

ӘОК: 579.6

Original Article

РЕКОМБИНАНТТЫ СҮТ ҰЙЫТУ ФЕРМЕНТІН *PICHIA PASTORIS* АШЫТҚЫСЫНДА АЛУАқишев Ж.^{1,2}, Әуез М.^{1,2}, Балтин К.К.¹, Турсунбекова А.¹, Хасенов Б.*¹¹ Ұлттық биотехнология орталығы, Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана қ., 010000;² Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Сәтпаев, 2, Астана, 010008;

*khasenov@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Химозин к-казеинге қатысты жоғары арнайылыққа ие және осыған байланысты ірімшік өнеркәсібінде қолданылатын негізгі фермент болып табылады. Зерттеу жұмысында *Pichia pastoris* ашытқысындағы ешкі прохимозин генінің экспрессиясы және рекомбинантты ешкі химозинінің сүт ұйыту белсенділігін зерттеу нәтижелері келтірілген. Ешкі прохимозин гені ашытқының хромосомалық ДНҚ-сына интеграцияланған және метанол индукциясы арқылы ашытқы дақылында прохимозин секрециясы жүзеге асырылады. Белсендірілгеннен кейін химозин анион және катион алмасу хроматографиясы арқылы тазартылды. Биохимиялық зерттеу ферменттің сүт ұйыту белсенділігінің төмендеуі рН жоғарылаған кезде байқалғанын көрсетті. Рекомбинантты ешкі химозинінің ең жоғары белсенділігі 60°C және рН 4,5-5,0 көрсеткіштерінде байқалды және сәйкесінше сиыр мен ешкі сүті үшін 7680 ± 32 және 8727 ± 39 құрады. Ферменттің жалпы протеолитикалық белсенділігі 7769,2 ± 38 бірлік/мг құрады. Алынған нәтижелер рекомбинантты ешкі химозинінің ірімшік өнеркәсібінде қолдануға болатынын және ешкі сүтінен ірімшік алу кезінде практикалық қолдану үшін жақсы перспективалары бар екенін көрсетеді.

Негізгі сөздер: фермент, *Pichia pastoris*, сүт ұю белсенділігі, ірімшік, ешкі

КІРІСПЕ

Химозин (ЕС 3.4.23.4) – ірімшік өндіруде қолданылатын аспарагинді протеаза болып табылады [1]. Бұл фермент к-казеин молекуласындағы Phe105 және Met106 арасындағы пептидтік байланысты гидролиздеуге қабілетті, жоғары арнайылық эндопептидаза [2]. Бұл пептидтік байланыстың гидролизі барлық казеиндік мицеллийдің тұрақсыздығына әкеледі, бұл казеин ақуыздарының кейінгі коагуляциясы мен тұндыруынан көрінеді. Осы ерекше белсенділіктен басқа, химозиннің жалпы протеолитикалық белсенділігі де бар, ол басқа аспарагиндік протеаза - пепсинге қарағанда айтарлықтай төмен [3]. Бұл қасиеттер химозинді сүтті ұйытатын фермент ретінде ірімшік жасау технологиясында қолдануға ықпал етті [1].

Дәстүрлі түрде химозин бұзаулардың, қозылардың және ешкілердің жас жануарларының асқазандарынан алынады, оларда химозин асқазанның төртінші бөлімінде (ұлтабар) 10 күн ішінде асқазан люменіне бөлінеді [3]. Алайда гендік инженерия мен рекомбинантты ДНҚ технологиясының дамуымен микроағзаларда химозиндердің өндірісі енді мүмкін болды [4]. Бүгінгі таңда қолданылатын мәйек ферментінің 90%-дан астамы халал да, кошерлі де болып табылатын ферментациялық жолмен алынған химозинге тән [1]. Ферменттік гендік инженерия тарихында химозин АҚШ-тың Азық-түлік және дәрі-дәрмек сапасын бақылау агенттігімен пайдалануға рұқсат етілген алғашқы рекомбинантты фермент болып табылады [5]. Бұзаудан алынатын химозиннен бөлек, рекомбинантты ДНҚ технологиясын пайдаланып химозин алтай маралы, бұлан, қодас, түйеден алынады [6-11].

Ірі қара сүті - ірімшік өндірісінде қолданылатын сүттің негізгі түрі. Сиыр мен буйвол сүтінің жалпы өндірісінің үлесі 96% деңгейінде азды-көпті тұрақты (сиыр мен буйвол сүтінің үлесі сәйкесінше әлемдік сүт өндірісінің 81% және 15,2% құрады). Сонымен қатар ешкі сүті әртүрлі елдердегі ауыл шаруашылығында маңызды рөл атқарады [12]. Ешкі сүтін тұтыну, әсіресе сиыр сүтінің қол-

жетімділігі шектеулі аймақтарда маңызды ас көзі болып саналады.[13]. Әлемдік ешкі популяциясы 2018-2019 жылдары 1 миллиардтан асты, оның 203 миллионы сүттілі ешкі санатына жатады. Бұл ешкілер жылына шамамен 15,26 миллион тонна сүт береді. Ешкі сүтінде кездесетін ақуыздардың ас қорыту жылдамдығының жоғарылауы, буферлік қасиеттері және сиыр сүтімен салыстырғанда орташа сілтілік сияқты ерекше қоректік және функционалдық сипаттамаларын атап өтуге болады [14]. Аталған сипаттамалар зерттеушілердің назарын ешкі сүтіне негізделген өнімдердің жаңа формулаларын жасауға аударады [15]. Ешкі сүтінің гипоаллергенді қасиеттері оны тағамға, әсіресе сиыр сүтіне сезімталдығы бар адамдарға қолайлы өнім етеді [16]. Ешкі химозинінің ешкі сүтіне арналған сүт ұйыту ферменті ретінде қолданған жөн деп болжауға болады. Осыған байланысты, ешкі химозинінің биохимиялық белсенділігін зерттеу қажеттілігі туындайды.

Осыған байланысты, осы зерттеудің мақсаты *Pichia pastoris* ашытқысында рекомбинантты ешкі химозинінің алу және субстраттың температурасы мен рН-на байланысты ешкі мен сиыр сүтіндегі ферменттің сүт ұйыту белсенділігін зерттеу, ешкі химозинінің белсенділігінің кальций иондарының концентрациясына тәуелділігін зерттеу болды.

МАТЕРИАЛДАР МЕН ӘДІСТЕР

Штаммдар, ферменттер, олигонуклеотидер, векторлар, қоректік орталар және химиялық заттар

pPICZαA векторы (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, АҚШ) ашытқы экспрессиялық кассетасын жасау үшін пайдаланылды. Нысаналы генді амплификациялау және клондау үшін EcoRI, NotI және MssI рестрикциялық ферменттері, FastAP фосфатазасы, T4 ДНҚ-лигазасы, В буфер және Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific, Вильнюс, Литва) ДНҚ-полимеразасы қолданылды. *Escherichia coli* DH5α (Thermo Fisher Scientific) және *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen) штаммдары пайдаланылды. Зерттеу

жұмысында қолданылған химиялық реагенттер молекулалық-биологиялық немесе аналитикалық тазалық дәрежесі бар және Sigma-Aldrich (Сент-Луис, АҚШ) және AppliChem (Дармштадт, Германия) компанияларынан сатып алынды.

Ешкі прохимозин генінің конструкциясымен экспрессия векторы

Ешкі прохимозин генінің нуклеотидтік тізбегі GenBank-тан (NM_001285759.1) алынды. Берілген тізбек бойынша ген MacroGen Company (Корея) компаниясы арқылы pTOP_Blunt_V2 векторында синтезделген. Ешкі прохимозин гені (*prosum*) Forward (5'-CCGGAATTCGCTGAGATCACAGGATCC-3') және Reverse (5'-ATAGTTT AGCGGCCGCGATGGCTTTGGCCAGCCCCA-3') олигонуклеотидтерін пайдаланып pTOP_Blunt_V2/ProsumCH-тан амплификацияланды және pPICZαA векторында EcoRI және NotI сайттары бойынша клондалды. Нәтижесінде pPICZαA/ProsumCH бинарлы плазмиды алынды. Секвенирлеу алмастырулар, инсерциялар мен делециялардың жоқтығын растады. Кодталатын ақуыз, прохимозин ашытқы культурасында секреция үшін α-фактордың N-терминалды сигналдық пептидін тасымалдайды.

Ашытқы штаммының трансформациясы және штамм-продуцентті сұрыптау

pPICZαA/ProsumCH векторын MssI эндонуклеаза-сымен Buffer В-де сызықтандырылды. Сызықтық вектор фенол/хлороформ экстракциясы арқылы тазартылды, содан кейін этанолмен тұндырылды. *P. pastoris* GS115 жасушалары сызықтық вектормен келесідей электропорацияға ұшырады: 80 мкл компетентті ДНҚ қосылды, жасуша суспензиясы MicroPulser™ (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, АҚШ) электропораторымен 4,8 мс бойы 2 кВ-та электропорацияланды. Оң клондар антибиотик зеоцин (200 мкг/г) қосылған YEPD агар табақшасында (1% ашытқы сығындысы, 2% пептон, 3% декстроза, 2% агар, рН 7,0) сұрыпталды. Алынған клондарды ПТР әдісімен AOX1fw (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') және AOX1rv (5'-GCAAATGGCATTTCTGCATCC-3') праймерлерін пайдаланып кірістірмелердің барына тексерілді. ПТР скринингінен кейін іріктелген клондар метанол ортасында 3 күн бойы өсірілді, рекомбинантты ашытқы дақылының сүт ұю белсенділігінің болуы бойынша клондардың химозин экспрессиясына талданды, максималды белсенділігі бар клон штамм-продуцент ретінде пайдаланылды.

Препараттық мөлшерде прохимозин өндіру

Продуцент-штамм жасушалары 5 мл YEPD ортасы (1% ашытқы сығындысы, 2% пептон және 3% декстроза, рН 7,0) бар 50 мл қолбаға зеоцинмен (100 мкг /мл) инокуляциялап, түні бойы 30°C температурада және 250 айн/мин Climo Shaker ISF1-X (Kuhner, Базель, Швейцария) шейкер-инкубаторында өсірілді. Түнгі дақыл 500 мл қолбада 50 мл YEPD-ге инокуляцияланып, түні бойы 30°C және 250 айн/мин инокуляцияланды. Әрі қарай, 500 мл YEP 100 мМ цитрат-фосфат буферімен, рН 4,0, 10 мМ аскорбин қышқылы, 1,34% YNB, 0,0004% биотин және 5% сорбитолмен толықтырылған 5 литрлік қолбаға ауыстырылып, шейкер-инкубаторда 28°C және 250 айн / мин инокуляциялауды күнделікті 2% метанол қоса отырып, 120

сағат бойы жалғастырылды. Жасушаларды 3500×g центрифугалау арқылы 4°C температурада 20 минут бойы жиналып, алынып тасталды ал дақыл ферментті тазарту үшін пайдаланылды.

Рекомбинантты ешкі химозинінің тазарту

Тазартылған дақыл алу үшін клеткасыз дақылды 30 минут бойы 4°C температурада, 10000×g центрифугаланып, рекомбинантты ешкі химозинінің тазарту үшін қолданылды. Ол үшін культура сүзгіден өткізілді (0,22 мкм), 100 мМ натрий цитратының көмегімен рН 4,0-ге дейін төмендетілді, 24 сағат ішінде 22°C температурада инкубацияланып, кейіннен рН 1 М HCl көмегімен тағы да 3,0-ге дейін төмендетілді. Ерітінді 50 мМ натрий-цитрат буферімен (рН 3,0), 25 мМ NaCl теңестірілген DEAE-сефароза FF (Cytiva, Уппсала, Швеция) бар бағанға жүктелді. Баған арқылы өткен ерітінді сұйылтылып, бағанға 50 мМ натрий-цитрат буферімен (рН 3,0), 25 мМ NaCl алдын ала теңестірілген SP-сефароза FF (Cytiva, Уппсала, Швеция) бар бағанға жүктелді. Кейіннен бағанды 25 мМ натрий-ацетатты буфердес (рН 5,5) 50 мМ NaCl-мен шайылды. Фракция 25 мМ натрий-ацетат буферінде (рН 5,5) 750 мМ NaCl арқылы элюцияланды. Элюцияланған фракциядағы NaCl концентрациясы 25 мМ-ге дейін төмендетілді және қоспа 25 мМ натрий-ацетат буферімен (рН 5,5), 25 мМ NaCl алдын ала теңестірілген Q-сефароз FF (Cytiva, Уппсала, Швеция) шайырына жүктелді. Баған 25 мМ натрий-ацетат буферімен (рН 5,5), 25 мМ NaCl шайылып, химозин 25 мМ натрий-ацетат буферінде (рН 5,5) 50-2 М NaCl градиентімен элюцияланды. Фракциялар сүт ұю белсенділігіне зерттелді және Лэмбли әдісі бойынша ПААГ-ДСН көмегімен визуализацияланды. Ең белсенді фракциялар біріктіріліп, одан әрі эксперименттерде қолданылды.

Сүт ұю белсенділігін анықтау

Талдау [9] сәйкес жүргізілді, субстрат ретінде 100 мМ натрий-ацетат буферінде (рН 5,5) 12% (мас/көлем) қалпына келтірілген майсыздандырылған ұнтақ тәрізді сиыр немесе ешкі сүті қолданылды. Ферментативті реакция 1 мл субстрат пен 20 мкл фермент ерітіндісі бар сынауықтарда 37°C температурада жүргізілді. Сүт ұйындысының пайда болуы, сүттің коагуляция уақытын анықтау үшін сынауықтарды айналдыру арқылы анықталды. Сүт ұю белсенділігі (А) келесі теңдеуге сәйкес есептелді:

$$A = \frac{V_{\text{сүт}}}{V_{\text{ХИМОЗИН}}} \times \frac{2400}{T_{\text{ҰЮ}}}$$

Мұнда, V_{сүт} – сүт мөлшері (мл), V_{химозин} – қосылған химозин мөлшері (мл), ал T_{үю} – сүттің ұю уақыты (с). 37°C температурада 40 минут ішінде бір миллилитр майсыз сүтті коагуляциялау үшін қажетті ферменттің мөлшері сүтті ұю белсенділігінің 1 бірлігі ретінде анықталды.

Субстраттың рН сүт ұю белсенділігіне әсері

Майсыздандырылған сүт ұнтағы 100 мМ натрий-ацетат буферінде (рН 4,5-6,0) немесе 100 мМ имидазол-HCl-буферінде (рН 6,0-7,5) ерітілді. Сүт ерітінділері 2 мл сыйымдылығы бар сынауықтарға субстрат ретінде

орналастырылды. Ферменттің максималды белсенділігі 100% белсенділік ретінде белгіленді және осы негізде басқа үлгілер бағаланды. Тесттер үш тәуелсіз қайталауда жүргізілді және нәтиже үш қайталаудың орташа мәні ретінде анықталды.

Субстрат температурасының сүт ұю белсенділігіне әсері

Сүт ұю белсенділігі 100 мМ натрий-ацетат буферінде (рН 5,5) 0-75°C (5°C аралықпен) температура диапазонында өлшенді. Субстрат пен ферменттің ерітінділері реакция температурасына дейін 3 минут бойы алдын ала қыздырылды. Ферменттің максималды белсенділігі 100% белсенділік ретінде белгіленді және осы негізде басқа үлгілер бағаланды. Тесттер үш тәуелсіз қайталауда жүргізілді және нәтиже үш қайталаудың орташа мәні ретінде анықталды.

CaCl₂ сүт ұю белсенділігіне әсері

Кальцийдің сүт ұю белсенділігіне әсері [10] сипатталған әдіс бойынша жүзеге асырылды. Сүт ұю белсенділігі рН 5,5 натрий-ацетат буферінде 100 мМ ерітілген 0-ден 160 мМ-ге дейінгі концентрация диапазонында CaCl₂ қатысуымен 37°C температурада талдауда зерттелді. Қосымша кальций болмаған кездегі ферменттің белсенділігі 100% - да қабылданды, соның негізінде басқа үлгілер әртүрлі металл иондарымен сыналды. Тесттер үш тәуелсіз қайталауда жүргізілді және нәтиже үш қайталаудың орташа мәні ретінде анықталды.

Протеолитикалық белсенділікті талдау

Протеолитикалық белсенділікті өлшеу Энсон әдісі арқылы [17] модификациямен жүргізілді. Реакция қоспасы 50 мМ цитрат буферінде (рН 3,0) 1 мл 1% гемоглобиннен және 0,02 мл ферменттен тұрды. Қоспа 37°C температурада 10 минут бойы инкубацияланды. Реакция 0,5 мл 10% трихлорацет қышқылын қосу арқылы тоқтатылды.

Оптикалық тығыздық UV-1900i спектрофотометрінде (Shimadzu, Oregon, АҚШ) 280 нм-де өлшенді. Белсенділік бірлігі ретінде минутына 1 мкг тирозин шығару үшін қажетті фермент мөлшері қабылданды.

Ақуыз концентрациясын анықтау

Ақуыз концентрациясы Брэдфорд әдісін пайдаланып [18], стандарт ретінде бұқа сарысу альбуминімен анықталды. 100 мкл Брэдфорд реагенті (Bio-Rad, Мюнхен, Германия) 860 мкл 10% PBS-пен 1% глицеринмен араластырып, 40 мкл ақуыз үлгісі қосылды. Қоспа бөлме температурасында 2 минут инкубацияланды және 595 нм спектрофотометрдегі оптикалық тығыздық өлшенді. Ақуыз концентрациясы калибрлеу қисығымен анықталды.

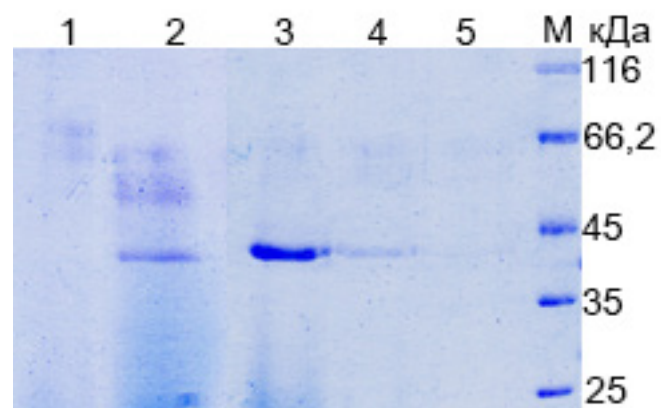
Статистикалық талдау және бағдарламалық қамтамасыз ету

Барлық сандық өлшеулер үш қайталымда жүргізілді. Орташа мәндер мен стандартты ауытқу (SD) GraphPad Prism V.8.0.1 бағдарламалық жасақтамасымен есептелді. Сүт ұю белсенділігі орташа ± стандартты ауытқу (n = 3) ретінде ұсынылған.

НӘТИЖЕЛЕР МЕН ТАЛДАУЛАР

Ешкі прохимозин гені метанолмен индукцияланған

АОХ1 промоторының бақылауымен рPICZαА ашытқы экспрессия векторына интеграцияланды, нәтижесінде рPICZα/ProsumCH плазмидасы пайда болды. Ешкі прохимозин генінің GenBank нуклеотидтер тізбегін талдауға сәйкес геннің жалпы ұзындығы 1098 жұп негізді құрайды және оның трансляциясы 365 аминқышқылынан тұратын ақуыздың пайда болуына әкеледі. *Pichia pastoris* GS115 штаммының компетентті жасушалары рPICZα/ProsumCH линеаризацияланған вектор арқылы трансформацияланды. Трансформантты клондар алынды, олардың геномдық ДНҚ-сына ешкі прохимозин гені интеграцияланған. Сүт ұю белсенділігі скринингі арқылы 1,5% метанол қосылған YEP-те трансформацияланған клондарды 72 сағат өсіргеннен кейін штамм өндіруші ретінде пайдаланылған максималды белсенділігімен (52 бірлік/мл) клон таңдалды. 500 мл индукцияланған рекомбинантты ашытқы дақылынан ешкі прохимозинін бөлу және тазарту жүргізілді. рН 4,0-ге дейін төмендеген кезде прохимозин жетілген химозин түзәле отырып белсендірілді, содан кейін ол ион алмасу хроматографиясы арқылы бөлініп алынды. 1-суретте тазартылған рекомбинантты ешкі химозинінің НДС-ПААГ нәтижелері көрсетілген.



Сурет 1. Рекомбинантты ешкі химозинін тазартқаннан кейінгі НДС-ПААГ электрофорез. 1- Индукцияланған дақыл сұйықтығы; 2- SP-сефарозда тазарту; 3,4,5- Q-сефарозда тазартудан кейінгі фракциялар; М- ақуыз молекулалық маркері

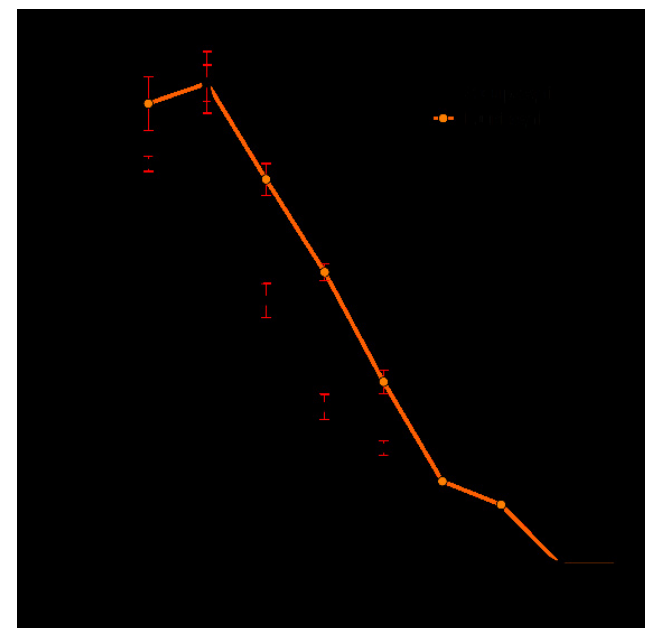
Ешкі прохимозинінің аминқышқылдарының тізбегін биоақпараттық зерттеу ақуыздың бір ықтимал N-гликозилдену сайты бар екенін көрсетеді: Asp333-His334-Ser335. Ашытқыдан алынған және полиакриламидті геледегі НДС-электрофорез әдісімен анықталған рекомбинантты ешкі химозинінің молекулалық салмағы (1-сурет) 42 ± 1 кДа құрады. Мәліметтерден N-гликозилдену молекулалық массаны шамамен 3 кДа-ға аздап арттырады, өйткені *C.hircus*-тен гликозилденбеген рекомбинантты химозин В-ның болжамды молекулалық массасы 38,6 кДа құрайды. 1-кестеде тазартудың әр кезеңінен кейін сүт ұюының жалпы және меншікті белсенділігін анықтау нәтижелері келтірілген.

Сыыр мен ешкі сүтіндегі рекомбинантты ешкі химозинінің сүтті ұйыту белсенділігін өлшеу сәйкесінше $7680 \pm 0,32$ бірлік/мг және $8727 \pm 0,39$ бірлік/мг құрады. Жалпы протеолитикалық белсенділік $7769,2 \pm 0,38$ бірлік/мг құрады.

Кесте 1. Тазартудың әр кезеңінен кейін сүт ұюының жалпы және меншікті белсенділігін анықтау нәтижелері

Кезең	Жалпы сүт ұю белсенділігі, Бірлік	Ақуыз мөлшері, мг	Меншікті белсенділігі, Бірлік/мг
Индукцияланған дақыл сұйықтығы	45 048	73,5	613
SP-сефарозда тазарту	32 388	11,55	2804
Q-сефарозда тазарту	24 024	3,128	7680

Рекомбинантты ешкі химозинінің реакция жылдамдығының субстраттың рН-на тәуелділігін зерттеу сыыр мен ешкі сүтіндегі химозиннің рН 4,5-5,0 кезінде ең жоғары сүт ұю белсенділігі (80% - дан астам) бар екенін көрсетті (2-сурет).



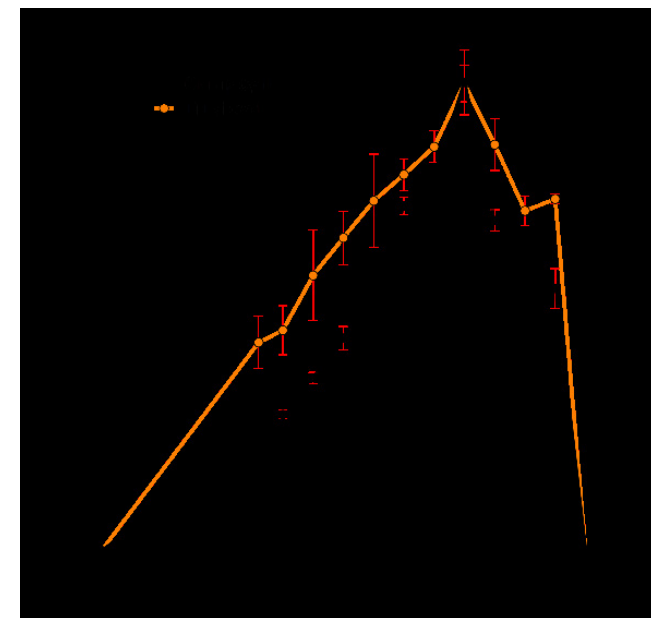
Сурет 2. Рекомбинантты ешкі химозинінің белсенділігінің ешкі мен сыыр сүтінің рН мәніне тәуелділігі

Химозиннің сүт ұйыту белсенділігі рН жоғарылаған кезде айтарлықтай төмендейді: сүттің рН 6,5-тен 7,5-ке дейін диапазонында 2-3 есе. Фермент рН ≥ 8 кезінде толығымен инактивацияланады.

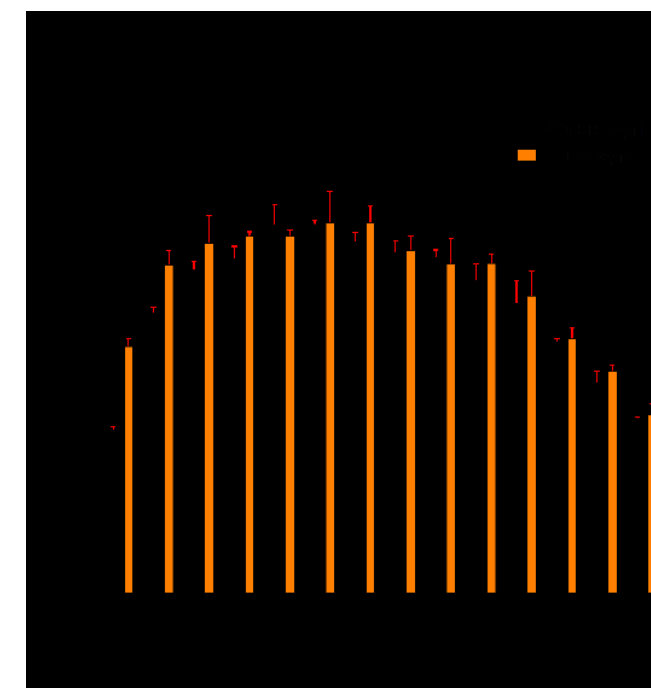
Химозиннің температурадан белсенділігін зерттеу сүттің екі түрінде де 60°C температурада ең жоғары белсенділік байқалатынын көрсетті. 45-тен 65°C-қа дейінгі температурада фермент 70% белсенділікті сақтайды және 80°C температурада толығымен инактивацияланады (3-сурет).

Химозин сүт түріне қарамастан кальцийге тәуелді фермент екені белгілі [10]. Рекомбинантты ешкі химозинінің сүт ұю белсенділігі 0-ден 160 мМ-ге дейінгі кальций хлоридінің концентрациясына байланысты зерттелді. Сүттің ұюының тұрақты белсенділігін қамтамасыз ететін CaCl₂ концентрациясы 45 мМ, максималды белсенділікпен 10-нан 90 мМ-ге дейін болды (4-сурет).

Рекомбинантты ешкі химозинінің биохимиялық қасиеттерін зерттеу ферменттің химозиндер тұқымдасының басқа ферменттеріне ұқсас параметрлері бар екенін көрсетті [9, 19], мұны олардың жақын туыстығымен және гомологияның жоғары дәрежесімен түсіндіруге болады. Фермент қышқыл ортада ең белсенді: 4,5-тен 5,5-ке дейін



Сурет 3. Рекомбинантты ешкі химозинінің белсенділігінің ешкі мен сыыр сүтінің температурасына тәуелділігі



Сурет 4. Кальций хлориді концентрациясының рекомбинантты ешкі химозинінің сүт ұйыту белсенділігіне әсері

рН диапазонында рекомбинантты ешкі химозинінің белсенділігі 40% - дан төмен түспеді. рН жоғарылаған сайын сүт ұю белсенділігі төмендеді. Бұл ешкі химозинінің қышқыл протеаза екенін және оның әсері жануарлардың асқазанымен шектелетінін көрсетеді, өз кезегінде асқазан

сөлінің қышқылдығы олардың протеолитикалық және коагуляциялық қабілеттерін барынша арттырады.

Фермент кальций концентрациясына қатаң тәуелділікті көрсетті. Химозиннің белсенділігі сүттегі кальций хлоридінің төмен және жоғары концентрациясында да төмендейді. Кальций хлориді болмаған кезде рекомбинантты ешкі химозині сиыр сүтінде 45% - дан аз және ешкі сүтінде 67% - дан аз салыстырмалы сүт үю белсенділігіне ие болды. Бұл кальций мөлшері төмен пастерленген сүтті қолданған кезде маңызды.

Рекомбинантты ешкі химозинінің қатысуымен реакцияның температуралық сезімталдығын зерттеу ферменттің сүт түріне қарамастан 60°C температурада максималды белсенділік көрсететіні анықталды. Рекомбинантты ешкі химозинінің протеолитикалық белсенділігін сүт үю белсенділігімен салыстыру сүт үюының (C) жалпы протеолитикалық (П) белсенділікке қатынасы - C/П = 0,9 екенін көрсетті, бұл ферменттің сүт үю белсенділігі бар арнайы протеаза екенін көрсетеді.

ҚОРЫТЫНДЫ

Бұл зерттеу жұмысында рекомбинантты ешкі химозині алынды және биохимиялық тұрғыда сипатталған. Ион алмасу хроматографиясы ашытқыдағы секреторлық экспрессиядан кейін дақылдан рекомбинантты ешкі химозинін тазарту үшін пайдаланылды. Тазартылған рекомбинантты ешкі химозинінің сүтті үю белсенділігін өлшеу сәйкесінше сиыр мен ешкі сүті үшін белсенділік $7680 \pm 0,32$ және $8727 \pm 0,39$ екенін көрсетті. Ферменттің жалпы протеолитикалық белсенділігі $7769,2 \pm 0,38$ бірлік/мг құрады. рекомбинантты ешкі химозині рН 4,5-5,0 диапазонында ең жоғары белсенділікті көрсетті. Ферменттің коагуляциялық әсері үшін оңтайлы температура сүттің екі түрі үшін де 60°C оңтайлы екендігі анықталды. Нәтижелер ашытқыдан алынған рекомбинантты ешкі химозинін ірімшік өнеркәсібінде қолдануға болатынын және перспективасы практикалық қолданысы бар екенін көрсетеді.

ҚАРЖЫЛАНДЫРУ

Бұл зерттеулерді Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым комитеті қаржыландырды (грант № AP19678941).

ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Johnson, M.E., *A 100-Year Review: Cheese production and quality*. J Dairy Sci, 2017. 100(12): p. 9952-9965. DOI: 10.3168/jds.2017-12979
2. Szecsi, P.B., *The aspartic proteases*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1992. 210: p. 5-22. PubMed PMID: 1455179, DOI:10.3109/00365519209104650
3. Szecsi, P.B. and M. Harboe, *Chapter 5 Chymosin*, in *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2013. p. 37-42. DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00005-3
4. Khan, U. and Z. Selamoglu, *Use of Enzymes in Dairy Industry: A Review of Current Progress*. Arch Razi Inst, 2020. 75(1): p. 131-136. PubMed PMID: 32292011, DOI: 10.22092/ARI.2019.126286.1341
5. Flamm, E.L., How FDA approved chymosin: a case his-

tory. Biotechnology (N Y), 1991. 9(4): p. 349-51. PubMed PMID: 1367006 DOI: 10.1038/nbt0491-349

6. Belenkaya, S.V., 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 (Mosc), 2020. 85(7): p. 781-791. PubMed PMID: 33040722 DOI: 10.1134/S0006297920070068
7. Ersöz, F. and M. İnan, Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2019. 154: p. 126-133. PubMed PMID: 30336214, DOI: 10.1016/j.pep.2018.10.007
8. Wang, N., et al., *Expression and characterization of camel chymosin in Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2015. 111: p. 75-81. PubMed PMID: 25837439, DOI: 10.1016/j.pep.2015.03.012
9. Akishev, Z., et al., *Constitutive expression of Camelus bactrianus prochymosin B in Pichia pastoris*. Heliyon, 2021. 7(5): p. e07137. PubMed PMID: 34113734, PMID: PMC8170492, DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07137
10. Akishev, Z., 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 (Basel), 2022. 11(11): p. e1545. PubMed PMID: 36358248 , PMID: PMC9687658 DOI: 10.3390/biology11111545
11. Balabova, D.V., et al., *Biochemical Properties of a Promising Milk-Clotting Enzyme, Moose (Alces alces) Recombinant Chymosin*. Foods, 2023. 12(20): p. 3772. DOI:10.3390/foods12203772
12. Chia, J., et al., *Chapter 27 - Minerals in Sheep Milk*, in *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease*, R.R. Watson, R.J. Collier, and V.R. Preedy, Editors. 2017, Academic Press. p. 345-362. PMID: PMC9266239, PMID: 35804782, DOI:10.1016/B978-0-12-809762-5.00027-9
13. Tiwari, G., et al., *Nutritional Values and Therapeutic Uses of Capra hircus Milk*. International Journal of Pharmaceutical Investigation, 2022. 12(4). PMID: PMC10563692, PMID: 37823128, DOI: 10.1002/fsn3.3531
14. Saikia, D., M.I. Hassani, and A. Walia, *Goat milk and its nutraceutical properties*. Int J Appl Res, 2022. 8(4): p. 119-22. DOI:10.22271/allresearch.2022.v8.i4b.9639
15. Van Leeuwen, S.S., et al., *Goat milk oligosaccharides: Their diversity, quantity, and functional properties in comparison to human milk oligosaccharides*. Journal of agricultural and food chemistry, 2020. 68(47): p. 13469-13485. PMID: 33141570, PMID: PMC7705968, DOI: 10.1021/acs.jafc.0c03766
16. Riskó, T.C. and Z. Csapó, *Goat Keeping and Goat Milk Products in Human Nutrition-Review*. Applied Studies in Agribusiness and Commerce, 2019. 13(1-2): p. 24-36. DOI:10.19041/APSTRACT/2019/1-2/3
17. Anson, M.L., *THE ESTIMATION OF PEPSIN, TRYP-SIN, PAPAN, AND CATHEPSIN WITH HEMOGLOBIN*. J Gen Physiol, 1938. 22(1): p. 79-89. PMID: PMC2213732, PMID: 19873094 , DOI: 10.1085/jgp.22.1.79
18. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utiliz-*

ing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54. PubMed PMID: 942051, DOI: 10.1006/abio.1976.9999

19. Akishev Zh.D., A.A.N., Abeldenov S.K., Khassenov B.B., *Expression and characterization of bovine chymosin in Pichia (Komagataella) pastoris*. Eurasian Journal of Applied Biotechnology, 2017(2): p. 64-67.

УДК: 579.6

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В ДРОЖЖАХ
PICHIA PASTORIS

Акишев Ж.^{1,2}, Әуез М.^{1,2}, Турсунбекова А.¹, Хасенов Б.^{1*}

¹ Национальный центр биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, г.Астана 010000,

² Евразийский Национальный Университет им. Л.Н.Гумилева, ул. Сатпаева, 2, г.Астана, 010008

*khassenov@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Химозин является основным ферментом, обладающим высокой степени специфичности по отношению к к-казеину и вследствие этого используемым в сыродельной промышленности. В данной работе представлены результаты по экспрессии гена козьего прохимозина в дрожжах *Pichia pastoris* и изучении молокосвертывающей активности рекомбинантного козьего химозина. Ген козьего прохимозина был интегрирован в хромосомную ДНК дрожжей и путем метанольной индукции осуществлена секреция прохимозина в культуру дрожжей. После активации химозин очищали методом последовательной анионной и катионообменной хроматографии. Биохимическое изучение показало, что снижение молокосвертывающей активности фермента наблюдалось при повышении pH. Наибольшая активность рекомбинантного козьего химозина проявлялась при 60°C и pH 4,5-5,0 и составила $7680 \pm 0,32$ и $8727 \pm 0,39$ для коровьего и козьего молока, соответственно. Общая протеолитическая активность фермента составила $7769,2 \pm 0,38$ Ед/мг. Полученные результаты позволяют предположить, что рекомбинантный козий химозин может быть использован в сыродельческой промышленности и имеет хорошие перспективы для практического применения при получении сыра из козьего молока.

Ключевые слова: фермент, *Pichia pastoris*, молокосвертывающая активность, сыр, коза

UDC:579.6

PRODUCTION OF RECOMBINANT MILK-CONVERTING ENZYME IN YEAST *PICHIA PASTORIS*

Akishev Zh.^{1,2}, Auyez M.^{1,2}, Tursunbekova A.¹, Khassenov B.^{1*}

¹ National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhyn Road, Astana, 010000;

² L.N.Gumilyev Eurasian National University, 2 Kanysh Satpayev Street, Astana, 010008;

*khassenov@biocenter.kz

Chymosin is the main enzyme with a high degree of specificity towards k-casein and is therefore used in the cheese industry. This work presents the results on the expression of the goat prochymosin gene in the yeast *Pichia pastoris* and the study of the milk-clotting activity of recombinant goat chymosin. The goat prochymosin gene was integrated into the chromosomal DNA of yeast and the secretion of prochymosin into yeast culture was carried out by methanol induction. After activation, chymosin was purified by sequential anion and cation exchange chromatography. A biochemical study showed that a decrease in the milk-clotting activity of the enzyme was observed with an increase in pH. The highest activity of recombinant goat chymosin was manifested at 60 °C and pH 4.5-5.0 and amounted to 7680 ± 0.32 and 8727 ± 0.39 for cow's and goat's milk, respectively. The total proteolytic activity of the enzyme was 7769.2 ± 0.38 U/mg. The results obtained suggest that recombinant goat chymosin can be used in the cheese industry and has good prospects for practical application in the production of cheese from goat's milk.

Keywords: enzyme, *Pichia pastoris*, milk-converting activity, cheese, goat