

НАРАБОТКА КОЗЬЕГО ХИМОЗИНА В УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ В КЛЕТКАХ *P. PASTORIS*

М. Әуез^{1,2}, Ж. Акишев^{1,2}, А. Турсунбекова¹, Б. Хасенов^{1*}

¹Национальный центр биотехнологии, Республика Казахстан, 000010, г.Астана, Кургальжинское шоссе, 13/5

²Евразийский Национальный Университет им. Л.Н.Гумилева, Республика Казахстан, 010008, г. Астана, ул. Сампаева, 2

*e-mail: khassenov@biocenter.kz

Химозин является основным ферментом, обладающим высокой степенью 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.

Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности козьего прохимозина показал, что белок имеет один возможный сайт N-гликозилирования: Asp333-His334-Ser335. Молекулярная масса рекомбинантного козьего химозина, полученного в дрожжах определена методом электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле, составила 42 ± 1 кДа. Из данных следует, что N-гликозилирование увеличивает молекулярную массу примерно на 3 кДа, поскольку предполагаемая молекулярная масса негликозилированного рекомбинантного химозина В из *C. hircus* составляет 38,6 кДа.

Чтобы проверить возможности масштабирования производства рекомбинантного химозина *C. hircus*, в биореакторе объемом 10 л культивировали *P. pastoris* трансформированный клон для ферментации дрожжевого штамма.

Было обнаружено, что рост биомассы хорошо коррелирует с выходом ферментной активности. Использование оптимальных условий роста, среды роста YPD+CAS+BMz (10 г/л) позволило достичь 55 г массы сухих клеток после 96 ч роста штамма *P. pastoris* GS115/pPICZ α A/СНproСУМВ. Продукция белка началась с после 24 ч культивирования и достигло 145 Ед/мл. Максимальная скорость производства фермента 12 150 Ед/ч наблюдалась на третий день. После 96 часов роста не наблюдалось дальнейшего роста выработки химозина, что совпало с началом стационарной фазы роста.

После активации химозин очищали методом последовательной анионной и катионообменной хроматографии. Биохимическое изучение показало, что снижение молокосвертывающей активности фермента наблюдалось при повышении рН. Наибольшая активность рекомбинантного козьего химозина проявлялась при 60°C и рН 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.