

DOI: 10.7868/S3034574X26050060

Оригинальная статья

УДК 577.1

ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА ТИХООКЕАНСКОГО БЕЛОБОКОГО ДЕЛЬФИНА (*Sagmatias obliquidens*)

В.О. Щеголькова^{1,2,3,*}, В.О. Труфанов^{1,3}, С.В. Беленькая^{1,3}, Е.А. Савенцева^{1,3},
Е.А. Волосникова¹, Д.Н. Щербаков^{1,3}, В.В. Ельчанинов²

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
Кольцово, Российская Федерация

² Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия,
Барнаул, Российская Федерация

³ «Алтайский государственный университет», Барнаул, Российская Федерация

*E-mail: v.shhegolkova1@mail.ru

Аннотация. Методом флуоресцентной спектроскопии были определены кинетические параметры рекомбинантного химозина тихоокеанского белобочного дельфина (*Sagmatias obliquidens*), полученного в системе экспрессии дрожжей *Kluyveromyces lactis*. Исследовано взаимодействие фермента с синтетическими флуорогенными пептидными субстратами, имитирующими химозин-чувствительные участки к-казеинов коровы (*Bos taurus*), верблюда (*Camelus dromedarius*) и дельфина (*Sagmatias obliquidens*). Проведен сравнительный анализ кинетических характеристик рекомбинантного химозина дельфина, коровы и верблюда. На всех исследованных пептидах химозин дельфина демонстрировал близкие значения константы Михаэлиса (K_m) (1.6–2.2 мкМ), указывающие на близкое родство к различным к-казеинам, однако на этих же субстратах максимальная скорость прироста флуоресценции (V_{max}) и число оборотов фермента (k_{cat}) существенно различались. Показано, что наибольшую каталитическую эффективность химозин дельфина проявлял при гидролизе субстрата, имитирующего химозин-чувствительный участок к-казеина коровы: $K_m = 1.9 \pm 0.3$ мкМ, $V_{max} = 0.133 \pm 0.006$ U/c, $k_{cat} = 0.027 \pm 0.001$ (U×л)/(с×нМ). Полученные данные расширяют представления о кинетических свойствах аспартатных молокосвертывающих протеиназ и могут быть использованы для понимания механизмов их специфичности.

Ключевые слова: рекомбинантный химозин тихоокеанского белобочного дельфина, система экспрессии *Kluyveromyces lactis*, молокосвертывающая активность, кинетика Михаэлиса-Ментен

Финансирование. Научно-исследовательская работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания, проект FZMW-2026-0005. **Соблюдение этических стандартов.** Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Ссылка цитирования: Щеголькова В.О., Труфанов В.О., Беленькая С.В., Савенцева Е.А., Волосникова Е.А., Щербаков Д.Н., Ельчанинов В.В. Особенности ферментативной кинетики рекомбинантного химозина тихоокеанского белобочного дельфина (*Sagmatias obliquidens*). *Прикладная биохимия и микробиология* / *Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 5. С. 741–754. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26050060>

© В.О. Щеголькова, В.О. Труфанов, С.В. Беленькая, Е.А. Савенцева, Е.А. Волосникова, Д.Н. Щербаков, В.В. Ельчанинов, 2026

FEATURES OF THE ENZYMATIC KINETICS OF RECOMBINANT CHYMOSIN FROM THE PACIFIC WHITE-SIDED DOLPHIN (*Sagmatias obliquidens*)

V.O. Shchegolkova^{1,2,3,*}, V.O. Trufanov^{1,3}, S.V. Belenkaya^{1,3}, E.A. Saventseva^{1,3},
E.A. Volosnikova¹, D.N. Shcherbakov^{1,3}, V.V. Elchaninov²

¹State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russian Federation

²Federal Altai Scientific Center of Agrobiotechnology, Siberian Research Institute of Cheesemaking, Barnaul, Russian Federation

³Altai State University, Barnaul, Russian Federation

*E-mail: v.shchegolkova1@mail.ru

Abstract. The kinetic parameters of recombinant chymosin from the Pacific white-sided dolphin (*Sagmatias obliquidens*), obtained using the *Kluyveromyces lactis* yeast expression system, were determined by fluorescence spectroscopy. The interaction of the enzyme with synthetic fluorogenic peptide substrates mimicking the chymosin-sensitive regions of κ -caseins from cow (*Bos taurus*), camel (*Camelus dromedarius*), and dolphin (*Sagmatias obliquidens*) was studied. A comparative analysis of the obtained kinetic characteristics of the recombinant dolphin chymosin with commercial preparations of recombinant cow and camel chymosin was performed. For all studied peptides, dolphin chymosin demonstrated similar Michaelis constant (K_m) values (1.6–2.2 μ M), indicating similar affinity for different κ -caseins; however, maximum fluorescence increase rate (V_{max}) and enzyme turnover number (k_{cat}) varied significantly depending on the species origin of the substrate. It was shown that dolphin chymosin exhibits the highest catalytic efficiency towards the cow substrate. During the hydrolysis of the substrate mimicking cow κ -casein, dolphin chymosin showed the following parameters: $K_m = 1.9 \pm 0.3 \mu$ M, $V_{max} = 0.133 \pm 0.006$ U/s, $k_{cat} = 0.027 \pm 0.001$ (U $\times$ L)/(s $\times$ nM). The obtained data expand the understanding of the kinetic properties of aspartic milk-clotting proteases and can be used to understand the mechanisms of their specificity.

Keywords: recombinant chymosin of the Pacific white-sided dolphin, *Kluyveromyces lactis* expression system, milk-clotting activity, Michaelis-Menten kinetics.

Funding. This research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under state assignment project FZMW-2026-0005.

Ethics declarations. This article does not contain any studies involving humans or animals.

Conflict of interest. The authors of this work declare no conflicts of interest.

Author contributions. All authors made significant contributions to the concept development, conduct of the study, and preparation of the article.

For Citation: Shchegolkova V.O., Trufanov V.O., Belenkaya S.V., Saventseva E.A., Volosnikova E.A., Shcherbakov D.N., Elchaninov V.V. Features of the Enzymatic Kinetics of Recombinant Chymosin from the Pacific White-Sided Dolphin (*Sagmatias obliquidens*). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(5):741–754. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26050060>

ВВЕДЕНИЕ

Химозин (КФ 3.4.23.4) — протеолитический молокосвертывающий фермент, который синтезируется в желудках новорожденных большинства Млекопитающих (*Mammalia*) [46]. Согласно классификации MEROPS, химозин (Хн) относится к семейству пепсиноподобных аспартатных протеаз [<https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=A1>]. Фермент проявляет исключительно высокую специфичность по отношению к одной связи в молекуле κ -казеина (в κ -казеине коровы это связь F105-M106). Гидролиз связи F105-M106, которая также называется Хн-чувствительной связью, запускает процесс свертывания молока и приводит к формированию молочного сгустка. Благодаря комплексу биохимических свойств, Хн широко используется в сыроделии в качестве технологического коагулянта молока [25–26].

Ранее, в качестве сырья для производства коммерческих препаратов высококачественных Хн использовали желудки детенышей сельскохозяйственных животных, питающихся молоком. После разработки технологии рекомбинантных ДНК появилась возможность получать генно-инженерные Хн любых видов млекопитающих, вырабатывающих этот фермент [23, 46, 51].

Одним из первых достижений генной инженерии стала разработка технологии получения рекомбинантного химозина (рХн) коровы (*Bos taurus*) и внедрение его в сыродельную практику [23]. Позднее был синтезирован рХн одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*), который не только эффективно свертывает коровье молоко, но и превосходит рХн коровы по соотношению коагуляционной и общей протеолитической активности (ПА) [30]. В настоящее время эти генно-инженерные ферменты широко представлены на рынке промышленных коагулянтов молока.

Получение и исследование новых генно-инженерных молокосвертывающих аспартатных протеиназ, которые могут обладать ценными технологическими свойствами, является актуальным научным направлением. За последние два десятилетия были получены и охарактеризованы рХн различных представителей класса *Mammalia*: овцы (*Ovis aries*) [38], козы (*Capra hircus*) [45, 47, 49], буйвола (*Bubalus arnee bubalis*) [44, 48], яка (*Bos grunniens*) [20, 34], альпака (*Vicugna pacos*) [13], марала (*Cervus elaphus sibiricus*) [14–17], двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) [5, 6], тупайи (*Tupaia belangeri chinensis*) [9], лося (*Alces alces*) [8], белухи (*Delphinapterus leucas*) [22], кролика (*Oryctolagus cuniculus*) [7], северного оленя (*Rangifer tarandus*) [1–4], косули (*Capreolus pygargus*) [36].

Расширение круга изученных Хн-ов позволило выявить случаи «конфликтов» между этими ферментами и молоком различных видов. Наи-

более известен парадокс «Хн коровы — молоко верблюда». Суть парадокса в том, что Хн коровы не коагулирует (или коагулирует очень медленно) верблюжье молоко [12, 19, 21, 27, 46, 50] тогда как рХн одногорбого верблюда не только эффективно свертывает молоко коровы, но и превосходит коровий фермент по удельной молокосвертывающей активности (МА) [30]. Считается, что причиной парадокса могут быть различия первичной структуры κ -казеинов (κ -КЗ) коровы и верблюда на участке 98–112 [29, 41, 42]. Известны и другие примеры межвидового «конфликта» молока и Хн. Сообщалось, что из-за медленного гидролиза κ -КЗ лошади (*Equus caballus*) Хн коровы не способен свертывать кобылье молоко [46], в то время как рХн двугорбого верблюда успешно справляется с этой задачей [5, 6]. Кроме того, Хн коровы не коагулирует молоко некоторых сумчатых млекопитающих [43]. Намного медленнее, чем гомологичный субстрат, Хн коровы свертывает молоко крысы (*Rattus norvegicus*), кролика, козы и северного оленя [32]. Коагуляционная активность кроличьего рХн, измеренная на молоке осла (*Equus asinus*), коровы, козы, овцы и верблюда различается более чем на порядок и составляет, соответственно, 40.0; 10.0; 5.7; 3.1 и 2.7 IMCU/ml [7].

Анализ «конфликтов» Хн и гетерологичного молока позволяет условно разделить химозины на 2 типа: «универсальные», способные одинаково эффективно свертывать как гомологичное, так и гетерологичное молоко (например, Хн верблюда), и «специализированные» — проявляющие наибольшую МА только по отношению к гомологичному молоку (например, Хн коровы).

Гастральные протеиназы морских млекопитающих изучены крайне поверхностно, но даже фрагментарные данные о свойствах этих ферментов указывают на то, что некоторые из них могут иметь технологическую перспективу [39, 40].

Наиболее многочисленным таксоном морских млекопитающих является инфраотряд Китообразные (94 вида) [24]. На сегодняшний день информация о свойствах Хн Китообразных ограничивается работой [22], в которой рассмотрены биохимические свойства рХн зубатого кита белухи (*Delphinapterus leucas*), полученного в метилотрофных дрожжах *Komagataella phaffii*.

Важными параметрами биохимической характеристики любого фермента являются его каталитические свойства, количественно описываемые в рамках модели Михаэлиса-Ментен. Определение кинетических параметров гидролиза гомологичных и гетерологичных субстратов необходимо для понимания механизма действия фермента и оценки его технологического потенциала.

Целью данной работы являлось определение параметров кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантного химозина тихоокеанского белобочного дельфина (*S. obliquidens*), полученного в системе

экспрессии *Kluyveromyces lactis*, а также сравнительный анализ полученных характеристик с соответствующими показателями коммерческих генно-инженерных химозинов коровы и одногорбого верблюда.

МЕТОДИКА

Конструирование интеграционного плазмидного вектора. Для синтеза и секретиции прохимозина *S. obliquidens* (ПроХн-Sao) в системе экспрессии *K. lactis*, применяли оригинальный интеграционный вектор pSVB, который ранее был использован для получения дрожжевых продуцентов ферментативно-активных химозинов, обеспечивающих секрецию целевых ферментов в культуральную жидкость [10, 16]. Нуклеотидная последовательность (GenBank XM_027096246.1) ПроХн-Sao, оптимизированная под экспрессию *K. lactis* с использованием сервиса «Codon Optimisation Tool» («Integrated DNA Technologies», США), была синтезирована компанией «ДНК-синтез» (Россия). Клонирование синтезированной последовательности в составе вектора pSVB проводили по уникальным сайтам рестрикции C↓CTAGG и G↓GATCC путем гидролиза эндонуклеазами рестрикции BamHI и AspA2I («СибЭнзайм», Россия) с последующим лигированием. Сконструированный вектор pSVB-Sao позволил интегрировать экспрессионную кассету, содержащую последовательность ПроХн-Sao, в геном *K. lactis* штамм SVB-1. Получение и культивирование штамма *K. lactis* SVB-1/Sao, активация зимогена и частичная хроматографическая очистка рХн белобочного дельфина (рХн-Sao) выполнялись по методикам, описанным в работах [10, 16]. Чистоту полученного препарата оценивали методом электрофореза по Laemmli [33]. В качестве маркеров молекулярных масс использовали набор LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare).

Общую МА полученного препарата рХн-Sao и ферментов сравнения определяли в соответствии с процедурой, представленной в работе [14]. В качестве стандарта МА использовали сухой препарат рХн коровы (CHY-MAX® Powder Extra, «Chr. Hansen», Дания), аттестованный по МА. Готовили 0.5%-ный раствор стандарта в 20 мМ Na-ацетатном буфере (pH 5.8). Субстратом для определения общей МА служило сборное непастеризованное коровье молоко. В молочный субстрат вносили NaN_3 до концентрации 0.02% и доводили до pH 6.5, используя 2.0 М HCl.

Для определения общей МА субстрат (1.25 мл), прогретый на водяной бане при 35°C не менее 5 мин, быстро смешивали с раствором исследуемого рХн (0.1 мл) и регистрировали продолжительность коагуляции (ПК) в секундах. Общую МА жидких препаратов рХн рассчитывали по формуле (1) и выражали в International Milk Clotting Units на 1 мл (IMCU/ml).

$$MA = MA_{st}/200 \times T_1/T \quad (1),$$

где MA_{st} — заявленная МА стандарта (IMCU/г); 200 — фактор разведения (мл/г); T_1 — ПК (с) со стандартом; T — ПК (с) с исследуемым рХн.

Оценка способности рХн-Sao и ферментов сравнения коагулировать молоко коровы и одногорбого верблюда. Для проведения исследования рХн-Sao, рХн-Bos и рХн-Cam разводили 20 мМ Na-ацетатным буфером до МА ≈ 8 IMCU/мл (на молоке коровы). В качестве субстрата использовали цельное непастеризованное молоко коровы и одногорбого верблюда, в которое вносили NaN_3 до конечной концентрации 0.02%, доводили pH до 6.5 и хранили при 2–8°C не более 2 сут.

Для оценки коагуляционной способности рХн, молоко коровы и верблюда (2.5 мл) прогревали на водяной бане при 35°C в течение 5 мин, быстро смешивали с исследуемым ферментом (0.2 мл) и включали секундомер. Регистрировали ПК (с), как момент образования первых хлопьев коагулята. Коагуляционную активность исследуемых ферментов рассчитывали как 1/ПК и выражали в %. За 100% принимали активность рХн-Bos, полученную на молоке коровы.

Определение параметров кинетики Михаэлиса–Ментен. Для определения параметров кинетики Михаэлиса–Ментен использовали хроматографически очищенный препарат рХн-Sao в 20 мМ Na-ацетатном буфере (pH 5.8). Ферментами сравнения были рХн коровы («Maxiren 1800», производства компании «DSM Food Specialties», Франция) и одногорбого верблюда («Chy-Max M», производства компании «Chr. Hansen», Дания). Сухие препараты рХн коровы (рХн-Bos) и рХн верблюда (рХн-Cam) растворяли в 20 мМ Na-ацетатном буфере (pH 5.8), выдерживали в течение 15 мин на водяной бане при 35°C и охлаждали до комнатной температуры. Все препараты рХн нормировали по МА рХн-Sao. Концентрацию белка в препаратах рХн определяли по методу Лоури.

Кинетику Михаэлиса–Ментен изучали методом флуоресцентной спектроскопии. Измерения проводили на флуориметре Thermo Scientific Varioskan LUX («Thermo Fisher Scientific», Сингапур) в режиме кинетического считывания при 20°C. Длины волн возбуждения — 480 нм, эмиссии — 530 нм, ширина полосы пропускания — 12 нм. Количество считываний — 40, с интервалом 15 с.

В качестве субстратов использовали флуорогенные синтетические пептиды (Pep), имитирующие Хн-чувствительные участки к-КЗ коровы (Dabcyl-NRHPHLSFMAIPK(5-FAM)KK-NH₂), верблюда (Dabcyl-NRPRPSFIAIPK(5-FAM)KK-NH₂) и дельфина (Dabcyl-NRHPRPSFLAIPK(5-FAM)KK-NH₂), где Dabcyl = 4-(dimethylaminoazo)benzene-4-carboxylic acid, а 5-FAM = 5-carboxyfluorescein.

Подготовка к измерению флуоресценции. Готовили 10 нМ растворы исследуемых рХн в 50 мМ Na-ацетатном буфере (рН 5.8). Для подготовки субстрата готовили маточные растворы, содержащие 400 мкМ флуоресцентно-меченых пептидов, имитирующих Хн-чувствительные участки к-КЗ коровы, верблюда и дельфина, 50 мМ Na-ацетатного буфера (рН=5.8) и 4%-ный DMSO. Фермент-субстратные смеси готовили в 384-луночном планшете. В ряд лунок вносили по 5 мкл раствора субстрата с концентрацией 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.316, 0.156, 0.078, 0.039, 0.020 мкМ. Ферментативную реакцию запускали, добавляя в каждую из лунок по 5 мкл раствора исследуемого рХн. Конечная концентрация фермента в каждой лунке была одинаковой и составляла 5 нМ. Сразу после внесения фермента начинали измерение флуоресценции. Интенсивность флуоресценции измеряли в условных единицах (U), которые зависели от настроек используемого оборудования. Графики зависимости скорости реакции от концентрации субстрата обрабатывали в соответствии с методикой, описанной в [31].

Для расчета константы Михаэлиса (K_m) и предельной скорости ферментативной реакции (V_{max}) использовали уравнение 2:

$$V = (V_{max} \times [S]) / (K_m + [S]) \quad (2),$$

где V – скорость реакции; $[S]$ – концентрация субстрата; K_m – константа Михаэлиса; V_{max} – максимальная скорость реакции.

Константу скорости реакции гидролиза или число оборотов фермента рассчитывали по формуле 3:

$$k_{cat} = V_{max} / [E], \quad (3),$$

где k_{cat} – константа скорости реакции гидролиза (число оборотов фермента); V_{max} – максимальная скорость реакции; $[E]$ – концентрация исследуемого рХн.

Каталитическую эффективность (константу специфичности) определяли как соотношение k_{cat}/K_m . Использовали следующие размерности кинетических параметров: K_m – мкМ; V_{max} – U/c; k_{cat} – (U × л)/(с × нМ);

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Excel («Microsoft Corporation», США). Для количественных переменных результаты представлены в виде среднего арифметического (M) с указанием среднеквадратичного отклонения ($\pm$ SD). Все измерения повторяли не менее 3 раз ($n \geq 3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Интеграция экспрессионной кассеты из вектора pSVB-Sao (рис. 1а) в геном *K. lactis* (штамм SVB-1) позволила получить штамм-продуцент генно-инженерного Хн тихоокеанского белобочного дельфина. В результате культивирования продуцента, активации зимогена и частичной хроматографической очистки целевого фермента был наработан препарат рХн-Sao (рис. 1б) с общей МА 10.3 IMCU/мл, который использовали в настоящей работе.

Оценка способности рХн-Sao коагулировать молоко коровы и одногорбого верблюда. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о способности рХн-Sao коагулировать молоко коровы и верблюда. Это означает, что рХн дельфина гидролизует как минимум одну пептидную связь в к-КЗ *B. taurus* и *C. dromedarius*. Интересно, что МА всех исследованных рХн на субстрате, имитирующем к-КЗ коровы, была примерно одинакова. По сравнению с молоком коровы, МА рХн-Sao на молоке одногорбого верблюда была на 25% ниже.

Таблица 1. Общая МА рХн-Sao, рХн-Bos и рХн-Cam при использовании в качестве субстратов молока коровы и одногорбого верблюда

Table 1. Total MA of rCh-Sao, rCh-Bos and rCh-Cam when using cow's milk and dromedary camel's milk as substrates

Молоко	Рекомбинантный химозин, МА, %		
	рХн-Sao	рХн-Bos	рХн-Cam
Коровы	102.00 $\pm$ 0.00	100	103.00 $\pm$ 0.00
Одногорбо- го верблюда	74.73 $\pm$ 1.17	13.93 $\pm$ 0.12	116.50 $\pm$ 2.08

Выше было указано, что причиной межвидовых конфликтов Хн и молока могут быть различия в структуре Хн-чувствительных участков к-КЗ различных видов. Аминокислотные последовательности Хн-чувствительных участков к-КЗ коровы (GenBank: AFZ62609.1), верблюда (GenBank: AHG05799.1) и белобочного дельфина (GenBank: XP_026945454.1) представлены на рис. 2. Последовательности этих участков для верблюда и дельфина совпадали на 75%, что намного выше, чем гомология полноразмерных к-КЗ *B. taurus* с к-КЗ *C. dromedarius* (58.4%) и *S. obliquidens* (66.8%). Все сравниваемые к-КЗ различаются структурой ключевой пептидной связи: гидрофобный серосодержащий остаток

Met106 (в к-КЗ *B. taurus*) замещен аминокислотами, несущими гидрофобные R-группы с разветвленной алифатической цепью – L (*S. obliquidens*) или I (*C. dromedarius*). Таким образом, несмотря на различия в структуре Хн-чув-

ствительных связей к-КЗ *B. taurus*, *S. obliquidens* и *C. dromedarius* рХн дельфина (как и рХн верблюда) способен эффективно коагулировать и коровье и верблюжье молоко (табл. 1), что указывает на «универсальность» этого фермента.

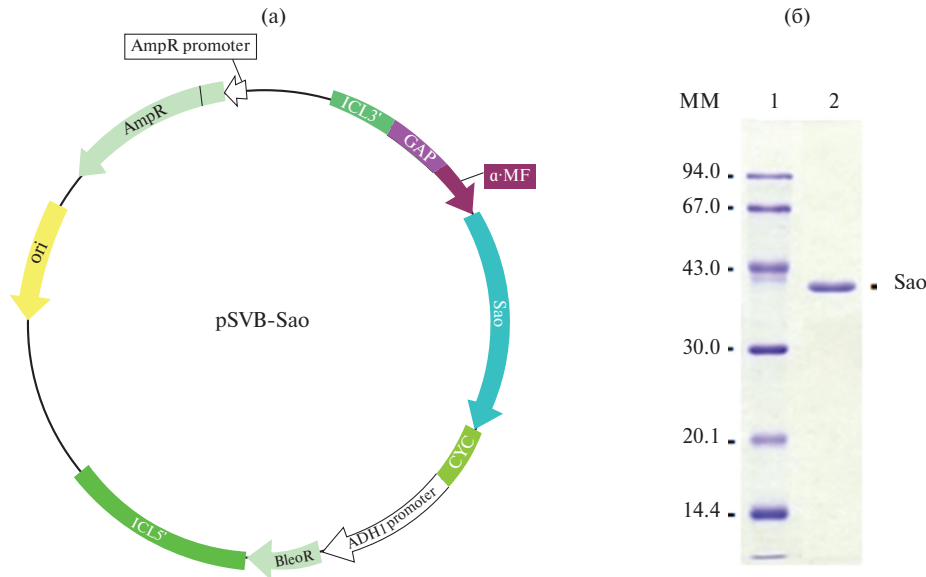


Рис. 1. Генетическая карта плазмиды pSVB-Sao (а): ICL-3' – регуляторная последовательность промотора изоцитратлиазы; GAP – коровья последовательность промотора глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы; α-MF – сигнал секретиции белка α-MF *S. cerevisiae*; Sao – последовательность, кодирующая прохимозин белогобокого дельфина; CYC – последовательность терминатора транскрипции гена CYC1 *S. cerevisiae*; ADH1 – промотор гена алкогольдегидрогеназы; BleoR – ген устойчивости к зеоцину; ICL-5' – 5' последовательность гена промотора изоцитратлиазы; ori – ориджин репликации; AmpR – ген устойчивости к ампициллину. Электрофореграмма препарата рХн тихоокеанского белогобокого дельфина, полученного в системе экспрессии *K. lactis* (штамм SVB-1) (б): 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – хроматографически очищенный препарат рекомбинантного химозина тихоокеанского белогобокого дельфина (Sao)

Fig. 1. Genetic map of the pSVB-Sao plasmid (a): ICL-3' – regulatory sequence of the isocitrate lyase promoter; GAP – core sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter; α-MF – secretion signal of the α-MF protein of *S. cerevisiae*; Sao – sequence encoding prochymosin of the white-sided dolphin; CYC – transcription terminator sequence of the CYC1 gene of *S. cerevisiae*; ADH1 – promoter of the alcohol dehydrogenase gene; BleoR – gene of resistance to zeocin; ICL-5' – 5' sequence of the isocitrate lyase promoter gene; ori – origin of replication; AmpR – gene of resistance to ampicillin. Electropherogram of the rCh preparation of the Pacific white-sided dolphin obtained in the expression system of *K. lactis* (strain SVB-1) (b): 1 – molecular mass markers; 2 – chromatographically purified preparation of recombinant chymosin from Pacific white-sided dolphin (Sao)

96	119	
ARHPRHLSF-MAIPPKKNQDKTEI		<i>Bos taurus</i>
ERRPRRPSF-IAIPPKKTQDKTVN		<i>Camelus dromedarius</i> (58.4%)
AHHPRRPSF-LAIPPKKTQDKTVI		<i>Sagmatias obliquidens</i> (66.8%)

Рис. 2. Аминокислотные последовательности Хн-чувствительных участков (96-119) к-КЗ коровы, одnogорбого верблюда и белогобокого дельфина. В скобках указана степень гомологии первичной структуры полноразмерных к-КЗ по отношению к к-КЗ коровы. Красным цветом отмечена последовательность 105-106 к-КЗ коровы. Желтым цветом выделены аминокислотные замены, по сравнению с к-КЗ коровы. Аминокислотные последовательности взяты из базы данных BLAST

Fig. 2. Amino acid sequences of the X-sensitive regions (96-119) of bovine, dromedary, and white-sided dolphin k-KZ. The degree of homology of the primary structure of the full-length k-KZ to bovine k-KZ is indicated in parentheses. The sequence 105-106 of bovine k-KZ is shown in red. Amino acid substitutions, compared to bovine k-KZ, are highlighted in yellow. The amino acid sequences were taken from the BLAST database

Параметры кинетики Михаэлиса–Ментен.

Кинетические параметры взаимодействия рХн с пептидами, имитирующими Хн-чувствительные участки к-КЗ коровы (**Pep-Bos**), верблюда (**Pep-Cam**) и дельфина (**Pep-Sao**) приведены в табл. 2. Для улучшения читаемости таблицы кинетические параметры приведены без единиц измерения.

Рассмотрим значения, полученные для рХн коровы и верблюда. По сообщению [28], в сравнении с Хн коровы, верблюжий рХн демонстрирует более высокую активность в отношении субстрата, имитирующего к-КЗ коровы. Полученные результаты коррелируют с этими данными. Действительно, по сравнению с рХн коровы максимальная скорость гидролиза пептида к-КЗ коровы химозином верблюда оказалась в 3 раза выше ($V_{\max} = 0.72 \pm 0.22$ и 0.24 ± 0.01 U/c, соответственно). Высокая эффективность рХн верблюда на модельном коровьем субстрате хорошо коррелирует с технологическими показателями этого фермента, при его использовании в сыроделии, в качестве коагулянта коровьего молока [11, 18, 27, 30, 35, 37].

Данные [28] о том, что рХн коровы обладает низкой протеолитической активностью в отношении верблюжьего к-КЗ, также находятся в соответствии с нашими результатами: Хн коровы в 16 раз быстрее гидролизует Pep-Bos, чем Pep-Cam ($V_{\max} = 0.24 \pm 0.01$ и 0.015 ± 0.005 U/c, соответственно). При

взаимодействии с пептидом к-КЗ верблюда, рХн верблюда показывает скорость гидролиза 0.15 ± 0.4 U/c, тогда как рХн коровы на этом же субстрате «работает» в 10 раз медленнее — 0.015 ± 0.005 U/c.

Результаты кинетического исследования рХн коровы и верблюда хорошо коррелируют с данными других авторов [27, 28, 30], что позволяет уверенно интерпретировать результаты, полученных в экспериментах с рХн белого дельфина.

По сравнению с рХн верблюда и дельфина, рХн коровы, при взаимодействии с пептидом к-КЗ верблюда, демонстрирует самые низкие значения $V_{\max}$ и K_m . Это можно объяснить следующим образом: коровий рХн проявляет высокое сродство к пептиду к-КЗ верблюда, но высокая аффинность фермента к субстрату препятствует быстрому распаду фермент-субстратного комплекса на свободный рХн и продукты протеолиза.

На всех использованных нами субстратах рХн белого дельфина показал близкие значения K_m (табл. 2). Это означает, что аффинность фермента дельфина ко всем этим субстратам примерно одинакова. Однако, судя по значениям $V_{\max}$ и k_{cat} скорость гидролиза пептида к-КЗ коровы в 10 раз выше, чем скорость гидролиза субстратов, имитирующих к-КЗ верблюда и дельфина. Возможно, это связано со структурными различиями фрагментов 96–119 к-КЗ данных видов (рис. 2).

Таблица 2. Результаты кинетических исследований взаимодействия рекомбинантных химозинов с субстратами, имитирующими Хн-чувствительные участки к-КЗ коровы, белого дельфина и одногорбого верблюда

Table 2. Results of kinetic studies of the interaction of recombinant chymosins with substrates imitating the ChN-sensitive sites of cow, white-sided dolphin, and dromedary camel chymosins

Химозин	Субстрат		
	Pep-Sao (<i>S. obliquidens</i>)	Pep-Bos (<i>B. taurus</i>)	Pep-Cam (<i>C. dromedarius</i>)
pХн-Sao	$K_m = 2.2 \pm 0.7$ $V_{\max} = 0.041 \pm 0.007$ $k_{\text{cat}} = 0.008 \pm 0.001$	$K_m = 1.9 \pm 0.3$ $V_{\max} = 0.133 \pm 0.006$ $k_{\text{cat}} = 0.027 \pm 0.001$	$K_m = 1.6 \pm 0.4$ $V_{\max} = 0.058 \pm 0.008$ $k_{\text{cat}} = 0.012 \pm 0.002$
pХн-Bos	$K_m = 1.9 \pm 1.0$ $V_{\max} = 0.011 \pm 0.004$ $k_{\text{cat}} = 0.002 \pm 0.001$	$K_m = 2.0 \pm 0.5$ $V_{\max} = 0.240 \pm 0.010$ $k_{\text{cat}} = 0.049 \pm 0.002$	$K_m = 0.4 \pm 0.0$ $V_{\max} = 0.015 \pm 0.005$ $k_{\text{cat}} = 0.030 \pm 0.010$
pХн-Cam	$K_m = 2.0 \pm 0.2$ $V_{\max} = 0.064 \pm 0.002$ $k_{\text{cat}} = 0.013 \pm 0.000$	$K_m = 5.1 \pm 0.31$ $V_{\max} = 0.720 \pm 0.220$ $k_{\text{cat}} = 0.140 \pm 0.040$	$K_m = 2.0 \pm 0.43$ $V_{\max} = 0.150 \pm 0.400$ $k_{\text{cat}} = 0.030 \pm 0.010$

Примечание: Результаты представлены в виде $M \pm SD$

Note: results are presented as $M \pm SD$

Пептид к-КЗ *S. obliquidens* проявляет примерно одинаковое сродство ко всем исследованным ферментам (на это указывают близкие значения K_m), но гидролизуется ими с различной эффективностью. Так, Рер-Sao гораздо медленнее расщепляется коровьим рХн (0.011 ± 0.004 У/с), по сравнению с рХн дельфина (0.041 ± 0.007 У/с) и рХн верблюда (0.064 ± 0.002 У/с).

Таким образом, по сравнению с другими субстратами, рХн белобочного дельфина демонстрирует наибольшую эффективность при гидролизе пептида к-КЗ коровы. По скорости и эффективности гидролиза субстрата, имитирующего к-КЗ коровы, исследованные нами ферменты располагаются в следующей последовательности: рХн-Sam > рХн-Bos > рХн-Sao. Полученные результаты указывают на то, что рХн-Sao может представлять интерес для сыроделия, в качестве технологического коагулянта коровьего молока, из которого вырабатывается большинство видов сычужных сыров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В системе экспрессии *K. lactis* получен рекомбинантный химозин тихоокеанского белобочного дельфина и проведен сравнительный анализ параметров его кинетики Михаэлиса-Ментен с коммерческими генно-инженерными химозинами коровы и одnogорбого верблюда.

Показано, что рХн *S. obliquidens* способен эффективно свертывать молоко *B. taurus* и *C. dromedarius*. На молоке коровы активность рХн дельфина сопоставима с активностью ферментов сравнения. При замене коровьего молока на верблюжье, рХн дельфина сохранял около 74% от исходной активности. Это позволяет отнести химозин дельфина, наряду с ферментом верблюда, к «универсальному» типу. Коагуляционная способность рХн коровы на верблюжьем субстрате (в отличие от коровьего) не

превышает 14%, что подтверждает его «специализированный» характер.

Анализ кинетики гидролиза флуорогенных пептидов, имитирующих Хн-чувствительные участки к-КЗ трех видов, показал, что аффинность рХн дельфина ко всем субстратам примерно одинакова (K_m 1.6–2.2 мкМ), но скорость их гидролиза варьирует.

Особенностью, отличающей фермент дельфина от ферментов сравнения, является то, что на гетерологичных субстратах рХн *S. obliquidens* демонстрирует более высокие показатели константы скорости гидролиза и предельной скорости реакции, чем на пептиде, имитирующем его биологический субстрат. Наибольшие значения V_{max} и k_{cat} рХн дельфина зарегистрированы на фрагменте к-КЗ коровы (0.133 УЕ/с и 0.027 УЕ/с×нМ соответственно), что, в 2.3–3.3 раза выше, чем на пептидах дельфина и верблюда.

Результаты кинетического исследования ферментов сравнения хорошо согласуются с литературными данными. Так, верблюжий рХн гидролизует имитацию к-КЗ *B. taurus* в 3 раза быстрее, чем рХн коровы (V_{max} 0.72 против 0.24 УЕ/с). В свою очередь, коровий рХн очень медленно расщепляет пептид верблюда (V_{max} 0.015 УЕ/с), демонстрируя, при этом, высокое сродство к нему (K_m 0.4 мкМ).

Таким образом, установлено, что рХн тихоокеанского белобочного дельфина проявлял максимальную каталитическую эффективность в отношении субстрата, имитирующего к-КЗ коровы. Высокая скорость гидролиза этого субстрата позволяет рассматривать рХн *S. obliquidens* как перспективный коагулянт для производства сыров, вырабатываемых, в первую очередь, из коровьего молока. Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о межвидовых взаимодействиях в системе «фермент-субстрат» у аспартатных молоко-свертывающих протеиназ млекопитающих.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пушкарев В.А., Мусина О.Н., Беленькая С.В. и др. Комплекс биохимических свойств рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*) с точечной аминокислотной заменой K53E // Пищевая промышленность. 2023. № 5. С. 16–19. <https://doi.org/10.52653/PPI.2023.5.5.004>
2. Пушкарев В.А., Мусина О.Н., Беленькая С.В. и др. Молокосвертывающая и общая протеолитическая активность инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*) // Сыроделие и маслоделие. 2023. № 1. С. 22–25. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2023-1-22-25>
3. Пушкарев В.А., Мусина О.Н., Беленькая С.В. и др. Влияние концентрации ионов кальция и pH на молоко-свертывающую активность инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*) // Сыроделие и маслоделие. 2023. № 2. С. 31–33. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2023-2-31-33>
4. Пушкарев В.А., Мусина О.Н., Беленькая С.В. и др. Термостабильность и параметры кинетики Михаэлиса-Ментен инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*) // Сыроделие и маслоделие. 2023. № 3. С. 42–44. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2023-3-42-44>

5. Akishev Z., Aktayeva S., Kiribayeva A. et al. *Obtaining of Recombinant Camel Chymosin and Testing Its Milk-Clotting Activity on Cow's, Goat's, Ewes', Camel's and Mare's Milk*. Biology. 2022. vol. 11. 1545. <https://doi.org/10.3390/biology11111545>
6. Akishev Z., Kiribayeva A., Mussakhmetov A. et al. *Constitutive expression of Camelus bactrianus prochymosin B in Pichia pastoris*. Heliyon, 2021, vol. 7, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07137>
7. Alihanoglu S., Ektiren D., Karaaslan M. *Recombinant expression and characterization of Oryctolagus cuniculus chymosin in Komagataella phaffii (Pichia pastoris)*. Prot. Expr. Purif., 2021, vol. 183, 105874. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105874>
8. Balabova D.V., Rudometov A.P., Belenkaya S.V. et al. *Biochemical and technological properties of moose (Alces alces) recombinant chymosin*. Vavilov. J. Genet. Breed., 2022, vol. 26, P. 240–249. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-31>
9. Balabova D.V., Belenkaya S.V., Volosnikova E.A. et al. *Can Recombinant Tree Shrew (Tupaia belangeri chinensis) Chymosin Coagulate Cow (Bos taurus) Milk?* Appl. Biochem. Microbiol., 2022, vol. 58, P. 763–772. <https://doi.org/10.1134/S0003683822060023>
10. Balabova D.V., Belash E.A., Belenkaya S.V. et al. *Biochemical Properties of a Promising Milk-Clotting Enzyme, Moose (Alces alces) Recombinant Chymosin*. Foods, 2023, vol. 12, no. 20. P. 37–72. DOI:10.3390/foods12203772
11. Bansal N., Fox P., McSweeney P.H.L. *Comparison of the level of residual coagulant activity in different cheese varieties*. J. Dairy Res., 2009, vol. 76, no. 3, P. 290–293. <https://doi.org/10.1017/S0022029909004075>
12. Bayoumi S. *Studies on composition and rennet coagulation of camel milk*. Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber, 1990, vol. 42, P. 3–8.
13. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N. et al. *Biochemical Properties of Recombinant Chymosin in Alpaca (Vicugna pacos L.)*. Appl. Biochem. Microbiol., 2018, vol. 54, P. 569–576. <https://doi.org/10.1134/S0003683818060054>
14. Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Balabova D.V. et al. *Production of Maral (Cervus elaphus sibiricus Severtzov) Recombinant Chymosin in the Prokaryotic Expression System and the Study of the Aggregate of Its Biochemical Properties Relevant for the Cheese-Making Industry*. Appl. Biochem. Microbiol., 2020, vol. 56, P. 647–656. <https://doi.org/10.1134/S0003683820060034>
15. Belenkaya S.V., Bondar A.A., Kurgina T.A. et al. *Characterization of the Altai Maral Chymosin Gene, Production of a Chymosin Recombinant Analog in the Prokaryotic Expression System, and Analysis of Its Several Biochemical Properties*. Biochemistry, 2020, vol. 85, P. 781–791. <https://doi.org/10.1134/S0006297920070068>
16. Belenkaya S.V., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N. *Development of a Producer of Recombinant Maral Chimosine based on the Kluyveromyces lactis Yeast*. Biotechnology, 2021, vol. 37, P. 20–27. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-20-27>
17. Belenkaya S.V., Chirkova V.Y., Sharlaeva E.A., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N. *Parameters of enzymatic kinetics of recombinant chymosin of the Altai red deer (Cervus elaphus sibiricus) obtained in pro- and eukaryotic expression systems*. Biotechnology, 2022, vol. 38, P. 11–16. <https://doi.org/10.56304/S0234275822050027>
18. Borsting M.W., Qvist K.B., Rasmussen M. et al. *Impact of selected coagulants and starters on primary proteolysis and amino acid release related to bitterness and structure of reduced-fat Cheddar cheese*. Dairy Sci. & Technol., 2012, vol. 92, P. 593–612. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0080-7>
19. Boudjenah-Haroun S., Laleye C.L., Mouliti-Mati F. et al. *Comparative study of milk clotting activity of crude gastric enzymes extracted from camels' abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk*. Emir. J. Food Agric., 2011, vol. 23, no. 4, P. 301–310.
20. Ersöz F., Inan M. *Large-scale production of yak (Bos grunniens) chymosin A in Pichia pastoris*. Prot. Expr. Purif., 2019, vol. 154, P. 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.10.007>
21. Farah Z., Bachmann M.R. *Rennet coagulation properties of camel milk*. Milchwissenschaft, 1987, vol. 42, P. 689–692.
22. Filkin S.Y., Chertova N.V., Zatsepin S.S. et al. *Production of Beluga Whale (Delphinapterus leucas) Chymosin in the Methylotrophic Yeast Komagataella phaffii and Characteristics of the Recombinant Enzyme*. Appl. Biochem. Microbiol., 2021, vol. 57, P. 297–302. <https://doi.org/10.1134/S0003683821030029>
23. Flamm E.L. *How FDA approved chymosin: a case history*. Nature Biotechnology, 1991, vol. 9, no. 4. P. 349–35. <https://doi.org/10.1038/nbt0491-349>
24. Foltmann B. *Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases*. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1992, vol. 210, P. 65–79. <https://doi.org/10.1080/00365519209104656>
25. Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. *The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants*. Ed. B.A. Law, A.Y. Tamime. Wiley-Blackwell, 2010, Ch. 3, P. 98–129. <https://doi.org/10.1002/9781444323740.ch3>
26. Jacob M., Jaros D., Rhom H. *Recent advances in milk clotting enzymes*. Int. J. Dairy Technol., 2011, vol. 64, no. 1, P. 14–33. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>

27. Jensen J.L., Mølgaard A., Poulsen J.-C.N. et al. *Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties*. Acta Cryst. Section D, Biol. Crystallogr., 2013, vol. 69, P. 901–913. <https://doi.org/10.1107/S0907444913003260>
28. Jensen J.L., Jacobsen J., Moss M.L. et al. *The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay*. J. Dairy Sci., 2015, vol. 98, P. 2853–2860. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8672>
29. Kappeler S., Farah Z., Puhani Z. *Sequence analysis of Camelus dromedarius milk caseins*. J. Dairy Res., 1998, vol. 65, P. 209–222. <https://doi.org/10.1017/S0022029997002847>
30. Kappeler S.R., van den Brink H.J., Rahbek-Nielsen H. et al. *Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, vol. 342, P. 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014>
31. Kitaoka M. *Automatic calculation of the kinetic parameters of enzymatic reactions with their standard errors using Microsoft Excel*. J. Appl. Glycosci., 2023, vol. 70, P. 33–37. https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2022_0012
32. Kotts C., Jenness R. *Isolation of κ -casein-like proteins from milks of various species*. J. Dairy Sci., 1976, vol. 59, P. 816–822. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84281-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84281-6)
33. Laemmli U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970, vol. 227 (5259), P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
34. Luo F., Jiang W.H., Yang Y.X., Li J., Jiang M.F. *Cloning and Expression of Yak Active Chymosin in Pichia pastoris*. Asian-Australas. J. Anim. Sci., 2016, vol. 29, P. 1363–1370. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0038>
35. Moynihan A.C., Govindasamy-Lucey S., Jaeggi J.J. et al. *Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese*. J. Dairy Sci., 2014, vol. 97, P. 85–96. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7081>
36. Murashkin D.E., Belenkaya S.V., Bondar A.A., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N. *Analysis of Some Biochemical Properties of Recombinant Siberian Roe Deer (Capreolus pygargus) Chymosin Obtained in the Mammalian Cell Culture (CHO-K1)*. Biochemistry, 2023, vol. 88, no. 9, P. 1284–1295. <https://doi.org/10.31857/S0320972523090087>
37. Myagkonosov D.S., Abramov D.V., Delitskaya I.N., Bukcharina G.B. *Effect of the recombinant chymosins of different origins on the quality and shelf life of soft cheeses*. Food Systems, 2022, vol. 5, no. 3, P. 239–248. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-3-239-248>
38. Rogelj I., Perko B., Francky A., Penca V., Pungercar J. *Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production*. J. Dairy Sci., 2001, vol. 84, P. 1020–1026. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74561-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74561-4)
39. Shamsuzzaman K., Haard N.F. *Purification and characterization of a chymosin-like protease from the gastric mucosa of harp seal (Pagophilus groenlandicus)*. Can. J. Biochem. Cell Biol., 1984, vol. 62, P. 699–708. <https://doi.org/10.1139/o84-091>
40. Shamsuzzaman K., Haard N.F. *Evaluation of Harp Seal Gastric Protease as a Rennet Substitute for Cheddar Cheese*. J. Food Sci., 1983, vol. 48, P. 179–182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb14818.x>
41. Sørensen J., Palmer D.S., Qvist K.B., Schiøtt B. *Initial stage of cheese production: a molecular modeling study of bovine and camel chymosin complexed with peptides from the chymosin-sensitive region of κ -casein*. J. Agric. Food Chem., 2011, vol. 59, P. 5636–5647. <https://doi.org/10.1021/jf104898w>
42. Sørensen J., Palmer D.S., Schiøtt B. *Hot-Spot Mapping of the Interactions between Chymosin and Bovine κ -Casein*. J. Agric. Food Chem., 2013, vol. 61, no. 33, P. 7949–7959. <https://doi.org/10.1021/jf4021043>
43. Stasiuk S.J., Summers E.L., Demmer J. *Cloning of a marsupial κ -casein cDNA from the brushtail possum (Trichosurus vulpecula)*. Reprod. Fertil. Dev., 2000, vol. 12, no. 4, P. 215–222. <https://doi.org/10.1071/RD99036>
44. Tyagi A., Kumar A., Mohanty A.K. et al. *Expression of buffalo chymosin in Pichia pastoris for application in mozzarella cheese*. LWT Food Sci. Technol., 2017, vol. 84, P. 733–739. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.033>
45. Tyagi A., Kumar A., Yadav A.K. et al. *Functional expression of recombinant goat chymosin in Pichia pastoris bioreactor cultures: A commercially viable alternate*. LWT Food Sci. Technol., 2016, vol. 69, P. 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.015>
46. Uniacke-Lowe T., Fox P.F. *Chymosin, Pepsins and other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-clotting Properties*. Ed. P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, P.D. Cotter et al. 4th Ed. Oxford, UK: Elsevier, Academic Press, 2017, P. 69–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15956-5.00027-0>
47. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. *Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins*. J. Dairy Sci., 2012, vol. 95, P. 609–613. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4445>
48. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. *Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in Pichia pastoris*. J. Agric. Food Chem., 2008, vol. 56, P. 10606–10610. <https://doi.org/10.1021/jf802339e>

49. Vega-Hernandes M.C., Gomes-Coello A., Villar J., Claverie-Martin F. *Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin*. J. Biotechnol., 2004, vol. 114, P. 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.002>
50. Wangoh J., Farah Z., Puhon Z. *Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract*. Milchwissenschaft, 1993, vol. 48, P. 322–325.
51. Yu P.L. *Production of chymosin for the dairy industry by recombinant DNA technology*. Australasian Biotechnol., 1994, vol. 4, no. 1, P. 19–23.

REFERENCES

1. Pushkarev V.A., Musina O.N., Belenkaya S.V., et al. Complex of biochemical properties of recombinant reindeer (*Rangifer tarandus*) chymosin with the K53E point amino acid substitution // Food Industry. 2023. No. 5. P. 16–19. <https://doi.org/10.52653/PPI.2023.5.5.004>
2. Pushkarev V.A., Musina O.N., Belenkaya S.V., et al. Milk-clotting and general proteolytic activity of an engineered variant of recombinant reindeer (*Rangifer tarandus*) chymosin // Cheesemaking and Buttermaking. 2023. No. 1. P. 22–25. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2023-1-22-25>
3. Pushkarev V.A., Musina O.N., Belenkaya S.V., et al. Effect of calcium ion concentration and pH on the milk-clotting activity of an engineered variant of recombinant reindeer (*Rangifer tarandus*) chymosin // Cheesemaking and Buttermaking. 2023. No. 2. P. 31–33. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2023-2-31-33>
4. Pushkarev V.A., Musina O.N., Belenkaya S.V., et al. Thermal stability and Michaelis-Menten kinetic parameters of an engineered variant of recombinant reindeer (*Rangifer tarandus*) chymosin // Cheese and Butter Making. 2023. No. 3. P. 42–44. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2023-3-42-44>
5. Akishev Z., Aktayeva S., Kiribayeva A. et al. *Obtaining of Recombinant Camel Chymosin and Testing Its Milk-Clotting Activity on Cow's, Goat's, Ewes', Camel's and Mare's Milk*. Biology. 2022. vol. 11. 1545. <https://doi.org/10.3390/biology11111545>
6. Akishev Z., Kiribayeva A., Mussakhmetov A. et al. *Constitutive expression of Camelus bactrianus prochymosin B in Pichia pastoris*. Heliyon, 2021, vol. 7, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07137>
7. Alihanoglu S., Ektiren D., Karaaslan M. *Recombinant expression and characterization of Oryctolagus cuniculus chymosin in Komagataella phaffii (Pichia pastoris)*. Prot. Expr. Purif., 2021, vol. 183, 105874. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105874>
8. Balabova D.V., Rudometov A.P., Belenkaya S.V. et al. *Biochemical and technological properties of moose (Alces alces) recombinant chymosin*. Vavilov. J. Genet. Breed., 2022, vol. 26, P. 240–249. <https://doi.org/10.18699/VJGB-22-31>
9. Balabova D.V., Belenkaya S.V., Volosnikova E.A. et al. *Can Recombinant Tree Shrew (Tupaia belangeri chinensis) Chymosin Coagulate Cow (Bos taurus) Milk?* Appl. Biochem. Microbiol., 2022, vol. 58, P. 763–772. <https://doi.org/10.1134/S0003683822060023>
10. Balabova D.V., Belash E.A., Belenkaya S.V. et al. *Biochemical Properties of a Promising Milk-Clotting Enzyme, Moose (Alces alces) Recombinant Chymosin*. Foods, 2023, vol. 12, no. 20. P. 37–72. DOI:10.3390/foods12203772
11. Bansal N., Fox P., McSweeney P.H.L. *Comparison of the level of residual coagulant activity in different cheese varieties*. J. Dairy Res., 2009, vol. 76, no. 3, P. 290–293. <https://doi.org/10.1017/S0022029909004075>
12. Bayoumi S. *Studies on composition and rennet coagulation of camel milk*. Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber, 1990, vol. 42, P. 3–8.
13. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N. et al. *Biochemical Properties of Recombinant Chymosin in Alpaca (Vicugna pacos L.)*. Appl. Biochem. Microbiol., 2018, vol. 54, P. 569–576. <https://doi.org/10.1134/S0003683818060054>
14. Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Balabova D.V. et al. *Production of Maral (Cervus elaphus sibiricus Severtzov) Recombinant Chymosin in the Prokaryotic Expression System and the Study of the Aggregate of Its Biochemical Properties Relevant for the Cheese-Making Industry*. Appl. Biochem. Microbiol., 2020, vol. 56, P. 647–656. <https://doi.org/10.1134/S0003683820060034>
15. Belenkaya S.V., Bondar A.A., Kurgina T.A. et al. *Characterization of the Altai Maral Chymosin Gene, Production of a Chymosin Recombinant Analog in the Prokaryotic Expression System, and Analysis of Its Several Biochemical Properties*. Biochemistry, 2020, vol. 85, P. 781–791. <https://doi.org/10.1134/S0006297920070068>
16. Belenkaya S.V., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N. *Development of a Producer of Recombinant Maral Chimosine based on the Kluyveromyces lactis Yeast*. Biotechnology, 2021, vol. 37, P. 20–27. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-20-27>

17. Belenkaya S.V., Chirkova V.Y., Sharlaeva E.A., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N. *Parameters of enzymatic kinetics of recombinant chymosin of the Altai red deer (Cervus elaphus sibiricus) obtained in pro- and eukaryotic expression systems*. Biotechnology, 2022, vol. 38, P. 11–16. <https://doi.org/10.56304/S0234275822050027>
18. Børsting M.W., Qvist K.B., Rasmussen M. et al. *Impact of selected coagulants and starters on primary proteolysis and amino acid release related to bitterness and structure of reduced-fat Cheddar cheese*. Dairy Sci. & Technol., 2012, vol. 92, P. 593–612. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0080-7>
19. Boudjenah-Haroun S., Laleye C.L., Mouliti-Mati F. et al. *Comparative study of milk clotting activity of crude gastric enzymes extracted from camels' abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk*. Emir. J. Food Agric., 2011, vol. 23, no. 4, P. 301–310.
20. Ersöz F., Inan M. *Large-scale production of yak (Bos grunniens) chymosin A in Pichia pastoris*. Prot. Expr. Purif., 2019, vol. 154, P. 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.10.007>
21. Farah Z., Bachmann M.R. *Rennet coagulation properties of camel milk*. Milchwissenschaft, 1987, vol. 42, P. 689–692.
22. Filkin S.Y., Chertova N.V., Zatsepin S.S. et al. *Production of Beluga Whale (Delphinapterus leucas) Chymosin in the Methylophilic Yeast Komagataella phaffii and Characteristics of the Recombinant Enzyme*. Appl. Biochem. Microbiol., 2021, vol. 57, P. 297–302. <https://doi.org/10.1134/S0003683821030029>
23. Flamm E.L. *How FDA approved chymosin: a case history*. Nature Biotechnology, 1991, vol. 9, no. 4, P. 349–35. <https://doi.org/10.1038/nbt0491-349>
24. Foltmann B. *Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases*. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1992, vol. 210, P. 65–79. <https://doi.org/10.1080/00365519209104656>
25. Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. *The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants*. Ed. B.A. Law, A.Y. Tamime. Wiley-Blackwell, 2010, Ch. 3, P. 98–129. <https://doi.org/10.1002/9781444323740.ch3>
26. Jacob M., Jaros D., Rhom H. *Recent advances in milk clotting enzymes*. Int. J. Dairy Technol., 2011, vol. 64, no. 1, P. 14–33. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>
27. Jensen J.L., Mølgaard A., Poulsen J.-C.N. et al. *Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties*. Acta Cryst. Section D, Biol. Crystallogr., 2013, vol. 69, P. 901–913. <https://doi.org/10.1107/S0907444913003260>
28. Jensen J.L., Jacobsen J., Moss M.L. et al. *The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay*. J. Dairy Sci., 2015, vol. 98, P. 2853–2860. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8672>
29. Kappeler S., Farah Z., Puhani Z. *Sequence analysis of Camelus dromedarius milk caseins*. J. Dairy Res., 1998, vol. 65, P. 209–222. <https://doi.org/10.1017/S0022029997002847>
30. Kappeler S.R., van den Brink H.J., Rahbek-Nielsen H. et al. *Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, vol. 342, P. 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014>
31. Kitaoka M. *Automatic calculation of the kinetic parameters of enzymatic reactions with their standard errors using Microsoft Excel*. J. Appl. Glycosci., 2023, vol. 70, P. 33–37. https://doi.org/10.5458/jag.jag.JAG-2022_0012
32. Kotts C., Jenness R. *Isolation of κ -casein-like proteins from milks of various species*. J. Dairy Sci., 1976, vol. 59, P. 816–822. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84281-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84281-6)
33. Laemmli U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970, vol. 227 (5259), P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
34. Luo F., Jiang W.H., Yang Y.X., Li J., Jiang M.F. *Cloning and Expression of Yak Active Chymosin in Pichia pastoris*. Asian-Australas. J. Anim. Sci., 2016, vol. 29, P. 1363–1370. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0038>
35. Moynihan A.C., Govindasamy-Lucey S., Jaeggi J.J. et al. *Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese*. J. Dairy Sci., 2014, vol. 97, P. 85–96. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7081>
36. Murashkin D.E., Belenkaya S.V., Bondar A.A., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N. *Analysis of Some Biochemical Properties of Recombinant Siberian Roe Deer (Capreolus pygargus) Chymosin Obtained in the Mammalian Cell Culture (CHO-K1)*. Biochemistry, 2023, vol. 88, no. 9, P. 1284–1295. <https://doi.org/10.31857/S0320972523090087>
37. Myagkonosov D.S., Abramov D.V., Delitskaya I.N., Bukcharina G.B. *Effect of the recombinant chymosins of different origins on the quality and shelf life of soft cheeses*. Food Systems, 2022, vol. 5, no. 3, P. 239–248. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-3-239-248>
38. Rogelj I., Perko B., Francky A., Penca V., Pungercar J. *Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production*. J. Dairy Sci., 2001, vol. 84, P. 1020–1026. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74561-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74561-4)

39. Shamsuzzaman K., Haard N.F. *Purification and characterization of a chymosin-like protease from the gastric mucosa of harp seal (*Pagophilus groenlandicus*)*. Can. J. Biochem. Cell Biol., 1984, vol. 62, P. 699–708. <https://doi.org/10.1139/o84-091>
40. Shamsuzzaman K., Haard N.F. *Evaluation of Harp Seal Gastric Protease as a Rennet Substitute for Cheddar Cheese*. J. Food Sci., 1983, vol. 48, P. 179–182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb14818.x>
41. Sørensen J., Palmer D.S., Qvist K.B., Schiøtt B. *Initial stage of cheese production: a molecular modeling study of bovine and camel chymosin complexed with peptides from the chymosin-sensitive region of κ -casein*. J. Agric. Food Chem., 2011, vol. 59, P. 5636–5647. <https://doi.org/10.1021/jf104898w>
42. Sørensen J., Palmer D.S., Schiøtt B. *Hot-Spot Mapping of the Interactions between Chymosin and Bovine κ -Casein*. J. Agric. Food Chem., 2013, vol. 61, no. 33, P. 7949–7959. <https://doi.org/10.1021/jf4021043>
43. Stasiuk S.J., Summers E.L., Demmer J. *Cloning of a marsupial κ -casein cDNA from the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*)*. Reprod. Fertil. Dev., 2000, vol. 12, no. 4, P. 215–222. <https://doi.org/10.1071/RD99036>
44. Tyagi A., Kumar A., Mohanty A.K. et al. *Expression of buffalo chymosin in *Pichia pastoris* for application in mozzarella cheese*. LWT Food Sci. Technol., 2017, vol. 84, P. 733–739. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.033>
45. Tyagi A., Kumar A., Yadav A.K. et al. *Functional expression of recombinant goat chymosin in *Pichia pastoris* bioreactor cultures: A commercially viable alternate*. LWT Food Sci. Technol., 2016, vol. 69, P. 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.015>
46. Uniacke-Lowe T., Fox P.F. *Chymosin, Pepsins and other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-clotting Properties*. Ed. P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, P.D. Cotter et al. 4th Ed. Oxford, UK: Elsevier, Academic Press, 2017, P. 69–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15956-5.00027-0>
47. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. *Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins*. J. Dairy Sci., 2012, vol. 95, P. 609–613. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4445>
48. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. *Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in *Pichia pastoris**. J. Agric. Food Chem., 2008, vol. 56, P. 10606–10610. <https://doi.org/10.1021/jf802339e>
49. Vega-Hernandes M.C., Gomes-Coello A., Villar J., Claverie-Martin F. *Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin*. J. Biotechnol., 2004, vol. 114, P. 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.002>
50. Wangoh J., Farah Z., Puhan Z. *Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract*. Milchwissenschaft, 1993, vol. 48, P. 322–325.
51. Yu P.L. *Production of chymosin for the dairy industry by recombinant DNA technology*. Australasian Biotechnol., 1994, vol. 4, no. 1, P. 19–23.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Щеголькова Виктория Олеговна — младший научный сотрудник, Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул, Российская Федерация; аспирант, стажер-исследователь, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Российская Федерация; младший научный сотрудник, Алтайский государственный университет, Барнаул, Российская Федерация
E-mail: v.shhegolkova1@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9862-3174>

Труфанов Вадим Олегович — стажер-исследователь, аспирант, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Российская Федерация; младший научный сотрудник, Алтайский государственный университет, Барнаул, Российская Федерация
E-mail: trufano8@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-8473-1385>

AUTHOR INFORMATION

Shhegolkova, Viktoria O. — Junior Researcher, Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul, Russian Federation; Postgraduate Student, Research Intern, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russian Federation; Junior Researcher, Altai State University, Barnaul, Russian Federation
E-mail: v.shhegolkova1@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9862-3174>

Trufanov, Vadim O. — Research Intern, Postgraduate Student, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russian Federation; Junior Researcher, Altai State University, Barnaul, Russian Federation
E-mail: trufano8@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0000-8473-1385>

Беленькая Светлана Валерьевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Российская Федерация; ведущий научный сотрудник Алтайский Государственный Университет, Барнаул, Российская Федерация
E-mail: belenkaya.sveta@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3883-6335>

Савенцева Екатерина Алексеевна — младший научный сотрудник, Алтайский государственный университет, Барнаул, Российская Федерация; аспирант, стажер-исследователь, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Российская Федерация
E-mail: ekaterina.belash1@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0003-3176-7925>

Волосникова Екатерина Александровна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Российская Федерация
E-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Щербakov Дмитрий Николаевич — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Российская Федерация; Алтайский государственный университет, Барнаул, Российская Федерация
E-mail: dnschcherbakov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

Ельчанинов Вадим Валентинович — кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул, Российская Федерация
E-mail: ve3636@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4355-6055>

Belenkaya, Svetlana V. — Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russian Federation, Leading Researcher, Altai State University, Barnaul, Russian Federation
E-mail: belenkaya.sveta@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-3883-6335>

Saventseva, Ekaterina A. — Junior Researcher, Altai State University, Barnaul, Russian Federation; Postgraduate Student, Research Intern, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russian Federation
E-mail: ekaterina.belash1@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0003-3176-7925>

Volosnikova, Ekaterina A. — Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russian Federation
E-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Shcherbakov, Dmitry N. — Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russian Federation; Altai State University, Barnaul, Russian Federation
E-mail: dnschcherbakov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

Elchaninov, Vadim V. — Candidate of Technical Sciences, Leading Researcher, Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul, Russian Federation
E-mail: ve3636@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4355-6055>

Поступила в редакцию 17.04.2026

После доработки 29.05.2026

Принята к публикации 11.07.2026

Received April 17, 2026

Revised May 29, 2026

Accepted July 11, 2026