

УДК 577.21:577.15:637.334.2

ОСНОВНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМОЗИНОВ (ОБЗОР)

© 2020 г. С. В. Беленькая^{1,4}, Д. В. Балабова², А. Н. Белов³,
А. Д. Коваль³, Д. Н. Щербаков^{1,2}, В. В. Ельчанинов^{3, *}

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора,
Кольцово, 630559 Россия

²Алтайский государственный университет, Барнаул, 656049 Россия

³Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия, Барнаул, 656016 Россия

⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: ve3636@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.11.2019 г.

После доработки 16.12.2019 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

В обзоре обсуждаются основные биохимические свойства известных рекомбинантных химозин, используемых в сыроделии или претендующих на роль технологических коагулянтов молока. Рассмотрены параметры кинетики Михаэлиса-Ментен, молокосвертывающая активность, протеолитическая активность, специфичность и зависимость коагуляционной способности от рН и концентрации ионов кальция.

Ключевые слова: рекомбинантный химозин, кинетика Михаэлиса-Ментен, молокосвертывающая активность, протеолитическая активность, термостабильность, концентрация ионов кальция, рН-оптимум

DOI: 10.31857/S0555109920040030

Сыроделие является одной из древнейших биотехнологий. Коагуляция молока с использованием молокосвертывающих протеаз и последующее преобразование молочного сгустка в различные виды сыров используется человеком на протяжении примерно 8 тысяч лет [1, 2].

Традиционно эталоном молокосвертывающего фермента (МФ) для сыроделия считался натуральный коровий химозин (Хн) (КФ 3.4.23.4). Начиная с 90 гг. XX века в производстве сыров стал использоваться генно-инженерный Хн коровы (*Bos taurus*) [3]. В 2006 г. был открыт, а позднее внедрен в сыродельную практику рекомбинантный химозин (рХн) одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) [4], который по ряду технологических свойств превосходит рХн коровы, что делает его экономически более привлекательным при производстве большей группы сыров. В настоящее время на рынке сыродельных МФ присутствуют два эталонных коагулянта коровьего молока – рХн коровы и рХн одногорбого верблюда. Получение рХн верблюда стимулировало поиск других рХн, которые по совокупности биохимических свойств могут превосходить существующие эталоны.

В современной научной периодике имеются данные о получении и исследовании биохимических свойств рХн коровы [5–14], одногорбого верблюда [4, 12, 15], овцы (*Ovis aries*) [16], козы (*Capra hircus*) [12, 17–20], буйвола (*Bubalus bubalis*) [12, 21, 22], яка (*Bos grunniens*) [23, 24] и альпака (*Vicugna pacos*) [25]. Все эти животные относятся к отряду Парнокопытные (Artiodactyla).

Для синтеза рекомбинантных химозин могут использоваться системы экспрессии бактерий (*Escherichia coli*), дрожжей (*Pichia (Komagataella) pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluyveromyces lactis*), плесневых грибов (*Aspergillus niger*), трансгенных высших млекопитающих и растений [5–28]. В настоящее время в производстве сыров официально применяются два генно-инженерных химозина – рХн коровы и одногорбого верблюда, синтезируемые в системах экспрессии *A. niger* var. *awamori* и *K. lactis* [27, 28].

О перспективах использования нового рХн в сыроделии может свидетельствовать комплекс его биохимических свойств и, прежде всего тех, которые традиционно используются для технологической оценки (характеристики) молокосвертывающих протеиназ, включающий: коагуляционную

или молокосвертывающую активность (МА), общую протеолитическую активность (ПА) и специфичность, термостабильность (ТС), зависимость МА от рН и концентрации ионов кальция.

Парадоксально, но в полном объеме комплекс биохимических свойств, важных с точки зрения технологии сыроделия, исследован только для 2 коммерческих рекомбинантных МФ – рХн коровы и одногорбого верблюда. В то же время остаются неизвестны параметры кинетики Михаэлиса–Ментен для рХн яка, альпака и овцы, отсутствуют данные о зависимости МА рХн козы и буйвола от концентрации ионов кальция и только еще предстоит установить ПА и специфичность рХн яка и зависимость его МА от концентрации хлорида кальция в молоке.

В данном обзоре рассмотрены наиболее важные, с точки зрения сыроделия, биохимические свойства известных рХн.

Отдельно следует отметить работу [29], в которой сообщается о получении в системе *S. cerevisiae* рХн игрунки обыкновенной (*Callithrix jacchus*) и исследовании его субстратной специфичности по отношению к синтетическим пептидам, отличающимся структурой от Хн-чувствительного участка к-казеина (к-КЗ) коровы. Однако натуральный Хн игрунки синтезируется в виде пепсиноподобного фермента, обладающего высокой общей ПА [30], что делает его малопривлекательным для использования в сыроделии. В этой связи свойства рХн *S. jacchus* не будут рассматриваться в данном обзоре.

Параметры кинетики Михаэлиса–Ментен. После получения нового рХн в первую очередь оценивается его МА на коровьем молоке, которое является основным сырьем для производства сыров. Параметры кинетики Михаэлиса–Ментен, включающие: константу Михаэлиса (K_m), число оборотов фермента (k_{cat}), каталитическую эффективность или константу специфичности (k_{cat}/K_m), – изучаются намного реже [4, 12, 19, 21, 31, 32], хотя именно они важны для полной биохимической характеристики нового рекомбинантного фермента. В настоящее время кинетические показатели определены для рХн 4 видов животных – коровы, одногорбого верблюда, козы и буйвола (табл. 1).

Отсутствие единой стандартизированной методики определения кинетических свойств химозин, синтезированных про- и эукариотическими системами экспрессии и применение для этой цели различных хромогенных субстратов дает настолько противоречивые результаты, полученные разными научными группами (порой на одних и тех же рХн и субстратах), что их сравнение становится трудной задачей. Например, константы Михаэлиса, полученные разными исследовательскими группами (с использованием флюоресцентин тиокарбамоил-к-казеина [33]) для препаратов рХн буйвола, синтезированного в *P. pastoris*, раз-

личаются больше, чем в 15 раз [12, 21], а для рХн козы – более чем в 45 раз [12, 19] (табл. 1).

По данным портала BRENDA K_m натуральных Хн и рХн различного генеза варьируют от 0.0018 до 6.5 мМ, k_{cat} – от 0.02 до 2600 s^{-1} , k_{cat}/K_m – от 160 до 7100 $mM^{-1} s^{-1}$ и зависят от структуры используемого субстрата, рН, температуры и некоторых других факторов [https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.4]. В то же время результаты исследования [32] указывают на то, что такая важная посттрансляционная модификация, как гликозилирование, незначительно влияет на показатели ферментативной кинетики рХн верблюда и коровы (табл. 1).

Более информативными и поддающимися сравнительному анализу выглядят результаты, полученные на одном и том же субстрате в рамках одного исследования [4, 12, 31, 32]. Но даже в этом случае иногда приходится сталкиваться с труднообъяснимыми противоречиями. Так, согласно данным [4] значение K_m указывает на то, что аффинность рХн верблюда к хромогенному субстрату, имитирующему к-КЗ коровы, примерно вдвое выше по сравнению с коровьим рХн. В то же время рХн верблюда характеризуется гораздо меньшим (в 3.8 раза) значением числа оборотов фермента и меньшей (в 1.8 раза) каталитической эффективностью (табл. 1). Если оценивать способность рХн верблюда гидролизовать к-КЗ коровы исключительно по его кинетическим параметрам, полученным на модельном субстрате, то он значительно менее эффективен рХн коровы. Однако совокупность биохимических свойств [4] и практика использования этих ферментов в сыроделии [34–36] свидетельствует о более высокой технологической эффективности рХн одногорбого верблюда по сравнению с рХн коровы.

При оценке практических перспектив новых рХн необходимо задуматься о значимости результатов, полученных с использованием хромогенных субстратов, имитирующих изолированный водорастворимый к-КЗ.

Согласно поликонденсационной модели [37, 38], в молоке гидрофобный N-концевой участок к-КЗ находится во взаимодействии с α - и β -казеинами и частично погружен в казеиновую мицеллу, а гидрофильный анионный C-терминальный участок экспонирован на поверхности мицеллы, образуя стабилизирующий отрицательно заряженный “волосковый слой”. Химозину гораздо сложнее внедриться в этот слой и связаться с ключевой связью мицеллярного к-КЗ, чем в случае водорастворимого субстрата. Именно поэтому различаются кинетические параметры, полученные на водорастворимых аналогах к-КЗ и препаратах мицеллярного к-КЗ [39, 40].

Наиболее подходящим искусственным субстратом для изучения кинетики Михаэлиса–

Таблица 1. Параметры кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантных химозинов

Вид Хн	Продуцент	K_m , мМ	k_{cat} , s^{-1}	k_{cat}/K_m , $mM^{-1} s^{-1}$	Субстрат*	Источник
рХн В коровы	<i>E. coli</i>	0.38	18.9	49.7	1	[31]
рХн В коровы (мутант: + His-Gly на С-конце)	<i>E. coli</i>	0.67	2.52	3.8	1	[31]
рХн В коровы (мутант: Thr77 → Asp)	<i>E. coli</i>	0.79	16.8	21.3	1	[31]
рХн коровы	<i>A. niger</i>	0.165	44.3	268.0	2	[4]
рХн одногорбого верблюда	<i>A. niger</i>	0.077	11.7	152.0	2	[4]
рХн коровы	<i>A. niger</i>	0.134	4.3	32.2	3	[4]
рХн одногорбого верблюда	<i>A. niger</i>	0.056	5.1	91.3	3	[4]
рХн коровы (Pfizer)	<i>E. coli</i>	2.280	–	–	4	[34]
рХн буйвола	<i>P. pastoris</i>	0.012	–	–	4	[21]
рХн козы	<i>P. pastoris</i>	0.0178	–	–	4	[19]
рХн буйвола	<i>P. pastoris</i>	0.00076	0.00104	1.37	4	[12]
рХн козы	<i>P. pastoris</i>	0.00039	0.00331	8.49	4	[12]
рХн коровы (ChyMax, Chr. Hansen)	<i>A. niger</i>	0.00819	0.00621	0.76	4	[12]
рХн одногорбого верблюда (ChyMax М, Chr. Hansen)	<i>A. niger</i>	0.00060	0.00032	0.53	4	[12]
рХн коровы (ChyMax, Chr. Hansen), негликозилированный	<i>A. niger</i>	0.038 (рН 6.65) 0.026 (рН 6.00) 0.022 (рН 5.50)	8 (рН 6.65) 28 (рН 6.00) 28 (рН 5.50)	0.2 (рН 6.65) 1.1 (рН 6.00) 1.3 (рН 5.50)	5	[32]
рХн коровы (ChyMax, Chr. Hansen), моногликозилированный	<i>A. niger</i>	0.037 (рН 6.65) 0.028 (рН 6.00) 0.026 (рН 5.50)	7 (рН 6.65) 27 (рН 6.00) 28 (рН 5.50)	0.2 (рН 6.65) 1.0 (рН 6.00) 1.1 (рН 5.50)	5	[32]
рХн одногорбого верблюда (ChyMax М, Chr. Hansen), негликозилированный	<i>A. niger</i>	0.018 (рН 6.65) 0.011 (рН 6.00) 0.007 (рН 5.50)	11 (рН 6.65) 53 (рН 6.00) 47 (рН 5.50)	0.6 (рН 6.65) 5.0 (рН 6.00) 6.8 (рН 5.50)	5	[32]
рХн одногорбого верблюда (ChyMax М, Chr. Hansen), дигликозилированный	<i>A. niger</i>	0.020 (рН 6.65) 0.011 (рН 6.00) 0.008 (рН 5.50)	14 (рН 6.65) 65 (рН 6.00) 59 (рН 5.50)	0.7 (рН 6.65) 5.8 (рН 6.00) 7.4 (рН 5.50)	5	[32]

*1 – L-S-F(NO₂)-Nle-A-L-OMe [31]; 2 – H-P-H-P-H-L-S-(p-NO₂)F-M-A-I (имитация κ-КЗ коровы) [4]; 3 – R-P-R-P-R-P-S-(p-NO₂)F-I-A-I (имитация κ-КЗ верблюда) [4]; 4 – флуоресцеин тиокарбамоил-κ-казеин коровы [33]; 5 – DabcyI-H-P-H-P-H-L-S-F-M-A-I-P-K(5-FAM)-K-K [32].

Ментен химозинов мог бы стать С-терминальный фрагмент κ-КЗ коровы (например, κ f96-169), закрепленный N-концевым участком на поверхности белковых (α-, β-казеиновых) или фосфолипидных мицелл или связанный с искусственной гидрофобной поверхностью.

Молокосвертывающая активность, общая протеолитическая активность и специфичность. Молокосвертывающая активность является главной характеристикой любого нового МФ, поскольку указывает на его способность гидролизовать в молекуле κ-КЗ пептидную связь F105–M106, чув-

ствительную к действию Хн, и вызывать коагуляцию молока.

Специалистам в области сыроделия хорошо известен так называемый “парадокс химозина коровы и молока верблюда”, который заключается в том, что Хн коровы не коагулирует верблюжье молоко (или коагулирует, но очень медленно), что делает невозможным использование коровьего фермента для производства сыров из молока верблюда [13, 27, 41–43]. Для решения этой проблемы и выработки сыров из верблюжьего молока был получен рХн одногорбого верблюда. При его исследовании обнаружилось, что верблюжий рХн не только эффективно свертывал коровье молоко, но и превосходил рХн коровы по удельной МА и низкому уровню неспецифической ПА [4]. Парадокс “Хн коровы – молоко верблюда” наиболее известный, но не единственный случай “конфликта” гетерологичных химозинов и молока различных видов млекопитающих. Согласно данным литературы, кроме верблюжьего молока, Хн коровы не способен коагулировать молоко лошади (*Equus caballus*) [27] и одного из представителей инфракласса сумчатых млекопитающих – лисьего кузу (*Trichosurus vulpecula*) [44]. Оказалось также, что Хн коровы, по-видимому, намного медленнее свертывает молоко крысы (*Rattus norvegicus*) и кролика (*Oryctolagus cuniculus*), чем молоко коровы (*B. taurus*), козы (*C. hircus*) и северного оленя (*Rangifer tarandus*) [45]. Поэтому изучение любого нового МФ для перспективы использования в сыроделии начинается с определения его МА по отношению именно к коровьему молоку, которое является основным сырьем для производства сыров.

Химозины способны гидролизовать пептидные связи не только в к-КЗ но и в других белках, в частности в α - и β -казеинах. Характеризуя новый рХн и оценивая его пригодность для выработки сыров, наряду с коагуляционной, крайне важно учитывать его протеолитическую активность [4, 46, 47]. В сыроделии различают два типа ПА: специфическую или молокосвертывающую активность, характеризующую способность гидролизовать одну пептидную связь в молекуле к-КЗ (для рХн коровы – это связь F105-M106 в коровьем к-КЗ) и общую ПА, характеризующую способность гидролизовать в α -, β - и к-казеинах молока любые пептидные связи на которые специфически действует фермент [47]. Общую ПА молокосвертывающих ферментов также называют неспецифической ПА.

Высокая общая ПА коагулянта молока считается негативным фактором в сыроделии, поскольку приводит к снижению выхода готовой продукции из-за потерь с сывороткой продуктов протеолиза [48]. Остающийся в сырном зерне МФ с высокой общей ПА может стать причиной формирования пороков текстуры и вкуса (горечь) в длительно со-

зревающих и хранящихся сырах [49]. Применение МФ с высокой ПА ухудшает технологические характеристики подсырной сыворотки, используемой в качестве сырья при производстве некоторых продуктов. В связи с этим идеальный МФ для сыроделия при максимальной МА должен иметь минимальную общую ПА [47, 50].

Для оценки способности МФ гидролизовать единственную, “ключевую” связь к-КЗ, рассчитывается специфичность его действия, которая определяется как отношение МА и общей ПА (МА/ПА). По мере уменьшения специфичности используемые в сыроделии МФ ранжируются следующим образом: рХн верблюда > рХн коровы, натуральный Хн коровы > говяжий пепсин (КФ 3.4.23.1) > мукопепсины (КФ 3.4.23.23) > эндотиापепсин (КФ 3.4.23.22) [50]. Представленный ряд отражает универсальность МФ, выражающуюся в том, что чем выше его специфичность, тем он универсальнее, и указывает на возрастающую вероятность развития пороков вкуса и консистенции сыров с длительными сроками созревания и хранения при использовании коагулянта с высокой ПА [25].

Данные о МА, общей ПА и специфичности рХн различных видов представлены в табл. 2.

В работе [25] был описан рХн альпака, который по специфичности превосходил рХн коровы, буйвола и козы, но уступал рХн верблюда. Следует отметить, что рекомбинантные химозины верблюда и альпака не являются единственными МФ, превосходящими по специфичности рХн коровы. Показано, что рХн буйвола и козы характеризуются лучшими соотношениями МА/ПА, чем рХн коровы, но общая ПА этих ферментов и коровьего рХн почти совпадают [12]. Противоречие данных о МА, общей ПА и специфичности рХн верблюда и рХн коровы, опубликованных в работах [12] и [4], по-видимому, объясняется использованием различных методических подходов при определении этих параметров. Вместе с тем, информация, приведенная в работе [4], о более высокой специфичности рХн верблюда по сравнению с рХн коровы, подтверждается данными других авторов, изучавших общую ПА этих ферментов непосредственно в сырах [34, 35].

Получению и исследованию рХн яка посвящены работы [23] и [24]. В первой публикации была описана процедура получения рХн яка и оценена только МА полученного препарата, которая составила 14.6 ед. Сокслета/мл [23]. Вторая работа посвящена крупномасштабному получению рХн А яка (*Bos grunniens*). К сожалению, биохимические свойства полученного в работе [24] фермента изучены неполно. Так, не была определена общая ПА, поэтому не было возможности рассчитать специфичность, отсутствовали данные о зависимости МА от концентрации ионов кальция. Тем не менее,

Таблица 2. Молокосвертывающая активность (МА), общая протеолитическая активность (ПА) и специфичность (МА/ПА) рекомбинантных химозинов (по данным [25], с дополнениями)

Вид химозина	МА*, % от МА рХн коровы	ПА, % от ПА рХн коровы	МА/ПА	Система экспрессии	Источник
рХн альпака	102	34	3.0	<i>E. coli</i>	[25]
рХн коровы	100	100	1.0	<i>E. coli</i>	[25]
рХн одногорбого верблюда	170	25	6.8	<i>A. niger</i>	[4]
рХн коровы	100	100	1.0	<i>A. niger</i>	[4]
рХн овцы	≈100**	≈98**	≈1.0	<i>E. coli</i>	[16]
рХн коровы	100	100	1.0	<i>K. lactis</i>	[16]
рХн буйвола	105	96	1.1	<i>P. pastoris</i>	[12]
рХн одногорбого верблюда	99	110	0.9	<i>A. niger</i>	[12]
рХн козы	148	106	1.4	<i>P. pastoris</i>	[12]
рХн коровы	100	100	1.0	<i>A. niger</i>	[12]
рХн яка	214***	—	—	<i>P. pastoris</i>	[24]

* По отношению к молоку коровы.

** Результаты исследования ПА и МА представлены в виде графиков, цифровые данные отсутствуют.

*** Значения МА даны в ИМСУ/мл.

была выработана опытная партия сыра с применением рХн яка и проведена контрольная выработка с использованием коммерческого рХн коровы (RENMAX 600 ИМСУ/мл, “Mayasan”, Турция). Выход сыра в контроле составил 12.5%, в опыте — 12.0% [24]. Несколько меньший выход сыра в опытной выработке свидетельствовал о потерях белка с сывороткой, что косвенно указывало на более высокую общую ПА рХн яка по сравнению с контрольным рХн коровы.

В работе [16] сообщалось о получении и частичной характеристике рХн овцы. ПА овечьего рХн изучали по изменению соотношения небелкового и общего азота, определенного методом Кьельдаля. В сырах, выработанных с применением рХн овцы, общая ПА была на 28% ниже, чем в контроле с использованием рХн коровы. В этой работе [16] отсутствовали данные о концентрации или активности рХн овцы и рХн коровы в исследованных сырах. Вместе с тем, в сырном зерне могут оставаться до 30% внесенного МФ в зависимости от типа коагулянта, рН, температуры и содержания влаги [51]. Согласно данным [52] в сырах типа Чеддар (Cheddar) остается 10.0–17.5% рХн коровы. Поэтому не исключено, что различные концентрации продуктов протеолиза в контрольных и опытных сырах были обусловлены различным содержанием рХн овцы и рХн коровы, оставшихся в сыре, а не различной общей ПА используемых коагулянтов. Данные работы [16] о соотношении МА и общей ПА рХн овцы и коровы, полученные в процессе коагуляции молока, указывают на то, что специфичность этих ферментов примерно одинакова.

Таким образом, большинство полученных и охарактеризованных рХн уступают по общей ПА и специфичности двум коммерческим генно-инженерным химозинам (одногорбого верблюда и коровы), а также рекомбинантному Хн альпака.

Термостабильность. Термостабильность можно охарактеризовать как диапазон температур, при которых МФ проявляет высокую (≥80%) МА. Порог термоинактивации — это температура, при которой раствор МФ начинает терять МА. Термостабильность, наряду с МА, общей ПА и специфичностью, является важнейшей биохимической характеристикой МФ. На стадии свертывания молока под воздействием Хн не гидролизуются α- и β-казеины. Протеолитическая деградация пара-казеина (f E1-F105), а также α1-, α2- и β-казеинов, активным ферментом, остающимся в сгустке, начинается позже, в процессе созревания сыра [34, 52]. В результате гидролиза казеинов образуются пептиды и аминокислоты, а также продукты их деградации и биохимической модификации, которые влияют на формирование физико-химических и органолептических показателей сыра. Поэтому данные о ТС коагулянта молока позволяют не только правильно определить сферу применения МФ, но и регулировать степень протеолиза и сроки созревания сыров путем варьирования температуры обработки сырного зерна [25].

Верблюжий рХн имеет более высокий порог термоинактивации, чем рХн коровы, а общая ПА этих ферментов возрастает при повышении температуры [4]. Аналогичные результаты были получены в работе [25] для рХн коровы и альпака, синтезированных в системе *E. coli*. Таким образом, термостабильный МФ может увеличивать

нежелательную ПА после разрезания молочного сгустка на технологических стадиях обработки сырного зерна, связанных с повышением температуры.

Результаты, полученные в работе [4], согласуются с данными других работ, в которых было установлено, что интенсивность протеолиза в сырах типа Reggiano зависит от 2 параметров: ТС используемого коагулянта и температуры второго нагревания [34].

Известно, что в молекуле α s1-казеина химозины атакуют связь F23–F24. В результате образуются два продукта: α s1 (f1-23) и α s1-I (f24-199), которые используют в качестве маркеров общей ПА в сырах. При выработке сыров типа Reggiano с применением рХн коровы было показано, что увеличение температуры обработки сырного зерна с 50 до 56°C приводит к значительному снижению концентрации продуктов протеолиза α s1-казеина, в частности, водонерастворимого (гидрофобного) полипептида α s1-I (f24-199). Происходит это вследствие более полной инактивации МФ при повышении температуры. В сырах с температурой второго нагревания 56°C, выработанных с применением более термостабильного рХн верблюда [4, 12], интенсивность протеолиза была выше, чем при использовании рХн коровы [34]. Данное исследование является примером того, что МФ (в данном случае – рХн верблюда), имеющий уровень общего протеолиза вчетверо меньший, чем рХн коровы, но превосходящий его по ТС, может проявлять более высокую неспецифическую ПА в созревающих и хранящихся сырах.

В сыроделии МФ с различной ТС используют дифференцировано. Термолабильные ферменты применяют при выработке полутвердых, твердых и сверхтвердых сыров с высокой температурой второго нагревания (52–58°C) и длительными сроками созревания и хранения. После второго нагревания термолабильный МФ инактивируется и не вносит вклад в процессы вторичного протеолиза, который в этом случае зависит только от активности протеолитических ферментов заквасочной микрофлоры. Термостабильные МФ целесообразно использовать для производства мягких сыров с короткими сроками созревания и хранения или при выработке сыров без созревания [25].

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют, что рХн одних и тех же видов, полученные при помощи разных систем экспрессии, могут различаться по ТС. В частности, пороги полной температурной инактивации для рХн верблюда, синтезированного в системах высших плесневых грибов (*A. niger*) [4] и дрожжей (*P. pastoris*) [15], различаются на 10°C. По данным работы [12] верблюжий рХн, полученный в системе *A. niger*, сохранял $\approx 35\%$ от исходной МА даже после инкубации при 70°C.

В работе [12] показано, что генно-инженерный Хн буйвола, продуцированный *P. pastoris*, при 60°C полностью инактивируется, а согласно исследованиям [22] рХн буйвола, полученный в той же системе экспрессии, при 60°C сохранял 37% МА. Наблюдаемые вариации могут объясняться различными условиями определения ТС, включающими значения МА исследуемых ферментов, величины рН, концентрации ионов Ca^{2+} , белковые добавки и продолжительность прогревания. По-видимому, при постановке функционального теста оптимальная длительность прогревания раствора исследуемого рХн должна быть равна 30 мин, поскольку имитирует среднюю продолжительность стадии второго нагревания и последующей обработки сырного зерна.

Наиболее достоверный результат определения ТС и порога термоинактивации дает метод дифференциальной сканирующей калориметрии, позволяющий с высокой точностью регистрировать процесс тепловой денатурации (плавления) белков и определять температуру перехода (T_m) между нативной и полностью денатурированной структурой фермента. Такие данные приведены в работе [13] для 2 коммерческих коагулянтов молока – рХн коровы и одnogорбого верблюда, синтезированных в *A. niger*. В этой работе также изучено влияние степени гликозилирования рекомбинантных Хн на ТС. Из промышленных препаратов рХн одnogорбого верблюда были выделены варианты фермента с различным количеством углеводных остатков и определены их температуры плавления. Агликозилированный верблюжий рХн характеризовался самыми низкими T_m в диапазоне 59.05–59.35°C. Моногликозилированный (N100) белок проявлял повышенную устойчивость при нагревании – его T_m увеличивалась до 61.25°C. Дигликозилированная по остаткам N100 и N291 форма рХн верблюда характеризовалась промежуточными точками плавления в диапазоне 59.85–60.45°C [13].

В общем массиве данных отдельно стоит работа [14], в которой ТС рХн коровы оценивали не по остаточной МА, а по реологическому параметру – модулю упругости (G') молочного сгустка.

Можно предположить, что высокая термостабильность рХн коровы и альпака, наблюдаемая в работе [25], связана с особенностями их синтеза в системе *E. coli*. Известно, что у про- и эукариотов фолдинг и посттрансляционный процессинг синтезируемых *de novo* рекомбинантных белков протекает по-разному [53–55]. Этим могут быть обусловлены наблюдаемые различия в ТС между коммерческим рХн коровы, полученным в эукариотической системе (*A. niger*), и рХн коровы и альпака, продуцируемыми прокариотической системой (*E. coli*). С одной стороны, высокая ТС существенно ограничивает сферу промышленного

Таблица 3. Термостабильность рекомбинантных химозинов различного генеза (по данным [25], с дополнениями)

Вид химозина, продуцент	Диапазон ТС, °С	Комментарии
рХн коровы, <i>A. niger</i> ¹	5–52.5	Полная инактивация при >55°С
рХн одногорбого верблюда, <i>A. niger</i> ¹	5–55.0	Полная инактивация при 60°С
рХн одногорбого верблюда, <i>P. pastoris</i> ²	45–50	Полная инактивация при 70°С
рХн овцы, <i>E. coli</i> ³	≈25–50*	При 40°С ≈ 100%, при 50°С ≈ 30% МА
рХн козы, <i>P. pastoris</i> ⁴	≈35–45*	При 50°С ≈ 45% МА, при 70°С ≈ 10% МА
рХн буйвола, <i>P. pastoris</i> ⁴	≈30–37*	При 50°С ≈ 20% МА, при 60°С ≈ 0% МА
рХн одногорбого верблюда, <i>A. niger</i> ⁴	≈25–40*	При 50°С ≈ 45% МА, при 70°С ≈ 35% МА
рХн коровы <i>A. niger</i> ⁴	≈35–40*	При 50°С ≈ 20% МА, при 65°С ≈ 0% МА
рХн коровы, <i>E. coli</i> ⁵	35–50	При 60°С – 23% от исходной МА
рХн альпака, <i>E. coli</i> ⁵⁾	35–55	При 55°С – 164% МА, при 60°С – 144% МА
Коммерческий рХн коровы (ChyMax, “Chr. Hansen”), <i>A. niger</i> ⁵	35–40	При 45°С ≈ 56% МА, при 55°С – <1% МА
рХн яка, <i>P. pastoris</i> ⁶	30–40	Полная инактивация при 70°С
Коммерческий рХн коровы (ChyMax, “Chr. Hansen”), <i>A. niger</i> ⁷⁾	57.65	Указан порог (°С) тепловой денатурации.
Коммерческий рХн одногорбого верблюда (ChyMax М, “Chr. Hansen”), <i>A. niger</i> ⁷	60.65	Указан порог (°С) тепловой денатурации.
рХн козы, <i>P. pastoris</i> ⁸⁾	≈30–40*	Полная инактивация при 70°С
рХн коровы, <i>P. pastoris</i> ⁹	30–40	Параметр – модуль упругости (G'). При 30°С – 68.7 Па, при 40°С – 77.1 Па, при 50°С – 50.7 Па
рХн буйвола, <i>P. pastoris</i> ¹⁰	30–42	При 35–38°С – 100% МА, при 60°С – 37% МА
рХн коровы, <i>P. pastoris</i> ¹¹	25–37°С	При 37°С – 100% МА, при 42°С – 25% МА

¹ [4], время прогревания – 12.5 ч, в присутствии бычьего сывороточного альбумина; ² [15], время прогревания – 10 мин; ³ [16], время прогревания не указано; ⁴ [12], время прогревания – 60 мин; ⁵ [25], время прогревания – 30 мин; ⁶ [24] время прогревания – 60 мин; ⁷ [13], калориметрия, температура фазового перехода нативный – денатурированный фермент (Tm); ⁸ [19], время прогревания – 60 мин; ⁹ [14], время прогревания – 30 мин, измеряемый параметр – модуль упругости (G'); ¹⁰ [22], время прогревания – 60 мин; ¹¹ [9], время прогревания – не указано; *результаты исследования представлены в виде графиков, цифровых данных нет.

применения рХн альпака и предполагает его использование только при производстве сыров с короткими сроками созревания и хранения. С другой стороны, не исключено, что очень низкая общая ПА рХн альпака способна, хотя бы частично, нивелировать негативный эффект его высокого порога термоинактивации. Для ответа на вопрос, какова сфера применения рХн альпака, превосходящего по уровню общей ПА эталонный коммерческий рХн коровы почти в 3 раза, но имеющего более широкий диапазон термостабильности, – необходимо апробировать фермент при выработке сыра [25].

Исключительно термолабильный рХн В коровы был получен в экспрессионной системе *P. (Komagataella) pastoris* (штамм GS115) [9]. По данным, приведенным в этой работе, полученный рХн имел очень низкий порог термоинактивации, равный примерно 37°С.

Таким образом, ТС известных рекомбинантных химозинов может варьировать в зависимости от метода и условий определения этого технологического параметра, вида источника гена и системы экспрессии, в которой получен МФ. Все, полученные в настоящее время генно-инженерные химозины, охарактеризованы по ТС.

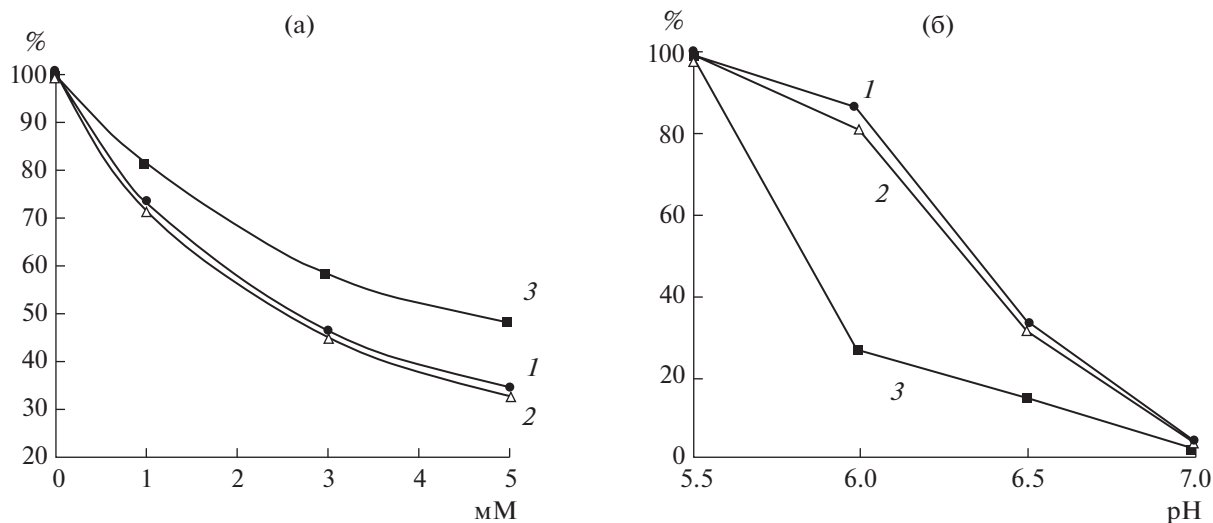


Рис. 1. Зависимость молокосвертывающей активности (%) коммерческого рХн коровы (произцент – *A. niger*, 1), рХн коровы (произцент – *E. coli*, 2) и рХн альпака (произцент – *E. coli*, 3) от концентрации хлорида кальция (мМ, а) и рН молочного субстрата (б) [25].

Зависимость молокосвертывающей активности от концентрации ионов кальция. Ионы кальция ускоряют сычужное свертывание молока. Свежевыдоенное коровье молоко содержит ≈ 30 мМ кальция, при этом его большая часть ($\sim 68\%$) связана с казеиновыми мицеллами в виде коллоидного или аморфного моногидрофосфата (CaHPO_4), а в ионизированной форме находится примерно 1 мМ [56].

При промышленном производстве большинства видов сыров молоко проходит стадию пастеризации (например, при $71\text{--}76^\circ\text{C}$ с выдержкой 20–25 с). С повышением температуры растворимость кальциевых солей фосфорной кислоты падает, поэтому при пастеризации молока часть присутствующих в нем ионов кальция необратимо осажается в виде нерастворимого фосфата кальция. Это приводит к снижению концентрации Ca^{2+} и увеличению продолжительности свертывания молока под действием МФ. Для компенсации этого феномена после пастеризации в молоко вносится 0.1–0.5 г/л ($\approx 1\text{--}5$ мМ) CaCl_2 . Внесение хлорида кальция улучшает коагуляционную способность пастеризованного молока по двум причинам. Во-первых, Ca^{2+} частично экранирует отрицательный заряд поверхности казеиновых мицелл и пептидная связь F105–M106 в молекуле к-КЗ, расположенная в “волосковом” слое, становится более доступной для гидролиза МФ. Во-вторых, Ca^{2+} участвует в образовании ионных “мостиков” между дестабилизированными мицеллами, что ускоряет их агрегацию и формирование молочного сгустка [57]. Внесение дополнительного количества хлорида кальция в молоко также применяется в практике сыроделия с це-

лью улучшения коагуляционных и технологических свойств сычужно-вялого сырья [58].

Однако увеличение концентрации хлорида кальция на 1–5 мМ вызывает не только повышение МА, но и общей ПА фермента, особенно на стадии коагуляции. По данным [15] ферментативная активность рХн одnogорбого верблюда возрастает в диапазоне 0–20 мМ CaCl_2 примерно в 5 раз, а максимальная свертывающая активность наблюдается при его концентрации 20–40 мМ. В связи с этим при использовании МФ, высокочувствительного к концентрации Ca^{2+} , всегда следует учитывать опасность увеличения общей ПА и ее негативные последствия. Поэтому при производстве сыров из пастеризованного молока стремятся использовать минимально необходимые дозы CaCl_2 . Чувствительность МФ к содержанию Ca^{2+} , эквивалентная или меньшая, чем чувствительность эталонного фермента (Хн коровы), является положительным фактором, так как позволяет варьировать количество вносимого хлорида кальция, не беспокоясь о значительных изменениях МА и ПА.

Коагуляционная активность рХн альпака по сравнению с коммерческим рХн коровы менее чувствительна к повышению концентрации Ca^{2+} в молочном субстрате (рис. 1а). При увеличении концентрации CaCl_2 от 1 до 5 мМ свертывающая активность рХн альпака возрастала на 19–52%. В этом же диапазоне концентраций хлорида кальция увеличение МА коммерческого рХн коровы составляло 27–66%. В присутствии 3 мМ CaCl_2 (концентрация, наиболее часто используемая в сыроделии) коагуляционная активность рХн аль-

Таблица 4. Оптимумы рН действия рекомбинантных химозинов различной видовой принадлежности (по данным [25], с дополнениями)

Вид химозина, <i>продуцент</i>	рН-оптимум	Субстрат	Источник
рХн буйвола, <i>P. pastoris</i>	≈4.6	Обезжиренное молоко (26%)	[21]
рХн козы, <i>P. pastoris</i>	5.5	Обезжиренное молоко (26%)	[19]
рХн одногорбого верблюда, <i>P. pastoris</i>	5.0	Обезжиренное молоко (26%)	[15]
рХн коровы, <i>P. pastoris</i>	5.0	Цельное молоко коровы	[14]
рХн альпака, <i>E. coli</i>	≤5.5	Обезжиренное молоко (10%)	[25]
рХн овцы, <i>E. coli</i>	≤6.0	Обезжиренное молоко (11%)	[16]
рХн яка, <i>P. pastoris</i>	6.0	Обезжиренное молоко (26%)	[24]
рХн коровы, <i>A. niger</i>	4.9	Синтетический аналог к-КЗ	[4]
рХн одногорбого верблюда, <i>A. niger</i>	5.1	Синтетический аналог к-КЗ	[4]
рХн коровы, <i>P. pastoris</i>	5.5	Обезжиренное молоко (26%)	[9]
рХн буйвола, <i>P. pastoris</i>	5.5	Восстановленное обезжиренное молоко коровы	[22]

пака увеличивалась на 42%, а активность коммерческого рХн коровы – на 54% [25].

По данным [16] рХн овцы проявлял умеренную чувствительность к концентрации Ca^{2+} , близкую к чувствительности рХн коровы.

При концентрации CaCl_2 в молоке коровы в диапазоне 0–2 мМ и рН 6.6 коагуляционная активность рХн верблюда была на 10% выше, чем активность рХн коровы [4].

Таким образом, из 7-ми рекомбинантных Хн, полученных в настоящее время, зависимость МА от концентрации хлорида кальция установлена для 4-х (коровы, одногорбого верблюда, овцы и альпака). Зависимость МА рХн одногорбого верблюда, овцы и альпака от концентрации CaCl_2 сопоставима с рХн коровы и удовлетворяет требованиям сыроделия.

Зависимость молокосвертывающей активности от рН субстрата. Технология производства большинства сыров предусматривает подготовку молока перед внесением в него МФ. В исходное цельное молоко, имеющее рН ≈ 6.7, добавляют концентрат молочнокислых бактерий и инкубируют полученную смесь в течение 30–40 мин при 32–35°C. Развивающаяся микрофлора закваски начинает потреблять лактозу с образованием лактата, что приводит к снижению рН молока. Как правило, для получения сгустка МФ вносится в молочную смесь при рН 6.5–6.6. В связи с этим одним из основных требований к МФ является способность эффективно коагулировать молоко при слабокислом рН [25].

Даже незначительные колебания рН приводят к существенному изменению баланса сил, стабилизирующих мицеллы казеина, что отражается на технологических свойствах молока, в частности, на

времени его сычужного свертывания. При увеличении концентрации H^+ продолжительность коагуляции зависит не только от нарастающей активности молокосвертывающих ферментов, оптимумы ферментативной активности которых соответствуют кислому рН (табл. 4), но и от электростатических и гидрофобных параметров мицелл казеина.

Подкисление молока приводит к уменьшению отрицательного заряда казеинов вследствие приближения рН к значениям рI казеинов. Снижение суммарного отрицательного заряда уменьшает силы электростатического отталкивания между мицеллами и одновременно усиливает казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия, что ускоряет образование молочного сгустка [50, 57].

При увеличении рН и его удалении от рI казеинов увеличиваются их суммарные отрицательные заряды. В результате, силы межмицеллярного электростатического отталкивания нарастают, что препятствует сближению казеиновых мицелл и замедляет образование сгустка при ферментативной коагуляции молока. Поэтому при увеличении рН молочной смеси в диапазоне 5.0–7.0 продолжительность сычужного свертывания должна увеличиваться [57].

Зависимость МА коммерческого рХн коровы и экспериментальных рХн коровы и альпака от рН молочного субстрата (рис. 16) изучена в работе [25]. При рН 6.0 коммерческий (полученный из *A. niger*) и экспериментальный (полученный из *E. coli*) рХн коровы демонстрировали высокую коагуляционную активность, равную 82–86% от максимальной. По мере приближения к нейтральным значениям рН МА всех ферментов начинала быстро снижаться. Так, при рН 7.0 коагуляционная активность коровых рХн снижалась более

чем на 96% от исходных значений (при рН 5.5). Эти результаты согласуются с данными работ [4] и [12], в которых наблюдалась аналогичная зависимость МА рХн коровы от рН субстрата. При повышении рН динамика снижения МА рХн альпака (синтезированного в системе *E. coli*) отличалась от поведения коровых рХн. При рН 6.0 МА рХн альпака составляла $\approx 27\%$ и была на 55–59% меньше МА коровых рХн. После резкого падения МА при рН 6.0 снижение активности замедлялось и при рН 6.5 разница в скорости свертывания молока между коагулянтами альпака и коровы не превышала 19%. При рН 7.0 все три фермента почти полностью утрачивали МА (рис. 16).

По динамике изменения МА в зависимости от рН субстрата рХн альпака очень похож на рХн верблюда, претендующего в настоящее время на роль заменителя рХн коровы. По данным [15] коагуляционная активность рХн верблюда, полученного в *P. pastoris*, при рН 6.0 и 6.5 составляла ≈ 18 и $\approx 16\%$ от максимальных значений, наблюдавшихся при рН 5.0 соответственно.

Аналогичную зависимость МА от рН демонстрировал и рХн овцы, полученный в экспрессионной системе *E. coli*. В диапазоне рН 6.0–6.4 фермент проявлял высокую МА, которая постепенно снижалась при увеличении рН с 6.4 до 6.8. При рН субстрата, равном 6.8, рХн овцы утрачивал $\approx 90\%$ исходной максимальной МА [16].

Максимальная МА рХн буйвола при свертывании восстановленного обезжиренного молока коровы наблюдалась при рН 5.5, а при подщелачивании субстрата до рН 6.5 коагуляционная активность снижалась на 34% [22]. По данным [21] рН-оптимум рХн буйвола составлял ≈ 4.6 , в диапазоне рН 5.5–6.5 фермент сохранял $\approx 90\%$ МА, а при рН > 7.0 быстро утрачивал свертывающую активность и при рН 7.5 проявлял не более 5% МА.

Обращают на себя внимание зависимости МА от рН рХн яка и козы, которые были синтезированы в системе *P. pastoris*. В отличие от большинства рХн парнокопытных, рХн яка демонстрировал высокую (более 80%) коагуляционную активность в диапазоне рН, равном 5.5–7.0, и начинал терять способность свертывать молоко коровы при рН > 7.0 . Но даже при рН 7.5 рХн яка сохранял около 40% от максимального значения МА, наблюдавшегося при рН 6.0 [24]. Зависимость МА от рН субстрата, схожую с рХн яка, проявлял и рХн козы (также полученный в системе *P. pastoris*), который характеризовался МА близкой к $\approx 100\%$ в диапазоне рН 3.5–5.5 и плавным ее снижением до $\approx 50\%$ при рН 8.0–9.0 [12].

Можно предположить, что расход рекомбинантных Хн козы и яка при свертывании молочной смеси с рН около 6.5 будет ниже, чем для большинства генно-инженерных Хн, быстро теряющих МА при рН ≥ 6.5 . В связи с этим наиболее

перспективными по характеру зависимости МА от рН являются химозины, медленно инактивирующиеся при удалении от рН-оптимума в щелочную область и способные проявлять в диапазоне рН 6.5–7.0 высокую коагуляционную активность. Пример рХн козы и яка не исключает, что в дальнейшем такие коагулянты будут найдены.

Таким образом, в настоящее время получены генно-инженерные химозины 7-ми видов млекопитающих, относящихся к отряду Парнокопытные. Комплекс основных биохимических характеристик, имеющих технологическое значение, изучен только для рХн коровы и одногорбого верблюда, широко применяемых в промышленном производстве сыров. Рекомбинантные химозины 5 оставшихся видов охарактеризованы неполно. Несмотря на наличие у рХн козы, овцы, буйвола, яка и альпака отдельных параметров, привлекательных для сыроделия, все они уступают рХн коровы и верблюда по совокупности биохимических свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 19-44-220010 p_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salque M., Bogucki P.I., Pyzel J., Sobkowiak-Tabaka I., Grygiel R., Szmyt M., Evershed R.P. // *Nature*. 2013. V. 493. № 7433. P. 522–525.
2. Evershed R.P., Payne S., Sherratt A.G., Copley M.S., Coolidge J., Urem-Kotsu D., Kotsakis K., Özdoğan M., Özdoğan A.E., Nieuwenhuys O., Akkermans P.M.M.G., Bailey D., Andeescu R.-R., Campbell S., Farid S., Hodder I., Yalman N., Özbaşaran M., Bıçakcı E., Garfinkel Y., Levy T., Burton M.M. // *Nature*. 2008. V. 455. № 7212. P. 528–531.
3. Flamm, E.L. // *Nat. Biotechnol.* 1991. V. 9. № 4. P. 349–351.
4. Kappeler S.R., van den Brink H.(J.)M., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E.B., Johansen E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 2. № 342. P. 647–654.
5. Uchiyama H., Uozumi T., Beppu T., Arima K. // *Agric. Biol. Chem.* 1980. V. 44. № 6. P. 1373–1381.
6. Emtage J.S., Angal S., Doel M.T., Harris T.J.R., Jenkins B., Lilley G., Lowe P.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. № 12. P. 3671–3675.
7. Cullen D., Gary G.L., Wilson L.J., Hayenga K.J., Lamsa M.H., Rey M.W., Norton S., Berka R.M. // *Nat. Bio/Technol.* 1987. V. 5. P. 369–376.
8. Nosedo D.G., Recúpero M., Blasco M., Ortiz G.E., Galvagno M.A. // *Protein Expr. Purif.* 2013. V. 92. P. 235–244.
9. Nosedo D.G., Blasco M., Recúpero M., Galvagno M.A. // *Protein Expr. Purif.* 2014. V. 104. P. 85–91.
10. Nosedo D.G., Recúpero M., Blasco M., Bozzo J., Galvagno M.A. // *Protein Expr. Purif.* 2016. V. 123. P. 112–121.

11. Старовойтова В.В., Величко Т.И., Баратова Л.А., Филиппова И.Ю., Лавренова Г.И. // Биохимия. 2006. Т. 71. № 3. С. 402–407.
12. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. // J. Dairy Sci. 2012. V. 95. № 2. P. 609–613.
13. Jensen J.L., Mølgaard A., Poulsen J.-C.N., Harboe M.K., Simonsen J.B., Lorentzen A.M., Hjerno K., van den Brink J.M., Qvist K.B., Larsen S. // Acta Crystallgr. D. Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. № 5. P. 901–913.
14. Espinoza-Molina J.A., Acosta-Muñiz C.H., Sepulveda D.R., Zamudio-Flores P.B., Rios-Velasco C. // Mol. Biotechnol. 2016. V. 58. № 10. P. 657–664.
15. Wang N., Wang K.Y., Li G., Guo W., Liu D. // Protein Expr. Purif. 2015. V. 111. P. 75–81.
16. Rogelj I., Perko B., Francky A., Penca V., Purgenčar J. // J. Dairy Sci. 2001. V. 84. № 5. P. 1020–1026.
17. Vega-Hernandes M.C., Gomes-Coello A., Villar J., Claverie-Martin F. // J. Biotechnol. 2004. V. 114. № 1–2. P. 69–79.
18. Kumar A., Sharma J., Grover S., Mohanty A.K., Batish V.K. // Food Biotechnol. 2007. V. 21. № 1. P. 57–69.
19. Tyagi A., Kumar A., Yadav A.K., Saklani A.C., Grover S., Batish V.K. // LWT-Food Sci. Technol. 2016. V. 69. P. 217–224.
20. Liu W.-G., Wang Y.-P., Zhang Z.-J., Wang M., Lv Q.-X., Liu H.-W., Lu M. // Protein Expr. Purif. 2017. V. 135. P. 78–82.
21. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 22. P. 10606–10610.
22. Tyagi A., Kumar A., Mohanty A.K., Kaushik J.K., Grover S., Batish V.K. // LWT-Food Sci. Technol. 2017. V. 84. P. 733–739.
23. Luo F., Jiang W.H., Yang Y.X., Li J., Jiang M.F. // Asian-Australas. J. Anim. Sci. 2016. V. 29. № 9. P. 1363–1370.
24. Ersöz F., İnan M. // Protein Expr. Purif. 2019. V. 154. P. 126–133.
25. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 6. P. 569–576.
26. Wei Z.-Y., Zhang Y.-Y., Wang Y.-P., Fan M.-X., Zhong X.-F., Xu N., Lin F., Xing S.-C. // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 5. P. 624–632.
27. Uniacke-Lowe T., Fox P.F. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Oxford, UK: Elsevier, Academic Press, 2017. P. 69–113.
28. Roller S., Praaning-Van Dalen D., Andreoli P. Food Industry and the Environment: Practical Issues and Cost Implications. Boston, MA (US): Springer, 1994. P. 64–65.
29. Kageyama T. // Biochemistry. 2004. V. 43. № 48. P. 15122–15130.
30. Kageyama T. // J. Biochem. 2000. V. 127. № 5. P. 761–770.
31. Chitpintiyol S., Goode D., Crabbet M.J.C. // Food Chem. 1998. V. 62. № 2. P. 133–139.
32. Jensen J.L., Jacobsen J., Moss M.L., Rasmussen F., Qvist K.B., Larsen S., van den Brink J.M. // J. Dairy Sci. 2015. V. 98. № 5. P. 2853–2860.
33. Ageitos J.M., Vallejo J.A., Poza M., Villa T.G. // J. Dairy Sci. 2006. V. 89. № 10. P. 3770–3777.
34. Costabel L.M., Bergamini C.V., Pozza L., Cuffia F., Candidi M.C., Hynes E. // J. Dairy Res. 2015. V. 82. № 3. P. 375–384.
35. Bansal N., Drake M.A., Piraino P., Broe M.L., Harboe M., Fox P.F., McSweeney P.H.L. // Int. Dairy J. 2009. V. 19. № 9. P. 510–517.
36. Børsting M.W., Qvist K.B., Rasmussen M., Vindeløv J., Vogensen F.K., Ardö Y. // Dairy Sci. Technol. 2012. V. 92. № 5. P. 593–612.
37. Horne D.S. // Int. Dairy J. 1998. V. 8. № 3. P. 171–177.
38. Horne D.S. // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2002. V. 7. P. 456–461.
39. Hyslop D.B. Advanced Dairy Chemistry. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publ., 2003. P. 839–878.
40. van Hooydonk A.C.M., Walstra P. // Neth. Milk Dairy J. 1987. V. 41. P. 19–47.
41. Farah Z., Bachmann M.R. // Milchwissenschaft. 1987. V. 42. № 11. P. 689–692.
42. Wangoh J., Farah Z., Puhan Z. // Milchwissenschaft. 1993. V. 48. № 6. P. 322–325.
43. Boudjenah-Haroun S., Laleye C.L., Moulti-Mati F., Si A.S., Mahboub N., Siboukeur O.E., Mati A. // Emir. J. Food Agric. 2011. V. 23. № 4. P. 301–310.
44. Stasiuk S.J., Summers E.L., Demmer J. // Reprod. Fertil. Dev. 2000. V. 12. № 4. P. 215–222.
45. Kotts C., Jenness R. // J. Dairy Sci. 1976. V. 59. № 5. P. 816–822.
46. Белов А.Н., Коваль А.Д., Авданина Е.А., Ельчанинов В.В. // Сыроделие и маслоделие. 2009. № 1. С. 22–24.
47. Мурунова Г.В., Свириденко Ю.Я. // Сыроделие и маслоделие. 2006. № 5. С. 2–5.
48. Emmons D.B., Beckett D.C., Binns M. // J. Dairy Sci. 1990. V. 73. № 8. P. 2007–2015.
49. Singh T.K., Drake M.A., Cadwallader K.R. // Compr. Rev. Food Sci. Food Safety. 2003. V. 2. № 4. P. 139–162.
50. Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. Technology of Cheesemaking. N.Y.: J. Wiley & Sons, 2010. P. 98–129.
51. Upadhyay V.K., McSweeney P.L.H., Magboul A.A.A., Fox P.F. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology. L.: Elsevier Acad. Press, 2004. P. 391–433.
52. Bansal N., Fox P., McSweeney P.H.L. // J. Dairy Res. 2009. V. 76. № 3. P. 290–293.
53. Daly R., Hearn M.T.W. // J. Mol. Recognit. 2005. V. 18. № 2. P. 119–138.
54. Narhi L.O., Arakawa T., Strickland T.W. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 34. P. 23022–23026.
55. Macauley-Patrick S., Fazenda M.L. // Yeast. 2005. V. 22. № 4. P. 249–270.
56. Cross K.J., Huq L., Palamara J.P., Perich J.W., Reinolds E.C. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 15. P. 15362–15369.
57. Lucey J.A. // J. Dairy Sci. 2002. V. 85. № 2. P. 281–294.
58. Майоров А.А., Мироненко И.М., Байбикова А.А. // Сыроделие и маслоделие. 2011. № 2. С. 19–23.

Basic Biochemical Properties of Recombinant Chymosins (Review)

S. V. Belenkaya^{a, d}, D. V. Balabova^b, A. N. Belov^c, A. D. Koval^c,
D. N. Shcherbakov^{a, b}, and V. V. Elchaninov^{c, *}

^aState Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" Rospotrebnadzora, Koltsovo, 630559 Russia

^bAltai State University, Barnaul, 656049 Russia

^cFederal Altay Scientific Centre of Agrobiotechnologies, Siberian Institute of Cheese Making, Barnaul, 656016 Russia

^dNovosibirsk state University, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: ve3636@yandex.ru

The work is devoted to the review of the main biochemical properties of known types of recombinant chymosins used in cheese making or claiming to be technological coagulants of milk. The parameters of Michaelis-Menten kinetics, milk-clotting activity, proteolytic activity, specificity, dependence of coagulation ability on pH and concentration of calcium ions are considered.

Keywords: recombinant chymosin, Michaelis-Menten kinetics, milk-clotting activity, proteolytic activity, thermal stability, calcium ion concentration, pH-optimum