

УДК 577.112.083

ПОЛУЧЕНИЕ ХИМОЗИНА БЕЛУХИ (*Delphinapterus leucas*) В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Komagataella phaffii* И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА

© 2021 г. С. Ю. Филькин¹, Н. В. Чертова¹, С. С. Зацепин¹, Э. Г. Садыхов¹,
А. Н. Фёдоров¹, А. В. Липкин¹, *

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: lipus57@yahoo.com

Поступила в редакцию 30.10.2020 г.

После доработки 17.12.2020 г.

Принята к публикации 22.12.2020 г.

Получен штамм-продуцент *Komagataella phaffii* рекомбинантного химозина белухи *Delphinapterus leucas* с продуктивностью 80 мг/л, изучены физико-химические свойства фермента для возможного применения в пищевой промышленности. Удельная активность рекомбинантного химозина белухи была значительно ниже по сравнению с химозином быка и составляла 55 ИМСУ/мг. Химозин белухи обладал высокой неспецифической протеолитической активностью, что ухудшало его свойства, и делало невозможным его использование в пищевой промышленности. Можно предположить, что аминокислотные замены K221M и K294Q критически важны и приводят к ослаблению связывания мицелл казеина с рекомбинантным химозином белухи.

Ключевые слова: *Pichia pastoris*, метилотрофные дрожжи, химозин, белуха

DOI: 10.31857/S0555109921030028

Химозин различных жвачных животных в настоящее время активно используется в пищевом производстве. Химозин быка является аспаргатовой эндопептидазой и одним из наиболее изученных и востребованных ферментов в современной биохимии, широко используемый в сыроварении [1]. Более 70% используемого химозина в мировой пищевой промышленности – это рекомбинантный химозин. С большинством известных ферментов ученые ведут постоянную работу по созданию суперпродуцентов и получению мутантов с улучшенными свойствами. Поиск более активных и стабильных форм химозина из других видов животных для нужд пищевой промышленности ранее привел к открытию и использованию новых форм рекомбинантного химозина [2, 3]. Прежде всего, это относится к изучению химозина верблюда, который обладал большей термостабильностью и специфичностью: наилучшим соотношением молокосвертывающей активности (МСА) к протеолитической (ПА), МСА/ПА. Стоит отметить, что химозин яка также обладает высокой стабильностью в более широком диапазоне pH. Список химозинов других видов, охарактеризованных ранее, включает: химозин овцы, буйвола, яка, одногорбого и двугорбого верблюдов, а также альпака и марала [2, 4–8]. Однако, химозин

белухи ранее не был охарактеризован. На первый взгляд, эволюционная разница между жвачными животными и китообразными велика, но химозин белухи обладает высокой гомологией с химозином быка по первичной последовательности.

Белуха (*Delphinapterus leucas*) это морское млекопитающее семейства нарваловых, значительная часть популяции которого живет в арктических условиях. Молоко морских млекопитающих одно из наиболее жирных по составу, поэтому молодые детеныши набирают вес быстро [9]. Кроме того, первичная последовательность казеина белухи близка к казеину быка [10]. Экстремальные условия существования этого животного позволили предположить, что его химозины могут иметь изменения в структуре, связанные с адаптацией к арктическим условиям.

В качестве экспрессирующей системы для продукции химозина белухи были выбраны метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). Экспрессирующая система *K. phaffii* широко используется для создания рекомбинантных белков в пищевой индустрии и показывает свою состоятельность при создании рекомбинантных штаммов-продуцентов химозина быка, буйвола, верблюда и яка, что подтверждает удобство использования данной платформы [6, 11–13]. Кроме того,

использование штамма-продуцента *K. phaffii* позволяет проверить ранее разработанный метод выделения рекомбинантного фермента на химозине белухи *D. leucas*.

Цель работы – получение рекомбинантного химозина белухи *Delphinapterus leucas*, экспрессированного в метилотрофных дрожжах *K. phaffii*, и исследование его физико-химических свойств для возможного применения в пищевой индустрии.

МЕТОДИКА

Материалы. В работе использовали: ДНК-полимеразу (Pfu, “Stratagene Inc.”, США), эндонуклеазы рестрикции, T4 ДНК-лигазу (“New England Biolabs”, США), зеоцин (“Thermo Fisher Scientific”, США). Олигонуклеотиды синтезированы в “Евроген” (Россия). Наборы для выделения и экстракции ДНК “Qiagen GmbH” (Германия). Использовались сорбенты DEAE-сефароза и фенил-сефароза (“GE Healthcare”, Швеция).

Штаммы микроорганизмов и вектора. Штамм *Komagataella phaffii* GS115 his4[mut+] и вектор pPICZα получены от “Invitrogen” (США). Для клонирования использовали штамм *E. coli* X110 Gold endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)] (“Stratagene”, США). Компоненты сред производства “Acros Organics” (США).

Приготовление сред. Среды были приготовлены по протоколу [12]. Чашки Петри для селекции трансформантов заливали твердой средой YPD, содержащей (%): дрожжевой экстракт – 1, пептон – 2, глюкоза – 2, агар-агар – 2. Для селекции трансформантов использовали среду YPD с концентрацией зеоцина 100 и 200 мкг/мл. Среду VMGY, имеющую следующий состав (%): дрожжевой экстракт – 1.0; пептон – 2.0; дрожжевых азотистых оснований без аминокислот – 1.34; глицерин – 1.0; биотин – 4×10^{-5} ; 100 мМ фосфат калия, pH 6.0; использовали для культивирования трансформантов. Для индукции экспрессии среду VMGY заменяли средой VMMY, содержащей (%): дрожжевой экстракт – 1.0; пептон – 2.0; дрожжевые азотистые основания без аминокислот – 1.34; глицерин – 1.0, метанол – 1.0, биотин – 4×10^{-5} , 100 мМ фосфат калия, pH 6.0.

Синтез гена и конструкция вектора. Кодон-оптимизированный вариант гена прохимозина белухи *D. leucas* (A0A2Y9P896) для *K. phaffii* был синтезирован “Twist Bioscience” (США). Для конструирования экспрессирующего вектора ген прохимозина ChymBe был рестрицирован по сайтам XhoI/NotI и лигирован в вектор pPICZα по сайтам XhoI/NotI.

Трансформация *K. phaffii* и селекция трансформантов. Трансформацию метилотрофных дрож-

жей *K. phaffii* осуществляли методом электропорации. Электрокомпетентные клетки были приготовлены согласно протоколу: 10 мкг плазмиды pPICZα_ChymBe линейаризовали эндонуклазой рестрикции SacI и трансформировали в компетентные клетки GS-115 *K. phaffii*. Трансформированные клетки высевали на чашки Петри с твердой средой, содержащей 1.0% дрожжевого экстракта, 2% пептон, 2% глюкозы и 1 М сорбитол с концентрацией зеоцина 200 мкг/мл в соответствии с протоколом производителя.

Отобранные Mut⁺-трансформанты, устойчивые к зеоцину, анализировали на наличие вставки гена ChymBe при помощи ПЦР с олигонуклеотидными праймерами AOX1F 5'-GACTGGTTC-CAATTGACAAGC-3' и AOX1R 5'-GCAATGG-CATTCTGACATCC-3'.

Первичные культуры отобранных клонов выращивали в 50 мл пробирках в среде VMGY 12–16 ч при 30°C до достижения значения ОП₆₀₀ 3.0–4.0. Выросшие клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 3000 g и температуре 25°C. Клетки разбавляли средой VMMY до достижения ОП₆₀₀ 1.0. Экспрессию индуцировали 1%-ным метанолом. Каждые 24 ч добавляли 1%-ный раствор метанола для поддержания его постоянной концентрации. Время культивирования составляло 84 ч. Культуральную жидкость осаждали [14] ТХУ и анализировали присутствие химозина в 10%-ном ПААГ с ДНС по методу Лэммли [15].

Продукция рекомбинантного химозина белухи в ферментере. Отобранный клон культивировали в 150 мл среды VMGY до достижения ОП₆₀₀ 10 при 30°C. Затем инокулят переносили в ферментер “Biostat B+” (“Sartorius”, Германия) с 0.5 л минеральной среды BSM, следующего состава (г/л): глицерин – 70, КН₂РO₄ – 9.4, минеральная подпитка РТМ1 – 4.86 мл, (NH₄)₂SO₄ – 15.7, MgSO₄ – 4.6, СаСl₂ – 0.35, биотин – 4 мг. Для защиты от пенообразования использовали пеногаситель “Софэксил” в концентрации 0.5 г/л (“Софэкс-Силикон”, Россия). Значение pH поддерживали на уровне 4.0 при помощи титрования 10%-ными растворами серной кислоты и гидроксида аммония. После достижения максимального уровня плотности клеток проводили индукцию метанолом. В первые 48 ч добавляли 1% метанола и 2% сорбитола, затем добавляли только 1% метанола. При индукции температуру среды снижали до 26°C, а pH поднимали до уровня 5.5. Потребление метанола оценивали по уровню кислорода в культуральной жидкости, время культивирования составляло 84 ч с момента индукции метанолом.

Выделение и очистка рекомбинантного химозина. Культуральную жидкость, содержащую химозин, отделяли от клеток центрифугированием 3000 g 10 мин при 25°C. Супернатант фильтровали через (0.45 мкм) фильтр (“Millipore”, США),

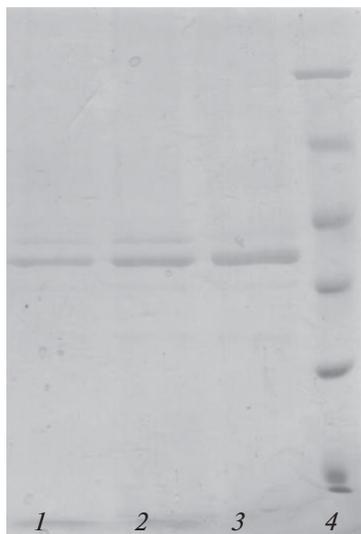


Рис. 1. Электрофореграмма белков химозина белухи, образуемых в биореакторе в ходе ферментации рPICzα-ChymBe за 24 (1), 48 (2), 72 (3) ч от начала индукции метанолом, (4) маркеры молекулярной массы 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4, 10 кДа.

инкубировали с DEAE-сефарозой, предварительно уравновешенной 50 мМ Na₂HPO₄, pH 5.5. Связавшийся белок элюировали тем же буфером, содержащим 0.3 М NaCl. Фракции, содержащие химозин, объединяли, добавляли хлорид натрия до 3.0 М концентрации. Объединенные фракции наносили на колонку, объемом 10 мл с фенил-сефарозой, предварительно уравновешенную 50 мМ Na₂HPO₄ с 3 М NaCl, pH 5.5. Элюцию проводили градиентом концентрации хлорида натрия (от 3.0 → 0.0 М). Фракции, содержащие химозин, собирали, количество белка (ОП₂₈₀) измеряли в каждой фракции спектрофотометрическим методом. Чистоту полученного белка подтверждали электрофорезом в ПААГ с ДНС.

Определение активности химозина. Молокосвертывающую активность определяли согласно [11]. Сухое обезжиренное молоко восстанавливали в объеме 100 мл, добавляли 50 мМ CaCl₂, инкубировали при 37°C 30 мин. К 1 мл молока при 37°C добавляли 25 мкл раствора химозина. Время образования сгустка определяли в соответствии с соответствующим временем свертывания контрольного образца химозина (600 IMCU/мл). Все измерения проводили независимо в трех повторах.

Протеолитическую активность определяли согласно [7] с незначительными изменениями. В качестве субстрата использовали раствор 1%-ного казеина быка ("Biotech", США) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 5.5. Образцы химозина разбавляли раствором субстрата в соотношении 1 : 4 и инкубировали при 35°C в течение 0, 30, 60, 90 и 180 мин. Реакцию останавливали добав-

лением ТХУ. Специфичность фермента определяли, как отношение молокозвертывающей активности к протеолитической, принимая отношение активностей химозина быка за 1.0.

Гомологичное моделирование структуры химозина и филогенетический анализ. Построение модели рекомбинантного химозина белухи осуществлялось при помощи программы "Modeller 9v12". Кристаллографическая структура химозина быка 4AA8 [16] использовалась в качестве шаблона. Для филогенетического анализа использовали программу "Clystal Omega".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Селекция трансформантов *K. phaffii*. Ген прохимозина белухи был синтезирован "Twist Bioscience", США. Аминокислотная последовательность гена взята из Uniprot (A0A2Y9P896). Плазмиды рPICzα содержала ген прохимозина белухи ChymBe под контролем AOX1 промотора. Для секретиции рекомбинантного прохимозина использовался альфа-фактор из *Saccharomyces cerevisiae* [17].

Электрокомпетентные клетки GS115 использовались для трансформации, селекцию трансформантов проводили на твердой среде YPD при концентрации зеоцина 100 мкг/мл. Для дальнейшего скрининга было отобрано 30 трансформантов, которые выращивались в 50 мл среды VMGY в 250 мл колбах. После 84 ч индукции, культуральную жидкость проверяли на наличие химозина и молокозвертывающую активность. Прохимозин был предварительно активирован понижением pH, как описано в методике. Активность химозина белухи составляла 3 IMCU/мл при концентрации белка 50 мг/л, что значительно меньше, чем для химозина быка, экспрессированного при тех же условиях. Клон трансформанта с максимальной активностью и наиболее высокой концентрации белка использовался для продукции прохимозина белухи в реакторе. Идентичность прохимозина белухи была подтверждена методом MALDI-масс-спектрометрии.

Культивирование химозина белухи в ферментере. Экспрессию прохимозина белухи в ферментере осуществляли, как описано в [12]. Выращивание дрожжей проводили в 0.5 л минеральной среды в течение 22 ч, при этом ОП₆₀₀ достигало значения 290. Экспрессию фермента индуцировали раствором 1%-ного метанола и 2%-ного сорбитола в течение 48 ч. На втором этапе индукции добавляли только 1%-ный раствор метанола, при этом концентрация белка достигала значения 80 мг/л при массе сухих клеток 120 г/л (рис. 1). Молокосвертывающая активность составляла 5 IMCU/мл, что значительно ниже соответствующих значений, достигнутых при выращивании продуцента химозина быка [12].

Выделение и очистка химозина белухи. Активацию, выделение и очистку химозина проводилась как описано в [12]. Выделение химозина осуществляли в несколько этапов: активация с понижением pH, нейтрализация, анионообменная хроматография, хроматография гидрофобных взаимодействий. Раствор активированного химозина разбавляли в соотношении 1 : 3 об./об. 50 mM натрий-фосфатным буфером pH 5.5. При двухстадийной очистке химозина последовательно использовали хроматографию на DEAE-сефарозе и фенил-сефарозе. Результаты всех стадий очистки представлены в табл. 1.

Ферментативные свойства химозина белухи. Очищенные рекомбинантные химозины из *B. taurus* и *D. leucas* обладали молокосвертывающей активностью – 220 и 55 IMCU/мг соответственно. Специфическая молокосвертывающая активность рекомбинантного химозина белухи была значительно ниже, при этом протеолитическая активность химозина белухи была выше по сравнению с соответствующей активностью химозина быка. Соотношение молокосвертывающей активности к протеолитической МСА/РА для химозина быка 1.0, при этом расчетное значение для белухи было ниже 0.2. Сравнение результатов с полученными ранее для других видов, показало, что такие химозины как химозин верблюда [16] и альпака [7] являются более специфичными по отношению к субстрату.

pH-оптимум химозина белухи был определен как 6.0 (рис. 2а), что немного выше оптимального значения для химозина быка (5.5–5.8). Значение температурного оптимума для рекомбинантного химозина белухи 35°C не отличалось от химозина быка (рис. 2б). Активность химозина белухи была максимальной при более низкой концентрации кальция по сравнению с химозином быка (рис. 2в), что может быть связано с морской средой обитания белухи.

Сравнение аминокислотных последовательностей химозина быка и белухи выявило несколько замен (рис. 3, 4). Как было ранее показано в статье [16] аминокислотные замены K221M и K294Q являются критически важными для проявления активности и, возможно, вели к ухудшению связывания казеиновых мицелл с химо-

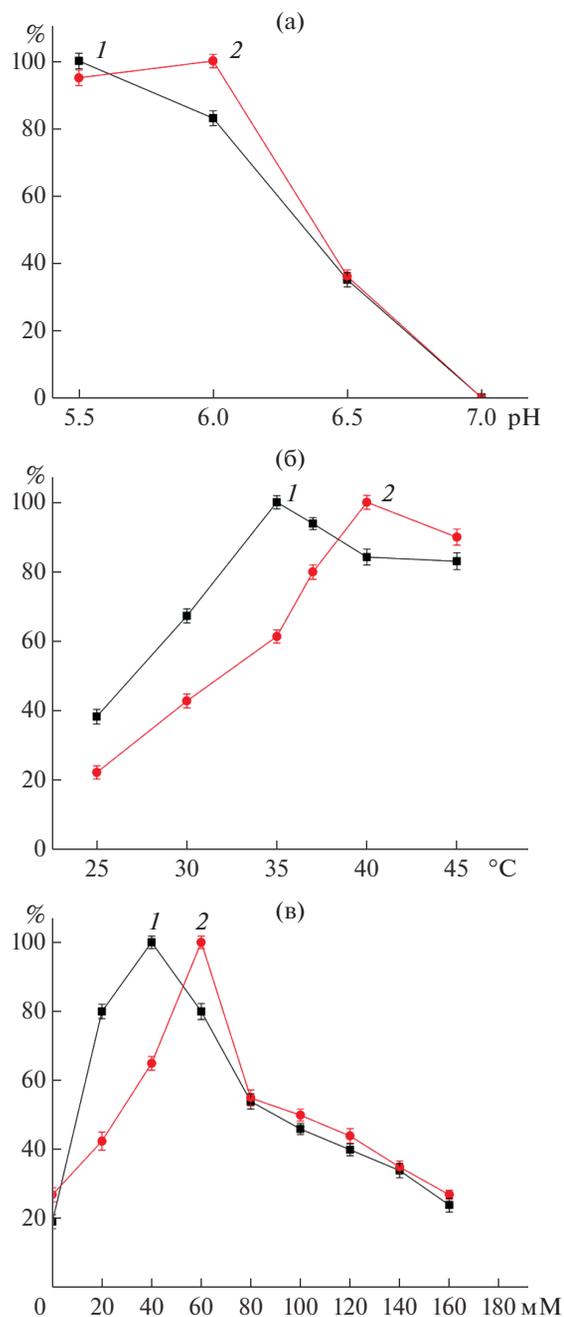


Рис. 2. Влияние pH (а), температуры (б) и хлорида кальция (в) на относительную молоко-свертывающую активность: 1 – химозин быка rChym *Bos taurus*, 2 – rChymBe химозин белухи *D. leucas*.

Таблица 1. Стадии выделения и очистки химозина

Стадия очистки	Общее количество химозина, мг	Активность химозина, IMCU/мл	Специфическая активность, IMCU/мг	Выход химозина по белку, %	Чистота препарата по белку, %
Супернатант	42.0	5.0	5.0	100	30
Анион-обменная хроматография	30.2	66 ± 10	37	71	60
Хроматография гидрофобных взаимодействий	25.2	230 ± 12	55	60	85–90

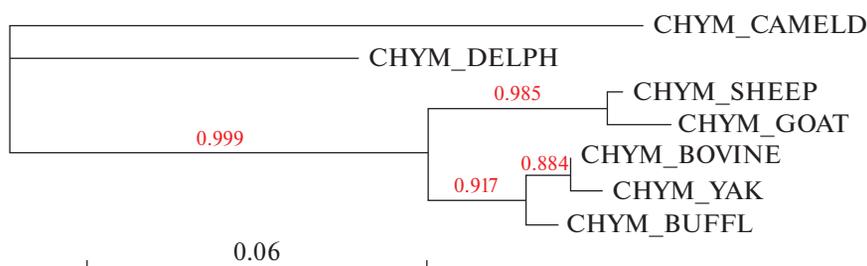


Рис. 3. Филогенетическое дерево химозинов различных видов: CHYM_CAMELD *Camelus dromedarius*, CHYM_DELPH *Delphinapterus leucas*, CHYM_SHEEP *Ovis aries*, CHYM_GOAT *Capra aegagrus*, CHYM_BOVINE *Bos taurus*, CHYM_YAK *Bos grunniens*, CHYM_BUFFL *Bubalus bubalis*. Масштаб соответствует с филогенетической дистанцией.

CHYM_CAMDR	GKVAREPLTSYLDQYFGKIYIGTPPQEFV V FDTGSSDLWVPSIYCKSNVCKNHHRFDP 60
CHYM_DLEUC	GEVASEPLTSYLDQYFGKIYIGTPSQEFV V FDTGSSDLWVPSYVCKSDACQNHHRFDP 60
CHYM_BOVIN	GEVASVPLTNYLDQYFGKIYLGTPPQEFV L FDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDP 60
CHYM_SHEEP	GEVASVPLTNYLDQYFGKIYLGTPPQEFV L FDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDP 60
	*:*** **.*:*****:*** **.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****
CHYM_CAMDR	RKSSTFRNLGKPLSIHYGTGSMGFLGYDVTVSNIVDPNQTVGLSTEQ P GEVFTY S EFD 120
CHYM_DLEUC	SMSSTFQNMGKPLSIQYGTGSMQGFGLGYDVTVSNIVDQQT V GLSTQ E PGD V FTY S EFD 120
CHYM_BOVIN	RKSSTFQNLGKPLSIHYGTGSMQGI L GYDVTVSNIVDI Q QTVGLSTQ E PGD V FTY A EFD 120
CHYM_SHEEP	RKSSTFQNLGKPLSIRYGTGSMQGI L GYDVTVSNIVDI Q QTVGLSTQ E PGD V FTY A EFD 120
	****.*:*****:*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
CHYM_CAMDR	GILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMDRHLVARDLFSVYMDRNGQGSMLTLGAI D PSY T Y G SL 180
CHYM_DLEUC	GILGLAYPSLASEYSVPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYLDNRNGQESMLTLGAI D PSY T Y G SL 180
CHYM_BOVIN	GILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRNGQESMLTLGAI D PSY T Y G SL 180
CHYM_SHEEP	GILGMAYPSLASEYSVPVFDNMMDRRLVAQDLFSVYMDRSGQGSMLTLGAI D PSY T Y G SL 180
	****.*:*****:*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
CHYM_CAMDR	HWVPVTLQQYWQFTVDSVTINGVAVACVGGCQA I LD T GT S V L F GPSSDI L K I Q M AIGATE 240
CHYM_DLEUC	HWI P VTLQ K YWQFTLDSVTIGGVVACDGGCQA I LD T GT S M L V GPSSDI L N I Q M AIGATQ 240
CHYM_BOVIN	HWVPVTVQQYWQFTVDSVTISGVVACVGGCQA I LD T GT S K L V GPSSDI L N I Q Q AIGATQ 240
CHYM_SHEEP	HWVPVTLQKYWQFTVDSVTISGAVVACVGGCQA I LD T GT S K L V GPSSDI L N I Q Q AIGATQ 240
	:*:*.*:*****:*****.*:*** ***** **.* *****:*** *****:
CHYM_CAMDR	N RYGEFDVNCGNLRSMP T VVFEINGRDYPLSPAYTSKDQGFCTSGFGQDN S EL W I L GD 300
CHYM_DLEUC	N RYGEFDIDCGSLSSMP T VVFEINSRMYPL T PSAYTNQDQGFCTSGFGQEN S Q Q W I GD 300
CHYM_BOVIN	N QYGEFDIDCDNLSYMP T VVFEINGKMYPL T PSAYTSQDQGFCTSGFQ S EN H S Q K W I L GD 300
CHYM_SHEEP	N QYGEFDIDCDLSYMP T VVFEINGKMYPL T PYAYTSQ E EGFCTSGFGQEN H SH S Q W I L GD 300
	*:*****:***.* *****:***:*** *****:*****:*****:*****:*****:*****
CHYM_CAMDR	V F I R EYYSV F DRANN R V G LAKAI 323
CHYM_DLEUC	V F I R EYYSV F DRANN R V G LAKAV 323
CHYM_BOVIN	V F I R EYYSV F DRANN L V G LAKAI 323
CHYM_SHEEP	V F I R EYYSV F DRANN L V G LAKAI 323
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Рис. 4. Выравнивание белковых последовательностей химозинов различных видов: CHYM_CAMELD *Camelus dromedarius*, CHYM_DELPH *Delphinapterus leucas*, CHYM_SHEEP *Ovis aries*. Жирным шрифтом выделены значимые аминокислотные замены в химозине белухи, по сравнению с химозинами быка, овцы, верблюда.

зином (рис. 5). В дополнение к этому, рекомбинантный химозин белухи обладал более высокой неспецифической активностью, что ограничивало возможность его использования в пищевой промышленности. Вероятно, снижение специфической активности к казеиновым мицеллам связано с уменьшением общего поверхностного заряда

рекомбинантного химозина белухи (+13) по сравнению с поверхностным зарядом химозина быка (+15) [16], а также положительно заряженным химозином верблюда (общий заряд +22). Другое возможное объяснение низкой активности рекомбинантного химозина белухи связано с субстратной специфичностью, так как в аминокислотных по-

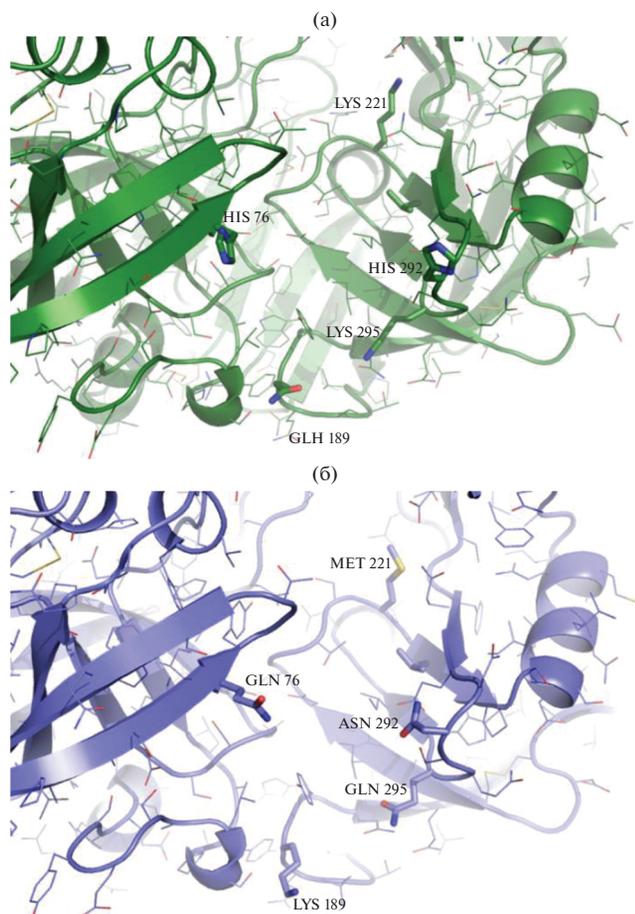


Рис. 5. Модель трехмерные структуры сайтов связывания химозина быка (а), 4AA8 [16] и белухи (б). Указаны позиции значимых аминокислотных замен в сайте связывания казеина.

следовательностях казеинов белухи и быка имеются одиночные отличия, такие как L103P и M106L [10].

В результате работы был получен штамм-продукцент с продуктивностью 80 мг/л. Однако специфическая активность рекомбинантного химозина белухи оказалась значительно ниже химозина быка и составила 55 IMCU/мг. Возможными причинами снижения удельной активности химозина белухи по сравнению с химозином быка являются аминокислотные замены K221M и K294Q, снижающие связывание отрицательно заряженной казеиновой мицеллы с химозином. При этом протеолитическая активность химозина белухи выше, что делает его непригодным для использования в пищевой промышленности.

При проведении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по соглашению от 26.11.2018 г. № 14.607.21.0207 (УИН RFMEFI60718X0207), ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar A., Grover S., Sharma J., Batish V.K. // Crit. Rev. Biotechnol. 2010. V. 30. № 4. P. 243–258.
2. Kappeler, S.R., van den Brink, H.(J.) M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E.B., Johansen, E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 2. № 342. P. 647–654.
3. Бельская С.В., Балабова Д.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Щербаков Д.Н., Ельчанинов В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 315–326.
4. Vallejo, J.A., Ageitos, J.M., Poza, M., Villa, T.G. // J. Dairy Sci. 2012. V. 95. № 2. P. 609–613.
5. Ersöz F., İnan M. // Protein Expr. Purif. 2019. V. 154. P. 126–133.
6. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 22. P. 10606–10610.
7. Бельская С.В., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Кригер А.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Ельчанинов В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 6. С. 585–593.
8. Belen'kaya S.V., Bondar A.A., Kurgina T.A., Elchani-nov V.V., Bakulina A. Yu., Rukhlova E.A., Lavrik O.I., Plyichev A.A., Shcherbakov D.N. // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 7. P. 916–928.
9. Oftedal O.T. // Encyclopedia of Dairy Sciences. /Ed. J. Fuquay, P.F. Fox and P. McSweeney, San Diego, CA.: Academic Press, 2011. V. 3. P. 563–580.
10. Manguy J., Shields D.C. // R. Soc. Open Sci. 2019. V. 6. № 10. P 1–17.
11. Noseda D.G., Recupero M., Blasco M., Bozzo J., Galvagno. M.A. // Protein Expr. Purif. 2016. V. 123. P. 112–121.
12. Филькин С.Ю., Чертова Н.В., Вавилова Е.А., Зацепин С.С., Эльдаров М.А., Садыхов Э.Г., Фёдоров А.Н., Липкин А.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. №. 6. С. 571–576.
13. Wang N., Wang K.Y., Li G., Guo W., Liu D. // Protein Expr. Purif. 2015. V. 111. P. 75–81.
14. Sagar A.J., Pandit M.W. // Biochim. Biophys. Acta. 1983. V. 743. № 3. P. 303–309.
15. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
16. Langholm Jensen J., Mølgaard A., Navarro Poulsen J.C., Harboe M.K., Simonsen J.B., Lorentzen A.M., Hjerno K., van den Brink J.M., Qvist K.B., Larsen S. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. № 5. P. 901–913.
17. Higgins D.R., Busser K., Comiskey J., Whittier P.S., Purcell T.J., Hoeffler J.P. // Methods Mol. Biol. 1998. V.103. P. 41–53.

**Preparation of Beluga Whale (*Delphinapterus leucas*) Chymosin
in the Methylophilic Yeast *Komagataella phaffii*
and Characterization of the Recombinant Enzyme**

S. Yu. Filkin^a, N. V. Chertova^a, S. S. Zatsepin^a, E. G. Sadykhov^a, A. N. Fedorov^a, and A. V. Lipkin^{a, *}

*^aBach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology"
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: lipus57@yahoo.com*

The main purpose of this work was the purification a producer strain of recombinant beluga whale (*Delphinapterus leucas*) chymosin and the investigation of physico-chemical properties of recombinant beluga whale chymosin. We have obtained a producer strain *Komagataella phaffii* with productivity of 80 mg/L. The specific activity of the recombinant beluga chymosin was 55 IMCU/mg, which is significantly lower than that of recombinant bovine chymosin. The beluga whale chymosin has a high nonspecific proteolytic activity, which reduces the value of this enzyme for food industry. Apparently, the amino acid substitutions K221M and K294Q are critically important and lead to a lower binding of casein micelles to the recombinant chymosin of the beluga whale.

Keywords: chymosin, *Pichia pastoris*, methylophilic yeast, beluga whale