

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 040360

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.24

(51) Int. Cl. A23C 19/04 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)

(21) Номер заявки
201892534

(22) Дата подачи заявки
2017.05.19

(54) ВАРИАНТЫ ХИМОЗИНА С УЛУЧШЕННЫМИ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИМИ
СВОЙСТВАМИ

(31) 16170411.9

(56) WO-A1-2015128417
WO-A1-2013174840
WO-A1-2016207214
WO-A1-2017037092

(32) 2016.05.19

(33) EP

(43) 2019.06.28

(86) PCT/EP2017/062086

(87) WO 2017/198810 2017.11.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Яэкель Кристиан, Лунд Мартин, Ван
Ден Бринк Йоханнес Мортен (DK)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)

(57) Предложены варианты химозина с улучшенными молокосвертывающими свойствами.

040360

B1

040360

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к вариантам химозина с улучшенными молокосвертывающими свойствами.

Предшествующий уровень техники

Химозин (ЕС 3.4.23.4) и пепсин (ЕС 3.4.23.1), молокосвертывающие ферменты желудка млекопитающих, представляют собой аспарагиновые протеазы, принадлежащие к большому классу пептидаз

При продуцировании в клетках слизистой желудка химозин и пепсин образуются в виде ферментативно неактивного предшественника прохимозина и предшественника пепсиногена соответственно. При выведении химозина, N-концевой пептидный фрагмент, пре-фрагмент (сигнальный пептид) отщепляется с получением прохимозина, включающего про-фрагмент. Прохимозин является по существу неактивной формой фермента, который, однако, активируется в кислых условиях в активный химозин посредством автокаталитического удаления про-фрагмента. Эта активация происходит *in vivo* в просвете желудка при подходящем pH или *in vitro* в кислых условиях.

Подробно изучены структурные и функциональные характеристики бычьего, то есть *Bos taurus*, пре-прохимозина, прохимозина и химозина. Предварительная часть молекулы пре-прохимозина быка содержит 16 ак (аминокислотных) остатков и про-часть соответствующего прохимозина имеет длину 42 ак остатков. Активный бычий химозин содержит 323 ак.

Химозин продуцируется естественным образом в таких видах млекопитающих как крупный рогатый скот, верблюды, козы, буйволы, овцы, свиньи, люди, обезьяны и крысы.

Бычий и верблюжий химозин в течение ряда лет были доступны в продаже для молочной промышленности.

Ферментативная коагуляция молока посредством молокосвертывающих ферментов, таких как химозин и пепсин, является одним из наиболее важных процессов в производстве сыров. Ферментативная коагуляция молока представляет собой двухфазный процесс: первая фаза, где протеолитический фермент, химозин или пепсин, воздействует на к-казеин, что приводит к метастабильному состоянию структуры мицеллы казеина, и вторая фаза, где молоко затем свертывается и образует коагулят (ссылка 1).

В WO 02/36752 A2 (Chr. Hansen) описано рекомбинантное получение верблюжьего химозина.

В WO 2013/174840 A1 (Chr. Hansen) описаны мутанты/варианты бычьего и верблюжьего химозина.

В WO 2013/164479 A2 (DSM) описаны мутанты бычьего химозина.

Ссылки, перечисленные непосредственно ниже, могут в настоящем контексте рассматриваться как ссылки, описывающие мутанты химозина:

Suzuki et al: Site directed mutagenesis reveals functional contribution of Thr218, Lys220 and Asp304 in chymosin, *Protein Engineering*, vol. 4, January 1990, pages 69-71;

Suzuki et al: Alteration of catalytic properties of chymosin by site-directed mutagenesis, *Protein Engineering*, vol. 2, May 1989, pages 563-569;

van den Brink et al: Increased production of chymosin by glycosylation, *Journal of biotechnology*, vol. 125, September 2006, pages 304-310;

Pitts et al: Expression and characterisation of chymosin pH optima mutants produced in *Trichoderma reesei*, *Journal of biotechnology*, vol. 28, March 1993, pages 69-83;

M.G. Williams et al: Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants of bovine chymosin, *Protein engineering design and selection*, vol. 10, September 1997, pages 991-997;

Strop et al: Engineering enzyme subsite specificity: preparation, kinetic characterization, and x-ray analysis at 2.0 Å resolution of Val111phe site mutated calf chymosin, *Biochemistry*, vol. 29, October 1990, pages 9863-9871;

Chitpinitol et al: Site-specific mutations of calf chymosin B which influence milk-clotting activity, *Food Chemistry*, vol. 62, June 1998, pages 133-139;

Zhang et al: Functional implications of disulfide bond, Cys45-Cys50, in recombinant prochymosin, *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1343, December 1997, pages 278-286.

Ни одна из указанных выше ссылок на предшествующий уровень техники не описывает прямо и однозначно ни один из вариантов химозина с улучшенной специфической свертывающей активностью и повышенным значением C/P по сравнению с родительским веществом, из которого этот вариант получен, как описано ниже.

Краткое изложение сущности изобретения

Задача, решаемая настоящим изобретением, состоит в том, чтобы предложить варианты химозина, которые, по сравнению с родительским полипептидом, имеют повышенную свертывающую активность или повышенное соотношение C/P или повышение обоих параметров.

Основываясь на интеллектуальном проектировании и сравнительном анализе различных вариантов авторы настоящего изобретения идентифицировали ряд положений аминокислот, которые имеют важное значение, поскольку благодаря изменению в одном или более положениях в родительском полипептиде можно получить улучшенный вариант химозина либо с повышенной удельной свертывающей активностью, либо с увеличенными соотношениями C/P, либо с увеличением обоих свойств.

Нумерация аминокислот, используемая здесь для определения варианта, основана на зрелом пепти-

де. Как известно в данной области, различные полипептидные последовательности натурального химозина дикого типа, полученные из разных видов млекопитающих (такие как, например, коров, верблюдов, овец, свиней или крыс), имеют относительно высокое сходство/идентичность последовательности. На фиг. 1 это представлено выравниванием соответственных различных последовательностей химозина.

В связи с этим относительно близким соответствием последовательностей считается, что трехмерные структуры различных природных химозинов дикого типа также относительно схожи.

В данном контексте природный химозин дикого типа (такой как бычий или верблюжий химозин) здесь может быть примером родительского полипептида, то есть родительского полипептида, для которого производится модификация с целью получения варианта по настоящему изобретению.

Не ограничиваясь теорией, считается, что обсуждаемые положения аминокислот химозина имеют существенное значение для любого рассматриваемого здесь, представляющего интерес фермента химозина (например, химозинов коров, верблюдов, овец, свиней, крыс и т.д.), в том смысле, что сделав изменение в одном или более этих положений, можно получить улучшенный вариант химозина в целом (например, улучшенный вариант бычьего, верблюжьего, овечьего, свиного или крысиного химозина).

Как рассматривается в настоящем документе, в качестве эталонной последовательности для определения положения аминокислоты представляющего интерес полипептида родительского химозина (например, верблюда, овцы, быка и т.д.) здесь используют последовательность SEQ ID NO: 2 зрелого химозина общеизвестного *Camelius dromedarius*. В качестве альтернативы он может быть назван здесь верблюжьим химозином. Последовательность также показана на фиг. 1.

В настоящем контексте считается, что родительский полипептид химозина (например, овец или крыс), который имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжьим химозином), может рассматриваться здесь как достаточно структурно связанный, например, с бычьим или верблюжьим химозином для того, чтобы быть улучшенным посредством изменения любого положения аминокислоты, как описано здесь.

Воплощения настоящего изобретения описаны ниже.

Определения

Все определения настоящих соответствующих терминов соответствуют тому, что будет понятно специалисту в данной области применительно к соответствующему техническому контексту.

Термин "химозин" относится к ферменту класса EC 3.4.23.4. Химозин обладает высокой специфичностью и преимущественно створаживает молоко посредством расщепления одной связи 104-Ser-Phe-|-Met-Ala-107 в к-цепи казеина. В качестве побочной активности химозин также расщепляет α -казеин в основном между Phe23 и Phe24 и β -казеин в основном между Leu192 и Tyr193 (ссылки 2, 3). Полученные пептиды α S1(1-23) и β (193-209) будут дополнительно расщеплены протеазами из микробных культур, добавленных в созревающему сыру (ссылка 4). Альтернативным названием химозина, используемым в данной области, является реннин.

Термин "химозиновая активность" относится к химозиновой активности фермента химозина, как понятно специалисту в настоящем контексте.

Специалист в данной области знает, как определить соответствующую химозиновую активность.

Как известно в данной области техники, соответствующее так называемое соотношение C/P определяя путем деления удельной свертывающей активности (C) на протеолитическую активность (P).

Как известно в данной области техники, более высокое отношение C/P подразумевает, как правило, что потеря белка во время, например, производства сыра из-за неспецифической деградации белка снижается, что может привести к улучшению выхода сыра.

Термин "выделенный вариант" означает вариант, который модифицирован действиями человека. В одном аспекте вариант является по меньшей мере на 1% чистым, например по меньшей мере на 5% чистым, по меньшей мере на 10% чистым, по меньшей мере на 20% чистым, по меньшей мере на 40% чистым, по меньшей мере на 60% чистым, по меньшей мере на 80% чистым и по меньшей мере на 90% чистым, как определено посредством SDS PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия).

Термин "зрелый полипептид" означает пептид в его окончательной форме после трансляции и любых посттрансляционных модификаций, таких как N-концевой процессинг, C-концевое усечение, гликозилирование, фосфорилирование и т.д.. В данном контексте может быть обозначен соответствующий зрелый полипептид химозин как активная последовательность полипептида химозина, то есть без пре-части и/или про-части. Соответствующие здесь примеры зрелого полипептида представляют собой, например, зрелый полипептид SEQ ID NO: 1 (бычий химозин), который расположен от аминокислотного положения 59 до аминокислотного положения 381 последовательности SEQ ID NO: 1, или зрелый полипептид SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин), который расположен от аминокислотного положения 59 до аминокислотного положения 381 последовательности SEQ ID NO: 2.

Термин "родительский" или "родительский полипептид, имеющий химозиновую активность" означает полипептид, в котором осуществлена модификация с получением вариантов фермента по настоящему изобретению. Родительским может быть природный (дикого типа) полипептид или его вариант.

Термин "идентичность последовательности" относится к сходству двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей.

Для целей настоящего изобретения степень идентичности у двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), реализованного в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), предпочтительно версии 3.0.0 или более поздней. Возможными используемыми параметрами являются штраф за открытие гэпа - 10, штраф за продление гэпа - 0,5 и матрица замен EBLOSUM62 (EMBOSS версия BLOSUM62). Результат Needle, отмеченный как "наиболее длинная идентичность" (полученный с использованием опции nobrief) используют в качестве процента идентичности и рассчитывают следующим образом:

$(\text{идентичные остатки} \times 100) / (\text{длина выравнивания} - \text{общее количество гэпов при выравнивании})$.

Для целей настоящего изобретения степень идентичности между у двух дезоксирибонуклеотидных последовательностей определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, выше), реализованного в программе Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, выше), предпочтительно версии 3.0.0 или более поздней. Возможными используемыми параметрами являются штраф за открытие гэпа - 10, штраф за продление гэпа - 0,5 и матрица замен EDNAFULL (EMBOSS версия NCBI NUC4.4). Результат Needle, отмеченный как "наиболее длинная идентичность" (полученный с использованием опции -nobrief) используют в качестве процента идентичности и рассчитывают следующим образом:

$(\text{идентичные дезоксирибонуклеотиды} \times 100) / (\text{длина выравнивания} - \text{общее количество разрывов при выравнивании})$.

Термин "вариант" означает пептид, обладающий химозиновой активностью и содержащий модификацию, то есть замену, вставку и/или удаление в одном или более (нескольких) положениях. Замена означает замену аминокислоты, занимающей положение, другой аминокислотой; делеция означает удаление аминокислоты, занимающей положение; и вставка означает добавление 1-3 аминокислот, примыкающих к аминокислоте, занимающей положение.

Аминокислота может быть природной или не природной аминокислотой, например замена, например, в частном случае, D-изомерами (или D-формами), например D-аланином может быть теоретически возможной.

Термин пептид "дикого типа" относится к природной нуклеотидной последовательности или пептидной последовательности, то есть нуклеотидной последовательности или пептидной последовательности, которые не подвергались целенаправленным мутациям с помощью человека.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Выравнивание соответствующих различных последовательностей химозина.

Как понятно специалисту в настоящем контексте, приведенные здесь соответствующие проценты идентичности последовательности зрелого полипептида химозина, например овцы, двугорбого верблюда, верблюда, свиньи или крысы со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 3 (бычьим химозином - то есть аминокислотной последовательностью от положения 59 до 381 SEQ ID NO: 3) относительно сходны с вышеупомянутыми процентами идентичности последовательностей.

Фиг. 2. 3D-структура верблюжьего химозина (подробно, PDB: 4AA9) с моделью связанного к-казеина, показанного зеленым цветом, к-казеин размещен в субстратсвязывающей щели химозина с расщепляемой связью между остатками 105 и 106. Мутации R242E, Y243E, N249D, G251D, N252D, R254E, S273D, Q280E, F282E выделены синим цветом.

Фиг. 3. 3D-структура бычьего химозина (PDB: 4AA8) с моделью связанного к-казеина, показанного зеленым цветом, к-казеин размещен в субстратсвязывающей щели химозина с расщепляемой связью между остатками 105 и 106. Положения H292 и Q294 выделены желтым цветом.

Фиг. 4. 3D-структура верблюжьего химозина (подробно, PDB: 4AA9). Остатки Y11, L12 и D13 N-конца белка, а также потенциальное взаимодействие Y11 с партнером D290 выделены пурпурным цветом.

Подробное описание изобретения

Определение положения аминокислоты представляющего интерес химозина

Как обсуждалось выше, в качестве эталонной последовательности для определения положения аминокислоты соответствующего интересующего полипептида химозина (например, верблюдов, овец, быков и т.д.) здесь используют общеизвестную последовательность верблюжьего химозина, раскрытую как SEQ ID NO: 2.

Аминокислотную последовательность другого полипептида химозина выравнивают с полипептидом, раскрытым в SEQ ID NO: 2, и на основании выравнивания номер положения аминокислоты, соответствующей любому аминокислотному остатку в полипептиде, раскрытом в SEQ ID NO: 2, определяют, используя алгоритм ClustalW, как описано в рабочем примере 1 в данном описании изобретения.

Основываясь на вышеупомянутых хорошо известных компьютерных программах, квалифицированный специалист легко может определить аминокислотное положение в релевантном здесь интересующем полипептиде химозина (например верблюдов, овец, быков и т.д.).

На фиг. 1 здесь показан пример выравнивания.

Как пример: на фиг. 1 можно видеть, что здесь используемый бычий эталон SEQ ID NO: 3 имеет "G" в положении 50 и "Camelus_dromedarius" (SEQ ID NO: 2 herein) имеет "A" в этом положении 50.

Обозначение вариантов

При описании вариантов настоящего изобретения обозначения, описанные ниже, предназначены для облегчения сравнения. Используют принятые IUPAC (Международный союз теоретической и прикладной химии) однобуквенные или трехбуквенные сокращения аминокислот.

Конкретные варианты, обсуждаемые в этом разделе "обозначений" ниже, могут не соответствовать релевантным вариантам настоящего изобретения, то есть этот раздел "обозначений" предназначен только для описания настоящего соответствующего обозначения как такового.

Замены. Для аминокислотной замены используют следующее обозначение: исходная аминокислота, положение, замещенная аминокислота. Соответственно теоретическое замещение треонина аланином в положении 226 обозначают как "Thr226Ala" или "T226A". Множественные мутации разделяют добавлением меток ("+"), например "Gly205Arg + Ser411Phe" или "G205R + S411F", представляющими замены в положениях 205 и 411 глицина (G) аргинином (R) и серина (S) фенилаланином (F) соответственно. Замена, например обозначенная "226A", относится к замещению родительской аминокислоты (например, T, Q, S или другой родительской аминокислоты) аланином в положении 226.

Удаления. Для удаления аминокислоты используют следующее обозначение: исходная аминокислота, положение, *. Соответственно удаление глицина в положении 195 обозначают как "Gly195*" или "G195*". Множественные удаления разделяют добавлением меток ("+"), например "Gly195* + Ser411*" или "G195* + S411*".

Вставки. Для аминокислотной вставки используют следующее обозначение: исходная аминокислота, положение, исходная аминокислота, вставленная аминокислота. Соответственно вставку лизина после глицина в положении 195 обозначают "Gly195GlyLys" или "G195GK". Вставка нескольких аминокислот обозначают [исходная аминокислота, положение, исходная аминокислота, вставленная аминокислота #1, вставленная аминокислота #2; и т.д.]. Например, вставка лизина и аланина после глицина в положении 195 указывают как "Gly195GlyLysAla" или "G195GKA".

В таких случаях вставленный(е) аминокислотный(е) остаток(и) нумеруют путем добавления строчных букв к номеру положения аминокислотного остатка, предшествующего вставленному(ым) аминокислотному(ым) остатку(ам). В приведенном выше примере последовательность будет выглядеть так:

Родительский:	Вариант:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

Множественные модификации. Варианты, содержащие множественные модификации, разделяют путем добавления меток ("+"), например, "Arg170Tyr+Gly195Glu" или "R170Y+G195E" представляют замену тирозина и глутаминовой кислоты аргинином и глицином в положениях 170 и 195 соответственно.

Разные замены. Если в одно положение могут быть введены разные замены, то эти разные замены разделяют запятой, например "Arg170Tyr,Glu" или "R170Y,E" представляет замещение аргинина тирозином или глутаминовой кислотой в положении 170. Таким образом, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" или "Y167G,A + R170G,A" обозначает следующие варианты:

"Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" и "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Предпочтительный родительский полипептид, имеющий химозиновую активность

Предпочтительно родительский полипептид имеет по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 3 (бычий химозин) и/или SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин).

В качестве примера в данном документе подходящий соответствующий родительский полипептид может, например, быть бычьим химозином А, как известно в данной области техники бычий химозин А может иметь только одно аминокислотное различие по сравнению с бычьим химозином В SEQ ID NO: 3.

В предпочтительном воплощении родительский полипептид имеет по меньшей мере 90% идентичность последовательности со зрелым полипептидом по SEQ ID NO: 3 (бычий химозин), более предпочтительно родительский полипептид имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности со зрелым полипептидом по SEQ ID NO: 3 (бычий химозин) и еще более предпочтительно родительский полипептид имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности со зрелым полипептидом по SEQ ID NO: 3 (бычий химозин). Может быть предпочтительным, чтобы родительский полипептид был зрелым полипептидом по SEQ ID NO: 3 (бычий химозин).

Как понятно специалисту в данном контексте соответствующий родительский полипептид, имеющий химозиновую активность, может быть, например, вариантом, например, соответствующего химозина дикого типа.

Например, вариант бычьего химозина, например с 5-10 модификациями (например, заменами) по сравнению со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 3 бычьего химозина дикого типа может все еще быть

родительским полипептидом, который имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 3 (бычий химозин).

Другими словами, в целом соответствующий здесь выделенный вариант полипептида химозина может содержать модификации (например, замены) в других положениях, чем заявленные здесь положения.

Как понятно специалисту в данном контексте, родительский полипептид может быть полипептидом, который имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюду). В предпочтительном воплощении родительский полипептид имеет по меньшей мере 92% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3, более предпочтительно родительский полипептид имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 и/или SEQ ID NO: 3 и еще более предпочтительно родительский полипептид имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Может быть предпочтительным, чтобы родительский полипептид был зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин).

Как понятно специалисту в данном контексте, выделенный вариант химозина может содержать модификации (например, замены) в других аминокислотных положениях, чем приведенные выше.

Например, вариант бычьего химозина, например с 5-10 модификациями (например, заменами) по сравнению с полипептидом верблюжьего химозина дикого типа, имеющим SEQ ID NO: 2, может все еще быть родительским полипептидом, который имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2.

Может быть предпочтительным, чтобы выделенный вариант бычьего химозина содержал менее 30 аминокислотных модификаций (например, замен) по сравнению со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин), или может быть предпочтительным, чтобы выделенный вариант верблюжьего химозина содержал менее 20 аминокислотных модификаций (например, замен) по сравнению со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2, или может быть предпочтительным, чтобы выделенный вариант бычьего химозина содержал менее 10 аминокислотных модификаций (например, замен) по сравнению со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2, или может быть предпочтительным, чтобы выделенный вариант верблюжьего химозина содержал менее 5 аминокислотных модификаций (например, замен) по сравнению со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин).

Способ получения выделенных вариантов полипептида химозина

Как обсуждалось выше, как известно в данной области техники, специалист может на основании общих знаний, обычным способом получать и очищать химозин и варианты химозина.

Другими словами, при наличии у специалиста релевантного здесь родительского полипептида, имеющего интересующую химозиновую активность (например, быков, верблюдов, овец, свиней или крыс) и раскрытого в данном описании изобретения руководства, получение варианта такого родительского интересующего химозина является рутинной работой для специалиста.

Примером подходящего способа получения и выделения химозина (варианта или родительского) может являться, например, хорошо известная технология на основе грибковой рекомбинантной экспрессии/производства, как, например, описано в WO 02/36752 A2 (Chr. Hansen).

Также для специалиста в данной области рутинной работой является модификация одного или более положений родительского полипептида, имеющего химозиновую активность, где модификация включает замену, удаление или вставку по меньшей мере в одном аминокислотном положении, как описано в данном описании.

Как известно специалисту в данной области, это может быть получено, например, посредством так называемого сайт-направленного мутагенеза и технологии на основе рекомбинантной экспрессии/производства.

Для квалифицированного специалиста также является рутинной работой определение наличия или отсутствия химозиновой активности у релевантного здесь родительского полипептида (например, верблюжьего или бычьего химозина дикого типа) и/или у релевантного здесь варианта химозина.

Как известно в данной области, специфичность химозина может быть определена по так называемому соотношению C/P, которое определяют путем деления удельной свертывающей активности (C) на протеолитическую активность (P). Как известно в данной области техники, более высокое соотношение C/P подразумевает, как правило, что потеря белка во время, например, производства сыра из-за снижения неспецифического разрушения белка понижена, то есть выход сыра улучшен.

Определение молокосвертывающей активности молока

Молокосвертывающая активность может быть определена с использованием метода REMCAT, который является стандартным методом, разработанным Международной федерацией молочных продуктов (метод IDF).

Молокосвертывающую активность определяют исходя из времени, необходимого для видимой флокуляции стандартного молочного субстрата, полученного из сухого обезжиренного молока низкотемпературного сгущения и распылительной сушки с 0,5 г на 1 л раствора хлорида кальция (pH≈6,5). Время свертывания образца сычужного фермента сравнивают со временем свертывания эталонного стандарта, имеющего известную молокосвертывающую активность и имеющего такой же ферментный

состав по IDF Standard 110B, в качестве образца. Образцы и эталонные стандарты измеряют в одинаковых химических и физических условиях. Образцы вариантов доводят до концентрации примерно 3 IMCU (Международная молокосвертывающая единица)/мл, используя 84 мМ уксуснокислый буфер, pH 5,5. Затем 20 мкл ферментного препарата добавляют к 1 мл предварительно нагретого молока (32°C) в стеклянной пробирке, помещенной на водяную баню, способной поддерживать постоянную температуру 32°C±1°C при постоянном помешивании.

Общую молокосвертывающую активность (эффективность) сычужного фермента рассчитывают в Международных молокосвертывающих единицах (IMCU) на мл относительно стандарта, имеющего такой же ферментный состав, что и образец, в соответствии с формулой:

$$\text{Активность в IMCU/мл} = \frac{S_{\text{standard}} \times T_{\text{standard}} \times D_{\text{sample}}}{D_{\text{standard}} \times T_{\text{sample}}}$$

S_{standard} : молокосвертывающая активность молока международного эталона для сычужного фермента.

T_{standard} : время свертывания в секундах, полученное для стандартного разбавления.

D_{sample} : коэффициент разбавления для образца.

D_{standard} : коэффициент разбавления для стандарта.

T_{sample} : время свертывания в секундах, полученное для разбавленного образца сычужного ферментного, от момента добавления фермента до времени флуклюляции.

Для определения молокосвертывающей активности может быть использован метод μ IMCU вместо метода REMCAT. По сравнению с REMCAT, время флуклюляции для вариантов химозина в анализе μ IMCU определяют путем измерения OD (оптической плотности) в 96-луночных планшетах для микротитрования при 800 нм в УФ/VIS (видимая область спектра) планшет-ридере. Стандартную кривую для различных разведений эталонного стандарта с известной эффективностью свертывания регистрируют для каждого планшета. Образцы получают путем разбавления фермента в 84 мМ ацетатном буфере, 0,1% тритона X-100, pH 5,5. Реакцию при 32°C начинают путем добавления 250 мкл стандартного молочного субстрата, содержащего 4% (мас./мас.) сухого обезжиренного молока низкотемпературного сгущения и распылительной сушки и 7,5% (мас./мас.) хлорида кальция (pH ≈ 6,5), к 25 мкл образца фермента. Затем определяют молокосвертывающую активность вариантов химозина в Международных молокосвертывающих единицах (IMCU)/мл на основании времени флуклюляции относительно стандартной кривой.

Определение общего содержания белка

Предпочтительно общее содержание белка может быть определено с использованием набора Pierce BCA Protein Assay Kit от Thermo Scientific в соответствии с инструкциями поставщиков.

Расчет удельной свертывающей активности

Удельную активность свертывания (IMCU/мг общего белка) определяли путем деления свертывающей активности (IMCU/мл) на общее содержание белка (мг общего белка на мл).

Определение протеолитической активности

Предпочтительно общая протеолитическая активность может быть измерена с использованием флуоресцентно меченного Bodipy-FL казеина в качестве субстрата (EnzChek; Molecular Bioprobes, E6638). Производные казеина, интенсивно меченные не чувствительным к pH зеленым флуоресцентным Bodipy-FL, вызывают гашение флуоресценции конъюгата. Катализируемый протеазой гидролиз высвобождает флуоресцентный Bodipy-FL. Этот способ является очень чувствительным, что является необходимым для этого эксперимента, поскольку эталон имеет самую низкую общую протеолитическую активность из всех известных коагулянтов. Раствор субстрата 0,04 мг/мл готовят в 0,2 М фосфатном буфере, pH 6,5, содержащем 100 мМ NaCl, 5% глицерина и 0,1% Бридж. Варианты химозина растворяют в 20 мМ малонатном буфере, содержащем 100 мМ NaCl, 5% глицерина и 0,1% Бридж. По 20 мкл раствора эталона и варианта химозина смешивают в черном 384-луночном плоскодонном полистироловом планшете Corning и непрерывно определяют флуоресценцию в флуориметре при 32°C в течение 10 ч. Наклоны линейной части кривой изменения флуоресценции используют для определения общей протеолитической активности.

Определение отношения C/P

Отношение C/P рассчитывают путем деления свертывающей активности (C) на протеолитическую активность (P).

Статистический анализ эффектов положения и мутации на удельную свертывающую активность и отношение C/P

Предпочтительно может быть использован статистический подход с машинным обучением анализа и PCA-анализ для определения влияния одиночных мутаций, присутствующих в вариантах с несколькими заменами, например на удельную молокосвертывающую активность, а также на соотношение свертывающей и общей протеолитической активности (C/P).

Предпочтительные воплощения изобретения

Как указано выше и проиллюстрировано в приведенных ниже примерах, авторы настоящего изобретения сделали ряд предпочтительных вариантов полипептида химозина с улучшенной свертывающей активностью и/или отношением C/P по сравнению с соответствующим родительским полипептидом в

сопоставимых условиях.

В предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному варианту полипептида химозина, содержащему модификацию в одном или более положениях по сравнению с родительским полипептидом, имеющим химозиновую активность, где модификация включает замену, удаление или вставку по меньшей мере в одном аминокислотном положении, соответствующем любому из положений: D59, V309, S132, N249, L166, N249, Q56, Y134, K295, M157, M256, R242, I96, H76, S164, S273, G251, Y11, L166, K19, Y21, S74, Y243, N249, S273, Q280, F282, L295, N252, R254, G70, V136, L222, K231, N291;

где

(1) аминокислотное положение родительского полипептида определяют выравниванием родительского полипептида с полипептидом SEQ ID NO: 2 и

(2) родительский полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин);

где выделенный вариант полипептида химозина имеет более высокую удельную свертывающую активность и/или соотношение C/P, чем соответствующий родительский полипептид.

Более конкретно, выделенный вариант полипептида химозина по настоящему изобретению имеет удельную свертывающую активность (IMCU/мг общего белка), которая составляет по меньшей мере 85%, такую как, например, по меньшей мере 90, 100, 110, 120, 130, 160 или 200% удельной свертывающей активности его родительского полипептида. Альтернативно или дополнительно выделенный вариант полипептида химозина по настоящему изобретению имеет соотношение C/P, составляющее по меньшей мере 200%, такое как, например, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500%, по меньшей мере 750% или по меньшей мере 1000% соотношение C/P его родительского полипептида.

Как указано выше, родительский полипептид может иметь по меньшей мере 80%, такую как, по меньшей мере, например, 82, 85, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин).

Модификация может включать замену, выбранную из списка, состоящего из

D59N, V309I, S132A, N249E, L166V, N249D, Q56H, Y134G, K295L, M157L, M256L,

R242E, I96L, H76Q, S164G, S273Y, G251D, Y11I, R242D, L222V, Y11V, L166I, K19T,

Y21S, S74D, Y243E, N249D, S273D, Q280E, F282E, L295K, N252D, R254E, G70D, V136I,

L222I, K231N, N291Q.

В соответствующем воплощении настоящее изобретение относится к выделенному варианту полипептида химозина, в котором модификация содержит одну или более комбинаций замен, включающих

Y11V, K19T, D59N, I96L, S164G, L166V, L222V, R242E, N249E, L253I;
 Y11I, D59N, I96L, S164G, L166V, L222V, R242E, G251D, L253I;
 Y11I, I96L, S164G, L222I, R242E;
 Y11I, K19T, D59N, I96L, S164G, L222I, R242E, N249E, G251D;
 H76Q, I96L, S164G, L222I, R242E, G251D, S273Y;
 K19T, D59N, H76Q, S164G, L222I, N249D, S273Y;
 K19T, D59N, H76Q, L166V, L222I, R242E, G251D, S273Y;
 K19T, D59N, H76Q, S132A, L222I, G251D, S273Y, V309I;
 Y21S, H76Q, S164G, L222I, R242E, G251D, S273Y;
 D59N, S132A, S164G, L222I, R242E, N249D, G251D, S273Y;
 D59N, H76Q, I96L, S132A, S164G, L166V, L222I, G251D, S273Y;
 H76Q, S164G, L166V, L222I, R242E, G251D, S273Y;
 D59N, H76Q, S132A, S164G, L166V, S273Y;
 K19T, D59N, H76Q, S164G, R242E, N249D, G251D, S273Y;
 Y21S, D59N, H76Q, I96L, S164G, L222I, N249D, G251D, S273Y;
 K19T, D59N, I96L, S164G, L222I, G251D;
 D59N, H76Q, S164G, L222I, S226T, R242E;
 H76Q, L130I, L222I, S226T, G251D, S273Y;
 Y21S, D59N, H76Q, I96L, L222I, S273Y;
 H76Q, S164G, L222I, N249D, G251D, S273Y, V309I;
 D59N, I96L, L166V, L222I, R242E, G251D;
 Y11V, K19T, D59N, I96L, S164G, L166V, L222I, R242E, G251D, L253I;
 K19S, D59N, I96L, S164G, L222I, R242E, N249E, G251D;
 K19T, D59N, I96L, S164G, L166I, L222I, R242E, N249D;
 H76Q, I96L, S164G, L222I, R242E, G251D, S273Y;
 K19T, I96L, L222I, R242E, L253I;
 K19T, D59N, I96L, S164G, L222V, R242E, N249D, L253I;
 I96L, S164G, L222I, R242E, G251D, S274Y;
 R242E, N252D, N100Q, N291Q;
 R242E, R254E, Q280E, N100Q, N291Q;
 R242E, Q280E, N100Q, N291Q;
 R242E, R254E, S273D, Q280E, N100Q, N291Q;
 R67Q, S132A, L222I, K231N, R242E, V248I;
 R67Q, I96L, L130I, M157L, K231N, R242E;
 R67Q, M157L, L222I, K231N, V248I;
 R67Q, I96L, M157L, L222I, K231N или
 R67Q, G70D, M157L, L222I, N291Q;

Возможно, выделенный вариант полипептида химозина может дополнительно содержать замены, которые изменяют картину гликозилирования, такие как, например, замены в одном или более положениях N100, N252 и/или N291, более конкретно N100Q, N252Q и/или N291Q.

Предпочтительные способы получения выделенных вариантов полипептида химозина

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способам получения выделенного полипептида в соответствии с настоящим изобретением.

В качестве соответствующего воплощения настоящее изобретение относится к способу получения выделенного варианта полипептида химозина, включающему стадии:

(а) модификация в одном или более положениях в родительском полипептиде, где модификация включает замену, удаление или вставку по меньшей мере в одном аминокислотном положении, соответствующем любому из положений:

D59, V309, S132,

N249, L166, N249, Q56, Y134, K295, M157, M256, R242, I96, H76, S164, S273, G251, Y11,

L166, K19, Y21, S74, Y243, N249, S273, Q280, F282, L295, N252, R254, G70, V136, L222,

K231, N291,

(б) получение и выделение модифицированного полипептида со стадии (а),
и где

(1) аминокислотное положение родительского полипептида определяют выравниванием родительского полипептида с полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин); и

(2) родительский полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 3 (бычий химозин) и/или по меньшей мере 80% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин).

Более конкретно, модификацией может быть одна или более из замен:

D59N,

V309I, S132A, N249E, L166V, N249D, Q56H, Y134G, K295L, M157L, M256L, R242E, I96L,

H76Q, S164G, S273Y, G251D, Y11I, R242D, L222V, Y11V, L166I, K19T, Y21S, S74D,

Y243E, N249D, S273D, Q280E, F282E, L295K, N252D, R254E, G70D, V136I, L222I, K231N,

N291Q.

В еще одном соответствующем аспекте настоящее изобретение относится к способу получения выделенного варианта полипептида химозина, как указано выше, где выделенный вариант полипептида химозина содержит замену в одной или более комбинациях положений, содержащих положения, соответствующие

Y11V, K19T, D59N, I96L, S164G, L166V, L222V, R242E, N249E, L253I;

Y11I, D59N, I96L, S164G, L166V, L222V, R242E, G251D, L253I;

Y11I, I96L, S164G, L222I, R242E;

Y11I, K19T, D59N, I96L, S164G, L222I, R242E, N249E, G251D;

H76Q, I96L, S164G, L222I, R242E, G251D, S273Y;

K19T, D59N, H76Q, S164G, L222I, N249D, S273Y;

K19T, D59N, H76Q, L166V, L222I, R242E, G251D, S273Y;

K19T, D59N, H76Q, S132A, L222I, G251D, S273Y, V309I;

Y21S, H76Q, S164G, L222I, R242E, G251D, S273Y;

D59N, S132A, S164G, L222I, R242E, N249D, G251D, S273Y;

D59N, H76Q, I96L, S132A, S164G, L166V, L222I, G251D, S273Y;

H76Q, S164G, L166V, L222I, R242E, G251D, S273Y;

D59N, H76Q, S132A, S164G, L166V, S273Y;

K19T, D59N, H76Q, S164G, R242E, N249D, G251D, S273Y;

Y21S, D59N, H76Q, I96L, S164G, L222I, N249D, G251D, S273Y;

K19T, D59N, I96L, S164G, L222I, G251D;

D59N, H76Q, S164G, L222I, S226T, R242E;

H76Q, L130I, L222I, S226T, G251D, S273Y;
 Y21S, D59N, H76Q, I96L, L222I, S273Y;
 H76Q, S164G, L222I, N249D, G251D, S273Y, V309I;
 D59N, I96L, L166V, L222I, R242E, G251D;
 Y11V, K19T, D59N, I96L, S164G, L166V, L222I, R242E, G251D, L253I;
 K19S, D59N, I96L, S164G, L222I, R242E, N249E, G251D;
 K19T, D59N, I96L, S164G, L166I, L222I, R242E, N249D;
 H76Q, I96L, S164G, L222I, R242E, G251D, S273Y;
 K19T, I96L, L222I, R242E, L253I;
 K19T, D59N, I96L, S164G, L222V, R242E, N249D, L253I;
 I96L, S164G, L222I, R242E, G251D, S274Y;
 R242E, N252D, N100Q, N291Q;
 R242E, R254E, Q280E, N100Q, N291Q;
 R242E, Q280E, N100Q, N291Q;
 R242E, R254E, S273D, Q280E, N100Q, N291Q;
 R67Q, S132A, L222I, K231N, R242E, V248I;
 R67Q, I96L, L130I, M157L, K231N, R242E;
 R67Q, M157L, L222I, K231N, V248I;
 R67Q, I96L, M157L, L222I, K231N или
 R67Q, G70D, M157L, L222I, N291Q.

Родительский полипептид может в качестве предпочтительного воплощения иметь по меньшей мере 95% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин).

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения пищевого или кормового продукта, включающего добавление эффективного количества выделенного варианта полипептида химозина, как описано здесь, к пищевому(ым) или кормовому(ым) ингредиенту(ам) и выполнение дополнительных стадий производства для получения пищевого или кормового продукта.

Другой соответствующий аспект настоящего изобретения относится к способу получения пищевого или кормового продукта, включающего добавление эффективного количества выделенного варианта полипептида химозина, как описано здесь, к пищевому(ым) или кормовому(ым) ингредиенту(ам) и выполнение дополнительных стадий производства для получения пищевого или кормового продукта в частности, при том, что пищевой или кормовой продукт представляет собой продукт на основе молока или пищевой или кормовой продукт, содержащий полипептид химозина по настоящему изобретению.

Другой соответствующий аспект настоящего изобретения относится к варианту полипептида химозина по настоящему изобретению в способе получения продукта на основе молока, такого как, например, сыр, такой как, например, вытяжной сыр, чеддер, сыры континентального типа, мягкий сыр или белый рассольный сыр.

Как обсуждалось выше, выделенный вариант полипептида химозина, как описано здесь, можно использовать в соответствии с уровнем техники, например для получения интересующего продукта на основе молока (такого как, например, сырный продукт).

Как обсуждалось выше, один аспект изобретения относится к способу получения пищевого или кормового продукта, включающему добавление эффективного количества выделенного варианта полипептида химозина, как описано в данном описании изобретения, к пищевому(ым) или кормовому(ым) ингредиенту(ам) и осуществление дальнейших стадий получения пищевого или кормового продукта.

Предпочтительно пищевой или кормовой продукт представляет собой продукт на основе молока, и способ включает добавление эффективного количества выделенного варианта полипептида химозина, как описано здесь, в молоко и осуществление дальнейших стадий производства с получением продукта на основе молока.

Молоко может представлять собой, например, соевое молоко, овечье молоко, козье молоко, буйволиное молоко, молоко яка, молоко ламы, верблюжье молоко или коровье молоко.

Продукт на основе молока может, например, представлять собой ферментированный молочный продукт, такой как творог, варк или сыр.

Как известно в данной области техники, рост, очистка, тестирование и обработка могут влиять на

активность ферментов, а следовательно, и на фермент по настоящему изобретению. Таким образом, настоящее изобретение относится к вариантам полипептида химозина, способам их получения и получения продуктов, содержащих их, где вариант полипептида химозина имеет улучшенную свертывающую активность и/или соотношение С/Р по сравнению с соответствующим родительским полипептидом при сопоставимых условиях и предпочтительно после получения или обработки иным способом в сопоставимых условиях.

Примеры

Пример 1. Выравнивание и нумерация белковых последовательностей химозина и последовательностей вариантов.

Последовательности белка химозина выравнивали, используя алгоритм ClustalW, представленный EBI (EBI, инструменты, множественное выравнивание последовательностей, CLUSTALW", <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), и как описано в Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007). *Bioinformatics* 23(21), 2947-2948.

Установки ClustalW2 для множественного выравнивания последовательностей были следующими: матрица сравнения аминокислот = BLOSUM, открытие гэпа = 10, удлинение гэпа = 0,5, расстояние между гэпами = 8, бесконечные гэпы, итерация = нет, максимальное количество итераций = 1, группировка = NJ.

В качестве эталонной последовательности использовали бычий химозин В препрохимозин (Genbank регистрационный номер P00794 - раскрытый в данном описании изобретения как SEQ ID NO: 1), где N-концевой метионин имеет номер 1 (MRCL.....) и С-концевой изолейцин (в белковой последовательности ...LAKAI) имеет номер 381. Варианты выравнивали относительно бычьего В пре-прохимозина и остатки пронумеровывали согласно соответствующему остатку бычьего химозина.

Пример 2. Конструкция вариантов химозина.

Варианты химозина конструировали с использованием различных стратегий.

Когда упоминается верблюжий химозин, речь в данном документе идет о верблюжьем химозине, содержащем полипептид с SEQ ID NO: 2.

Верблюжий химозин с SEQ ID NO: 2 можно рассматривать как релевантный здесь родительский полипептид, имеющий химозиновую активность и используемый для получения вариантов верблюжьего химозина.

Когда упоминается бычий химозин, речь в данном документе идет о бычьем химозине, содержащем полипептид с SEQ ID NO: 1.

Бычий химозин с SEQ ID NO: 1 можно рассматривать как релевантный здесь родительский полипептид, имеющий химозиновую активность и используемый для получения вариантов бычьего химозина.

Варианты 180-269 и 367-461 верблюжьего химозина были сконструированы на основе выравнивания большой совокупности общеизвестных аспарагиновых протеазных последовательностей, имеющих идентичность 25% или более по сравнению с бычьим химозином В.

Вариации обычно вводили в области с высоким уровнем вариации аминокислот между видами, в то время как консервативные области не изменяли. Аминокислотные замены выбирали на основе филогенетической, структурной и экспериментальной информации для идентификации изменений с высокой вероятностью для демонстрации положительных эффектов на удельную свертывающую активность и соотношение С/Р. В каждую вариантную конструкцию были введены множественные вариации, гарантирующие присутствие каждой одиночной мутации в нескольких вариантных конструкциях, чтобы минимизировать эффект ковариации между различными заменами. Использовали машинное обучение и статистический анализ для определения относительных вкладов аминокислотных замен на измеряемые характеристики коагуляции для вариантов химозина (ссылки 14, 15).

Варианты 271-366 были сконструированы на основании детального структурного анализа бычьего химозина (код PDB: 4AA8) и верблюжьего химозина (код PDB: 4AA9). Вариации выбирали, исходя из химической природы соответствующих боковых цепей аминокислот и их ожидаемого воздействия либо на связывание казеинового субстрата, либо на общие ферментные свойства. Большинство аминокислотных замен в вариантах 271-346 осуществляли в положениях последовательности либо внутри, либо в непосредственной структурной близости к субстратсвязывающей щели, или во вторичных структурных элементах, которые контактируют со связанным казеиновым субстратом. Кроме того, изменения были осуществлены в положениях на поверхности белка, которые изменяют профиль заряда этих областей (ссылка 5) и поэтому, как ожидается, оказывают влияние на характеристики фермента. Варианты 347-366 были сделаны на основе другой структурной конформации N-концевой последовательности в бычьем и верблюжьем химозине. Аминокислотные замены были сделаны в положениях в субстратсвязывающей щели, которые взаимодействуют с N-концом верблюжьего химозина.

Пример 3. Получение ферментного материала варианта химозина.

Все варианты химозина синтезировали как синтетические гены и клонировали в грибной экспрессионный вектор, такой как, например, pGAMPr-C (описанный в WO 02/36752 A2).

Векторы трансформировали в *E. coli* и плазмидную ДНК очищали, используя стандартные протоколы молекулярной биологии, известные специалисту в данной области.

Варианты плазмид индивидуально трансформировали в штамм *Aspergillus niger* или *Aspergillus nidulans* и белок продуцировали по существу так, как описано в WO 02/36752 A2, и очищали, используя стандартные хроматографические методы. Для скрининга библиотеки ферментов все варианты химозина получали в ферментациях 20-60 мл. Для более детальной характеристики вариантов 433, 436, 453 и 457 соответствующие ферменты еще раз ферментировали в масштабе 70 л.

Как известно в данной области, специалист может, на основе своих общих знаний, получать и очищать химозин и варианты химозина, такие как описанные в данном описании изобретения варианты бычьего и верблюжьего химозина.

Пример 4. Определение удельной химозиновой активности.

4.1 Определение молокосвертывающей активности.

Молокосвертывающую активность определяли, используя метод REMCAT, который представляет собой стандартный метод, разработанный Международной федерацией по молочному животноводству (метод IDF).

Молокосвертывающую активность определяли, исходя из времени, необходимого для видимой флокуляции стандартного молочного субстрата, полученного из сухого обезжиренного молока низкотемпературного сгущения и распылительной сушки с раствором хлорида кальция 0,5 г на литр (pH≈6,5). Время свертывания для образца сычужного фермента сравнивали со временем свертывания эталонного стандарта, имеющего известную молокосвертывающую активность и имеющего такой же ферментный состав согласно стандарту IDF НОВ в качестве образца. Образцы и эталонные стандарты измеряли в одинаковых химических и физических условиях. Образцы вариантов доводили до примерно 3 IMCU/мл, используя 84 мМ уксуснокислый буфер, pH 5,5. Затем 20 мкл ферментного препарата добавляли к 1 мл предварительно нагретого молока (32°C) в стеклянной аналитической пробирке, помещенной на водяную баню, способную поддерживать постоянную температуру 32°C±1°C, при постоянном перемешивании.

Общую молокосвертывающую активность (эффективность) сычужного фермента рассчитывали в Международных молокосвертывающих единицах (IMCU) на мл по сравнению со стандартом, содержащим такой же ферментный состав, что и образец, согласно формуле

$$\text{Активность в IMCU/мл} = \frac{S_{\text{standard}} \times T_{\text{standard}} \times D_{\text{sample}}}{D_{\text{standard}} \times T_{\text{sample}}}$$

S_{standard} : молокосвертывающая активность молока международного эталонного стандарта для сычужного фермента.

T_{standard} : время свертывания в секундах, полученное для стандартного разбавления.

D_{sample} : коэффициент разбавления для образца.

D_{standard} : коэффициент разбавления для стандарта.

T_{sample} : время свертывания в секундах, полученное для разбавленного образца сычужного фермента с момента добавления фермента до момента флокуляции.

Для определения свертывающей активности библиотек вариантов 1 и 3, а также сконструированных вариантов, использовали метод μ IMCU вместо метода REMCAT. По сравнению с REMCAT, время флокуляции для вариантов химозина в анализе μ IMCU определяли посредством измерения OD (оптической плотности) в 96-луночных планшетах при 800 нм в УФ/VIS планшет-ридере. Стандартная кривая различных разведений эталонного стандарта с известной активностью свертывания была зафиксирована для каждого планшета. Образцы готовили путем разбавления фермента 84 мМ ацетатным буфером, 0,1% тритона X-100, pH 5,5. Взаимодействие при 32°C начиналось при добавлении 250 мкл стандартного молочного субстрата, содержащего 4% (мас./мас.) сухого обезжиренного молока низкотемпературного сгущения и распылительной сушки и 7,5% (мас./мас.) хлорида кальция (pH≈6,5) до 25 мкл образца фермента. Молокосвертывающую активность вариантов химозина в Международных молокосвертывающих единицах (IMCU)/мл определяли на основании времени флокуляции для образца по сравнению со стандартной кривой.

4.2 Определение общего содержания белка.

Общее содержание белка определяли с использованием набора Pierce BCA Protein Assay Kit от Thermo Scientific в соответствии с инструкциями поставщиков.

4.3 Расчет удельной свертывающей активности.

Удельную свертывающую активность (IMCU/мг общего белка) определяли путем деления свертывающей активности (IMCU/мл) на общее содержания белка (мг общего белка на мл).

Пример 5. Определение протеолитической активности.

Общую протеолитическую активность измеряли, используя флуоресцентно меченного Bodipy-FL казеин в качестве субстрата (EnzChek; Molecular Bioprobes, E6638). Производные казеина, интенсивно меченные не чувствительным к pH зеленым флуоресцентным Bodipy-FL, вызывают гашение флуоресценции конъюгата. Катализируемый протеазой гидролиз высвобождает флуоресцентный Bodipy-FL. Этот способ является очень чувствительным, что было необходимо для этого эксперимента, поскольку СНУМАХ М имеет самую низкую общую протеолитическую активность всех коагулянтов, известных на сегодняшний день.

Раствор субстрата 0,04 мг/мл готовили в 0,2 М фосфатном буфере, pH 6,5, содержащем 100 мМ NaCl, 5% глицерина и 0,1% Бридж. Варианты химозина растворяли в 20 мМ малонатном буфере, содержащем 100 мМ NaCl, 5% глицерина и 0,1% Бридж. По 20 мкл раствора субстрата и варианта химозина смешивали в черном 384-луночном плоскодонном полистироловом планшете Corning и непрерывно определяли флуоресценцию в флуориметре при 32°C в течение 10 ч. Наклоны линейной части кривой изменения флуоресценции использовали для определения общей протеолитической активности.

Пример 6. Статистический анализ эффектов положения и мутации на удельную свертывающую активность и отношение C/P.

Для определения влияния одиночных мутаций, присутствующих в вариантах библиотек 1-3 с множественными заменами, на расщепление к-казеина между положениями Phe105 и Met106, то есть удельную молокосвертывающую активность, а также на соотношение свертывающей и общей протеолитической активности (C/P), использовали статистический подход с машинным обучением анализа и PCA-анализ.

Результаты.

Библиотека 1 множественных замен.

Получали варианты верблюжьего химозина, каждый из которых имел множественные замены по сравнению с диким типом, и анализировали, как описано выше. Все варианты имеют аминокислотную последовательность, идентичную верблюжьему химозину (SEQ ID NO: 2), за исключением вариаций, указанных в таблице. Верблюжий химозин (CHY-MAX M) включен в качестве эталона.

Активности свертывания определяли, используя метод μ MCU.

Таблица 1. Ферментативная активность вариантов верблюжьего химозина 180-222.

Значения приведены как % расщепления верблюжьим химозином дикого типа (CHY-MAX M)

вариант CHY-MAX M	мутации	Сверт (C) 100	Протеол (P) 100	C/P 100
180	H76Q S132A S164G L222I N249D G251D	72	37	194
181	Y21S D59N H76Q S164G L166V N249D G251D S273Y	77	37	210
182	D59N H76Q S164G L222I R242E S273Y V309I	96	21	449
183	D59N H76Q L130I L166V L222I N249D G251D S273Y	84	55	152
184	Y21S D59N S164G L222I R242E G251D S273Y V309I	102	35	287
185	K19T Y21S D59N H76Q S132A S164G L222I G251D S273Y	97	29	334
186	D59N H76Q I96L L130I S164G L222I R242E G251D	85	16	524
187	H76Q S164G L166V L222I S226T S273Y	103	21	504
188	K19T D59N I96L S164G L222I G251D	126	31	403
189	Y21S H76Q S164G L222I R242E G251D S273Y	138	14	975

190	H76Q	I96L	S164G	L222I	R242E	G251D	S273Y	153	10	1479
191	H76Q	S164G	L222I	N249D	G251D	S273Y	V309I	112	19	606
192	K19T	D59N	H76Q	S164G	L222I	N249D	S273Y	152	42	363
193	Y21S	D59N	H76Q	S164G	L222I	S226T	G251D S273Y V309I	107	32	340
194	H76Q	S164G	L166V	L222I	R242E	G251D	S273Y	132	14	949
195	D59N	H76Q	I96L	S164G	L222I	S226T	N249D G251D S273Y	96	19	498
196	D59N	H76Q	L130I	S164G	L166V	L222I	G251D S273Y V309I	76	24	316
197	D59N	S132A	S164G	L222I	R242E	N249D	G251D S273Y	138	38	365
198	H76Q	I96L	S164G	G251D	S273Y	V309I		71	16	443
199	D59N	H76Q	L130I	S164G	G251D	V309I		54	18	309
200	K19T	D59N	S164G	L166V	L222I	S226T	G251D S273Y	107	31	342
201	D59N	H76Q	I96L	S132A	S164G	L222I	S226T G251D S273Y	96	23	426
202	K19T	D59N	H76Q	I96L	S164G	L166V	L222I G251D S273Y	90	41	218
203	K19T	D59N	H76Q	L130I	S164G	L222I	S226T G251D S273Y	64	21	309
204	K19T	D59N	H76Q	S132A	L222I	G251D	S273Y V309I	141	48	294
205	H76Q	L130I	L222I	S226T	G251D	S273Y		124	38	322
206	K19T	Y21S	D59N	H76Q	L130I	S164G	L222I S273Y	75	25	295
207	Y21S	D59N	H76Q	I96L	S164G	L222I	N249D G251D S273Y	129	17	762
208	K19T	D59N	H76Q	S164G	R242E	N249D	G251D S273Y	129	15	879
209	D59N	H76Q	S164G	L222I	S226T	R242E		124	30	417
210	D59N	H76Q	I96L	S132A	S164G	L166V	L222I G251D S273Y	136	21	657
211	D59N	H76Q	S132A	S164G	L166V	S273Y		131	31	423
212	Y21S	D59N	S164G	L222I	S226T	N249D	G251D S273Y	92	48	190
213	D59N	H76Q	L130I	S132A	S164G	L222I	R242E G251D S273Y	108	24	441
214	D59N	H76Q	S164G	L166V	L222I	N249D	G251D S273Y V309I	111	65	171
215	D59N	H76Q	I96L	S164G	L222I	S226T	G251D S273Y V309I	87	24	369
216	K19T	D59N	H76Q	L166V	L222I	R242E	G251D S273Y	146	30	494
217	Y21S	D59N	H76Q	I96L	L222I	S273Y		118	52	228
218	D59N	H76Q	I96L	L130I	S164G	L222I	N249D G251D S273Y	75	23	323
219	L130I	S164G	L222I	S273Y				46	38	121
220	K19T	Y21S	H76Q	S164G	L222I	G251D	S273Y	65	28	228
221	Y21S	D59N	H76Q	L130I	S132A	S164G	L222I G251D S273Y	65	31	213
222	D59N	H76Q	S226T	R242E	G251D	S273Y		102	37	273

В табл. 1 представлены варианты верблюжьего химозина с данными по удельной свертывающей активности (С), неспецифической протеолитической активности (Р) и соотношения С/Р. Из 43 вариантов 17 обнаружили увеличенную на 10-50% удельную свертывающую активность по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа (CHY-MAX M). Все варианты имеют значительно увеличенное соотношение С/Р, с лучшим вариантом является 190, который демонстрирует приблизительно 15-кратное улучшение по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа.

Мутационный анализ библиотеки 1 с множественными заменами.

Статистический анализ позиционного и мутационного воздействий на удельную свертывающую активность и отношение С/Р проводили на основе протеолитических данных для библиотеки 1. Наиболее полезные мутации для увеличения удельного свертывания и С/Р показаны в табл. 2 и 3 соответственно.

Таблица 2. Мутационный вклад (среднее) в увеличение удельной свертывающей активности и стандартные отклонения (sd) на основе статистического анализа

мутация	среднее	sd
R242E	1.98E-01	2.47E-02
L222I	1.09E-01	3.35E-02
D59N	6.06E-02	3.12E-02
S273Y	6.06E-02	3.47E-02
K19T	5.13E-02	2.65E-02
V309I	4.37E-02	2.92E-02
S132A	4.18E-02	2.46E-02
N249D	3.85E-02	2.54E-02
I96L	3.38E-02	2.59E-02

На основании результатов, приведенных в табл. 2, был сделан вывод, что мутации K19T, D59N, I96L, S132A, L222I, R242E, N249D, S273Y и V309I увеличивают удельную свертывающую активность химозина. Следовательно, можно ожидать, что эти мутации позволяют снизить дозу химозина в производстве сыра.

Таблица 3. Мутационный вклад (среднее) в увеличение соотношения С/Р и стандартные отклонения (sd) на основе статистического анализа

мутация	среднее	sd
R242E	2.12E-01	2.82E-02
I96L	1.20E-01	2.81E-02
H76Q	9.10E-02	2.16E-02
S164G	8.59E-02	2.19E-02
S273Y	7.77E-02	2.01E-02
G251D	3.59E-02	1.99E-02

На основании результатов, приведенных в табл. 3, был сделан вывод, что мутации H76Q, I96L, S164G, R242E, G251D и S273Y увеличивают соотношение С/Р химозина. Следовательно, можно ожидать, что эти мутации приводят к повышенному выходу при производстве сыра с использованием соответствующих вариантов химозина.

Библиотека 2 с множественными заменами.

Другой набор вариантов верблюжьего химозина, каждый из которых имел множественные замены по сравнению с диким типом, был получен и проанализирован, как описано выше. Все варианты имеют аминокислотную последовательность, идентичную верблюжьему химозину (SEQ ID NO: 2), за исключением вариаций, указанных в таблице. Верблюжий химозин (CHY-MAX M) включен в качестве эталона.

Активности свертывания определяли, используя метод REMCAT.

Активность свертывания определяли с использованием метода REMCAT.

Таблица 4. Ферментативная активность вариантов верблюжьего химозина 223-269.
Значения приведены как % расщепления верблюжьего химозина дикого типа (CHY-MAX M)

вариант CHY-MAX M	мутации							Сверт (С) 100	Протеол (Р) 100	С/Р 100
223	K19T	D59N	I96L	S164G	L222I	G251D		89	37	242
224	Y11I	K19T	D59N	I96V	L222I	R242D	G251D	82	31	262
225	K19S	D59N	I96V	S164G	G251D			72	40	182
226	K19S	I96L	S164G	L166V	L222I	R242E		91	38	242
227	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	L222I	R242D G251D L253I	92	24	378
228	D59N	I96L	S164G	L222I	R242E	L253I	I263L	108	23	467
229	K19T	D59N	E83T	I96L	L222I	G251D	I263L	99	106	93
230	Y11I	K19T	D59N	S164G	L222I	G251D	I263V	54	16	343
231	K19T	D59N	I96L	S164G	L166I	G251D	L253V	63	30	206
232	K19T	I96V	S164G	L222I	N249D	G251D	L253I	56	29	193
233	K19T	I96L	L222I	R242E	L253I			125	57	220
234	K19T	E83S	I96L	S164G	L222I	R242E	G251D L253I	83	35	235
235	D59N	E83T	I96L	S164N	L222V	G251D		42	53	80
236	K19S	D59N	I96L	S164G	L222I	R242E	N249E G251D	130	28	459
237	K19T	I96L	S164G	L166V	L222I	N249D	I263L	65	30	217
238	D59N	I96L	L166V	L222I	R242E	G251D		178	51	347
239	K19T	D59N	E83T	S164G	L166V	L222I	R242D G251D	101	43	235
240	Y11I	K19T	D59N	E83S	I96L	S164G	L222I N249D	53	60	87
241	K19T	E83T	I96L	S164G	L222I	R242E	L253V	97	37	261
242	K19T	D59N	I96L	S164G	L166I	L222I	R242E N249D	129	21	623
243	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	L222I R242E G251D L253I	130	17	759
244	K19T	I96L	S164N	L222I	R242E	I263L		51	22	236
245	Y11V	D59N	I96L	S164G	L222I	G251D	L253V	63	24	265
246	K19T	D59N	I96V	S164G	L166V	L222I	R242E I263L	98	28	347
247	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164N	L166I	L222I G251D	32	16	202
248	K19T	I96L	S164G	L166V	L222I	R242E	N249D G251D I263V	105	19	566
249	K19T	I96L	S164G	R242E	L253I			73	14	516
250	K19S	D59N	E83S	I96L	S164N	L222I	G251D	47	64	74
251	K19T	D59N	I96L	S164G	L222V	N249E	G251D I263V	79	27	293
252	K19T	D59N	I96L	S164G	L222I	N249E	G251D L253V I263L	69	21	332
253	Y11I	K19T	I96L	S164G	L222V	R242E	G251D	58	2	3265
254	I96L	S164G	L222I	R242E	N249D	G251D	I263L	82	14	601
255	K19T	D59N	I96L	S164G	L166I	L222I	R242D G251D I263V	108	25	427
256	K19T	D59N	I96L	S164G	L222V	R242E	N249D L253I	111	19	574
257	H76Q	I96L	S164G	L222I	R242E	G251D	S273Y	128	8	1597
258	K19T	E83S	I96L	S164G	L222I	R242E	N249D G251D L253I	95	30	315
259	I96L	S164G	L166V	L222I	R242E	N249D	I263L	104	26	405
260	Y11V	K19T	E83S	I96L	S164G	L166V	L222I R242E G251D	97	14	676
261	Y11V	K19T	I96L	S164G	L166V	L222I	R242E	94	19	491
262	Y11V	E83S	I96L	S164G	L222I	R242E	G251D L253I I263L	61	18	332
263	Y11V	I96L	S164G	L222I	R242E	N249D	L253I I263L	67	7	961
264	K19T	I96L	S164G	L166V	L222I	R242E	N249D I263L	75	50	149
265	Y11V	E83S	I96L	S164G	L222I	R242E	L253I I263L	62	28	222
266	K19T	E83S	I96L	S164G	L166V	L222I	R242E N249D G251D L253I	97	32	302
267	I96L	S164G	L222I	R242E	G251D	S274Y		110	19	569
268	H76Q	I96L	S164G	L222I	R242E	G251D		102	10	1054
269	I96L	S164G	L222I	R242E	G251D			101	22	465

В табл. 4 представлены варианты верблюжьего химозина с данными по удельной свертывающей активности (С), неспецифической протеолитической активности (Р) и соотношения С/Р. Из 47 вариантов 8 обнаружили увеличенную на 10-78% удельную свертывающую активность по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа (CHY-MAX M). В то время как 43 варианта имеют значительно увеличенные соотношения С/Р, лучшим вариантом является 253, который демонстрирует приблизительно 33-кратное улучшение по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа.

Мутационный анализ библиотеки 2 с множественными заменами.

Статистический анализ позиционного и мутационного воздействия на удельную свертывающую активность и отношение С/Р проводили на основе протеолитических данных для библиотеки 2. Наиболее полезные мутации для увеличения удельного свертывания и С / Р показаны в табл. 5 и 6 соответственно.

Таблица 5. Мутационный вклад (среднее) в увеличение удельной свертывающей активности и стандартные отклонения (sd) на основе статистического анализа

мутация	среднее	sd
R242E	4.00E-01	3.19E-02
D59N	2.94E-01	2.26E-02
N249E	1.47E-01	3.22E-02
L166V	1.27E-01	2.70E-02
S273Y	1.23E-01	2.94E-02
L222I	1.07E-01	3.53E-02
H76Q	5.93E-02	2.94E-02
N249D	4.26E-02	2.38E-02

На основании результатов, приведенных в табл. 5, был сделан вывод, что мутации D59N, H76Q, L166V, L222I, R242E, N249D, N249E и S273Y увеличивают удельную свертывающую активность химозина. Следовательно, можно ожидать, что эти мутации позволяют снизить дозу химозина в производстве сыра.

Таблица 6. Мутационный вклад (среднее) в увеличение соотношение C/P и стандартные отклонения (sd) на основе статистического анализа

мутация	среднее	sd
R242E	4.13E-01	2.20E-02
H76Q	2.50E-01	3.24E-02
Y11I	2.49E-01	6.43E-02
S164G	2.27E-01	2.07E-02
G251D	2.10E-01	2.65E-02
R242D	1.85E-01	2.69E-02
L222V	1.75E-01	4.53E-02
Y11V	1.75E-01	2.83E-02
S273Y	8.29E-02	3.35E-02
L166I	7.64E-02	2.91E-02
I96L	3.85E-02	2.59E-02
K19T	3.85E-02	2.43E-02

На основании результатов, приведенных в табл. 6, был сделан вывод, что мутации Y11I, Y11V, K19T, H76Q, I96L, S164G, L166I, L222V, R242D, R242E, G251D и S273Y увеличивают соотношение C/P химозина. Следовательно, можно ожидать, что эти мутации приводят к повышенному выходу при производстве сыра с использованием соответствующих вариантов химозина.

Структурные изменения в верблюжьем химозине.

Варианты верблюжьего химозина (SEQ ID NO: 2) получали посредством замены аминокислот в положениях, определенных посредством структурного анализа белка (табл. 10). Мутации N100Q и N291Q были введены в оба сайта N-гликозилирования этих вариантов и эталонного верблюжьего химозина (CamUGly) с получением негликозилированных, гомогенных образцов белка.

Активности свертывания определяли, используя метод μ MCU.

Табл. 7: ферментативная активность вариантов верблюжьего химозина 271-308. Значения приведены как % расщепления негликозилированного верблюжьего химозина (CamUGly).

Таблица 7. CamBov

вариант CamUGly	мутации			Сверт (С)	Протеол (Р)	С/Р
		N100Q	N291Q	100	100	100
271	V221K	N100Q	N291Q	47	61	77
272	D290E	N100Q	N291Q	92	100	92
273	V136I	N100Q	N291Q	80	90	89
274	E240Q	N100Q	N291Q	84	144	58
276	G289S	N100Q	N291Q	93	107	86
277	N292H	N100Q	N291Q	95	93	100
278	L295K	N100Q	N291Q	102	70	146
279	V136E	N100Q	N291Q	102	102	100
280	D290L	N100Q	N291Q	44	198	22
281	F119Y	N100Q	N291Q	8	45	18
282	Q280E	N100Q	N291Q	79	72	110
283	F282E	N100Q	N291Q	93	80	116
284	N249D	N100Q	N291Q	118	84	140
285	R254S	N100Q	N291Q	47	94	50
286	R242E	N100Q	N291Q	114	67	170
288	V203R	N100Q	N291Q	99	113	88
289	N249R	N100Q	N291Q	76	108	70
290	H56K	N100Q	N291Q	99	133	74
291	S74D	N100Q	N291Q	94	87	108
292	A131D	N100Q	N291Q	17	39	44
293	Y190A	N100Q	N291Q	3	33	9
294	I297A	N100Q	N291Q	26	37	70
302	Y21S	N100Q	N291Q	97	87	111
303	L130I	N100Q	N291Q	77	82	95
306	G251D	N100Q	N291Q	100	81	123
307	Y243E	N100Q	N291Q	86	58	149
308	S273D	N100Q	N291Q	102	98	104

На основании результатов, приведенных в табл. 7, был сделан вывод, что мутации Y21S, S74D, R242E, Y243E, N249D, G251D, S273D, Q280E, F282E и L295K увеличивают соотношение С/Р химозина. Мутации R242E и N249D также приводят к увеличенной удельной свертывающей активности. Семь из десяти вариантов с увеличенными соотношениями С/Р, показанные в табл. 7, несут мутации (R242E, N249D, G251D, Y243E, S273D, Q280E, F282E) в отдельной области на поверхности белка, которая расположена вблизи связывающей щели, как видно на фиг. 2. Предполагается, что эта область поддерживает связывание к-казеин-субстрата посредством взаимодействия положительно заряженной последовательности Arg96 с His102 (ссылки 5, 16-18) в положениях P10 - P4 (ссылка 10). Отрицательные заряды, вводимые с мутациями, могут усилить эти взаимодействия, что приводит к повышенной специфичности для к-казеина (С/Р). Результаты показывают, что отдельные аминокислотные замены в этой области могут значительно увеличить С/Р.

Отрицательные комбинации зарядов в верблюжьем химозине.

Дополнительные варианты верблюжьего химозина (SEQ ID NO: 2) были сделаны с комбинациями мутаций, которые вводят отрицательные заряды в описанную выше область поверхности (R242E, Y243E, G251D, N252D, R254E, S273D, Q280E). Мутации N100Q и N291Q были введены в оба участка N-гликозилирования этих вариантов и эталона верблюжьего химозина (CamUGly) для получения негликозилированных гомогенных образцов белка (табл. 8).

Активности связывания определяли с использованием метода μ MCU.

Таблица 8. Ферментативная активность вариантов верблюжьего химозина 309-323. Значения приведены как % расщепления негликозилированного верблюжьего химозина (CamUGly)

вариант CamUGly	мутации				Сверт (С)	Протеол (Р)	С/Р
				N100Q N291Q	100	100	100
309	R242E	Q280E		N100Q N291Q	133	59	225
310	R242E	N252D		N100Q N291Q	136	63	216
311	N252D	Q280E		N100Q N291Q	108	96	112
312	Y243E	Q280E		N100Q N291Q	112	71	158
313	Y243E	N252D		N100Q N291Q	91	77	117
314	R254E	Q280E		N100Q N291Q	106	84	127
315	S273D	Q280E		N100Q N291Q	77	51	150
316	R242E	G251D		N100Q N291Q	107	72	148
317	R242E	G251D	Q280E	N100Q N291Q	138	84	164
318	R242E	S273D	Q280E	N100Q N291Q	136	98	139
319	N252D	S273D	Q280E	N100Q N291Q	115	67	171
320	G251D	S273D	Q280E	N100Q N291Q	114	64	176
321	R242E	R254E	Q280E	N100Q N291Q	134	66	202
322	R242E	R254E	S273D Q280E	N100Q N291Q	126	60	211
323	Y243E	R254E	S273D	N100Q N291Q	103	71	144

Все варианты, представленные в табл. 8, показывают увеличение отношения С/Р по сравнению с негликозилированным верблюжьим химозином. Некоторые из этих вариантов (309, 310, 321, 322, 323) имеют даже более высокий С/Р, чем лучший вариант с одиночной отрицательной мутацией заряда (286). Сделан вывод о том, что эффект увеличения С/Р, вызванный введением отрицательных зарядов в область взаимодействия P10-P4 в структуре химозина, может быть дополнительно усилен комбинациями соответствующих мутаций.

Структурные вариации в бычьем химозине.

Варианты бычьего химозина (SEQ ID NO: 1) получали с помощью замен аминокислот в положениях, определенных посредством структурного анализа белка (табл. 9). Мутации N252Q и N291Q вводили в оба сайта N-гликозилирования этих вариантов и эталонного бычьего химозина (BovUGly) с получением негликозилированных, гомогенных образцов белка.

Активности свертывания определяли, используя метод μ MCU.

Таблица 9. Ферментативная активность вариантов бычьего химозина 325-346. Значения приведены как % расщепления негликозилированного бычьего химозина (BovUGly)

вариант BovUGly	мутации			Сверт.(С)	Протеол (Р)	С/Р
		N252Q	N291Q	100	100	100
325	V223F	N252Q	N291Q	54	130	41
327	A117S	N252Q	N291Q	75	76	96
329	Q242R	N252Q	N291Q	76	166	45
330	Q278K	N252Q	N291Q	94	112	83
332	H292N	N252Q	N291Q	96	71	133
333	Q294E	N252Q	N291Q	99	79	123
334	K295L	N252Q	N291Q	106	182	58
335	D249N	N252Q	N291Q	89	129	68
337	G244D	N252Q	N291Q	100	106	93
338	Q56H	N252Q	N291Q	110	140	77
339	L32I	N252Q	N291Q	86	124	69
340	K71E	N252Q	N291Q	44	50	86
341	P72T	N252Q	N291Q	103	172	59
342	Q83T	N252Q	N291Q	92	103	88
343	V113F	N252Q	N291Q	42	44	95
344	E133S	N252Q	N291Q	93	199	46
345	Y134G	N252Q	N291Q	106	115	91
346	K71A	N252Q	N291Q	79	131	60

Данные в табл. 9 демонстрируют, что вариации Q56H, Y134G и K295L приводят к увеличенной удельной свертывающей активности и вариации H292N и Q294E приводят к повышенным соотношениям С/Р. Оба H292 и Q294 расположены в петле, частично покрывающую субстратсвязывающую щель (фиг. 3), что объясняет наблюдаемое воздействие соответствующих мутаций в этих положениях на специфич-

ность казеинового субстрата (С/Р). В частности, в то время как замены Н292N увеличивали С/Р и D249N, а также K295L уменьшали С/Р бычьего химозина, обратные эффекты на С/Р наблюдали соответствующих обратных мутаций N292H, N249D и L295K в верблюжьем химозине (табл. 7). Это демонстрирует, что эти изменения аминокислот оказывают сходное влияние на специфичность химозина среди видов.

Вариации N-конца верблюжьего химозина.

Варианты верблюжьего химозина (SEQ ID NO: 2) получали путем замены аминокислот в положениях, определенных посредством белкового структурного анализа молекулярных взаимодействий N-концевой последовательности Y11-D13 в субстратсвязывающей щели (табл. 10). Мутации N100Q и N291Q вводили в оба сайта N-гликозилирования этих вариантов и эталонного верблюжьего химозина (CamUGly) с получением негликозилированных, гомогенных образцов белка.

Активности свертывания определяли, используя метод μ MCU.

Таблица 10. Ферментативная активность вариантов верблюжьего химозина 347-366. Значения приведены как % расщепления негликозилированного верблюжьего химозина (CamUGly)

вариант	мутации			Сверт (С)	Протеол (Р)	С/Р
CamUGly		N100Q	N291Q	100	100	100
347	Y11H	N100Q	N291Q	76	131	58
348	Y11K	N100Q	N291Q	63	82	76
349	Y11R	N100Q	N291Q	55	277	20
350	Y11H D290E	N100Q	N291Q	74	105	71
351	Y11R D290E	N100Q	N291Q	62	101	62
352	Y11F	N100Q	N291Q	91	146	62
353	Y11I	N100Q	N291Q	96	83	116
354	Y11L	N100Q	N291Q	79	108	74
355	Y11V	N100Q	N291Q	101	64	157
356	L12F	N100Q	N291Q	96	147	66
357	L12I	N100Q	N291Q	83	91	91
359	D13N	N100Q	N291Q	88	131	67
360	D13Q	N100Q	N291Q	100	169	59
361	D13S	N100Q	N291Q	88	164	54
362	D13T	N100Q	N291Q	62	89	70
363	D13F	N100Q	N291Q	73	155	48
364	D13L	N100Q	N291Q	82	196	42
365	D13V	N100Q	N291Q	49	86	57
366	D13Y	N100Q	N291Q	74	99	75

Анализ структуры верблюжьего химозина сопровождал вариации в N-концевой последовательности Y11-D13, а также в положении D290, потенциального партнера взаимодействия Y11 (фиг. 4). Поскольку казеиновые субстраты конкурируют с N-концевой последовательностью химозина за связывание в связывающей щели, замены аминокислот, которые изменяют взаимодействия между связывающей щелью и мотивом Y11-D13, как ожидается, оказывают влияние на ферментативную активность в отношении различных казеиновых субстратов и, таким образом, на соотношение С/Р. Результаты соответствующих вариантов 347-366 показывают сильное изменение как удельной свертывающей активности, так и С/Р. В частности, варианты 353 и 355 обнаруживают увеличенные соотношения С/Р. Поэтому был сделан вывод, что аминокислотные замены Y11I и Y11V приводят к увеличенному соотношению С/Р. Поскольку связывающая щель химозина состоит, главным образом, из гидрофобных аминокислот (ссылка 9), обе мутации могут усилить связывание N-конца в связывающей щели посредством улучшенных гидрофобных взаимодействий и, таким образом, ингибировать неспецифическое связывание и гидролиз казеина (Р).

Библиотека 3 множественных замен.

Другой набор вариантов верблюжьего химозина, каждый из которых имел множественные замены по сравнению с диким типом, был получен и проанализирован, как описано выше. Все варианты имеют аминокислотную последовательность, идентичную верблюжьему химозину (SEQ ID NO: 2), за исключением вариаций, указанных в таблице. Верблюжий химозин (CHY-MAX M) включен в качестве эталона.

Активности свертывания определяли, используя метод μ MCU.

Таблица 11. Ферментативная активность вариантов верблюжьего химозина 367-416.
Значения приведены, как % расщепления верблюжьего химозина дикого типа (CHY-MAX M)

вариант CHY-MAX M	мутации						Сверт (С) 100	Протеол (Р) 100	С/Р 100
367	R67Q	N100Q	L130I	M157L	V248I	N291Q	46	64	72
368	N100Q	L130I	S132A	M157L	K231N		87	104	83
369	R67Q	I96L	L130I	M157L	L222I	M256L	49	56	88
370	R67Q	L130I	S132A	M157L	R242E	V248I	23	32	70
371	R67Q	N100Q	M157L	R242E	M256L		100	62	162
372	R67Q	G70D	M157L	R242E	V248I		89	32	276
373	V32L	R67Q	M157L	L222I	R242E		64	63	102
374	Y11V	R67Q	M157L	V248I	M256L		71	45	158
375	R67Q	V136I	M157L	L222I	V248I		88	20	449
376	L130I	M157L	V248I	M256L	N291Q		90	80	112
377	R67Q	I96L	L130I	M157L	K231N	R242E	124	37	339
378	V32L	R67Q	L130I	M157L	L222I	K231N	52	103	51
379	L130I	V136I	M157L	L222I	N292H		55	47	118
380	R67Q	G70D	M157L	L222I	N291Q		117	34	339
381	V32L	R67Q	L130I	K231N	N292H		58	66	87
382	Y11V	R67Q	N100Q	L130I	V136I	M157L	60	55	109
383	R67Q	L130I	L222I	R242E	M256L		78	27	290
384	R67Q	M157L	L222I	V248I	N292H		83	97	86
385	V32L	R67Q	M157L	M256L	N291Q		85	143	60
386	R67Q	L130I	S132A	M157L	L222I	N292H	78	133	58
387	R67Q	N100Q	L130I	M157L	K231N	N291Q	59	70	84
388	R67Q	L130I	K231N	V248I	N291Q		91	87	105
389	Y11V	R67Q	L130I	M157L	L222I	K231N	63	47	134
390	I45V	L130I	M157L	K231N	R242E		108	43	253
391	V32L	R67Q	V136I	M157L	N291Q		104	84	124
392	R67Q	N100Q	L130I	D158S	V248I		70	67	105
393	I45V	R67Q	L130I	M157L	L222I	K231N	79	54	147
394	V32L	R67Q	L130I	S132A	M157L	V248I	74	130	57
395	Y11V	R67Q	L130I	M157L	N291Q	N292H	74	83	90
396	R67Q	N100Q	L130I	M157L	L222I	K231N	60	81	74
397	I45V	R67Q	G70D	L130I	S132A		68	75	90
398	I45V	R67Q	L130I	V248I	N292H		53	81	66
399	Y11V	R67Q	L130I	M157L	L222I	R242E	106	28	373
400	R67Q	N100Q	D158S	L130I	M157L	L222I	57	58	98
401	R67Q	L130I	V136I	M157L	K231N	V248I	71	79	89
402	I45V	R67Q	L130I	L222I	N291Q		91	89	103
403	R67Q	G70D	L130I	M157L	K231N	M256L	89	53	167
404	V32L	R67Q	L130I	M157L	D158S	V248I	58	82	71
405	R67Q	L130I	M157L	D158S	R242E	N291Q	92	16	556
406	R67Q	L130I	M157L	D158S	K231N	N292H	53	74	72
407	R67Q	L130I	V248I	M256L	N292H		58	107	55
408	V32L	R67Q	I96L	L130I	M157L	V248I	35	76	46
409	R67Q	I96L	N100Q	L130I	M157L	N292H	96	36	263
410	V32L	R67Q	G70D	N100Q	M157L		68	66	104
411	V32L	R67Q	L130I	M157L	K231N	M256L	102	18	574
412	R67Q	I96L	M157L	L222I	K231N		120	55	220
413	R67Q	M157L	L222I	K231N	V248I		124	46	268
414	R67Q	L130I	M157L	R242E	M256L	N292H	115	59	196
415	R67Q	L222I	K231N	V248I			82	67	123
416	R67Q	S132A	L222I	K231N	R242E	V248I	129	42	306

В табл. 11 показаны варианты верблюжьего химозина с данными по удельной свертывающей активности (С), неспецифической протеолитической активности (Р) и соотношения С/Р. Из 50 вариантов, 6 обнаружили увеличенную на 10-29% удельную свертывающую активность по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа (CHY-MAX M). В то время как 23 вариантов имеют увеличенное более чем на 10% соотношение С/Р, лучшим вариантом является 411, который демонстрирует приблизительно 6-кратное улучшение по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа (CHY-MAX M).

Мутационный анализ библиотеки 3 множественных замен.

Статистический анализ позиционного и мутационного влияний на свертывающую активность (С) и соотношение С/Р выполняли на основании протеолитических данных библиотеки 3. Наиболее полезные мутации для увеличения свертывания и С/Р показаны в табл. 12 и 13 соответственно.

Таблица 12. Мутационный вклад (среднее) в увеличенную свертывающую активность и стандартные отклонения (sd) на основе статистического анализа

мутация	среднее	sd
R242E	4,63E-01	4,21E-02
I96L	2,31E-01	4,82E-02
N291Q	1,67E-01	3,97E-02
K231N	1,34E-01	3,52E-02
M256L	1,28E-01	4,44E-02
S132A	1,04E-01	3,35E-02
M157L	7,99E-02	3,49E-02

На основании результатов, приведенных в табл. 12, был сделан вывод, что мутации I96L, S132A, M157L, K231N, R242E, M256L и N291Q увеличивают удельную свертывающую активность химозина. Следовательно, можно ожидать, что эти мутации позволяют снизить дозу химозина в производстве сыра.

Таблица 13. Мутационный вклад (среднее) в увеличение соотношения С/Р и стандартные отклонения (sd) на основе статистического анализа

мутация	среднее	sd
R242E	6,66E-01	4,23E-02
G70D	3,32E-01	5,72E-02
Y11V	2,06E-01	3,61E-02
K231N	1,45E-01	2,92E-02
L222I	1,09E-01	3,71E-02
V136I	1,02E-01	4,53E-02
I96L	9,84E-02	6,02E-02
N291Q	4,78E-02	4,20E-02

На основании результатов, приведенных в табл. 13, был сделан вывод, что мутации Y11V, G70D, I96L, V136I, L222I, K231N, R242E и N291Q увеличивают соотношение С/Р химозина. Следовательно, можно ожидать, что эти мутации приводят к повышенному выходу при производстве сыра с использованием соответствующих вариантов химозина.

Библиотека 4 множественных замен.

Другой набор вариантов верблюжьего химозина, каждый из которых имел множественные замены по сравнению с диким типом, был получен и проанализирован, как описано выше. Все варианты имеют аминокислотную последовательность, идентичную верблюжьему химозину (SEQ ID NO: 2), за исключением вариаций, указанных в таблице. Верблюжий химозин (CHY-MAX M) включен в качестве эталона.

Активности свертывания определяли, используя метод REMCAT.

Таблица 14. Ферментативная активность вариантов верблюжьего химозина 417-461.

Значения приведены как % расщепления верблюжьего химозина дикого типа(CHY-MAX M)

вариант CHY-MAX M	мутации										Сверт (С) Протеол (Р)		С/Р
											100	100	
417	Y11V	K19T	D59N	S164G	L166V	L222I	R242E	N249E	G251D		132	20	651
418	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166I	L222I	R242E	N249E	G251D	114	21	556
419	Y11I	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	L222I	R242E	N249E	G251D	108	20	554
420	Y11I	K19T	D59N	I96L	S164G	L166I	L222I	R242E	G251D		98	11	898
421	Y11V	K19T	D59N	I96L	L166V	L222V	R242E	N249E	G251D	L253I	132	84	156
422	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	R242E				105	13	802
423	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L222V	R242E	G251D			89	8	1131
424	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166I	R242E	N249E	G251D	L253I	93	8	1111
425	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	N249E	G251D	105	18	572
426	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166I	L222V	R242E	N249E	G251D L253I	93	18	512
427	Y11V	K19T	D59N	L166V	L222I	R242E	N249E	G251D	L253I		137	42	323
428	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	L222I	R242E	N249E		120	15	803
429	Y11V	K19T	D59N	S164G	L166I	L222I	R242E	G251D			107	17	630
430	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	R242E	G251D				89	11	801
431	Y11V	D59N	I96L	S164G	L166I	L222V	R242E	G251D	L253I		79	28	283
432	Y11V	D59N	I96L	S164G	L166I	L222I	R242E	G251D			102	24	432

433	Y11I	D59N	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	G251D	L253I	97	25	392	
434	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L222I	R242E	N249E	G251D	99	33	301	
435	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166I	L222V	R242E	G251D	88	17	514	
436	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	N249E	L253I	95	10	949
437	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166I	L222V	R242E	N249E	G251D	114	22	520
438	Y11I	K19T	I96L	S164G	L166V	R242E	N249E	G251D		93	7	1262	
439	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	G251D	108	26	423	
440	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L222V	R242E	N249E	G251D	105	9	1196	
441	Y11I	K19T	L222V	R242E	N249E	G251D				122	26	469	
442	Y11V	K19T	I96L	L222V	R242E	N249E	G251D			105	21	503	
443	Y11I	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	N249E	G251D	105	18	595
444	Y11V	K19T	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	N249E	G251D	96	8	1242	
445	Y11I	K19T	D59N	I96L	S164G	L166I	L222V	R242E	N249E	G251D	82	12	707
446	Y11I	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	N249E	G251D		95	16	579	
447	Y11I	K19T	D59N	I96L	S164G	L222V	R242E	N249E		90	11	790	
448	Y11I	K19T	D59N	I96L	L222V	R242E	N249E	G251D		153	40	381	
449	Y11I	K19T	D59N	I96L	S164G	L222I	R242E			89	16	564	
450	Y11I	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	R242E	G251D		88	5	1686	
451	Y11I	K19T	D59N	S164G	L166I	L222V	R242E	G251D		93	21	440	
452	Y11I	I96L	L222V	R242E	N249E	G251D				122	22	566	
453	Y11I	I96L	S164G	L222I	R242E					74	5	1375	
454	Y11V	K19T	I96L	L166V	L222V	R242E	G251D			119	52	228	
455	Y11I	D59N	I96L	S164G	L222I	R242E	G251D			105	9	1139	
456	Y11I	D59N	I96L	S164G	L222V	R242E	N249E	G251D		95	15	615	
457	Y11I	K19T	D59N	I96L	S164G	L222I	R242E	N249E	G251D	101	7	1419	
458	Y11I	D59N	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	G251D		89	16	572	
459	Y11V	K19T	D59N	I96L	L222V	R242E	G251D			143	62	230	
460	Y11I	K19T	S164G	L166I	L222V	R242E	N249E	G251D		80	13	625	
461	Y11I	D59N	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	N249E	G251D	96	35	273	

В табл. 14 показаны варианты верблюжьего химозина с данными по удельной свертывающей активности (С), неспецифической протеолитической активности (Р) и соотношения С/Р. Из 45 вариантов 11 обнаружили увеличенную на 14-53% удельную свертывающую активность по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа (CHY-MAX M). В то время как все 45 вариантов имеют увеличенное более чем на 10% соотношение С/Р, лучшим вариантом является 450, который демонстрирует приблизительно 17-кратное улучшение по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа (CHY-MAX M).

Мутационный анализ библиотеки 4 множественных замен.

Статистический анализ позиционного и мутационного влияний на свертывающую активность (С) и соотношение С/Р выполняли на основании протеолитических данных библиотеки 4. Наиболее полезные мутации для увеличения свертывания и С/Р представлены в табл. 15 и 16 соответственно.

Таблица 15. Мутационный вклад (среднее) в увеличенную свертывающую активность и стандартные отклонения (sd) на основе статистического анализа

мутация	среднее	sd
D59N	3,99E-01	3,48E-02
L222I	2,05E-01	2,64E-02
L166V	1,92E-01	2,39E-02
N249E	1,45E-01	1,88E-02
G251D	9,79E-02	2,29E-02
Y11V	8,54E-02	1,56E-02
R242E	5,14E-02	2,06E-02

На основании результатов, приведенных в табл. 15 был сделан вывод, что мутации Y11V, D59N, L166V, L222I, R242E, N249E и G251D увеличивают удельную свертывающую активность химозина. Следовательно, можно ожидать, что эти мутации позволяют снизить дозу химозина при производстве сыра.

Таблица 16. Мутационный вклад (среднее) в увеличение соотношения С/Р и стандартные отклонения (sd) на основе статистического анализа

мутация	среднее	sd
S164G	7,51E-01	4,50E-02
K19T	2,85E-01	4,93E-02
I96L	2,43E-01	4,16E-02
R242E	2,25E-01	7,12E-02
L253I	2,22E-01	4,61E-02
Y11I	1,30E-01	4,93E-02
N249E	9,52E-02	3,86E-02
Y11V	9,49E-02	3,55E-02

На основании результатов, приведенных в табл. 16, был сделан вывод, что мутации Y11I, Y11V, K19T, I96L, S164G, R242E, N249E и L253I увеличивают соотношение С/Р химозина. Следовательно, можно ожидать, что эти мутации приведут к повышенному выходу при производстве сыра с использованием соответствующих вариантов химозина.

Выбранные варианты библиотеки 4 множественных замен снова подвергали ферментации в 70 л с последующей очисткой и характеристикой их протеолитического профиля (табл. 17).

Таблица 17. Ферментативная активность выбранных вариантов верблюжьего химозина из 70 л ферментации. Значения приведены как % расщепления верблюжьего химозина дикого типа (CHY-MAX M)

вариант CHY-MAX M	мутации										Сверт (С) 100	Протеол. (Р) 100	С/Р 100
433	Y11I	D59N	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	G251D	L253I		151	11	1356
436	Y11V	K19T	D59N	I96L	S164G	L166V	L222V	R242E	N249E	L253I	188	9	2007
453	Y11I	I96L	S164G	L222I	R242E						153	8	1893
457	Y11I	K19T	D59N	I96L	S164G	L222I	R242E	N249E	G251D		217	7	3002

В табл. 17 представлены варианты верблюжьего химозина из 70 л ферментации с данными по удельной свертывающей активности (С), неспецифической протеолитической активности (Р) и соотношения С/Р. Все 4 варианта обнаруживают увеличенную на 51-117% удельную свертывающую активность по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа (CHY-MAX M). В то время как все 4 варианта имеют более чем 13-кратное увеличение соотношения С/Р, лучшим вариантом является 457, который демонстрирует приблизительно 30-кратное улучшение по сравнению с верблюжьим химозином дикого типа (CHY-MAX M).

Ссылки.

1. A. Kumar, S. Grover, J. Sharma, V. K. Batish, *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010, **30**, 243-258.
2. M. W. Børsting, K. B. Qvist, M. Rasmussen, J. Vindeløv, F. K. Vogensen, Y. Ardö, *Dairy Sci.* 2012, **92**, 593-612.
3. K. Kastberg Møller, F. P. Rattray, Y. Ardö, *J. Agric. Food Chem.* 2012, **60**, 11421-11432.
4. P. L. H. McSweeney, *Int. J. Dairy Technol.* 2004, **57**, 127-144.
5. J. Langholm Jensen, A. Mølgaard, J.-C. Navarro Poulsen, M. K. Harboe, J. B. Simonsen, A. M. Lorentzen, K. Hjernø, J. M. van den Brink, K. B. Qvist, S. Larsen, *Acta Cryst.* 2013, **D69**, 901-913.
6. S. Chitpintyol, D. Goode, M. J. C. Crabbe, *Food Chem.* 1998, **62**, 133-139.
7. G. L. Gilliland, E. L. Winborne, J. Nachman, A. Wlodawer, *Proteins* 1990, **8**, 82-101.
8. D. S. Palmer, A. U. Christensen, J. Sørensen, L. Celik, K. Bruun Qvist, B. Schiøtt, *Biochemistry* 2010, **49**, 2563-2573.
9. J. Sørensen, D. S. Palmer, B. Schiøtt, *J. Agric. Food Chem.* 2013, **61**, 7949-7959.
10. I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967, **425**, 497-502.
11. L. K. Creamer, N. F. Olsen, *J. Food Sci.* 1982, **47**:631-636
12. N. Bansal, M. A. Drake, P. Piraino, M. L. Broe, M. Harboe, P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, *Int. Dairy J.* 2009, **19**:510-517.
13. A. C. Moynihan, S. Govindasamy-Lucey, J. J. Jaeggi, M. E. Johnson, J. A. Lucey, P. L. H. McSweeney, *J. Dairy Sci.* 2014, **97**:85-96.
14. J. Ehren, S. Govindarajan, B. Moron, J. Minshull, C. Khosla, *Prot. Eng. Des. Sel.* 2008, **21**, 699-707.
15. S. Govindarajan, B. Mannervik, J. A. Silverman, K. Wright, D. Regitsky, U. Hegazy, T. J. Purcell, M. Welch, J. Minshull, C. Gustafsson, *ACS Synth. Biol.* 2015, **4**, 221-227.
16. M. Newman, M. Safro, C. Frazao, G. Khan, A. Zdanov, I. J. Tickle, T. L. Blundell, N. Andreeva, *J. Mol. Biol.* 1991, **221**, 1295-1309.
17. E. Gustchina, L. Rumsh, L. Ginodman, P. Majer, N. Andreeva, *FEBS Lett.* 1996, **379**, 60-62.
18. S. Visser, C. J. Slangen, P. J. van Rooijen, *Biochem. J.* 1987, **244**, 553-558.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный вариант полипептида химозина, содержащий модификацию в положении по сравнению с родительским полипептидом, имеющим химозиновую активность, где модификация включает замену в аминокислотном положении, соответствующем положению Y11, где

(1) указанное аминокислотное положение родительского полипептида определено выравниванием родительского полипептида с полипептидом SEQ ID NO: 2 и

(2) родительский полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин);

где выделенный вариант полипептида химозина имеет более высокое соотношение C/P (удельная свертывающая активность/протеолитическая активность), чем соответствующий родительский полипептид, где модификация представляет собой Y11I или Y11V.

2. Выделенный вариант полипептида химозина по п.1, имеющий удельную свертывающую активность (IMCU(международная молокосвертывающая единица)/мг общего белка), которая составляет по меньшей мере 85%, такую как, например, по меньшей мере 90, 100, 110, 120 или 130% удельной свертывающей активности родительского полипептида.

3. Выделенный вариант полипептида химозина по п.1 или 2, имеющий соотношение C/P, составляющее по меньшей мере 200%, такое как, например, по меньшей мере 400%, по меньшей мере 500%, по

меньшей мере 750% или по меньшей мере 1000% соотношения C/P его родительского полипептида.

4. Выделенный вариант полипептида химозина по любому из пп.1-3, где родительский полипептид имеет по меньшей мере 82%, такую как по меньшей мере, например, 85, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин).

5. Выделенный вариант полипептида химозина по любому из пп.1-4, дополнительно включающий модификацию, где указанная модификация включает замену, выбранную из списка, состоящего из D59N, V309I, S132A, N249E, L166V, N249D, Q56H, M157L, M256L, R242E, I96L, H76Q, S164G, S273Y, G251D, R242D, L222V, L166I, K19T, Y21S, S74D, Y243E, S273D, Q280E, F282E, L295K, N252D, R254E, G70D, V136I, L222I, K231N, N291Q.

6. Способ получения выделенного варианта полипептида химозина по любому из пп.1-5, включающий стадии:

(а) осуществление модификации в положении в родительском полипептиде, где модификация включает замену в аминокислотном положении, соответствующем положению Y11;

(б) выделение модифицированного родительского полипептида со стадии (а) с получением варианта полипептида химозина,

и где

(1) аминокислотное положение родительского полипептида определено выравниванием родительского полипептида с полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин); и

(2) родительский полипептид имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 3 (бычий химозин) и/или по меньшей мере 80% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин),

где модификация представляет собой Y11I или Y11V.

7. Способ получения выделенного варианта полипептида химозина по п.6, дополнительно включающий модификацию, где указанная модификация представляет собой одну или более замен: S164G, L253I, D59N, V309I, S132A, N249E, L166V, N249D, Q56H, M157L, M256L, R242E, I96L, H76Q, S164G, S273Y, G251D, R242D, L222V, L166I, K19T, Y21S, S74D, Y243E, S273D, Q280E, F282E, L295K, N252D, R254E, G70D, V136I, L222I, K231N, N291Q.

8. Способ получения выделенного варианта полипептида химозина по п.6 или 7, где родительский полипептид имеет по меньшей мере 95% идентичность последовательности со зрелым полипептидом SEQ ID NO: 2 (верблюжий химозин).

9. Способ получения продукта на основе молока, включающий добавление эффективного количества выделенного варианта полипептида химозина по любому из пп.1-5 в молоко и выполнение дальнейших стадий производства с получением продукта на основе молока.

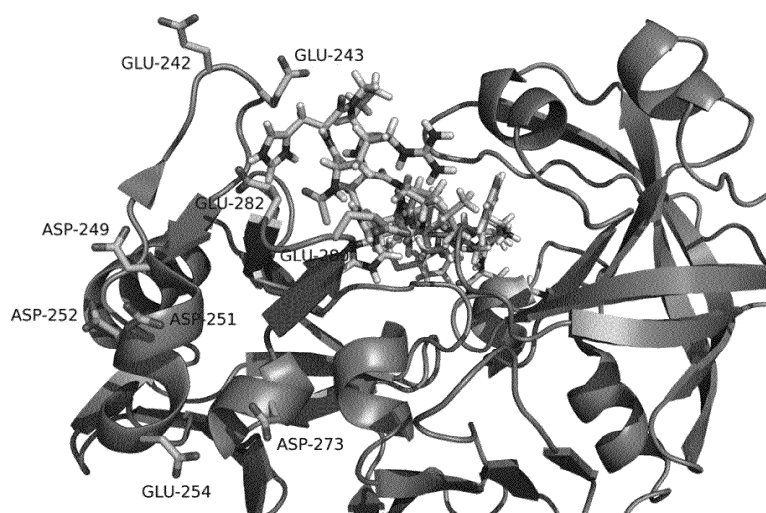
10. Применение варианта полипептида химозина по любому из пп.1-5 для получения сыра.

11. Применение варианта полипептида химозина по любому из пп.1-5 для получения вытяжного сыра, чеддера и сыров континентального типа.

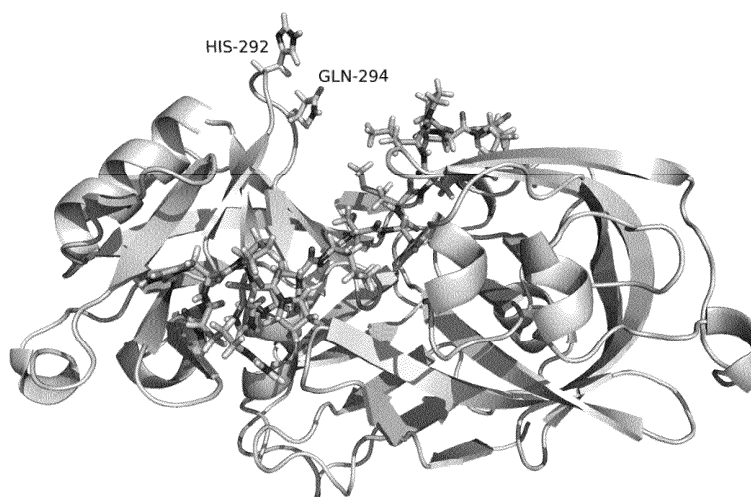
12. Применение варианта полипептида химозина по любому из пп.1-5 для получения мягкого сыра или белого рассольного сыра.

	1		50
Bos_bovis_chymosin_B	MRCLVLLAV	FALSQGAET	RIPLYKGKSL RKALKEHGLL EDFLQKQQYG
Овца	MRCLVLLAV	FALSQGAET	RIPLYKGKPL RKALKERGLL EDFLQKQQYG
C. bactrianus	MRCLVLLAA	LALSQASGIT	RIPLHKGKTL RKALKERGLL EDFLQKQQYA
Camelus_dromedarius	MRCLVLLAA	LALSQASGIT	RIPLHKGKTL RKALKERGLL EDFLQKQQYA
свинья	IRGRVLLAV	LALSQGSGIT	RVPLRKGKSL RKALKERGLL EDFLQKQPYA
крыса	MRCFVLLAV	LAIAQSHVVT	RIPLHKGKSL RNTLKEQGLL EDFLRRHQYE
	51		100
Bos_bovis_chymosin_B	ISSKYSGFGE	VASVPLTNYL	DSQYFGKIYL GTPPQEFTVL FDTGSSDFWV
Овца	VSSEYSGFGE	VASVPLTNYL	DSQYFGKIYL GTPPQEFTVL FDTGSSDFWV
C. bactrianus	VSSKYSSLGK	VAREPLTSYL	DSQYFGKIYL GTPPQEFTVW FDTGSSDLWV
Camelus_dromedarius	VSSKYSSLGK	VAREPLTSYL	DSQYFGKIYL GTPPQEFTVW FDTGSSDLWV
свинья	LSSKYSSFGE	VASEPLTNYL	DTQYFGKIYL GTPPQEFTVW FDTGSSDLWV
крыса	FSEKNSNIGM	VASEPLTNYL	DSEYFGLIYV GTPPQEFTVW FDTGSSDLWV
	101		150
Bos_bovis_chymosin_B	PSIYCKSNAC	KNHQRFDPK	SSTFQNLGKP LSIHYGTGSM QGILGYDTVT
Овца	PSIYCKSNAC	KNHQRFDPK	SSTFQNLGKP LSIHYGTGSM QGILGYDTVT
C. bactrianus	PSIYCKSNAC	KNHHRFDPK	SSTFRNLGKP LSIHYGTGSI EGFLGYDTVT
Camelus_dromedarius	PSIYCKSNVC	KNHHRFDPK	SSTFRNLGKP LSIHYGTGSM EGFLGYDTVT
свинья	PSVYCKSDAC	QNHHRFNPSK	SSTFQNLGKP LSIHYGTGSI QGFLGYDTVM
крыса	PSVYCSSKVC	RNHHRFDPK	SSTFQNLGKP LSIHYGTGSI EGFLGYDTVT
	151		200
Bos_bovis_chymosin_B	VSNIVDIQQT	VGLSTQEPGD	VFTYAEFDGI LGMAYPSLAS EYSIPVFDNM
Овца	VSNIVDIQQT	VGLSTQEPGD	VFTYAEFDGI LGMAYPSLAS EYSIPVFDNM
C. bactrianus	VSNIVDPNQT	VGLSTEQPGE	VFTYSEFDGI LGLAYPSLAS EYSVPVFDNM
Camelus_dromedarius	VSNIVDPNQT	VGLSTEQPGE	VFTYSEFDGI LGLAYPSLAS EYSVPVFDNM
свинья	VAGIVDAHQT	VGLSTQEPSD	IFTYSEFDGI LGLGYPELAS EYTPVFDNM
крыса	VSDIVVPHQT	VGLSTEEPGE	IFTYSEFDGI LGLAYPTFAS KYSVPVFDNM
	201		250
Bos_bovis_chymosin_B	MNRHLVAQDL	FSVYMDRNGQ	ESMLTLGAID PSYYTGSLHW VPVTVQQYWQ
Овца	MDRRLVAQDL	FSVYMDRSGQ	GSMLTLGAID PSYYTGSLHW VPVTLQKYWQ
C. bactrianus	MDRHLVARDL	FSVYMDRNGQ	GSMLTLGATD PSYYTGSLHW VPVTVQQYWQ
Camelus_dromedarius	MDRHLVARDL	FSVYMDRNGQ	GSMLTLGAID PSYYTGSLHW VPVTLQKYWQ
свинья	MHRHLVAQDL	FAVYMSRNDQ	GSMLTLGAID PSYYTGSLHW VPVMTQLYWQ
крыса	MNRHLVAQDL	FSVYMSRNDQ	GSMLTLGAID QSYFTGSLHW VPVTVQQYWQ
	251		300
Bos_bovis_chymosin_B	FTVDSVTISG	VVVACEGGCQ	AILDGTGSKL VGPSSDILNI QQAIGATQNG
Овца	FTVDSVTISG	AVVACEGGCQ	AILDGTGSKL VGPSSDILNI QQAIGATQNG
C. bactrianus	FTVDSVTING	VAVACVGGCQ	AILDGTGSKL VGPSSDILNI QQAIGATENR
Camelus_dromedarius	FTVDSVTING	VAVACVGGCQ	AILDGTGSKL VGPSSDILNI QQAIGATENR
свинья	FTVDSVTING	VVVACNGGCQ	AILDGTGSKL VGPSSDILNI QQAIGATESQ
крыса	FTVDRITIND	EVVACQGGCP	AVLDGTGSKL VGPSSDILNI QQAIGAVQGG
	301		350
Bos_bovis_chymosin_B	YGEFDIDCDN	LSYMPTVVFE	INGKMYPLTP SAYTSQDQGF CTSGFQSENH
Овца	YGEFDIDCDN	LSYMPTVVFE	INGKMYPLTP SAYTSQDQGF CTSGFQSENH
C. bactrianus	YGEFDVNCGS	LRSMPTVVFE	INGRDFPLAP SAYTSKDQGF CTSGFQGDNN
Camelus_dromedarius	YGEFDVNCGS	LRSMPTVVFE	INGRDFPLAP SAYTSKDQGF CTSGFQGDNN
свинья	YGEFDIDCGS	LSYMPTVVFE	ISGRMYPLPP SAYTNQDQGF CTSGFQGDNS
крыса	HDQFDIDCWR	LNFMPTVVFE	INGREFPLPP SAYTNQDQGF CSSGF..HG
	351		381
Bos_bovis_chymosin_B	SQKWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNLVGLAKA I
Овца	SHQWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNLVGLAKA I
C. bactrianus	SELWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNRVGLAKA I
Camelus_dromedarius	SELWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNRVGLAKA I
свинья	SQHWILGVVF	IQEYYSVFDR	ANNRVGLAKA I
крыса	SQMWILGDVF	IREYYSVFDR	ANNRVGLAKA I

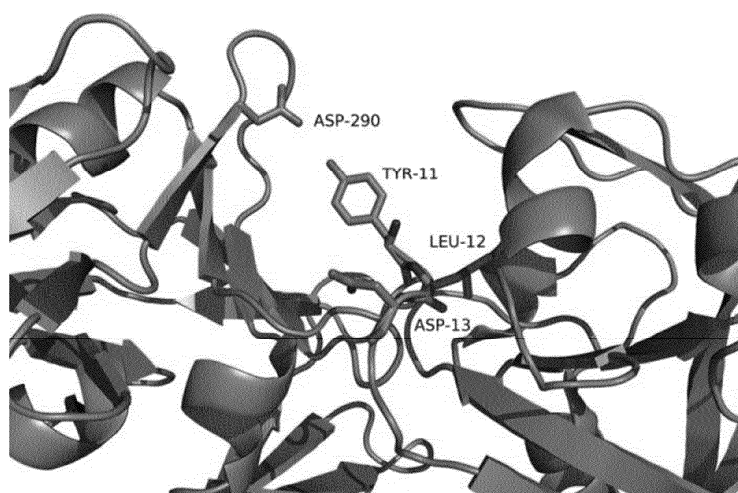
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

