ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2023, том 59, № 5, с. 465–471

УДК 577.151.45

СРАВНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМОЗИНОВ АЛЬПАКА (*Vicugna pacos*), ПОЛУЧЕННЫХ В ПРО- И ЭУКАРИОТЕЧЕСКОЙ СИСТЕМАХ ЭКСПРЕССИИ

© 2023 г. С. В. Беленькая[1, 2], В. В. Ельчанинов[3], В. Ю. Чиркова[4], Д. Н. Щербаков[1, 4, *]

[1] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, 630559 Россия*

[2] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

[3] *Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул-51, 656910 Россия*

[4] *Алтайский государственный университет, Барнаул, 656049 Россия*

**e-mail: dnshcherbakov@gmail.com*

Поступила в редакцию 28.03.2023 г.
После доработки 23.04.2023 г.
Принята к публикации 28.04.2023 г.

На основе дрожжей *Kluyveromyces lactis* разработан штамм-продуцент рекомбинантного прохимозина альпака (*Vicugna pacos*). Проведен сравнительный анализ биохимических свойств рекомбинантного химозина альпака, полученного в системах экспрессии *K. lactis* и *Escherichia coli*. Установлено, что рекомбинантный химозин альпака, синтезированный в *K. lactis* превосходил аналог, полученный в *E. coli*, по числу оборотов фермента в 12.9 раза, а по каталитической эффективности – в 2.9 раза. По сравнению с химозином, экспрессированным в *E. coli,* фермент, полученный в эукариотическом продуценте, имел повышенный на 5°C порог термостабильности. Замена прокариотического продуцента на эукариотический, усиливала падение молокосвертывающей активности фермента в ответ на изменение pH молока от 6.1 до 6.9, что сопровождалось увеличением продолжительности коагуляции на 8–35%. При повышении концентрации $CaCl_2$ в субстрате коагуляционная активность целевого фермента, синтезированного в *E. coli* была на 12–14% выше, чем у его аналога, полученного в *K. lactis*.

Ключевые слова: рекомбинантный химозин альпака, прокариотическая система экспрессии, эукариотическая система экспрессии, *Kluyveromyces lactis*, биохимические свойства, кинетика Михаэлиса-Ментен

DOI: 10.31857/S0555109923050033, **EDN:** NMCTLZ

Химозин (**Хн**) (КФ 3.4.23.4) – аспарагиновая протеаза, которая широко применяется в качестве коагулянта молока при производстве различных видов сычужных сыров. Традиционно Хн получали из сычугов молочных телят, но сегодня его основным источником являются генетически модифицированные штаммы микроорганизмов [1]. Актуальность исследования новых видов рекомбинантных Хн (**рХн**) обусловлена возможностью обнаружения ферментов, превосходящих по комплексу биохимических свойств уже известные генно-инженерные коагулянты молока [2].

Общеизвестно, что у прокариотов, в отличие от эукариотов, почти полностью отсутствуют посттрансляционные модификации (**ПТМ**) белков. В подавляющем большинстве случаев, одни и те же рекомбинантные белки, полученные в про- и эукариотической системе экспрессии, различаются по физико-химическим и биохимическим характеристикам. Однако однозначного ответа на вопрос о характере влиянии системы экспрессии на биохимические свойства получаемых рекомбинантных белков – не существует. Литературные данные, посвященные изучению этого вопроса, [3–9] свидетельствуют, преимущественно, о том, что *a priori* прогнозировать влияние системы экспрессии на биохимические свойства целевого рекомбинантного белка крайне затруднительно.

Сравнение свойств субъединицы B термолабильного энтеротоксина (**LTB**) кишечной палочки, полученного в системах экспрессии *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* и *Escherichia coli,* показало, что в первом случае, за счет гликозилирования, целевой белок имел бóльшую молекулярную массу, а также повышенную аффинность к ганглиозиду GM1, что усиливало его иммуноадьювантные свойства. Интересно, что уровень экспрессии LTB в системе *P. pastoris* был примерно в 3 раза

выше, чем в гомологичном для этого белка прокариотическом продуценте [3].

В работе [4] представлен сравнительный анализ кинетических параметров рекомбинантной дофамин-сульфотрансферазы человека, синтезированной в системах продукции *E. coli, Saccharomyces cerevisiae* и в клетках млекопитающих (трансформированные фибробласты обезьяны, линия COS-7 и фибробласты хомячка, линия V79). Показано, что K_m сульфотрансфераз, экспрессированных в про- и эукариотических системах были примерно равны и составляли около 1 мкМ. В то же время, отношение V_{max}/K_m у фермента, полученного в *E. coli,* было в 31, 138 и 629 раз выше, чем для сульфотрансфераз, синтезированных в *S. cerevisiae,* V79 и COS-7, соответственно.

Система экспрессии – *P. pastoris* или *E. coli* – не оказывала влияния на pH- и температурный оптимумы рекомбинантной фитазы бактерий рода *Shigella*. Оба фермента проявляли высокую специфичность к фитиновой кислоте и были резистентны к действию трипсина. Однако удельная активность фермента, полученного в эукариотическом продуценте, была в 3.1 раза ниже. По термостабильности при 60 и 70°C фитаза, синтезированная клетками *P. pastoris,* превосходила фермент, синтезированный в системе экспрессии *E. coli,* на 33 и 24% соответственно [5].

По данным [6], при экспрессии рекомбинантной монооксигеназы 1B1 кролика система (*E. coli* или *S. cerevisiae*) не оказывала достоверного влияния на термостабильность, электрофоретические и каталитические свойства фермента.

Противоречивые данные получены для рекомбинантных белков и ферментов, вовлеченных в систему гемостаза. Генно-инженерные внеклеточные домены тканевого фактора человека, синтезированные в дрожжах (*S. cerevisiae*), бактериях (*E. coli*) и клетках млекопитающих (культура CHO), обладали почти идентичными прокоагулянтными свойствами и, согласно спектрам ядерного магнитного резонанса, кругового дихроизма и флуоресценции, демонстрировали высокую структурную гомологию [7]. Фибринолитическая активность рекомбинантной человеческой урокиназы, полученной в бактериях (*E. coli*) и клеточных культурах млекопитающих (клетки миеломы мыши), была в 5 раз выше, чем у аналога, синтезированного в дрожжах (*P. pastoris*) [8].

Рекомбинантные сахарозосинтазы 1 картофеля, экспрессированные в *S. cerevisiae* и *E. coli* количественно и качественно различались по субстратной специфичности, а также по параметрам кинетики Михаэлиса–Ментен [9]. Сравнение биохимических свойств рекомбинантных химозинов, синтезированных в про- и эукариотических системах экспрессии, не проводилось.

Таким образом, скудные и неоднозначные экспериментальные данные не позволяют обобщить наши представления о влиянии системы экспрессии на свойства целевого рекомбинантного фермента и в каждом конкретном случае требуют экспериментального изучения.

Цель работы – сравнительный анализ биохимических свойств рекомбинантного химозина альпака (**рХн-Vic**), полученного в системах экспрессии *E. coli* (**рХн-Vic-EC**) и *K. lactis* (**рХн-Vic-KL**).

МЕТОДИКА

Конструирование экспрессионного вектора. Для получения рекомбинантного прохимозина (**рПроХн**) альпака в дрожжевой системе был сконструирован оригинальный плазмидный вектор pPOG-Vic (рис. 1), обеспечивающий синтез и секрецию зимогена целевого белка клетками *K. lactis*. Вектор включал следующие структурные элементы: последовательность промотора глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (**GAP**), сигнальную последовательность (**Ost2**); нуклеотидную последовательность прохимозина альпака (**VIC**); терминатор транскрипции гена цитохром С-оксидазы *S. cerevisiae* (**CYC**); промотор гена алкогольдегидрогеназы (**ADH1 promoter**); ген фактора устойчивости к зеоцину (**BleoR**); ориджин репликации (**ori**); ген фактора устойчивости к ампициллину (**AmpR**).

Фрагменты вектора (рис. 1) были амплифицированы с использованием рассчитанных праймеров (табл. 1), выделены из агарозного геля и очищены при помощи набора Cleanup Standard (“Евроген”, Россия).

Сборку фрагментов ДНК проводили с использованием Gibson Assembly Master Mix (“NEB”, США). Полученной реакционной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* (штамм NEB Stable). Для проверки корректности сборки, плазмидную ДНК клонов секвенировали по методу Сэнгера. В результате получали вектор pPOG-Vic (рис. 1).

Получение рХн альпака в системе экспрессии *K. lactis*. Для получения рекомбинантного штамма-продуцента, электрокомпетентные клетки *K. lactis* (штамм SVB-1) трансформировали вектором pPOG-Vic. Клетки продуцента рПроХн альпака культивировали по ранее описанной методике [10]. Зимоген, накапливающийся в культуральной жидкости, активировали путем ступенчатого изменения pH [11] и получали препарат рХн-Vic-KL.

Получение рХн альпака в системе экспрессии *E. coli*. Рекомбинантный Хн альпака, экспрессированный в системе *E. coli* (штамм BL21), получали по методике, описанной в работе [12].

Исследование биохимических свойств. Для сравнения полученных рХн использовали пока-

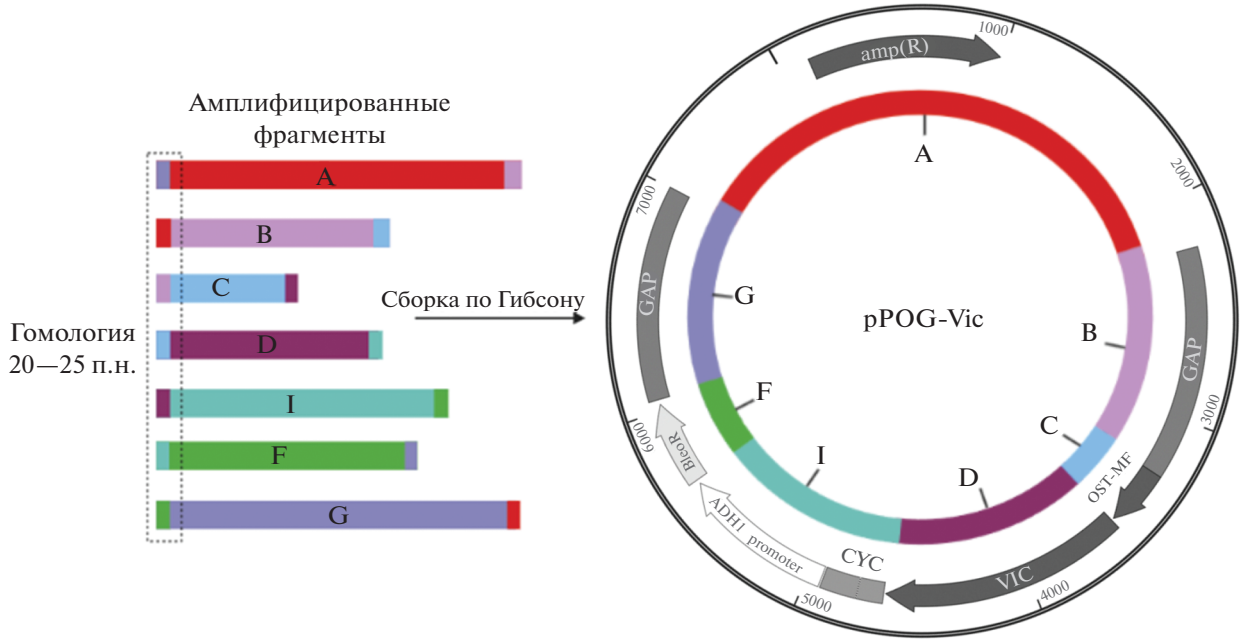

Рис. 1. Схема конструирования вектора pPOG-Vic.

затели кинетики Михаэлиса–Ментен и биохимические свойства, характеризующие молокосвертывающие протеиназы: молокосвертывающую активность (**МА**), общую протеолитическую активность (**ПА**), коагуляционную специфичность (**МА/ПА**), термостабильность (**ТС**), зависимость МА от pH и концентрации ионов кальция в молочном субстрате.

Общую и удельную МА, неспецифическую ПА, МА/ПА, ТС и зависимость МА от pH, концентрации ионов кальция определяли по методикам, опубликованным в работах [13, 14]. При опреде-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для амплификации компонентов вектора pPOG-Vic

Название	Последовательность (5'–3')	Матрица	ПЦР-продукт
A-F	gaattctaagtatcccgggaagctt	pJet 1.2	ori и AmpR
A-R	aggtagtatgacctgcagtaagtatcacgtgaagctt		
B-F	aggtcatactacctcggaagattcc	ДНК *K. lactis*	5'-GAP
B-R	ccaaacttgtctcattgtgtaatattctttttttttacttgaaactg		
C-F	gaatattacacaatgagacaagtttggttctcttggatcg	pGH-Ost2	Ost2
C-R	ggatccagcctctctttttttcca		
D-F	agagaggctggatccgcagagataactcgtatacctttatacaagggc	pGH-Vic	VIC
D-R	aaggaaaaggggcctgtcctaggctagatggcctttg		
I-F	acaggcccctttttcctttgtcg	pKLAC2	CYC и ADH1 promoter
I-R	ggtggcagatctggaattgct		
F-F	agcaattccagatctgccaccatggccaagttgaccagtg	pPICZ	BleoR
F-R	atcccagtcggtactgactcagtcctgctcctcggc		
G-F	gtcagtaccgactgggatcttg	ДНК *K. lactis*	3'-GAP
G-R	tcccgggatacttagaattccatgtccggtggtgacc		

Таблица 2. Параметры кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантных химозинов

Препарат	V_{max}, нМ/с	K_m, мкМ	k_{cat}, $с^{-1}$	k_{cat}/K_m, $мкМ^{-1}$ $с^{-1}$
рХн-Vic-KL	938.3 ± 66.0	51.1 ±1.5	150.1 ± 10.6	2.9 ± 0.3
рХн-Vic-EC	145.0 ± 14.5	11.6 ± 0.2	11.6 ± 1.2	1.0 ± 0.1
рХн-Bos	177.3 ± 29.8	22.9 ± 2.8	141.9 ± 23.9	6.2 ± 0.7

Таблица 3. Удельная молокосвертывающая активность, общая протеолитическая активность и специфичность рекомбинантных химозинов

Препарат	Удельная МА, УЕ/мг	Удельная МА, %	Общая ПА, %	Специфичность, МА/ПА
рХн-Vic-KL	107500 ± 1182	129	26	5.0
рХн-Vic-EC	85710 ± 771	103	34	3.0
рХн-Bos	83394 ± 1167	100	100	1.0
рХн-Cam	134698 ± 1616	162	24	6.8

лении биохимических свойств в качестве ферментов сравнения использовали коммерческие препараты рХн коровы (**рХн-Bos**) и рХн верблюда (**рХн-Cam**), производства компании “Chr. Hansen” (Дания).

Определение параметров кинетики Михаэлиса–Ментен. Предельную скорость реакции (V_{max}), константу Михаэлиса (K_m), число оборотов фермента(kcat) и каталитическую эффективность (k_{cat}/K_m) определяли по методике [14], с использованием флуоресцентно меченого пептидного субстрата, имитирующего Хн-чувствительную область ϰ-казеина (**ϰ-CN**) коровы.

Статистическую обработку данных проводили в вычислительной среде программы Microsoft Excel (“Microsoft Corporation”, США). Результаты определения количественных переменных представлены в виде среднего арифметического (M) с указанием среднеквадратического отклонения (±SD). На графиках не указывали 95%-ный доверительный интервал, поскольку его значения были меньше 10% от значений переменных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика Михаэлиса-Ментен. Система экспрессии существенно влияла на кинетические параметры рХн-Vic (табл. 2). Значения K_m показали, что аффинность рХн-Vic-KL к флуоресцентно меченому пептидному субстрату в 4.4 и 2.2 раза ниже, чем у рХн-Vic-EC и рХн-Bos соответственно. По-видимому, активный центр рХн-Vic-KL быстрее освобождался от продуктов гидролиза субстрата, что отражалось на его k_{cat} и k_{cat}/K_m. В результате, рХн-Vic, синтезированный в *K. lactis*, превосходил аналог, полученный в *E. coli*, по числу оборотов фермента более чем на порядок (в 12.9 раза), а по каталитической эффективности – в 2.9 раза.

Превосходство рХн-Bos над рХн-Vic-EC и рХн-Vic-KL в каталитической эффективности может быть связано с различиями в первичной структуре Хн-чувствительных участков к-CN коровы и представителей семейства Верблюдовые, к которым относится *Vicugna pacos*. По сравнению с к-CN коровы, на участке E96-N119 к-CN альпака обнаруживается 9 аминокислотных замен. Одна из них затрагивает Хн-чувствительную связь F105–M106, в которой наблюдается замена M106 → I [2].

Молокосвертывающая активность, специфичность. Поскольку МА является частным случаем общей ПА фермента, направленной на гидролиз связи F105–M106 в молекуле к-CN, для сравнения специфичности разных рХн используется соотношение МА/ПА. Специфичность новых видов рХн традиционно сравнивается с характеристиками рХн коровы – первого генно-инженерного коагулянта молока для сыроделия [1, 2, 15].

По специфичности рХн-Vic-KL и рХн-Vic-EC превосходили рХн коровы, но уступали рХн одногорбого верблюда. При этом, удельная МА рХн-Vic-KL оказалась на 25% выше, чем у рХн-Vic-EC. По сравнению с рХн-Vic, полученным в *E. coli,* экспрессия целевого фермента в *K. lactis* приводила к снижению его общей ПА на 24% (табл. 3). В результате, соотношение МА/ПА рХн-Vic-KL становилось в 5 раз выше, чем у рХн-Bos и приближалось к показателю рХн-Cam, специфичность которого по отношению к связи F105-M106 была максимальной среди известных молокосвертывающих аспартатных протеиназ [1, 15].

Термостабильность. Порогом ТС считали температуру прогревания, при которой снижение остаточной МА фермента составляло ≥20%. Согласно данному критерию, пороги ТС рХн-Vic-

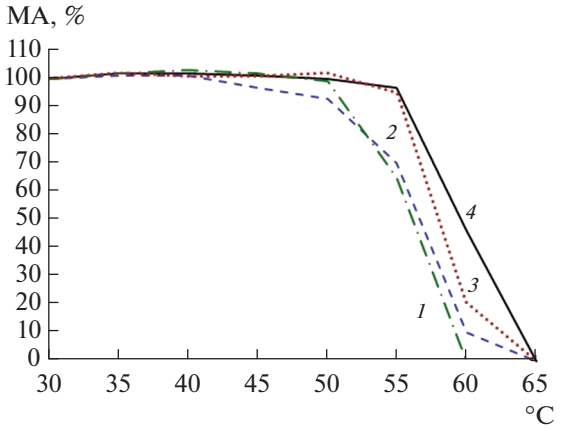

Рис. 2. Зависимость остаточной молокосвертывающей активности (МА, %) от температуры прогревания (*T*, °C): *1* – рХн-Bos; *2* – рХн-Vic-EC; *3* – рХн-Cam; *4* – рХн-Vic-KL.

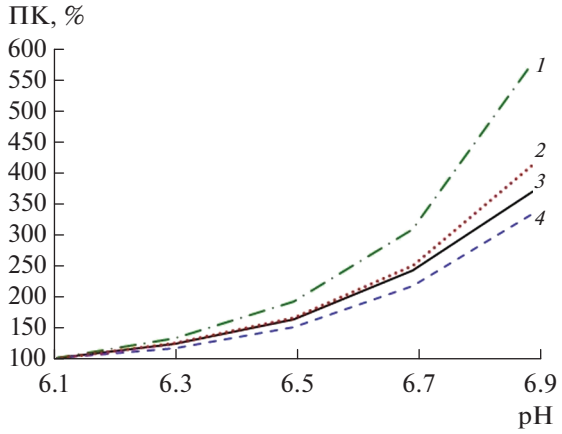

Рис. 3. Зависимость продолжительности коагуляции (ПК) от pH молочного субстрата: *1* – рХн-Bos; *2* – рХн-Cam; *3* – рХн-Vic-KL; *4* – рХн-Vic-EC.

EC и рХн-Vic-KL равны 55 и 60°C соответственно (рис. 2). Пороги ТС рХн коровы и верблюда также различались на 5°C, что согласуется с данными других авторов [1].

Низкую ТС рХн-Vic-EC можно объяснить незавершенным рефолдингом фермента, полученного в прокариотической системе экспрессии, в частности, неполным (или некорректным) замыканием дисульфидных связей. По данным [16] разрушение связи C45–C50 в молекуле рХн коровы, экспрессированного в *E. coli*, значительно снижает его ТС [16]. Другое возможное объяснение этого феномена – отсутствие ПТМ гетерологичных белков, полученных в *E. coli*. В частности, это относится к гликозилированию, которое может влиять на терморезистентность Хн. Так, в работе [17] приводятся данные, свидетельствующие о том, что при снижении степени гликозилирования рХн одногорбого верблюда ТС фермента – падает.

Зависимость МА от pH. Говоря о влиянии pH на продолжительность ферментативного свертывания молока, необходимо учитывать два аспекта. Во-первых, концентрация H^+ влияет на баланс электростатических и гидрофобных сил, стабилизирующих мицеллы казеина [18, 19]. При повышении pH молока, суммарные отрицательные заряды казеинов увеличиваются. Как следствие, возрастают силы межмицеллярного электростатического отталкивания и ослабевают казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия, что негативно влияет на скорость сычужного свертывания молока. Во-вторых, изменение pH субстрата отражается на ферментативных свойствах Хн. Оптимумы активности различных вариантов рХн находятся в диапазоне pH 4.5–5.5 [https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.4#pH%20OPTIMUM] и удаление от него приводит к снижению их коагуляционной способности.

По мере нарастания pH молока в диапазоне 6.1–6.9 скорость образования сгустка под действием генно-инженерных химозинов-замедляется [1].

Графики, представленные на рис. 3, показали, что наибольшую чувствительность к снижению концентрации H^+ в молочном субстрате демонстрировал рХн коровы, а наименьшую – рХн альпака, полученный в эукариотической системе продукции. При увеличении pH с 6.1 до 6.9 продолжительность коагуляции (**ПК**) молока, после внесения рХн-Bos, увеличивалась в 5.8 раза. Генно-инженерные Хн представителей семейства Верблюдовых (*Camelidae*) – одногорбого верблюда и альпака – были менее чувствительны к увеличению pH молока. Повышение pH с 6.1 до 6.9 замедляло свертывание молока, после внесения рХн-Vic-EC, рХн-Vic-KL и рХн-Cam, в 3.3, 3.7 и 4.1 раза соответственно.

Сравнивая рХн-Vic-EC и рХн-Vic-KL следует отметить постоянно увеличивающиеся различия в коагуляционной способности этих ферментов по мере увеличения pH субстрата. Если при pH 6.3 продолжительность свертывания молока под действием рХн-Vic-KL была всего на 8% больше, чем для рХн-Vic-EC, то при pH 6.9 эта разница составляла уже 35%. Таким образом, замена прокариотической системы экспрессии на эукариотическую усиливала негативную чувствительность коагуляционной активности рХн альпака к нарастанию pH субстрата в диапазоне 6.1–6.9, что приводило к увеличению продолжительности образования молочного сгустка на 8–35%.

Зависимость МА от концентрации ионов кальция. Внесение хлорида кальция в молоко ускоряет его свертывание под действием различных ви-

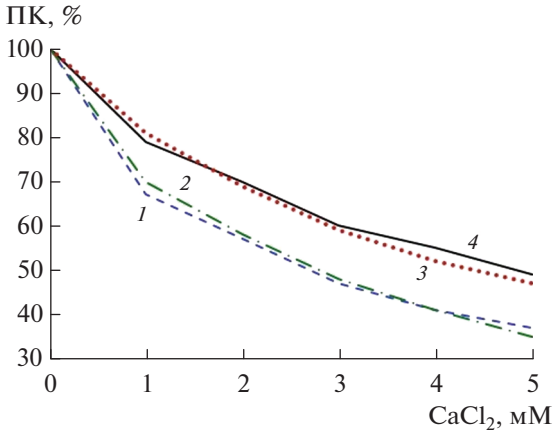

Рис. 4. Зависимость продолжительности коагуляции (ПК) от концентрации хлорида кальция (мМ) в молочном субстрате: *1* – рХн-Bos; *2* – рХн-Vic-EC; *3* – рХн-Cam; *4* – рХн-Vic-KL.

дов натуральных и генно-инженерных химозинов [1]. Стимулирующее действие экзогенного кальция обусловлено его влиянием и на первичную (ферментативную), и на вторичную (агрегационную) фазу сычужного свертывания молока. Повышение концентрации Ca^{2+} в молоке вызывает экранирование отрицательного заряда стабилизирующего "волоскового слоя", который образуют на поверхности казеиновых мицелл анионные С-терминальные участки к-CN. Снижение плотности анионных групп на поверхности мицелл облегчает доступ молокосвертывающего фермента к Хн-чувствительной связи к-CN (F105–M106) и ускоряет удаление "волоскового слоя" в первичной фазе сычужного свертывания. Во вторичной фазе экзогенный кальций усиливает агрегацию дестабилизированных мицелл за счет образования ионных мостиков между фосфорилированными остатками серина альфа- и бэта-казеинов сокращая, тем самым, продолжительность коагуляции молока [20].

Коммерческие рХн различаются по чувствительности к концентрации ионов кальция в молоке. Согласно литературным данным [1, 13, 15], коагуляционная активность рХн одногорбого верблюда в меньшей степени зависит от концентрации хлорида кальция, чем активность рХн коровы.

В данном исследовании при внесении в молоко 1 мМ $CaCl_2$ продолжительность образования сгустка под действием рХн-Bos и рХн-Cam сокращалась на 30 и 19% соответственно. Разница в 11–12% между этими ферментами сохранялась на протяжение всего исследуемого диапазона концентраций хлорида кальция (рис. 4).

Система экспрессии оказывала значительное влияние на чувствительность рХн альпака к изменению концентрации хлорида кальция в диапазоне 1–5 мМ. Фермент, синтезированный в прокариотической системе, ведет себя как рХн коровы, а Хн полученный в *K. lactis*, напротив, в большей степени напоминает рХн-Cam (рис. 4).

Так же, как и в паре "фермент коровы – фермент верблюда", рХн-Vic-EC свертывал молоко на 12–14% быстрее, чем рХн-Vic-KL, во всем исследованном диапазоне концентраций $CaCl_2$. Предположительно, разная чувствительность химозинов, синтезированных в про- и эукариотах, к изменениям концентрации Ca^{2+} обусловлена наличием посттрансляционного процессинга целевого фермента в системе экспрессии *K. lactis* и его отсутствием в *E. coli* [21].

Таким образом, впервые проведено сравнение биохимических свойств рХн альпака, полученного в системах экспрессии *E. coli* и *K. lactis*. Показано, что замена прокариотического продуцента рХн-Vic на эукариотический, на 8–35% усиливала падение МА фермента, в ответ на изменение pH молока от 6.1 до 6.9, приводила к росту его ТС на 5°C, на 12–14% снижала чувствительность МА к изменению концентрации хлорида кальция в диапазоне 1–5 мМ, а также увеличивала коагуляционную специфичность и улучшала показатели каталитической эффективности фермента.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Belenkaya S.V., Balabova D.V., Belov A.N, Koval A.D., Shcherbakov D.N., Elchaninov V.V.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 4. P. 363–372.
2. *Ельчанинов В.В.* Проблема поиска новых молокосвертывающих ферментов для сыроделия: критерии выбора источников генов для получения рекомбинантных химозинов. Барнаул: Изд. Алтайского гос. ун-та, 2021. 170 с.
3. *Ma X., Yao B., Zheng W., Li L.* // J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 20. № 3. P. 550–557.
4. *Dajani R., Sharp S., Graham S., Bethell S.S., Cooke R.M., Jamieson D.J., Coughtrie M.W.* // Protein Expr. Purif. 1999. V. 16. №1. P. 11–18.

5. *Pal Roy M., Mazumdar D., Dutta S., Saha S.P., Ghosh S.* // PloS one. 2016. V. 11. № 1. P. e0145745.

6. *Lawton M.P., Philpot R.M.* // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 8. P. 5728–5734.

7. *Stone M.J., Ruf W., Miles D.J., Edgington T.S., Wright P.E.* // Biochem. J. 1995. V. 310. № 2. P. 605–614.

8. *Wang P., Zhang J., Sun Z., Chen Y., Gurewich V., Liu J.N.* // Thromb. Res. 2000. V. 100. № 5. P. 461–467.

9. *Sauerzapfe B., Engels L., Elling L.* // Enzyme Microb. Technol. 2008. V. 43. № 3. P. 289–296.

10. *Belenkaya S.V., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N.* // Biotekhnologiya. 2021. V. 37. № 5. P. 20–27.

11. *Рудометов А.П., Беленькая С.В., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Кригер А.В., Ельчанинов В.В.* // Сыроделие и маслоделие. 2017. Т. 6. С. 40–43.

12. *Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 6. P. 569–576.

13. *Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 6. P. 647–656.

14. *Belenkaya S.V., Bondar A.A., Kurgina T.A., Elchaninov V.V., Bakulina A.Yu., Rukhlova E.A., Lavrik O.I., Ilyichev A.A., Shcherbakov D.N.* // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 7. P. 781–791.

15. *Kappeler S.R., van den Brink H.(J.)M., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E.B., Johansen E.* // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2006. V. 342. № 2. P. 647–654.

16. *Zhang Y., Li H., Wu H., Don Y., Liu N., Yang K.* // Biochim. Biophys. Acta (BBA). 1997. V. 1343. № 2. P. 278–286.

17. *Jensen J.L., Molgaard A., Poulsen J.-C.N., Harboe M.K., Simonsen J.B., Lorentzen A.M., Hjerno K., van den Brink J.M., Qvist K.B., Larsen S.* // Acta Cryst. (Section D, Biol. Crystallogr.). 2013. V. 69. № 5. P. 901–913.

18. *Horne D.S.* // Curr. Opin. Coll. Interface Sci. 2002. V. 7. P. 456–461.

19. *Horne D.S.* // Int. Dairy J. 1998. V. 8. P. 171–177.

20. *Lucey J.A.* // J. Dairy Sci. 2002. V. 85. № 2. P. 281–294.

21. *Spohner S.C., Schaum V., Quitmann H., Czermak P.* // J. Biotechnol. 2016. V. 222. P. 104–116.

Comparison of Biochemical Properties of Recombinant Alpaca (*Vicugna pacos*) Chymosins Produced in Pro- and Eukaryotic Expression Systems

S. V. Belenkaya[a, b], V. V. Elchaninov[c], V. Y. Chirkova[d], and D. N. Shcherbakov[a, d, *]

[a] *State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia*

[b] *Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

[c] *Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnologies, Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul-51, 656910 Russia*

[d] *Altai State University, Barnaul, 656049 Russia*

**e-mail: dnshcherbakov@gmail.com*

Based on the yeast *Kluyveromyces lactis*, a strain-producer of recombinant alpaca prochymosin (*Vicugna pacos*) was developed. A comparative analysis of the biochemical properties of recombinant alpaca chymosin obtained in the expression systems of *K. lactis* and *Escherichia coli* was carried out. It was found that the recombinant alpaca chymosin synthesized in *K. lactis* exceeds the analog obtained in *E. coli* by 12.9 times in the number of enzyme turnovers, and by 2.9 times in catalytic efficiency. Compared to chymosin expressed in *E. coli*, the enzyme obtained in a eukaryotic producer has a thermal stability threshold increased by 5°C. Replacing a prokaryotic producer with a eukaryotic one enhances the negative sensitivity of the milk-clotting activity of recombinant alpaca chymosin to an increase in substrate pH in the range of 6.1–6.9, which is accompanied by an increase in the duration of coagulation by 8–35%. With an increase in the concentration of CaCl2 in the substrate, the coagulation activity of the target enzyme synthesized in *E. coli* was 12–14% higher than that of its analogue obtained in *K. lactis*.

Keywords: recombinant chymosin alpaca, prokaryotic expression system, eukaryotic expression system, *Kluyveromyces lactis*, biochemical properties, Michaelis–Menten kinetics