9. **Harboe, M.** In: Technology of Cheesemaking. Law B.A., Tamime A.Y., Eds. / M.Harboe, M.L.Broe, K.B.Qvist // Wiley-Blackwell. Ch. 3. The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. 2010. P. 98–129.

10. **Мурунова, Г.В.** Принципы подбора молокосвертывающего фермента для производства сыра / Г.В.Мурунова, Ю.Я.Свириденко // Сыроделие и маслоделие. 2006. № 5. С. 2–5.

11. **Теплы, М.** Молокосвертывающие ферменты животного и микробного происхождения / М.Теплы, Я.Машек, Я.Гавлова. – М.: Пищевая промышленность, 1980. –272 с.

12. **Wei, C.** Oxidative refolding of recombinant prochymosin / C.Wei [et al.] // Biochem. J. 1999. V. 340. P. 345–351.

13. **Chen, H.** Functional Implications of Disulfide Bond, Cys206-Cys210, in Recombinant Prochymosin (Chymosin) / H.Chen [et al.] // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 12140–12148.

14. **Wei, C.** Chaperone-mediated refolding of recombinant prochymosin / C.Wei, Y.Zhang, K.Yang // J.Prot. Chem. 2000. V. 19. N. 6. P. 449–456.

15. **Eskandari, M.H.** Cloning, Expression, Purification and Refolding of Caprine Prochymosin / M.H. Eskandari [et al.] // Food Biotechnol. 2012. V. 26. № 2. P. 143–153.

16. **Беленькая, С.В.** Некоторые биохимические свойства рекомбинантного химозина альпака (Vicugna pacos L.) / С.В.Беленькая [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 6. С. 585–593.