

Андрей Павлович Рудометов¹, младший научный сотрудник
 Светлана Валерьевна Беленькая¹, аспирантка
 Дмитрий Николаевич Щербakov^{1, 3}, канд. биол. наук, доцент
 Дина Владимировна Балабова^{2, 3}, младший научный сотрудник
 Анастасия Викторовна Кригер², канд. техн. наук, доцент, старший научный сотрудник
 Вадим Валентинович Ельчанинов², канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник
¹ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирская область, п. Кольцово
²ФГБНУ СибНИИ сыроделия, Барнаул
³ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул
 E-mail: ve3636@yandex.ru
 УДК 637.325:543.54

Исследование ферментативной стабильности жидких препаратов рекомбинантного химозина коровы (*Bos taurus taurus L.*)*

Исследована ферментативная стабильность жидких препаратов рекомбинантного химозина (рХн) в присутствии хлорида натрия и бензоата натрия (Na-Bz). Установлено, что добавление в раствор рХн хлорида натрия в концентрации 10 % приводит к снижению молокосвертывающей активности (МА) на 46 %. Внесение Na-Bz в концентрации 0,4 % не влияет на активность препаратов рХн. Одновременное внесение NaCl (10 %) и Na-Bz (0,4 %) в препарат рХн снижает его активность на 45 %. Мониторинг МА контрольных и опытных препаратов проводился на протяжении 6 мес. Установлено, что в процессе длительного хранения МА контрольного препарата (без добавок) снизилась приблизительно на 16 %. Наиболее стабильными оказались образцы, содержащие 0,4 % Na-Bz, – потери МА составили приблизительно 11 %. Наибольшие потери МА наблюдали в образцах, содержащих 10 % NaCl и 10 % NaCl+0,4 % Na-Bz – приблизительно на 21 и 19 % соответственно. Сделан вывод о том, что для повышения стабильности жидких препаратов рХн необходимо оптимизировать концентрацию хлорида натрия и подобрать буфер с эффективной буферной емкостью в диапазоне ферментативной стабильности химозина.

Ключевые слова: сычужный фермент, рекомбинантный химозин, рекомбинантный прохимозин, активация, молокосвертывающая активность, длительное хранение.

Rudometov A.P., Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Krieger A.V., Elchaninov V.V. Characterization of enzymatic stability of recombinant bovine (*Bos taurus taurus L.*) chymosin liquid preparations

The enzymatic stability of liquid preparations of recombinant chymosin (rCn) in the presence of sodium chloride and sodium benzoate (Na-Bz) was investigated. Addition of sodium chloride at a concentration of 10 %, leads to a decrease in milk-clotting activity (MA) of the rCn sample by 46 %. The introduction of Na-Bz at a concentration of 0,4 % does not affect the activity of rCn preparations. Simultaneous application of NaCl (10 %) and Na-Bz (0,4 %) reduces the rCn preparations activity by 45 %. Monitoring of MA of control and test samples was carried out for 6 months. Found that during long-term storage MA of control product (without additives) has decreased by ~16 %. The most stable was the samples containing 0,4 % Na-Bz – MA loss was ~11 %. The greatest losses of MA observed in the samples containing 10 % NaCl and 10 % NaCl+0,4 % Na-Bz – by ~21 % and ~19 %, respectively. It is concluded that, to increase the stability of liquid preparations rCn it's necessary to optimize the concentration of sodium chloride and choose a buffer with an effective buffer capacity in the range of stability of the chymosin.

Key words: rennet, recombinant chymosin, recombinant prochymosin, activation, milk-clotting activity, long-time storage.

Ключевая стадия выработки сыра – получение молочного сгустка под действием молокосвертывающего ферментного препарата (МФП). В природе существует множество ферментов, способных свертывать молоко. Однако классическим МФП, обеспечивающим максимальный выход и качество сыра, традиционно считается сычужный фермент (СФ). Основным действующим агентом СФ является химозин – кислая аспаргатная эндопептидаза (ЕС 3.4.23.4). По совокупности биохимических и технологических свойств: высокой специфичности к связи Phe₁₀₅-Met₁₀₆ в молекуле κ-казеина, низкой общей протеолитической активности и термолабильности – химозин коровы до недавних пор считался эталонным молокосвертывающим ферментом (МФ).

* Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 17-44-220540_p_a и гранта Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК», № 9544ГУ.

Начиная со второй половины XX в., производители МФП столкнулись с нехваткой сычужков «легких» телят – основного сырья для производства СФ [1, 2]. Проблема обострилась в связи с эпидемией «скрэпи» (прионовое заболевание сельскохозяйственных животных), которая обрушила сырьевую базу натуральных МФ. Мировой дефицит СФ инициировал поиск его заменителей среди природных молокосвертывающих протеиназ животного, растительного и микробного происхождения, продолжающийся и в настоящее время [1–5].

Современное решение проблемы дефицита СФ – создание и совершенствование технологий производства рекомбинантных (генно-инженерных) МФ. Свидетельство тому – разработка промышленных технологий производства рекомбинантных химозинов основными промышленно развитыми сыродельными державами (Дания, США, Германия, Франция, Италия) [6]. Причем в насто-

ящее время речь идет не только о рекомбинантном химозине (рХн) коровы (*Bos taurus*), но и о рекомбинантных химозинах других видов млекопитающих [7, 8]. Именно с использованием методов генной инженерии компанией Chr. Hansen (Дания) была показана возможность производства коммерческого рХн верблюда (*Camelus dromedarius*), который по биохимическим и технологическим свойствам превосходит химозин *Bos taurus* [8]. Отметим, что промышленное производство натурального химозина верблюда невозможно ввиду отсутствия сырьевой базы.

Для того чтобы сохранить определенный уровень экономической и продовольственной безопасности, перед Россией возникла необходимость решения ряда проблем, связанных с импортозамещением. Одной из задач стало создание технологии получения рекомбинантных молокосвертывающих ферментов для сыроделия. Разработка технологии производства отечественного рХн призвана

обеспечить защиту и независимость российских сыропроизводителей от меняющейся политической и экономической конъюнктуры.

Целью настоящей работы является разработка технологии производства рекомбинантного химозина для сыроделия. Достижение поставленной цели предполагает получение генетических конструкций рХн или рекомбинантного прохимозина (рПроХн) коровы (или других видов млекопитающих), подбор оптимальных прокариотических систем экспрессии генов рХн или рПроХн, отработку технологии активации рПроХн, подготовку стабильных препаратов жидкого рХн, исследование биохимических и технологических характеристик рекомбинантного коагулянта и его апробацию при выработке сыра.

В 2016 г. группой исследователей из Алтайского государственного университета и ГНЦ ВБ «Вектор» в составе вектора рЕТ21а были клонированы гены химозина В и прохимозина В коровы. Для получения штамма продуцента проведена трансформация *E. coli* (штамм BL21) полученными рекомбинантными плазмидами [9]. Было показано, что в выбранной системе рХн накапливается в бактериальной массе гораздо интенсивнее, чем рПроХн. Однако после выделения и очистки полученный рХн был коагуляционно неактивен. В то же время выделенный и очищенный рПроХн после активации демонстрировал высокую молокозвертывающую активность (МА). В задачи данного исследования входило получение препаратов рПроХн, активация профермента, получение активных жидких препаратов рекомбинантного химозина и мониторинг их молокозвертывающей активности при длительном (не менее 6 мес) хранении.

Объект исследования – рПроХн В и рХн В коровы. Разработку прокариотического продуцента рекомбинантного прохимозина В коровы – *Escherichia coli* BL21(DE3) рLysE рЕТ21а – ProChym, выделение целевого белка из телечлук и очистку рПроХн и рХн при помощи металл-хелатной хроматографии проводили на базе АлтГУ с использованием методических приемов, опубликованных ранее [9]. Активацию препаратов рекомбинантного прохимозина, подготовку образцов рХн и исследование их специфической (молокозвертывающей)

активности в процессе длительного хранения проводили в лаборатории биохимии СибНИИ сыроделия.

Для активации и исследования МА были подготовлены два препарата рПроХн – № 1 (серия 25.11.16, объем ~22 мл) и № 2 (серия 26.11.16, объем ~20 мл), различающиеся по концентрации белка.

Активацию рПроХн проводили путем ступенчатого изменения рН. Все операции выполняли в пластиковой посуде при комнатной температуре. Для контроля исходной молокозвертывающей активности (МА) рекомбинантного прохимозина отбирали аликвоты неактивированного профермента. Для активации в образец рПроХн при постоянном перемешивании вносили 2,0М HCl до рН 3,0±0,1. Останавливали перемешивание и инкубировали смесь при рН 3,0±0,1 в течение 2 ч. По истечении времени инкубации доводили рН образца до 5,9±0,1, используя 0,5М NaOH. В активированном таким способом образце определяли МА.

После активации и определения МА препараты № 1 и № 2 объединили и получили препарат № 3 (объем ~40 мл), из которого приготовили образцы для мониторинга ферментативной стабильности. Для исследования влияния NaCl (в концентрации 10 %) и бензоата натрия (Na-Bz) (в концентрации 0,4 %) на ферментативную стабильность жидких препаратов рекомбинантного химозина (рХн), препарат № 3 разделили на четыре равные части и подготовили следующие образцы: 1 – контроль (без добавок); 2 – опыт (внесен NaCl, до конечной концентрации 10 %); 3 – опыт (внесен Na-Bz, до конечной концентрации 0,4 %); 4 – опыт (внесены NaCl и Na-Bz до конечной концентрации соответственно 10 и 0,4 %).

В контрольном и опытных образцах определяли МА (стартовые значения). В дальнейшем образцы хранили в пластиковых пробирках при температуре 5±3 °С. На протяжении полугода, через 30-дневные интервалы, во всех образцах определяли молокозвертывающую активность по ранее опубликованной методике [10]. В качестве субстрата использовали «Стандартизированный молочный субстрат» (СМС) производства ОАО «Московский завод сычужного фермента» (ОАО «МЗСФ»). Молокозвертывающую активность определяли, смешивая про-

гретые до 35±1 °С растворы СМС и исследуемых препаратов рХн в соотношении 10:1. Результат выражали в условных единицах (УЕ/мл), в качестве стандарта использовали отраслевой контрольный образец сычужного фермента (ОАО «МЗСФ»), аттестованный по МА.

Концентрация белка в образцах рПроХн № 1 и № 2 была соответственно ~0,22 и ~0,13 мг/мл. Концентрация белка в образце рПроХн № 3 (№ 1 + № 2) составила ~0,17 мг/мл.

Активация рПроХн. Химозин транслируется в рибосомах клеток слизистой оболочки желудка в виде неактивного предшественника (прекурсора), с молекулярной массой (ММ) ~43,0 кД – препрохимозина (рис. 1). «Пре» фрагмент или сигнальный пептид состоит из 16 аминокислотных остатков и проявляет гидрофобные свойства, что необходимо для внутриклеточного транспорта прекурсора. В процессе трансляции мРНК гидрофобный сигнальный пептид свободно внедряется в мембрану эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и «протаскивает» за собой молекулу препрохимозина. После проникновения во внутреннее пространство ЭПР сигнальный пептид элиминируется, и прекурсор превращается в прохимозин – неактивный зимоген с ММ ~40,8 кДа. Из цистерн ЭПР прохимозин попадает в аппарат Гольджи, откуда секретируется в периплазматическое пространство. «Про» фрагмент или активационный сегмент состоит из 42 аминокислотных остатков и блокирует активный центр фермента. Это создает стерическое препятствие для контакта с молекулами субстрата и обеспечивает ферментативную неактивность прохимозина [11, 12].

Активный (зрелый) химозин (ММ ~36,0 кД) образуется при кислых значениях рН (оптимально – при рН 4–5) за счет аутокаталитического гидролиза, при котором с N-терминального участка молекулы прохимозина удаляется активационный сегмент. Предполагается, что при рН ~2,0 от N-концевого участка прохимозина «отрезается» последовательность из 28 аминокислотных остатков и активация происходит с образованием промежуточного продукта – псевдохимозина, который превращается в химозин путем аутолиза еще

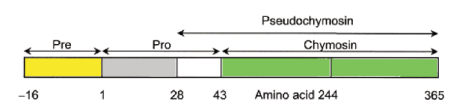


Рис. 1. Структура зимогенов химозина [12]

14 аминокислотных остатков, при pH > 4. Оба продукта активации – химозин и псевдохимозин – обладают молокосвертывающей активностью [11].

Во избежание аутокаталитической активации препараты рПроХн после выделения и очистки хранили в слабощелочном буфере (50 мМ TRIS-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,5±0,1). Для активации рПроХн выбрана процедура титрования до pH 3,0, поскольку на стадии предварительных экспериментов при этих значениях pH были получены максимальные значения МА. Конечное значение pH 6,0 выбрано, исходя из того, что химозин стабилен при умеренно кислых значениях pH 5,3–6,3 и теряет активность при pH > 6,5 [http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.4]. Результаты определения МА образцов рПроХн до и после активации представлены в табл. 1.

После активации специфическая (молокосвертывающая) активность исследованных препаратов возрастает более чем в 300 раз, что свидетельствует об эффективности процедуры превращения рПроХн В в активный рХн В.

Молокосвертывающая активность. Общая МА образца рХн (№ 3) составила ~511 УЕ/мл. Молокосвертывающая активность используемых в сыроделии жидких коммерческих МФП, как правило, составляет приблизительно 30–130·10³ УЕ/мл (например, «Naturen® Premium 225», «Chy-Max® 600» и «Chy-Max® М 1000», от компании Chr. Hansen (Дания) или «Clerici 9604» от компании Caglificio Clerici (Италия)). Таким образом, МА образца № 3 примерно в 60–250 ед. ниже требований, предъявляемым к жидким МФП. Низкие значения МА экспериментального образца № 3 обусловлены его большим разведением и частично потерями активного белка в процессе выделения и очистки. В дальнейшем коагуляционная активность препаратов рХн может быть увеличена до необходимых значений, например, с использованием ультрафильтрации (УФ). Отметим, что в ряде существующих технологий рПроХн секретируется продуцентом

в культуральную жидкость [13, 14]. Если компоненты культуральной жидкости коагуляционно неактивны и не содержат токсинов продуцента, то выделение и очистка целевого фермента не требуются. Активация профермента и превращение его в активный рХн могут проводить непосредственно в культуральной жидкости, которую впоследствии концентрируют методом УФ до необходимых значений МА.

В пересчете на белок специфическая активность образца № 3 составила 300 600 УЕ/г. Это значение сопоставимо с активностью сухих коммерческих импортных препаратов «100 % рекомбинантного химозина». Заявленная активность таких препаратов достигает 2100 IMCU/г, что соответствует приблизительно 275 000 УЕ/г.

Изменение МА в процессе длительного хранения. Основными консервантами, используемыми при производстве жидких препаратов СФ и рекомбинантных химозинов млекопитающих, являются хлористый натрий в концентрации 10,0 % и бензоат натрия в концентрации 1,0 или 0,5 %. При формулировании микробных коагулянтов молока, например мукорпепсинов, концентрация хлорида натрия может превышать 15,0 %, а бензоат натрия применяют в концентрации 0,3–0,5 %. Регламентируемые условия хранения жидких препаратов химозинов и микробных коагулянтов молока – пластиковая тара и температура 0–8 °С. Сроки годности, как правило, не превышают 12 мес. Допускаемые для жидких препаратов химозина потери МА составляют не более 4 % за 12 мес (Caglificio Clerici, Италия). Значения МА контрольных и опытных препаратов в зависимости от времени хранения представлены в табл. 2.

Внесение в раствор рХн В хлорида натрия до конечной концентрации 10 % (опыт 1) угнетает коагуляционную способность и приводит к снижению МА препарата приблизительно на 46 %. Внесение Na-Bz в концентрации 0,4 % не влияет на активность препаратов рХн (опыт 2). Одновременное внесение NaCl (10 %) и

Na-Bz (0,4 %) в препарат рХн снижает его активность на 45 % (опыт 3). Очевидно, что снижение ферментативной активности в опытных образцах № 1 и № 3 обусловлено высокой концентрацией соли. Несмотря на почти двукратное подавление МА в присутствии 10 % хлорида натрия, опытные образцы № 1 и № 3 включили в экспериментальный пул для определения динамики изменения МА в условиях высокой ионной силы.

В процессе хранения все исследованные препараты постепенно теряли МА. Динамика изменения коагуляционной активности контрольных и опытных образцов рекомбинантных химозинов в процентах от исходных (стартовых) значений представлена на рис. 2. Критической для контроля и образцов № 1 и № 3 оказалась отметка в 5 мес, после которой активность этих препаратов заметно снизилась. Через 6 мес хранения исследованные препараты продемонстрировали следующие значения остаточной МА: контроль – ~84 %, опыт 1 – ~79 %, опыт 2 – ~89 %, опыт 3 – ~81 %. Столь большие потери МА в процессе длительного хранения растворов рХн отчасти можно объяснить невысокой концентрацией активного фермента, которая была примерно на два порядка ниже, чем в коммерческих препаратах жидкого химозина. Как известно, стабильность ферментных препаратов снижается по мере уменьшения их концентрации [15].

Полученные данные показывают, что сконструированный рХн В коровы без каких-либо добавок в присутствии 50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl при pH 5,9±0,1 за полгода хранения в жидком виде теряет ~14 % МА. Следует отметить, что в экспериментах использовали препараты, содержащие TRIS-буфер, титрованный до pH 5,9±0,1, это является не лучшим вариантом для конечной формулы жидкого препарата рХн. К недостаткам Tris-буфера следует отнести его дороговизну и неподходящий для рХн диапазон буферной емкости (pKa = 8,3). Поэтому для дальнейшего совершенствования технологии производства жидкого рХн потре-

Таблица 1

Молокосвертывающая активность образцов рПроХн до и после активации

Образец	МА, усл. ед/мл (X ± m)
№ 1 (рПроХн, серия: 251116, неактивированный)	< 1,6*
№ 1 (рПроХн, серия: 251116, активированный)	505,97±4,49
№ 2 (рПроХн, серия: 261116, неактивированный)	< 1,6*
№ 2 (рПроХн, серия: 261116, активированный)	522,50±0,00**
№ 3 (рПроХн, № 1 + № 2, неактивированный)	< 1,6*
№ 3 (рПроХн, № 1 + № 2, активированный)	510,90±2,19

* Свертывания субстрата не наступает более 12 ч.

** Во всех повторностях получены одинаковые результаты.

Таблица 2

Молокосвертывающая активность контрольных и опытных образцов рХн в процессе хранения

Время хранения, мес	Молокосвертывающая активность, УЕ/мл (X ± m)			
	Контроль (без добавок)	Опыт 1 (+10 % NaCl)	Опыт 2 (+0,4 % Na-Bz)	Опыт 3 (+10 % NaCl, +0,4 % Na-Bz)
0 (старт)	510,9 ± 3,8	277,0 ± 1,1	518,6 ± 3,9	282,3 ± 0,4
1	484,3 ± 2,4	264,6 ± 2,5	508,8 ± 5,5	278,3 ± 2,4
2	464,5 ± 2,5	271,6 ± 1,8	482,3 ± 2,7	288,9 ± 2,9
3	463,0 ± 4,1	253,6 ± 1,2	467,6 ± 3,2	266,8 ± 2,2
4	470,7 ± 2,5	269,8 ± 1,2	476,5 ± 3,9	271,2 ± 0,9
5	462,4 ± 3,3	252,5 ± 1,3	476,1 ± 3,1	260,2 ± 0,5
6	431,2 ± 1,6	220,2 ± 2,7	462,1 ± 1,9	228,4 ± 2,4

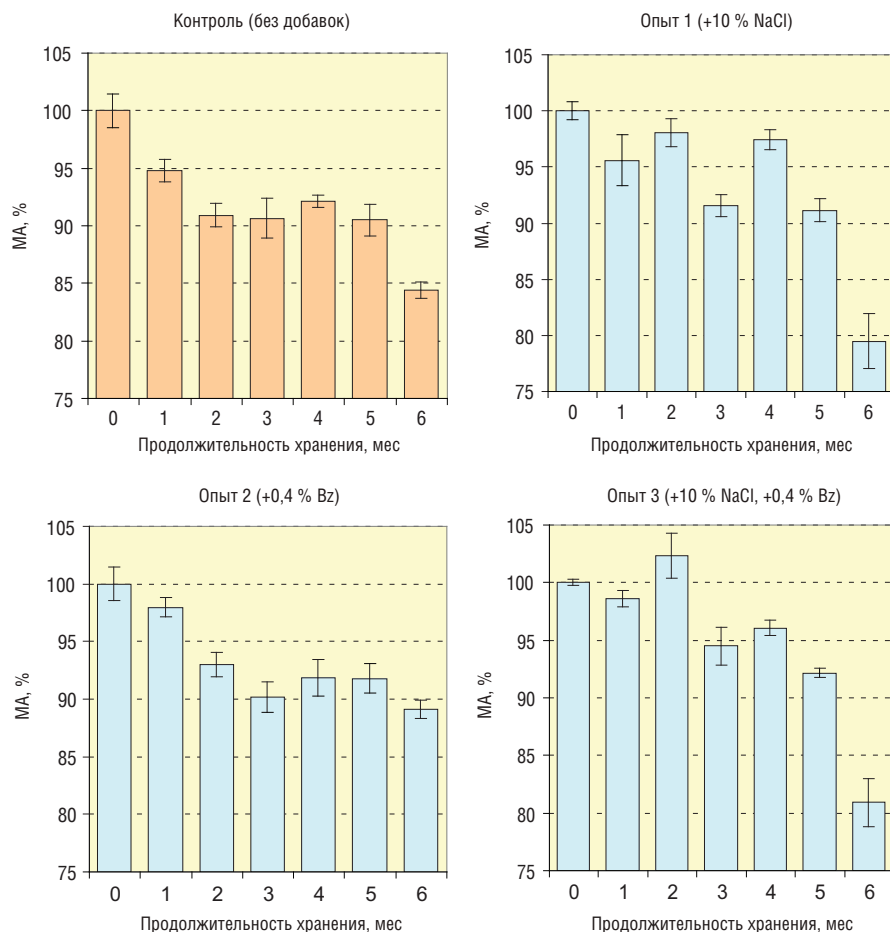


Рис. 2. Изменение молокозвертывающей активности жидких препаратов рекомбинантного химозина в зависимости от продолжительности хранения

буется подбор дешевого буфера с эффективной буферной емкостью в диапазоне максимальной ферментативной стабильности химозина.

Снижение МА через полгода хранения в опытных образцах № 1 и № 3 соответственно на ~21 и ~19 % позволяет сделать вывод о том, что хлорид натрия в концентрации 10 % не стабилизирует ферментативную активность рХн. А с учетом почти двукратного угнетения МА препаратов рХн сразу после внесения в них 10 % NaCl возникает вопрос о целесообразности использования этого реагента (по крайней мере, в использованных нами концентрациях) в качестве консерванта жидких препаратов генно-инженерного химозина коровы. Одной из дальнейших задач работы является подбор оптимальной концентрации хлорида натрия, при которой подавление МА будет минимальным.

Максимальную ферментативную стабильность продемонстрировал образец № 2 с добавлением 0,4 % бензоата натрия. В этом случае потеря специфической активности была минимальной и составила ~11 % за полгода хранения.

Выводы

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы:

- контрольный препарат рХн В в 50 мМ TRIS-HCl, 150 мМ NaCl при pH 5,9±0,1, за 6 мес хранения теряет ~16 % МА. Для создания промышленного препарата рХн потребуется заменить TRIS-буфер буфером с эффективной емкостью в диапазоне максимальной ферментативной стабильности химозина;

- внесение в контрольный препарат рХн В хлорида натрия до конечной концентрации 10 % приводит к немедленному снижению его МА почти в 2 раза (на 45–46 %). Препараты рХн В, содержащие 10 % хлорид натрия, за полгода хранения потеряли от ~19 до ~21 % МА. Необходимо проведение дальнейших исследований по подбору оптимальной концентрации NaCl в препаратах рХн;

- наибольший стабилизирующий эффект на МА рХн В в процессе длительного хранения оказывает бензоат натрия, следовательно, его введение в формулу конечного продукта является обязательным.

Полученные данные будут использованы для дальнейших работ, направленных на создание и совершенствование технологии производства отечественного рекомбинантного химозина для сыроделия.

Список литературы

1. Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. // Technology of Cheesemaking. Law BA, Tamime AY, Eds., John Wiley & Sons., 2010. Ch. 3. The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants, p. 98–129. DOI: 10.1002/9781444323740.ch3.
2. Jacob M., Jaros D., Rhom H. Recent advances in milk clotting enzymes // International Journal of Dairy Technology, 2011, vol. 64, no. 1, pp. 14–33. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x.
3. Shah M.A., Mir S.A., Paray M.A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. Dairy Science and Technology, 2014, vol. 94, no. 1, p. 5–16. DOI: 10.1007/s13594-013-0144-3.
4. Ельчанинов В.В., Уманский М.С., Белов А.Н., Коваль А.Д., Шелепов В.Г. Молокозвертывающий фермент из сычугов северного оленя. 1. Выделение и краткая характеристика // Сыроделие и маслоделие. 2005. № 4. С. 13–16.
5. Lebedev L.R., Kosogova T.A., Teplyakova T.V., Kriger A.V., Elchaninov V.V., Belov A.N., Koval' A.D. Study of technological properties of milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.). Foods and Raw Materials, 2016, vol. 4, no. 2, p. 58–65. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-58-65.
6. Flamm E.L. How FDA approved chymosin: a case history // Bio/Technology, 1991, vol. 9, no. 4, p. 349–351.
7. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins. Journal of Dairy Science, 2012, vol. 95, no. 2, p. 609–613. DOI: 10.3168/jds.2011-4445.
8. Kappeler S.R., van den Brink H.(J.)M., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhani Z., Hansen E.B., Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk // Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, no. 342, vol. 2, p. 647–654. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.02.014.
9. Рудометов А.П., Бельнская С.В., Колосова Е.А., Ельчанинов В.В., Кригер А.В., Балабова Д.В., Щербakov Д.Н. Сравнение экспрессии нуклеотидной последовательности химозина и прохимозина телянка в *E. coli* BL21 и оценка молокозвертывающей активности полученных рекомбинантных белков // Международный научно-исследовательский журнал. 2016. № 10 (52). Ч. 4. С. 37–40. DOI: 10.18454/IRJ.2016.52.052.
10. Ельчанинов В.В. Молокозвертывающий фермент из сычугов северного оленя. 5. Основные технологические характеристики // Сыроделие и маслоделие. 2006. № 4. С. 42–44.
11. Pedersen V.B., Christensen K.A., Foltmann B. Investigations on the activation of bovine prochymosin // European Journal of Biochemistry, 1979, vol. 94, p. 573–580.
12. Mohanty A.K., Mukhopadhyay U.K., Grover S., Batish V.K. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture // Biotechnology Advances, 1999, vol. 17, p. 205–217.
13. Jiang X.P., Yin M.L., Chen P., Yang Q. Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115 // World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, vol. 28, no. 5, p. 2087–2093. DOI: 10.1007/s11274-012-1012-7.
14. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin // *Pichia pastoris*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, vol. 56 (22), p. 10606–10610. DOI: 10.1021/jf802339e.
15. Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985. – 358 с.