

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Федеральный Алтайский научный центр агrobiотехнологий
Алтайский государственный университет

В.В. Ельчанинов

**ПРОБЛЕМА ПОИСКА НОВЫХ
МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ
ДЛЯ СЫРОДЕЛИЯ: КРИТЕРИИ ВЫБОРА
ИСТОЧНИКОВ ГЕНОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМОЗИНОВ**

Монография



Барнаул

Издательство
Алтайского государственного
университета
2021

УДК 637.3
ББК 36.958
Е 59

Рецензенты:

Кузнецов Никита Александрович, доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории исследования модификации
биополимеров Института химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН;

Щербаков Дмитрий Николаевич, кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией иммунохимии
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Ельчанинов, Вадим Валентинович

Е 59 Проблема поиска новых молокосвертывающих ферментов для сыроделия: критерии выбора источников генов для получения рекомбинантных химозинов : монография / В.В. Ельчанинов ; Министерство науки и высшего образования РФ ; Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий ; Алтайский государственный университет. — Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2021. — 170 с.
ISBN 978-5-7904-2529-5.

Монография впервые поднимает проблему обоснования начального этапа поиска новых рекомбинантных химозинов для сыроделия, а именно — выбора видов млекопитающих, которые потенциально являются источниками генов перспективных технологических ферментов.

В книге рассматриваются особенности стратегий лактации, нутриентный состав молока и некоторые механизмы адаптации млекопитающих к неблагоприятным условиям обитания. Представлен обзор биохимических и технологических свойств известных рекомбинантных химозинов, обсуждаются особенности первичной структуры химозин-чувствительных участков каппа-казеинов. Дан анализ взаимосвязи эпизодов псевдогенизации химозинов с механизмами передачи новорожденным факторов пассивного иммунитета. Сформулированы критерии выбора видов млекопитающих, являющихся потенциальными источниками генов перспективных химозинов.

Работа представляет интерес для специалистов в области биотехнологии и биохимии молокосвертывающих ферментов, преподавателей вузов, студентов и аспирантов соответствующих специальностей.

УДК 637.3
ББК 36.958

ISBN 978-5-7904-2529-5

© Ельчанинов В.В., 2021
© Оформление. Издательство Алтайского государственного университета, 2021
© Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Перечень сокращений и обозначений	5
Введение	6
Глава 1. Локализация и физиологическое значение химозина	9
Глава 2. Лактация как адаптационный механизм, краткая характеристика основных нутриентов молока	12
Глава 3. Стратегии лактации и особенности состава молока у различных таксономических групп млекопитающих	16
Глава 4. Информация о наличии аминокислотных последовательностей химозинов и к-казеинов млекопитающих в базах NCBI.....	22
Глава 5. Неблагоприятные природно-климатические условия обитания, зрелорождаемость, короткий период взросления и концентрация белка в молоке как критерии выбора видов — источников химозина	25
Глава 6. Относительное содержание основных нутриентов в молоке различных видов млекопитающих	37
Глава 7. Краткая характеристика биохимических и технологических свойств известных видов рекомбинантных химозинов.....	46
Глава 8. Экспрессия химозинов в различных таксономических группах млекопитающих, псевдогенизация и утрата генов химозина.....	65
Глава 9. Псевдогенизация и утрата генов химозина может быть связана с механизмами передачи потомству факторов пассивного иммунитета («иммунная гипотеза»)	69
Глава 10. Относительное содержание белка в молозиве и молоке — отражение стратегии переноса пассивного иммунитета.....	79
Глава 11. Могут ли аминокислотные последовательности каппа-казеинов быть критериями выбора вида — источника химозина?.....	85
Глава 12. Критерии выбора видов — источников генов химозинов	115

Заключение	126
Послесловие.....	127
Библиографический список	128
Приложение А. Видовой состав Хн и Хн-подобных последовательностей млекопитающих в базах NCBI	153
Приложение Б. Относительное содержание основных нутриентов в молоке различных видов млекопитающих	157
Приложение В. Стратегии переноса пассивного иммунитета, тип плаценты и статус гена Хн в различных таксономических группах млекопитающих.....	165

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

СФ	-	Сычужный фермент
Хн	-	Химозин, химозины
МФ	-	Молокосвертывающий фермент
МА	-	Молокосвертывающая активность
ПА	-	Протеолитическая активность
рХн	-	Рекомбинантный химозин, рекомбинантные химозины
ПроХн	-	Прохимозин
МФП	-	Молокосвертывающий ферментный препарат
УЕ	-	Условные единицы
ЖК	-	Жирные кислоты
ОРС	-	Открытая рамка считывания
κ-КЗ	-	Каппа-казеин
α-КЗ	-	Альфа-казеин
β-КЗ	-	Бета-казеин
КЗ	-	Казеин
КМ	-	Казеиновая мицелла
а.к.	-	Аминокислотная, аминокислоты, аминокислота
ММЖГ	-	Мембрана молочной жировой глобулы
МЖГ	-	Молочная жировая глобула
МУС 1	-	Муцин 1
МУС 15	-	Муцин 15
ЖКТ	-	Желудочно-кишечный тракт
ММ	-	Молекулярная масса
Ig	-	Иммуноглобулин, иммуноглобулины
ТС	-	Термостабильность
к.с.в.м.	-	Концентрация сухих веществ в молоке
к.б.м.	-	Концентрация белка в молоке
с.ш.	-	Северная широта
КМП	-	Казеинмакропептид
ГМП	-	Гликомакропептид
н.у.м.	-	Над уровнем моря

ВВЕДЕНИЕ

Использование методов геной инженерии, биоинформатики и прикладной биохимии позволяет постоянно расширять арсенал белков и ферментов, востребованных в производственной деятельности человека. Перспективы практического использования молокосвертывающих протеиназ в сыроделии стимулируют поиск, получение и изучение новых рекомбинантных коагулянтов молока.

Производство сыра — важнейшая сфера использования молока во всех странах мира. Для выработки сыров используется молоко овец, коз, верблюдов, буйволов и других сельскохозяйственных животных. Однако в подавляющем большинстве случаев сыры производятся из коровьего молока [1–3].

Традиционно для получения молочного сгустка при производстве сыров применяется сычужный фермент (СФ). Это препарат, получаемый из сычугов телят-молокопоек, основным действующим агентом которого является аспартатная эндопептидаза — химозин (ЕС 3.4.23.4) [4]. Химозины млекопитающих гидролизуют ключевую пептидную связь — Phe105-Met106 — в молекуле каппа-казеина (κ -КЗ), что приводит к дестабилизации казеиновых мицелл и образованию сычужного сгустка, который является основой для производства огромного ассортимента сыров. Уникальное сочетание биохимических свойств коровьего химозина: высокая молокосвертывающая активность (МА) в слабокислом диапазоне рН, низкая общая протеолитическая активность (ПА), высокая специфичность (соотношение МА и общей ПА), технологически выгодный диапазон термолабильности, характер зависимости МА от концентрации ионов Ca^{2+} — позволяет использовать его при производстве любых видов сычужных сыров и вырабатывать продукцию самого высокого качества. До недавнего времени (точнее, до 2006 г.) по совокупности технологических свойств химозин (Хн) коровы считался эталонным молокосвертывающим ферментом (МФ) для сыроделия [4].

Стабильный рост объемов вырабатываемых сыров, истощение производственно-сырьевой базы натуральных МФ животного происхождения, эпидемия прионовых заболеваний сельскохозяйственных животных в конце XX в. привели к возникновению мирового дефицита СФ, который стимулировал интенсивные поиски его заменителей. Было изучено множество природных протеаз про- и эукариотического генеза, способных свертывать коровье молоко. Однако в силу различных биохимических и технологических свойств, негативно влияющих на качество сыра, прежде всего избыточной общей ПА и высокой термостабильно-

сти, большинство этих ферментов не применяются в сыроделии, а если и применяются, то крайне ограниченно [4–8].

До 80-х гг. XX в., т.е. до начала интенсивного развития молекулярной биотехнологии, горизонт поисков новых МФ для сыроделия ограничивался сельскохозяйственными животными. На тот момент только крупный рогатый скот, козы, овцы, свиньи и некоторые другие, массово разводимые животные, могли обеспечить достаточную сырьевую базу (слизистые оболочки сычугов) для промышленного получения МФ. При этом поголовье животных, сычуги которых можно было бы использовать в качестве сырья для получения МФ, должно было быть значительным [9–11].

Методы геной инженерии и биотехнологии позволяют получать и производить МФ любых видов млекопитающих вне зависимости от численности популяции, не ограничиваясь сельскохозяйственными животными с большим поголовьем [12–21]. Поэтому современной альтернативой натуральному Хн коровы являются его генноинженерные аналоги [22–24]. Теоретически при наличии качественного генетического материала возможно получение рекомбинантных молокосвертывающих протеаз вымерших млекопитающих.

Технологии промышленного получения рекомбинантных белков, в том числе — химозинов, постоянно совершенствуются [22, 25–28] и экономически становятся все более выгодными. Перспективы развития индустрии переработки сельскохозяйственного сырья связаны с ростом и расширением рынка рекомбинантных ферментов, в том числе молокосвертывающих.

Объектами исследования и поиска новых коагулянтов коровьего молока становятся геномы различных видов — от микроорганизмов до высших млекопитающих. Мировое научное сообщество активно работает в этом направлении — банки генов и аминокислотных последовательностей молокосвертывающих протеиназ ежегодно пополняются новыми данными. Однако в настоящее время известен лишь один молокосвертывающий фермент, частично превосходящий Хн коровы по некоторым биохимическим характеристикам. Это Хн одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*), чьи уникальные технологические свойства установлены в 2006 г. [14]. Фактически сегодня мы имеем два эталонных МФ для сыроделия — Хн коровы и Хн верблюда, причем в коммерческом варианте оба существуют в виде рекомбинантных ферментов [29–31]. Но ни один из этих ферментов не является идеальным — рХн верблюда превосходит коровий фермент по удельной МА и специфичности, но уступает по термолабильности [14, 24]. Пример рХн верблю-

да позволяет предполагать возможность нахождения еще более совершенных технологических молокосвертывающих протеиназ среди других видов млекопитающих

Класс Млекопитающих насчитывает около 5500 современных видов [32] (число известных видов млекопитающих, включая вымерших, составляет примерно 20 000). Представителей этого класса объединяет общий адаптационный механизм — способность синтезировать и секретировать молоко — комплексный нутриент для вскармливания новорожденных. За 200 млн лет эволюции у млекопитающих возникли гастральные молокосвертывающие протеазы, способные преобразовывать молоко в молочный сгусток, что обеспечивает эффективное усвоение его компонентов. Примерно 8000 лет назад человек начал использовать эти ферменты для получения сыров [33].

Поиск и исследование новых молокосвертывающих ферментов для сыроделия является актуальной задачей современной биотехнологии [13, 27, 28, 34]. Но если мы ставим задачу поиска рХн, превосходящего по технологическим свойствам рХн коровы и верблюда, возникает закономерный вопрос: **какой вид из более чем 5,5 тысячи существующих взять в качестве источника нового молокосвертывающего фермента?** Большинство сельскохозяйственных парнокопытных животных являются продуцентами ординарных химозинов, чьи технологические характеристики не превосходят рХн коровы и верблюда. Возможно, по аналогии с верблюдом есть смысл продолжать поиск среди таксономических групп, близкородственных парнокопытным жвачным животным. Однако есть ли гарантии того, что наиболее подходящими для технологических нужд человека не окажутся рекомбинантные химозины животных, состоящих в очень отдаленном родстве с коровой и верблюдом?

Вплоть до настоящего времени принципы выбора объектов для получения новых рекомбинантных химозинов не сформулированы.

Цель данной работы — разработка научно обоснованной стратегии поиска новых молокосвертывающих протеиназ для сыроделия. Для достижения поставленной цели необходимо сформулировать критерии выбора видов, которые могут быть источником генов для получения перспективных рекомбинантных коагулянтов коровьего молока.

Глава 1

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ХИМОЗИНА

Слизистые оболочки желудков различных видов млекопитающих продуцируют пять типов гастрильных протеиназ — пепсин А (ЕС 3.4.23.1), пепсин В (ЕС 3.4.23.2), пепсин С или гастриктин (ЕС 3.4.23.3), пепсин F (не имеет номера Комиссии по ферментам, ЕС) и химозин (ЕС 3.4.23.4) [36–38]. У свиньи и крысы прохимозин (ПроХн) начинает экспрессироваться на стадии плода, а после рождения постепенно заменяется пепсиногеном А и/или прогастриктином [37]. По мнению Т. Kageyama [38], в желудке крольчат Хн не обнаруживается, но вместо него экспрессируется протеаза, специфичная для пре- и раннего постнатального периода, — пепсин F (foetal) (в то же время в работе [39] говорится о том, что ген Хн у кролика не псевдогенизирован, а в базах NCBI содержится информация об одной а.к. последовательности Хн дикого кролика, гомологичного химозину коровы на 72,7 % (табл. 1)). Продукция химозина и пепсина F (у крысы и кролика) начинается в период внутриутробного развития и продолжается в постнатальном периоде, пока новорожденный питается только молоком [38, 40].

В желудочном соке взрослых животных, питающихся грубой пищей, доминируют пепсины А, В и гастриктин. «Переключение» экспрессии генов от пренатального и раннего постнатального периода к синтезу «взрослых» протеаз регулируется несколькими факторами, в том числе стероидными гормонами [38, 40].

Зимогены химозина и пепсина — прохимозин (ПроХн) и пепсиноген синтезируются слизистыми шеечными клетками и главными клетками фундальных желез, которые локализованы в области дна, тела и интермедиальной зоны желудка [41]. Пока новорожденный питается молоком, шеечные и главные клетки иммунореактивны и по ПроХн, и по пепсиногену. После отъема от молочной железы и завершения молочного вскармливания (или перехода на смешанное вскармливание) экспрессия ПроХн в этих клетках постепенно затухает и полностью прекращается, тогда как иммунореактивность по пепсиногену сохраняется [42].

Несмотря на общность третичной структуры и структуры каталитического центра, Хн отличается от пепсинов низкой общей протеолитической активностью и исключительно высокой специфичностью по отношению к единственной связи (Phe105-Met106) в молекуле к-казеина молока. В то же время уровень протеолитической активности Хн по отношению к любым другим пептидным связям казеинов и сывороточных белков молока намного ниже.

Основные белковые нутриенты молока — α -, β - и κ -казеины — относятся к секретлируемым кальций-связывающим протеинам и обеспечивают организм новорожденного кальцием, аминокислотами, а также широким спектром биоактивных пептидов, обладающих в том числе антимикробной активностью [43]. В молоке казеины образуют гетерогенные мицеллы, внутренняя структура которых стабилизирована кальций-фосфатными комплексами, гидрофобными и ионными взаимодействиями. На поверхности мицелл экспонированы гидрофильные и отрицательно заряженные С-терминальные участки κ -казеинов, которые образуют стабилизирующий так называемый «волосковый слой» [44–46]. Химозин с высокой избирательностью и скоростью гидролизует связь Phe105-Met106, что приводит к утрате «волоскового слоя», дестабилизации, сближению и агрегации казеиновых мицелл. В результате образуется трехмерная сеть, состоящая из агрегированных казеиновых мицелл, — молоко коагулирует. Образование молочного сгустка обеспечивает постепенный ферментативный гидролиз казеинов и частично захватываемых сгустком сыровоточных белков под действием других гастральных и панкреатических протеаз.

Образование молочного сгустка под действием Хн (или другого МФ) широко используется при производстве сыров [47]. По этой причине подавляющее большинство исследований Хн сфокусированы на изучении его биохимических и технологических свойств, важных с точки зрения производственной деятельности человека.

В настоящее время нет однозначного ответа на вопрос о биологической способности казеинов формировать молочный сгусток. Предполагается, что образование сгустка замедляет прохождение пищи из просвета желудка до двенадцатиперстной кишки и далее в кишечник, а также обеспечивает деликатную стимуляцию пищеварительного тракта новорожденного [47]. В результате содержащиеся в сгустке, образовавшемся под действием Хн, белки и другие нутриенты дольше задерживаются в желудке, постепенно поступая в кишечник, где полноценно метаболизируются [48, 49]. В кишечнике Парнокопытных, особенно в первые часы после рождения, может происходить неселективная абсорбция и прямой транспорт белков в кровь и в лимфу [50].

Иммунологическое значение молока достаточно хорошо изучено для инфракласса Плацентарные (*Eutherians*). В молозиве большинства (но не всех!) отрядов эутериев иммуноглобулины (Ig) обычно секретруются в больших количествах. Иммуноглобулины молозива и молока могут напрямую всасываться в желудочно-кишечном тракте новорожденных млекопитающих и обеспечивать их пассивным иммунитетом. Способность эпителия ЖКТ новорожденных млекопитающих осуществлять прямой трансцеллюлярный транспорт Ig в кровь и лимфу ограничена временем

«закрытия» кишечника и колеблется от 24 часов у некоторых копытных, до 19 дней у грызунов [51].

Термин «молозиво» относится к первым порциям молока, которые выделяются молочными железами в результате рождения потомства. Фактически это молоко, обогащенное компонентами сыворотки крови, в том числе иммуноглобулинами (в первую очередь IgG). Молозиво секретируется в течение короткого времени, и концентрация антител в нем постепенно уменьшается в течение первых суток после рождения [52]. Антитела, содержащиеся в молозиве, всасываются эпителиальными клетками тонкой кишки за счет пиноцитоза (преимущественно в тощей и подвздошной кишке). Далее Ig транспортируются в лимфу и кровь, тем самым обеспечивая приобретенный пассивный иммунитет новорожденному [53]. Отметим, что кроме Ig (концентрация которых в молоке заметно снижается по сравнению с молозивом) молоко и молозиво содержит сывороточные факторы неспецифического иммунитета — комплекс белков и ферментов, обладающих антибактериальным действием, а жировая фракция молока, в частности, мембрана молочных жировых глобул (МЖГ), богата протеинами с выраженными антивирусными и антибактериальными свойствами [54–56].

Для многих видов млекопитающих (корова, свинья, собака, кошка, крыса) характерен послеродовый перенос материнских Ig (факторов приобретенного пассивного иммунитета) новорожденному с молозивом или молоком. В желудочном соке таких животных Хн присутствуют. В то же время у человека и некоторых высших приматов Ig матери передаются плоду через плаценту (трансплацентарный перенос), и в желудке новорожденных Хн не обнаруживается, что обусловлено его псевдогенизацией [39, 57]. Предполагается, что у млекопитающих с послеродовой передачей факторов приобретенного пассивного иммунитета с молозивом или молоком Хн (или Хн-подобные ферменты) возникли и эволюционировали неонатальные протеазы с высокой молокосвертывающей и низкой общей протеолитической активностью, предотвращающей повреждение Ig [47], и других белков молока, обладающих антибактериальным и антивирусным действием, — лактоферрина, лизоцима, ксантиноксидазы, муцина 1 (MUC1), муцина 15 (MUC15), лактадгедрина, ингибитора *Helicobacter pylori* [49, 54–56, 58–60].

Таким образом, Хн участвует в обеспечении не только питательной, но и защитной функции. Уникальные ферментативные свойства Хн — высокая молокосвертывающая активность при низкой общей протеолитической активности — обеспечивают быстрый гидролиз единственной связи в молекуле каппа-казеина, что вызывает свертывание молока, почти не затрагивая при этом пептидные связи Ig и белков, которые обладают защитными свойствами.

Глава 2

ЛАКТАЦИЯ КАК АДАПТАЦИОННЫЙ МЕХАНИЗМ, КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ НУТРИЕНТОВ МОЛОКА

Две основные особенности размножения млекопитающих — это живорождаемость и лактация — выработка и секреция молока. Из них только лактация является уникальной физиологической функцией и встречается у всех живущих ныне видов млекопитающих. Молоко — комплексный секрет молочной железы, содержащий различные нутриенты — воду, эмульгированные липиды, мицеллярные и растворимые протеины, карбогидраты (углеводы), витамины и минеральные соли, которые обеспечивают питательными веществами и энергией растущего новорожденного. Однажды появившись в ходе эволюции млекопитающих, секреция молока стала универсальным адаптационным механизмом. Отметим, что некоторые виды птиц (например, голуби, большие фламинго, императорские пингвины и некоторые виды попугаев) также производят питательные жидкости для кормления молодняка, но их секреты имеют эзофагальное (желудочное) происхождение [61, 62].

У млекопитающих молоко синтезируется в молочной железе из субстратов материнской диеты или из ее физиологических запасов. Развитие механизмов секреции молока позволило млекопитающим хранить энергию, минералы и другие питательные вещества и использовать их по мере необходимости. Поэтому молочное вскармливание, возможно, было одной из основных адаптаций, которые позволили (и позволяют) млекопитающим процветать в любых экологических условиях [63].

Кратко охарактеризуем основные нутриенты молока — белки, жиры и углеводы.

Белки молока. Энергетическая ценность белков молока составляет ~16,7 кДж/г [64]. Уникальными протеинами, присутствующими только в молоке, являются казеины (α -, β - и κ -), α -лактальбумин и β -лактоглобулин. Кроме того, молоко содержит сывороточный альбумин, Ig, лактоферрин, минорные белки, пептиды и эндогенные ферменты.

Казеины подразделяют на четыре основные группы (семейства): α s1-, α s2-, β - и κ -CN, их суммарное содержание в молоке некоторых видов может достигать 80 % [65]. Взаимодействие всех групп казеинов и коллоидного фосфата кальция приводит к формированию стабильных агрегатов, которые называются казеинаткальцийфосфатными комплексами [66, 67], или казеиновыми мицеллами [68]. Казеиновые мицеллы (КМ) — это над-

молекулярные (супермолекулярные) структуры, которые состоят из множества организованных белков и ионов, связанных и удерживаемых друг с другом нековалентными взаимодействиями [69, 70]. Основная биологическая функция КМ — обеспечение новорожденных млекопитающих энергией, ионами (прежде всего кальцием и фосфатами) и аминокислотами, необходимыми для роста и развития. Молоко коровы содержит примерно 30 мМ кальция и 22 мМ неорганического фосфата, при этом большая часть кальция (~68 %) и около половины фосфатов (~47 %) связаны с казеинами [71].

Казеины являются Са-связывающими белками и кроме аминокислот обеспечивают растущий организм биодоступным кальцием, необходимым для роста и развития костей и зубов [72], и играют важнейшую роль в свертывании молока. В результате взаимодействия каппа-казеина с молкосвертывающими ферментами (прежде всего с химозином) образуется молочный *сгусток*, который позволяет задержать жиры и белки молока в желудке новорожденного. Это обеспечивает непрерывное, но постепенное поступление питательных веществ в кишечник, предотвращая его быструю перегрузку, которая может привести к кишечному расстройству. Постепенная доставка питательных веществ молока из желудка в кишечник особенно важна для видов с большими интервалами между кормлениями. Например, новорожденный крольчонок получает материнское молоко один раз в день, но еще более экстремальный вариант выкармливания детенышей демонстрируют тупайи, у которых интервалы между кормлениями могут составлять 48 часов, и зайцы с интервалами кормления до одного раза в четверо суток (заяц-русак).

Авторская ремарка: *потенциальный критерий — большие интервалы между кормлениями; сгусток очень долго задерживается в желудке, можно предполагать, что общая ПА химозина должна быть минимальной.*

Имуноглобулины молока обеспечивают новорожденного факторами пассивного иммунитета. В первые несколько дней после родов наблюдается высокая и селективная секреция Ig в молозиво (раннее молоко), что критически важно для некоторых видов (например, парнокопытных и непарнокопытных) в связи с отсутствием у плода иммунитета, приобретенного в утробе матери. Кроме того, для большинства этих видов характерен короткий период после рождения, когда интактные Ig могут всасываться через кишечник. По истечении этого периода (~24 часа) происходит «закрытие кишечника», и дальнейшая абсорбция интактных белков и Ig становится незначительной [73, 74].

Кроме антител, в молочной сыворотке содержатся белки (лактоферрин) и ферменты (лизоцим, лактопероксидаза, рибонуклеаза), которые

обладают противовоспалительными, антивирусными, бактерицидными и бактериостатическими свойствами и участвуют в защите ЖКТ новорожденного от бактериальных и вирусных инфекций [75–78].

Мембрана МЖГ также содержит ряд протеинов, обладающих защитными свойствами. Например, один из основных белков ММЖГ — муцин 1 (MUC 1) — может играть протективную роль путем связывания и инактивации патогенных микроорганизмов в кишечнике новорожденного, питающегося молоком. Кроме того, вероятно, MUC 1 является антиканцерогенным фактором [79–85].

Липиды молока. Молочный жир служит одним из основных источников энергии для млекопитающих, его энергетическая ценность ~37,7 кДж/г [64]. Из-за низкой теплопроводности жир, откладываемый в подкожной жировой клетчатке, служит теплоизолятором, предохраняющим организм от потери тепла (у китов, тюленей и др.). Липиды — наиболее вариabельный компонент молока, их содержание варьирует от ≈0,2 % у черного носорога до ≈60,0 % у некоторых тюленей [86, 87]. Основная масса (97–99 массовых %) липидов молока представлена триацилглицеринами (три молекулы жирных кислот (ЖК), этерифицированные по гидроксильным группам глицерина), к минорным компонентам относятся моно- и диацилглицеролы, свободные ЖК, стиролы. Качественный состав ЖК имеет выраженные межвидовые различия и зависит от относительного вклада молекул, синтезированных *de novo* и поступающих непосредственно из рациона. Например, молочные железы жвачных животных, грызунов, зайцеобразных и приматов синтезируют значительные количества короткоцепочечных и/или среднецепочечных ЖК [86]. Напротив, у плотоядных, ластоногих и китообразных большинство ЖК молока происходят из рациона. В молоке некоторых видов морских и водных плотоядных животных содержится очень большое количество питательно значимых и незаменимых длинноцепочечных полиненасыщенных ЖК — ω-3 и ω-6 [88]. Для видов, чьи детеныши рождаются слаборазвитыми и беззащитными (например, медведи), но способными продуцировать специфические прегастральные и гастральные липазы, очень важен синтез коротко- и среднецепочечных ЖК, которые легко гидролизуются, транспортируются и метаболизируются в процессе пищеварения [89].

Авторская ремарка: у таких видов имеет смысл исследовать свойства прегастральных липаз для потенциального использования в сыроделии в качестве интенсификаторов вкуса и ускорителей созревания.

Коровье молоко содержит приблизительно 3–5 % (масса/объем) жира. Более 95 % жировой фракции находится в виде МЖГ диаметром 0,5–15,0 мкм, которые эмульгированы в водной фазе. Молочные жиры-

вые глобулы состоят из ядра, содержащего главным образом триглицериды (до 95 % от общих жиров глобулы), и биофункциональной оболочки толщиной 10–20 нм, которая называется мембраной молочной жировой глобулы (ММЖГ) [79, 80, 90]. Масса ММЖГ составляет 2–6 % от массы нативной жировой глобулы, ее основными компонентами являются белки (25–60 %), некоторые из которых — MUC 1, MUC 15, лактадгедрин и ингибитор *Helicobacter pylori* — обладают антивирусными и антибактериальными свойствами [54, 79, 81, 82, 91].

Углеводы молока. Лактоза (молочный сахар) синтезируется только в молочной железе и является наиболее распространенным углеводом молока. Энергетическая ценность ~15,7 кДж/г [64]. Синтез лактозы критичен для секреции водной фазы молока из-за необходимости регулирования осмотического давления в молочной железе. Лактоза также повышает абсорбцию кальция в кишечнике новорожденного. Для усвоения лактозы требуется специфический фермент — лактаза, гидролизующий β -галактозидазные связи. Отсутствие лактазы может привести к расстройству кишечника, диарее, потере воды и электролитов и потенциально к смерти новорожденного. Некоторые виды производят молоко, содержащее другие виды сахара, например, очень крупные олигосахариды (в частности, сумчатые). В молоке некоторых морских млекопитающих сахара отсутствуют или содержатся в следовых количествах [63].

Глава 3

СТРАТЕГИИ ЛАКТАЦИИ И ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА МОЛОКА У РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В огромном многообразии млекопитающих — более 5000 видов — можно выделить две основные стратегии лактации по критерию содержания сухих веществ в молоке [63].

Стратегия № 1. Продукция и секретирование молока с низкой концентрацией ($\leq 15\%$) сухих веществ (разбавленное молоко), с самыми высокими концентрациями сахаров. Характерна для тех видов, которые кормят потомство часто и по требованию, — непарнокопытных (лошади, носороги), приматов и некоторых парнокопытных (домашняя корова и коза). Эти виды кормят своих детенышей очень часто (например, лошади — каждые полчаса).

Стратегия № 2. Продукция и секретирование молока с высокой концентрацией ($>15\%$) сухих веществ (концентрированное молоко). Наиболее концентрированные типы молока секретироваются видами, которые кормят потомство нечасто и незапланированно. К ним относятся зайцеобразные (кролики и зайцы), некоторые грызуны и хищные, включая морских млекопитающих, которые обитают в экстремальных экологических (природно-климатических) условиях. Молоко этих животных содержит высокие концентрации жира и белка и низкие концентрации сахаров. Такие виды, как домашняя собака, кормят своих детенышей около восьми раз в сутки, но существуют и другие — с продолжительными интервалами между актами вскармливания. Пример — обыкновенная тупайя, которая кормит новорожденных один раз в 48 часов, и заяц-русак с интервалами между кормлениями до четырех суток.

Авторская ремарка: можно предполагать, что X_n (или его аналог) тупайи и заяц-русак должен обладать низкой общей ПА, чтобы при таких длительных интервалах между кормлениями компоненты молочного сгустка и прежде всего протеины метаболизировались медленно и попадали в кишечник постепенно; возможно, тупайя и заяц-русак — претенденты на получение рХн и изучение их свойств.

Предполагается, что такие режимы вскармливания (и типы молока) возникли в ходе эволюции в тех случаях, когда пищевая база значительно удалена от места локализации новорожденных, что позволяло матери больше времени проводить в поисках и потреблении пищи, необходимой для синтеза молока [63, 74].

Синтез концентрированного молока животными, обитающими в пустынях, может быть адаптационным механизмом, направленным на сбережение влаги организмом матери. Для морских млекопитающих высокая калорийность концентрированного молока, скорее всего, связана с необходимостью компенсировать затраты энергии новорожденного на терморегуляцию. Относительно концентрированное молоко у летучих мышей могло появиться как один из механизмов приспособления к дополнительным нагрузкам, связанным с полетом, а также как способ надолго оставлять молодняк в пещере или укрытии.

В ходе эволюции концентрированное молоко могло появиться у мелких млекопитающих в ответ на их высокие метаболические потребности в сочетании с малой емкостью кишечника. И, наоборот, у крупных млекопитающих, детеныши которых имеют пищеварительный тракт большой емкости, синтезируется молоко с низкими концентрациями нутриентов [63].

Ниже приводятся краткие резюме некоторых характеристик молока у разных таксонов, относящихся к классу Млекопитающих (*Mammalia*). Отметим, что достоверные данные для многих видов и некоторых отрядов, семейств и порядков на сегодняшний день отсутствуют.

Отряд Однопроходные (*Monotremata*) (яйцекладущие млекопитающие). Сразу после появления (вылупления) молодняка секрет молочных желез относительно разбавлен. Следом за первыми разбавленными порциями секрета молочные железы начинают продуцировать молоко с довольно высоким содержанием сухого вещества ($\approx 49\%$ у ехидны и $\approx 39\%$ у утконоса), содержащее 20–30 % жира, 8–12 % белка и 2–4 % углеводов [86]. В середине лактации детеныши ехидны получают молоко раз в несколько дней, для утконоса подтвержденных данных о частоте кормления нет.

Авторская ремарка: несмотря на высокое содержание белка, из-за слишком отдаленного эволюционного родства с коровой маловероятно, что МФ однопроходных и к-КЗ коровы будут совместимы.

Инфракласс Сумчатые (*Marsupialia*) (включает 7 отрядов сумчатых млекопитающих). Состав молока сумчатых резко меняется в процессе длительного периода лактации. При рождении молоко содержит 8–15 % сухих веществ, в середине лактации этот показатель увеличивается до 23–27 %. В среднем молоко содержит 3–7 % жира, 6–11 % белка и 11–14 % углеводов. Это одни из самых высоких концентраций углеводов в молоке среди млекопитающих, что можно объяснить практически фетальным (эмбриональным) статусом новорожденного. В этом состоянии плод метаболизирует прежде всего глюкозу, так как неспособен использовать жиры в качестве источника энергии. На поздних стадиях лак-

тации концентрация жира и белка в молоке увеличивается, а содержание углеводов снижается [74, 86].

Авторская ремарка: на первый взгляд длительный период лактации и преобладание углеводов в качестве источника энергии вызывают сомнения в наличии высокоэффективных химозинов.

Отряд Ежеобразные (*Erinaceomorpha*) и отряд Землеройкообразные (*Soricomorpha*) (некоторые исследователи объединяют Ежеобразных и Землеройкообразных в отдельный отряд — Насекомоядные (*Eulipotyphla*)) включают в себя очень мелкие виды с высокой скоростью метаболизма (например, землеройки) и более крупные виды, которые могут впадать в периодическое оцепенение (например, тенреки — щетинковые ежи). В целом насекомоядные выделяют молоко с относительно высоким содержанием сухого вещества (до ~50 %). Например, молоко белой землеройки содержит 30 % жира, 9 % белка и 3 % углеводов [74].

Отряд Трубокzubовые (*Tubulidentata*, включает всего 1 вид), отряд Силены (*Sirenia*), отряд Броненосцы (*Cingulata*), отряд Неполнозубые (*Pilosa*). Представители данных отрядов секретируют молоко с концентрацией сухих веществ 23–30 %, с высоким содержанием жиров — 11–20 % и белков — 8–12 %, но низким содержанием углеводов — 0,3–2,7 %.

Отряд Рукокрылые (*Chiroptera*). Отряд включает в себя около 1200 видов, населяющих все континенты Земли, кроме Антарктиды. Рукокрылых отличают две характерные особенности: машущий полет как основной способ передвижения, позволяющий им пользоваться ресурсами, недоступными для других млекопитающих, и эхолокация. Молоко рукокрылых изучено слабо — данные о его составе имеются всего для нескольких видов. Известно, что насекомоядные летучие мыши в середине лактации секретируют молоко, содержащее 25–27 % сухого вещества, 13–16 % жира, 6–7 % белка и 3 % углеводов. Напротив, у плодовых летучих мышей Старого Света молоко содержит 13–20 % сухих веществ, из них жиры составляют 6–10 %, белки — 2–3 %, углеводы — 6 % [63, 74].

Отряд Приматы (*Primates*). Молоко лемуров, ревунов, бабуинов и макак можно отнести к неконцентрированному типу. В середине лактации при концентрации сухих веществ 10–14 % оно содержит 1–4 % жира, 1–4 % белка и относительно большое количество углеводов — 7–8 %. В то же время молоко галаго и игрунок является более концентрированным и содержит 16–19 % сухих веществ, из них 7–10 % жиров, 3–5 % белков и 6–7 % углеводов [63, 74, 92].

Авторская ремарка: можно предполагать, что вероятность обнаружения коагулянтов молока с привлекательными для сыроделия технологическими свойствами невысока из-за используемой приматами стратегии

размножения, которая предполагает долгий период молочного вскармливания, длительные сроки взросления, низкие концентрации белка в молоке.

Отряд Хищные (*Carnivora*). Молоко представителей этого отряда, как правило, относительно концентрировано в середине лактации. Молоко лисиц, домашних собак и енотовидных собак содержат 18–23 % сухого вещества, 3–9 % жира, 3–5 % белка и 4–5 % углеводов; молоко песца, который обитает в более жестких климатических условиях, более концентрировано и содержит 29 % сухого вещества, 13 % жира, 11 % белка и 3 % углеводов [93, 94]. Молоко представителей семейств Куных (*Mustelidae*) и Кошачьих (*Felidae*) содержит 22–30 % сухого вещества, 8–14 % жира, 7–12 % белка и 3–4 % углеводов. Наиболее концентрированные типы молока синтезируют представители семейства Медвежьих (*Ursidae*) с концентрацией сухих веществ 32–38 % и содержанием жира 17–25 %. Так же, как и у сумчатых, медвежата рождаются совершенно беспомощными, после короткого периода развития в утробе матери (по сравнению с некоторыми видами Парнокопытных срок взросления молодняка — намного более продолжительный). Поэтому в процессе лактации относительное содержание основных нутриентов в молоке медвежьих значительно изменяется — на более поздних стадиях в нем увеличивается содержание белков и жиров, а концентрация сахаров — падает [63].

Ластоногие представители данного отряда характеризуются секрецией очень концентрированного, высокожирного молока с нулевым или следовым (0,1–0,8 %) содержанием углеводов. Молоко представителей семейства ушастых тюленей (морских котиков и морских львов) относительно менее концентрировано (41–63 % сухого вещества), содержат 32–50 % жира и 8–10 % белка, тогда как молоко Настоящих тюленей (тюлени, нерпы, морские слоны, морские леопарды) содержит 66–71 % сухого вещества, 47–61 % жира и 5–10 % белка [74, 86]. Для большинства видов данного таксона характерны изменения количественного состава молока (особенно жиров) от начала к середине лактации. Например, содержание жира в молоке серого тюленя быстро увеличивается с $\approx 39\%$ при рождении детенышей до $\approx 60\%$ в течение семи дней [87]. Представители ушастых тюленей кормят детенышей молоком в течение 4–12 месяцев. Напротив, у Настоящих тюленей лактация очень короткая и длится от нескольких дней(!) до нескольких недель. В течение этого периода новорожденный получает ударные дозы высококалорийного молока (с энергетической ценностью от 220 ккал/100 г у серого тюленя и до 600 ккал /100 г у тюленя-хохлача), после чего молочное вскармливание прекращается [61, 87]. У некоторых видов Настоящих тюленей вскармливание может прекращаться, когда детеныш еще не способен кормиться самостоятельно, и от двух до девяти недель он живет на накопленных жировых запасах.

Авторская ремарка: некоторые представители данного отряда вызывают интерес из-за высокого содержания белка в молоке, длительных интервалов между кормлениями и очень короткого периода молочного вскармливания.

Отряд Китообразные (Cetacea). Немногочисленные данные о составе молока китов и дельфинов указывают на то, что, как и у ластоногих, оно концентрированное, содержит 30–60 % сухого вещества, с высоким содержанием жира (22–41 %) и белка (11–15 %) [74, 92]. Продолжительность лактации варьирует от 6–7 месяцев у усатых китов, до 12–24 месяцев у представителей зубатых китов [63].

Авторская ремарка: по-видимому, Китообразные — перспективные источники генов для получения и исследования новых Хн из-за высокой концентрации белка в молоке; высокие концентрации сухих веществ делают молоко более вязким, что предъявляет повышенные требования к эффективности «работы» МФ.

Отряд Хоботные (Proboscidea). Молоко азиатских и африканских слонов похоже на молоко многих жвачных животных, содержит средние количества сухих веществ (17–18 %), 5–7 % жира, 4–5 % белка и 5 % углеводов. Лактация может длиться до 2 и более лет [74, 86].

Отряд Непарнокопытные (Perissodactyla). Все изученные виды лошадей, зебр и ослов производят очень разбавленное молоко (10–11 % сухого вещества), содержащего 1–2 % жира, 1–2 % белка и 6–7 % углеводов [74, 86]. Чуть более концентрировано молоко тапира (13–15 % сухого вещества), содержащее 2–4 % жира, 4–5 % белка и 5 % углеводов, тогда как молоко черного носорога является самым разбавленным (9 % сухих веществ) и содержит 0,2 % жира, 1 % белка и 7 % углеводов. Для всех представителей отряда характерны короткие интервалы между актами вскармливания [63].

Авторская ремарка: по-видимому, перспектива обнаружения высокоэффективного рХн у представителей Хоботных и Непарнокопытных низкая из-за невысокого содержания белка и сухих веществ в молоке.

Отряд Парнокопытные (Artiodactyla). Большинство видов неодомашенных жвачных и родственных им животных производят молоко, которое имеет примерно одинаковый состав: сухих веществ — 18–24 %, жиров — 5–10 %, белков — 5–8 %, углеводов — 3–5 % [63]. При этом замечено, что животные, используемые человеком в сельскохозяйственной практике — молочные породы крупного рогатого скота, коз и овец, — синтезируют менее концентрированное молоко, чем их дикие аналоги. Можно предполагать, что одомашнивание и создание тепличных условий для рождения и взросления молодняка отражается на концентрации основных нутриентов молока этих животных. Среди представителей дан-

ного отряда наиболее концентрированное молоко, содержащее до 28–35 % сухих веществ, продуцируют северные олени и овцебыки. Концентрация белков, жиров и углеводов в молоке этих животных составляет соответственно 10–12 %, 10–18 % и 3–4 % при энергетической ценности около 200 ккал/100 г [61, 63, 74, 86].

Авторская ремарка: наиболее вероятно, что МФ и к-КЗ у представителей данного отряда имеют близкую структуру и можно предполагать, что Хн и молоко различных видов будут максимально «подходить» друг другу, несмотря на известный конфликт Хн коровы и молока одногорбого верблюда; поиск новых Хн следует вести у диких аналогов сельскохозяйственных животных, так как содержание белка в их молоке выше.

Отряд Грызуны (Rodentia), отряд Тупайи (Scandentia) и отряд Зайцеобразные (Lagomorpha). Детеныши представителей этих отрядов рождаются на совершенно разных стадиях развития. Большинство видов грызунов, кроликов и зайцев производят умеренно концентрированное молоко. В середине лактации концентрация сухих веществ составляет 22–35 % при содержании жира 11–22 %, белка 6–15 % и углеводов 2–5 % [74]. Наиболее концентрированное молоко обнаруживается у домашней мыши — до 41 % сухих веществ. Наименьшая концентрация сухих веществ (17 %) отмечена в молоке морской свинки. Это может быть связано с тем, что детеныши рождаются зрелыми и на момент появления на свет уже имеют значительные жировые запасы [63].

Экстремальный вариант выкармливания потомства наблюдается в отрядах Тупайи и Зайцеобразные. У тупайи детеныши рождаются слепыми и беспомощными. За время лактации, длящейся около 18 суток, самка проводит с детенышами примерно 1,5 часа. Кормление происходит один (!) раз в 48 часов, при этом самка затрачивает на него не более 10–15 минут. Молоко малайской тупайи (*Tupaia belangeri*) содержит до 40 % сухих веществ, богато жирами (25,6 %) и белками (10,4 %), но бедно углеводами — 1,5 %. Зайчата появляются на свет зрячими и покрытыми густым мехом. Интервалы между кормлениями у зайца-русака могут достигать 24–96 часов (!).

Авторская ремарка: высокие концентрации белка в молоке в сочетании с наблюдаемыми у некоторых видов длительными интервалами между кормлениями позволяют предполагать наличие технологически значимых химозинов.

Таким образом, потенциальный интерес для поиска новых Хн могут представлять виды, для которых характерны вторая стратегия лактации, длительные интервалы между кормлениями, короткие сроки лактации, высокие концентрации белка (и, возможно, жира) в молоке.

Глава 4

ИНФОРМАЦИЯ О НАЛИЧИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ХИМОЗИНОВ И К-КАЗЕИНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В БАЗАХ NCBI

Почему «...химозинов и к-казеинов млекопитающих...»? Потому что структуры фермента и его основного субстрата неразрывно связаны. Изучение субстратной специфичности ферментов сформировало представление о том, что структура молекулы субстрата (в нашем случае — к-КЗ) и локализация определенных последовательностей (субсайтов специфичности) на трехмерной поверхности фермента (в нашем случае — Хн) конгруэнтны и подходят друг другу как «ключ к замку» [95]. При этом согласно с моделями «индукционного соответствия» у некоторых ферментов пространственная структура активного центра становится полностью комплементарной структуре субстрата только после его связывания. Ниже (в гл. 11) будет продемонстрирована попытка исследовать структуру известных Хн-чувствительных участков к-КЗ различных видов млекопитающих в свете возможности предсказания некоторых биохимических свойств еще не изученных химозинов. Поэтому представляет интерес информация о наличии доступных а.к. последовательностей как химозинов, так и к-казеинов в отрядах класса Млекопитающие.

По современным представлениям класс Млекопитающих (*Mammalia*) насчитывает 29 отрядов, в состав которых входит примерно 5500 видов [32]. Анализ информации в базах NCBI свидетельствует о том, что а.к. последовательности Хн и к-КЗ млекопитающих изучены фрагментарно и неравномерно (табл. 1).

Всего охарактеризованы первичные структуры 31 Хн и 69 Хн-подобных белков в 21 отряде млекопитающих. Лидерами по доступным а.к. последовательностям (Хн+Хн-подобные структуры) являются 6 отрядов: Парнокопытные (15 последовательностей), Хищные (18), Грызуны (16), Приматы (11), Рукокрылые (11), Китообразные (10), — на долю остальных 15 отрядов приходится всего 19 последовательностей. Для оставшихся 8 отрядов данные об а.к. составе Хн или Хн-подобных белков отсутствуют. Видовой состав известных а.к. последовательностей Хн и Хн-подобных ферментов представлен в Приложении А.

На сегодняшний день получены рХн 8 видов млекопитающих: 7 из них — представители отряда Парнокопытные, 1 вид относится к отряду Приматы. Рекомбинантные химозины двух видов — коровы (*Bos taurus*) и одногорбого верблюда (*Camelus dromedaries*) — используются в качестве официальных коммерческих коагулянтов молока в сыроделии.

Первичные структуры к-КЗ изучены подробнее, чем структуры Хн. Всего охарактеризовано 234 а.к. последовательностей к-КЗ в 19 отрядах млекопитающих (табл. 1).

Для 10 отрядов данных о первичной структуре к-КЗ не найдено. Наиболее полно представлены первичные структуры к-КЗ Парнокопытных (98 последовательностей), Приматов (29), Грызунов (29), Хищных (26) и Китообразных (15). В оставшихся 14 отрядах охарактеризовано 35 последовательностей к-КЗ.

Таким образом, в настоящее время известны а.к. последовательности Хн и Хн-подобных белков менее чем 2 % видов млекопитающих (1,8 %). Основные биологические субстраты химозинов изучены не намного полнее: в базах NCBI содержатся данные о первичной структуре к-КЗ примерно 4,3 % видов. Обращает на себя внимание тот факт, что во всех исследованных отрядах млекопитающих, за исключением Парнокопытных, процент гомологии первичной структуры Хн (и Хн-подобных последовательностей) химозину *Bos taurus* выше, чем гомология между к-КЗ коровы и к-КЗ других видов (табл. 1). Возможно, это указывает на то, что структура к-КЗ не так жестко детерминирована структурой химозина (или наоборот), как мы себе это представляем. В ряду химозинов, высокогомологичных коровьему ферменту, вслед за Парнокопытными идут Китообразные, Хищные, Приматы и Тупайи. Вторую, третью и четвертую позиции по степени гомологии к-КЗ коровы занимают Китообразные, Хищные и Непарнокопытные. Получение и исследование химозинов видов, относящихся к этим отрядам, следует отнести к ближайшим биотехнологическим задачам хотя бы для того, чтобы оценить перспективы поиска новых рекомбинантных коагулянтов молока «за пределами» отряда Парнокопытных.

Таблица 1

Наличие аминокислотных последовательностей Хн и к-КЗ млекопитающих в базах данных NCBI (по состоянию на 1-е полугодие 2020 г.)

Отряд	Хн (к-во ви- дов)	Хн- подоб- ный (к-во видов)	Гомоло- гия с Хн коровы (%)	к-КЗ (к-во ви- дов)	Гомоло- гия с к-КЗ коровы (%)
Однопроходные (Monotremata)	-	1	57,0	2	28,6–35,7
Опоссумы (Didelphimorphia)	-	1	72,4	1	26,7
Ценоlestы (Paucituberculata)	-	-	-	-	-
Микробиотерии (Microbiotheriidae)	-	-	-	-	-
Сумчатые кроты (Notoryctemorphia)	-	-	-	-	-

Окончание таблицы 1

Отряд	Хн (к-во ви- дов)	Хн- подоб- ный (к-во видов)	Гомоло- гия с Хн коровы (%)	к-КЗ (к-во ви- дов)	Гомоло- гия с к-КЗ коровы (%)
Хищные сумчатые (Dasyuromorphia)	-	1	71,1	-	-
Бандикуты (Peramelemorphia)	-	-	-	-	-
Двурезцовые сумчатые (Diprotodontia)	-	2	65,2–66,4	1	29,5
Трубказубовые (Tubulidentata)	-	1	78,2	1	39,8
Сирены (Sirenia)	-	1	76,6	1	45,0
Афросорициды (Afrosoricida)	-	2	77,4–79,5	2	39,9–43,5
Прыгунчиковые (Macroscelidea)	-	1	77,5	-	-
Дамановые (Hyracoidea)	-	-	-	-	-
Хоботные (Proboscidea)	-	1	76,4	1	47,4
Броненосцы (Cingulata)	-	1	76,9	-	-
Неполнозубые (Pilosa)	-	-	-	-	-
Тупайи (Scandentia)	1	-	81,6	1	41,9
Шерстокрылы (Dermoptera)	-	1	60,8	1	51,3
Приматы (Primates)	4	7	62,2–79,8 79,5–81,6	29	42,1–54,4
Грызуны (Rodentia)	2	14	63,4–75,4 71,1–71,4	29	36,2–48,2
Зайцеобразные (Lagomorpha)	1	-	72,7	2	43,1–49,2
Ежеобразные (Erinaceomorpha)	-	-	-	-	-
Землеройкообразные (Soricomorpha)	-	3	76,1–80,1	3	37,0–48,2
Рукокрылые (Chiroptera)	3	8	68,8–71,2 78,0–79,0	11	49,4–54,7
Панголины (Pholidota)	-	1	77,7	1	51,5
Хищные (Carnivora)	-	18	70,8–81,9	26	53,9–62,8
Непарнокопытные (Perissodactyla)	-	-	-	9	56,1–61,9
Парнокопытные (Artiodactyla)	14	1	93,7 81,4–100	98	75,6–100
Китообразные (Cetacea)	6	4	70,2–87,1 85,6–86,4	15	56,8–67,7
Всего	31	69		234	

Примечание: серой заливкой выделены отряды, для представителей которых нет данных о Хн и к-КЗ. Жирным шрифтом выделены отряды, входящие в инфракласс Сумчатые.

Глава 5

НЕБЛАГОПРИЯТНЫЕ ПРИРОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ ОБИТАНИЯ, ЗРЕЛОРОЖДАЕМОСТЬ, КОРОТКИЙ ПЕРИОД ВЗРОСЛЕНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИЯ БЕЛКА В МОЛОКЕ КАК КРИТЕРИИ ВЫБОРА ВИДОВ — ИСТОЧНИКОВ ХН

Одной из стратегий адаптации к условиям обитания, связанной с экспрессией МФ, является сокращение периода взросления молодняка, его максимально быстрое приспособление к внешней среде и переход на использование в качестве пищи не только молока, но и других видов корма. Значит, в качестве источников Хн значительный интерес могут представлять млекопитающие, среда обитания которых характеризуется неблагоприятными природно-климатическими условиями: экстремально низкими или высокими температурами; скудными пищевыми ресурсами; коротким летним периодом; гипоксией, связанной с низким парциальным давлением кислорода. Исходя из этого, в сферу интереса попадают виды, обитающие:

- 1) в циркумполярных областях — на участках суши и моря Арктики и Антарктики (представители отрядов Парнокопытные, Хищные, Грызуны, Зайцеобразные, Китообразные);
- 2) в пустынях и полупустынях (представители отрядов Парнокопытные, Хищные, Грызуны, Зайцеобразные);
- 3) в условиях высокогорья (представители отрядов Парнокопытные, Хищные, Грызуны, Зайцеобразные).

Сокращение периода взросления связано со степенью зрелости новорожденного. Зрелорождающиеся детеныши появляются на свет уже в значительной степени адаптированными к среде обитания. У них развиты зрение, обоняние и слух, тело покрыто шерстью. Детеныши таких видов вскоре после рождения могут самостоятельно передвигаться, затаиваться или следовать за матерью; они быстро утрачивают потребность в родительской опеке (заяц, северный олень, овцебык, некоторые виды тюленей и др.). Незрелорождающиеся животные не могут обходиться без родительской помощи в течение продолжительного времени (сразу после рождения зрение, обоняние и слух не развиты или развиты слабо), период постнатальной адаптации у таких видов, как правило, продолжительный (человек, кенгуру и др.).

Дополнительное значение короткий период взросления имеет для нехищных (травоядных) животных. В раннем постнатальном (неонаталь-

ном) периоде во время питания материнским молоком детеныши травоядных наиболее уязвимы и беззащитны перед хищниками. Логично предположить, что в процессе естественного отбора преимущество получают те виды, у которых период взросления молодняка максимально сокращен, чьи новорожденные способны быстрее других приспосабливаться к факторам внешней среды. В качестве примера такой стратегии адаптации можно привести некоторые виды отряда Парнокопытных (северный олень, овцебык, оронго или тибетская антилопа), детеныши которых уже через 5–30 минут после рождения способны встать на ноги и сосать молоко, а через несколько часов — самостоятельно передвигаться и следовать за матерью [96–99].

Для того чтобы сократить период только молочного вскармливания, он должен быть чрезвычайно эффективным. Достигается это и за счет того, что молоко таких видов, как правило, имеет повышенное (по сравнению с молоком коровы) содержание нутриентов, в том числе основных молочных белков — казеинов, что предполагает синтез в желудках новорожденных высокоэффективных МФ, которые могут обладать технологическими свойствами, привлекательными для сыроделия. По данным Vallejo et al., у различных представителей отряда Парнокопытных каталитическая эффективность химозинов по отношению к к-казеину (к-КЗ) коровы положительно коррелирует с относительным содержанием казеинов в молоке [12].

Высокая скорость адаптации новорожденных к самостоятельной жизни характерна для некоторых Зайцеобразных (*Lagomorpha*). Например, детеныши зайца-русака (*Lepus europaeus*) и зайца-беляка (*Lepus timidus*) рождаются покрытыми густым мехом, зрячими. Уже в первый день жизни способны самостоятельно передвигаться. Интервалы между кормлениями могут достигать четырех суток (!). Уже на второй неделе жизни зайчата начинают питаться грубым кормом. Самостоятельными становятся в возрасте 2–4 недель. Содержание сухих веществ, жиров и белков в заячьем молоке составляет соответственно $\approx 32,5\%$, $15,0\text{--}15,6\%$, $10,0\text{--}12,0\%$ [100].

Среди морских (или связанных с морем) млекопитающих, относящихся к отрядам Хищные (*Carnivora*) и Китообразные (*Cetacea*), примеры особенно коротких периодов молочного вскармливания можно найти у некоторых представители **семейства Настоящие тюлени** (*Phocidae*), для которых характерны исключительно короткие периоды лактации и ранние сроки начала питания детенышей твердыми кормами (табл. 2). Лактация у большинства изученных представителей Настоящих тюленей длится 4–40 дней, тогда как у других морских млекопитающих этот пери-

од составляет минимум 4 месяца (кагерленский морской котик), а максимум — 34 месяца (длиннорылый дельфин). Рекордсменом по кратковременности лактации является тюлень-хохлач — всего 4 дня!

Таблица 2

Продолжительность лактации и время начала употребления
молодняком твердого корма у морских млекопитающих из отрядов
Хищные (*Carnivora*) и Китообразные (*Cetacea*) (по данным [101])

Отряд, семейство (число видов), вид	Длительность лактации	Время начала употребления твердого корма
Отряд Хищные — CARNIVORA		
Семейство Куны — Mustelidae (59)		
Калан (<i>Enhydra lutris</i>)	6 месяцев	1 месяц
Семейство Медвежьи — Ursidae (8)		
Белый медведь (<i>Ursus maritimus</i>)	18–34 месяца	3–6 месяцев
Семейство Моржовые — Odobenidae (1)		
Морж (<i>Odobenus rosmarus</i>)	12–24 месяца	5–6 месяцев
Семейство Ушастые тюлени Otariidae (16)		
Кергеленский морской котик (<i>Arctocephalus gazella</i>)	4 месяца	4 месяца
Капский морской котик (<i>Arctocephalus pusillus</i>)	9 месяцев	4–7 месяцев
Южноамериканский морской котик (<i>Arctocephalus australis</i>)	12 месяцев	?
Новозеландский морской котик (<i>Arctocephalus forsteri</i>)	12 месяцев	?
Северный морской котик (<i>Callorhinus ursinus</i>)	4 месяца	4 месяца
Сивуч (<i>Eumetopias jubatus</i>)	4–12 месяцев	?
Австралийский морской лев (<i>Neophoca cinerea</i>)	17 месяцев	?
Галапагосский морской лев (<i>Zalophus wollebaeki</i>)	24 месяца	?
Калифорнийский морской лев (<i>Zalophus californianus</i>)	11 месяцев	4–5 месяцев
Семейство Настоящие тюлени — Phocidae (18)		
Тюлень-хохлач (<i>Cystophora cristata</i>)	4 дня	4 дня
Морской заяц (лахтак) (<i>Erignathus barbatus</i>)	24 дня	13–14 дней
Длинномордый тюлень (<i>Halichoerus grypus</i>)	17 дней	17 дней
Северный морской слон (<i>Mirounga angustirostris</i>)	26 дней	26 дней
Южный морской слон (<i>Mirounga leonina</i>)	23 дня	23 дня

Отряд, семейство (число видов), вид	Длительность лактации	Время начала употребления твердого корма
Гренландский тюлень (<i>Pagophilus groenlandicus</i>) ▲	12 дней	12 дней
Обыкновенный тюлень (<i>Phoca vitulina</i>)	27 дней	27 дней
Средиземноморский тюлень-монах (белобрюхий тюлень) (<i>Monachus monachus</i>)	119 дней	?
Тюлень Уэдделла (<i>Leptonychotes weddellii</i>)	40–50 дней (?)	45 дней
Кольчатая нерпа (<i>Pusa hispida</i>) ▲	39 дней	?
Отряд Китообразные — CETACEA		
Семейство Дельфиновые — Delphinidae (34)		
Обыкновенная гринда (<i>Globicephala melas</i>)	24 месяца	6–9 месяцев
Дельфин-белобочка (<i>Delphinus delphis</i>)	16 месяцев	?
Узкорылый (пятнистый) дельфин (<i>Stenella attenuata</i>)	20 месяцев	3–7 месяцев
Длиннорылый дельфин (<i>Stenella longirostris</i>)	11–34 месяца	?
Бутылконосый дельфин (афалина) (<i>Tursiops truncatus</i>)	19 месяцев	4–11 месяцев
Семейство Речные дельфины (3)		
Ла-платский дельфин (<i>Pontoporia blainvillei</i>)	9 месяцев	?
Семейство Нарваловые — Monodontidae (2)		
Белуха (<i>Delphinapterus leucas</i>)	20–24 месяца	12 месяцев
Семейство Морские свиньи — Phocoenidae (6)		
Морская свинья (<i>Phocoena phocoena</i>)	8–12 месяцев	2–3 месяца
Семейство Кашалотовые — Physeteridae (3)		
Кашалот (<i>Physeter macrocephalus</i>)	25 месяцев	12 месяцев
Семейство Клюворылые киты — Ziphiidae (21)		
Командорский ремнезуб (<i>Mesoplodon stejnegeri</i>)	12 месяцев	?
Семейство Гладкие киты — Balaenidae (4)		
Гренландский кит (<i>Balaena mysticetus</i>)	9–12 месяцев	?
Семейство Полосатиковые киты — Balaenopteridae (7)		
Северный малый полосатик (<i>Balaenoptera acutorostrata</i>)	5–6 месяцев	5–6 месяцев
Синий кит (<i>Balaenoptera musculus</i>)	6–7 месяцев	6–7 месяцев
Обыкновенный полосатик (<i>Balaenoptera physalus</i>)	6–7 месяцев	6–7 месяцев

Отряд, семейство (число видов), вид	Длительность лактации	Время начала употребления твердого корма
Ивасевый полосатик (сейвал) (<i>Balaenoptera borealis</i>)	6–7 месяцев	6–7 месяцев
Горбатый кит (<i>Megaptera novaeangliae</i>)	10–11 месяцев	5–6 месяцев
Семейство Серых китов — Eschrichtiidae (1)		
Серый кит (<i>Eschrichtius robustus</i>)	7–8 месяцев	6–7 месяцев
Семейство Ламантины — Trichechidae (3)		
Американский ламантин (<i>Trichechus manatus</i>)	12–24 месяца	3–5 месяцев

Условные обозначения: ? — нет точных данных, значком ▲ обозначены виды, натуральные химозины или Хн-подобные ферменты которых были частично охарактеризованы.

Исключение составляют два вида: тюлень Уэдделла и средиземноморский тюлень-монах. Сроки лактации и начала самостоятельного питания молодняка тюленя Уэдделла составляют почти 1,5 месяца (условия обитания этого вида — одни из самых экстремальных — побережье Антарктиды). Тюлень-монах обитает в теплых водах Средиземного и Черного морей и на Атлантическом побережье Африки до $\approx 15^\circ$ северной широты (с.ш.). Возможно, длительные (почти 4-месячные) по сравнению с другими представителями Настоящих тюленей сроки лактации у тюленя-монаха связаны с относительно мягкими условиями обитания.

Преимущественно представители семейства Настоящие тюлени обитают в умеренных или холодных водах Арктики и Антарктики. Детеныши нескольких видов — тюленя-хохлача, морского зайца, гренландского тюленя, кольчатой нерпы — рождаются на льду, поэтому быстрая адаптация новорожденных к низким температурам является одним из условий выживания этих видов. Новорожденные питаются молоком, содержащим высокие концентрации белков и жиров. Для быстрого превращения этого молока в ступок необходимы высокоэффективные гастральные МФ, обладающие низкой общей ПА, чтобы обеспечить его постепенное усвоение. Время начала питания твердым кормом, как правило, совпадает со временем окончания лактации и может считаться началом самостоятельной жизни в жестких природно-климатических условиях окружающей среды. Из данных, представленных в таблице 2, видно, что в большинстве случаев сроки такой адаптации среди новорожденных нерп, тюленей и морских слонов намного короче, чем для других видов морских млекопитающих, и фактически исчисляется днями, а не месяцами.

Относительное содержание белка в молоке представителей семейства Настоящие тюлени колеблется в диапазоне от 6,2 % (*Cystophora cristata*) до 10,2 % (*Mirounga angustirostris*). Также для молока этих видов характерно высокое содержание жиров и крайне низкое (вплоть до полного отсутствия) содержание сахаров.

В настоящее время рекомбинантные Хн животных, относящихся к семейству Настоящие тюлени, все еще не получены, а данные о структуре к-КЗ известны лишь для тюленя Уэдделла и гавайского тюленя-монаха. В научной периодике есть отрывочные данные о некоторых биохимических характеристиках натуральной Хн-подобной протеиназы гренландского тюленя (*Pagophilus groenlandicus*) [102] и натурального Хн кольчатой нерпы (*Pusa hispida*) [47]. Согласно данным В. Foltmann, по сравнению с Хн овцы, свиньи и кошки Хн кольчатой нерпы обладал более высокой специфической активностью по отношению к коровьему молоку и превосходил по этому показателю Хн коровы на 30 % [47]. Как сообщали Shamsuzzaman & Haard, при гидролизе гемоглобина Хн-подобный фермент гренландского тюленя продемонстрировал широкий рН-оптимум, равный 2,2–3,5, а его специфичность (отношение МА к общей ПА) была в 12 раз выше, чем у пепсина А, выделенного из желудка этого же вида [102].

В другой работе этих же авторов было показано, что неочищенный препарат протеиназ из желудка гренландского тюленя проявляет биохимические свойства, в большей степени присущие Хн, нежели пепсину: коагулирует молоко в более широком диапазоне рН, чем свиной пепсин, и имеет более высокое соотношение коагуляционной активности к протеолитической (МА/ПА) [103]. Экспериментальный сыр типа Чеддар, выработанный с использованием грубоочищенного молокосвертывающего ферментного препарата, полученного из желудка *Pagophilus groenlandicus*, имел значительно более высокие органолептические показатели, чем контрольные сыры, приготовленные с использованием коровьего СФ. Химический анализ выявил меньшие концентрации растворимого азота и свободных аминокислот в экспериментальном сыре, по сравнению с контролем, полученным с использованием коровьего СФ и протеазы *Mucor miehei* (мукорпепсина) [103].

Опираясь на эти данные, мы предполагаем, что высокое содержание белков в молоке ряда морских млекопитающих должно сопровождаться экспрессией Хн, способных эффективно гидролизовать к-КЗ в вязкой среде, насыщенной липидами. Не исключено, что Хн этих животных обладают комплексом значимых технологических свойств, позволяющих использовать эти МФ для выработки сыров из коровьего молока.

В поддержку предлагаемых критериев выбора источников перспективных хмозинов для сыроделия среди млекопитающих следует отнести уже полученные результаты исследования МФ видов, относящихся к отряду Парнокопытные (*Artiodactyla*): рХн одногорбого верблюда [13, 14, 29], рХн альпака [20] и натурального молокосвертывающего фермента из сычугов северного оленя [9–11], превосходящих по некоторым биохимическим и технологическим параметрам Хн коровы.

В качестве примера рассмотрим условия обитания, степень зрелорождаемости и концентрацию белка в молоке для представителей семейства Верблюдовых (*Camelidae*) (синтезированы и исследованы технологические свойства рХн двух видов), Оленевых (*Cervidae*) (получен и исследован один натуральный МФ — из сычугов северного оленя) и Полорогих (*Bovidae*) (известна первичная структура Хн 1-го вида, но рекомбинантные Хн не получены).

Семейство Верблюдовых (*Camelidae*) включает в себя три рода: верблюды (*Camelus*), ламы (*Lama*) и викуньи (*Vicugna*). На сегодняшний день один из представителей этого семейства уже является источником Хн для сыроделия. Рекомбинантный Хн одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) оказался первым МФ, превосходящим коровий Хн по аффинности к к-казеину и соотношению молокосвертывающей и протеолитической активности [14]. Коммерческий препарат рХн одногорбого верблюда (торговая марка — Чу-Мах[®]М) широко используется при производстве сыров и успешно конкурирует с рХн коровы (Чу-Мах[®]) [29]. Согласно официальной информации производителя — компании «Chr. Hansen», применение Чу-Мах[®]М обеспечивает снижение дозировки фермента, увеличение выхода сыра, более плотную консистенцию продукта, отсутствие горечи и повышение качества сыворотки [104].

Всех современных *Camelidae* объединяет не только общность происхождения и генетическая близость, но и сложные природно-климатические условия обитания. Для лам и викуний это высокогорья с опасностью гипоксии, для верблюдов — пустыни и полупустыни с дефицитом воды, резкими колебаниями суточных и сезонных температур, скудной кормовой базой. Одомашненный двугорбый верблюд — бактриан (*Camelus bactrianus*) встречается в степных и полупустынных районах восточной части Центральной и Средней Азии. Небольшая популяция диких двугорбых верблюдов (*Camelus ferus*) (хаптагаев) обитает в труднодоступных районах пустыни Гоби в условиях резко континентального климата с жарким и сухим летом и очень морозными и снежными зимами. Гоби расположена на высотах 700–1800 м над уровнем моря (н.у.м.), ее климатические условия близки к экстремальным: сезонные температуры изме-

няются от -55 до $+58$ °С, летом суточные колебания температур могут достигать 35 °С, уровень осадков в некоторых частях пустыни не превышает 50 мм в год. Анатомические и физиологические адаптационные особенности позволяют верблюдам необычайно долго обходиться без воды и довольствоваться самым грубым и малопитательным кормом.

Необычна предполагаемая взаимосвязь состава молока и адаптации крупных млекопитающих, таких как верблюды, к засушливым условиям обитания. На первый взгляд, было бы логично, чтобы такие виды синтезировали высококонцентрированное молоко, для того чтобы уменьшить потери воды матерью при кормлении новорожденных. Однако верблюды производят относительно разбавленное молоко, ненамного превосходящее по концентрации сухих веществ молоко коровы. По данным Skibieli et al., тип молока (разбавленное или концентрированное), секретируемый животными, обитающими в жарких условиях пустынь и полупустынь, может зависеть от массы тела и общей площади потоотделения. Поэтому крупные млекопитающие, такие как верблюды, производят относительно разбавленное молоко, чтобы интенсифицировать испарение и охлаждение тела новорожденного [105].

Вместе с тем, несмотря на невысокую концентрацию сухих веществ, относительное содержание белка в молоке верблюдов выше, чем в коровьем молоке. По результатам исследования, проведенного на территории Республики Казахстан, концентрация белка в молоке бактриана выше, чем в молоке одногорбого верблюда, и составляет $5,23$ % против $4,76$ % [106].

В 2017–2018 гг. с использованием таких критериев выбора вида — источника гена рХн, как неблагоприятная среда обитания (высокогорье, гипоксия, скудные пищевые источники), а также высокое по сравнению с молоком коровы содержание белка в молоке, впервые был получен рХн альпака (*Vicugna pacos*) и исследованы его технологические свойства [14]. Альпака — парнокопытное сельскохозяйственное животное из семейства Верблюдовых (*Camelidae*), обитающее в Андах (Южная Америка) на высоте 3500 – 5000 м н.у.м., в условиях значительного колебания среднесуточных температур и пониженного парциального давления кислорода.

По данным литературы, молоко *V. pacos* содержит $4,5$ – $6,9$ % белка, что превышает средние показатели коровьего молока ($3,2$ – $3,6$ %) [107–109]. Прослеживается зависимость между жесткостью условий обитания и концентрацией белка в молоке альпака. Так, **концентрация протеинов** в молоке особей, обитающих в высокогорных районах Анд на высоте 4000 м н.у.м., в условиях полупустыни Патагонии на высоте 12 м н.у.м. и акклиматизированных в Калифорнии (США), составляет, соответственно, $6,9$ %, $6,5$ % и $4,5$ % [109, 110].

Общая протеолитическая активность рХн альпака оказалась в три раза ниже, чем у эталонного рХн коровы, что очень ценно для его использования в сыроделии. Вместе с тем рХн альпака имел более высокую по сравнению с рХн коровы термостабильность. Возможно, негативная с прикладной точки зрения высокая термостабильность рХн альпака обусловлена недостаточным уровнем посттрансляционной модификации фермента при его экспрессии в прокариотической системе *E.coli*. Если данное предположение верно, то смена прокариотической системы экспрессии на эукариотическую (например, дрожжи или грибы), обеспечивающей качественно иной уровень посттрансляционной модификации целевого белка, может привести к изменению его биохимических свойств, в частности, к снижению термостабильности. В случае снижения термостабильности рХн альпака на 10–15 °С фермент попадает в категорию высококачественных коагулянтов коровьего молока, превосходящих по технологическим характеристикам рХн коровы [20].

Северный олень (*Rangifer tarandus*) — парнокопытное млекопитающее семейства Оленевых (*Cervidae*), обитает в жестких природно-климатических условиях районов Северного полярного круга Евразии и Северной Америки, на некоторых островах Северного Ледовитого океана, в арктических тундрах. Для этого вида характерны длительные, до 1000 км, сезонные миграции в поисках кормовых ресурсов. Телята северных оленей рождаются крупными и самостоятельными, их вес составляет около 6 кг. Сразу после появления на свет новорожденный способен встать на ноги и сосать молоко, а на второй день может бежать за матерью не отставая, даже по снегу. В возрасте одной недели олененок в состоянии преодолевать водные препятствия.

Концентрация белка в молоке северного оленя составляет 10–11 %, что почти в три раза превосходит этот показатель в молоке коровы, а содержание жира достигает 11,1 % [97, 107, 108]. Возможное влияние концентрации жира в молоке на эффективность действия молокосвертывающих ферментов обсуждается в главе 6.

Важенки кормят телят 30–50 раз в сутки, продолжительность кормежки — 0,5–1 мин. Количественный состав молока и характерный тип кормления обеспечивают интенсивный рост молодняка в условиях короткого северного лета. В 2-недельном возрасте, наряду с молоком, оленята начинают питаться зеленым кормом и лишайниками (описан случай обнаружения ягеля и зеленых побегов в желудке 2-суточного теленка). Вес 2-месячного теленка составляет около 22 кг. К 5–6 месяцам масса молодых северных оленей достигает 50–60 % массы взрослых животных [97]. Таким образом, быстрое взросление — необходимый адаптационный меха-

низм, который позволяет северным оленям приспособиться к обитанию в суровых природно-климатических условиях.

Темпы роста молодняка зависят от образа жизни млекопитающего и внешних условий. В результате даже внутри одной таксономической группы существуют значительные межвидовые различия в темпах адаптации новорожденных к внешней среде. Жесткие природно-климатические условия, характерные для местообитаний полярных и высокогорных животных, требуют очень быстрого развития молодняка. Различия в образе жизни и в природно-климатических условиях обитания приводят к тому, что новорожденный северный олень уже в первый день в состоянии следовать за матерью, а новорожденный благородный олень — только через 6–7 дней [97].

По данным [9, 10], МФ из сычугов северного оленя по ряду технологических параметров превосходит высококачественный СФ коровы. Выделенный в 2005 г. из желудков молодых северных оленей МФ не удалось идентифицировать как химозин или пепсин, так как он обладал смешанными биохимическими свойствами. При исследовании МФ северного оленя было показано, что его неспецифическая протеолитическая активность примерно вдвое ниже, чем у высококачественного коровьего СФ [9]. Высокая специфичность по отношению к коровьему κ -казеину и низкий уровень неспецифического протеолиза позволили увеличить выход, качество и сроки хранения сыров, выработанных с применением оленьего МФ [10]. И если рХн верблюда уже используется в сыроделии как коагулянт коровьего молока, то натуральный олений Хн в силу технических и экономических факторов (малая сырьевая база, сложные условия заготовки и высокая стоимость транспортировки сырья) в настоящее время не производится (а если и будет производиться, то, скорее всего, как рекомбинантный Хн). Поэтому получение и исследование рХн северного оленя является актуальной задачей биотехнологии, связанной с перспективой его промышленного производства и практического применения.

Оронго (чйру, тибетская антилопа) (*Pantholops hodgsonii*) — парнокопытное млекопитающее из семейства Полорогих (*Bovidae*) [98, 111]. Одно из самых малоизученных парнокопытных животных, единственный представитель рода Оронго (*Pantholops*). Вид находится под угрозой исчезновения, занесен в Красную книгу Всемирного союза охраны природы. Обитает на высоте 3250–5500 м [112] в высокогорных степях Тибетского плато на территории Китая, а также в Индии в области Ладакх («Малый Тибет») и в регионе Аксайчин [113]. Данный вид является одним из примеров исключительно быстрой адаптации детенышей к условиям обитания. Телята оронго появляются на свет полностью сформированными,

через 12–15 мин. после рождения могут питаться материнским молоком, через 1 час после рождения следуют за матерью [99] и способны опережать пони уже в течение первого дня жизни (!) [98].

Сведения о составе молока не найдены. В базах NCBI есть данные об а.к. последовательности Хн-подобного белка, высокомолекулярного химозину коровы (93,7 %). Рекомбинантный Хн *Pantholops hodgsonii* не получен.

Овцебык, или Мускусный бык (*Ovibos moschatus*) — единственный современный представитель рода Овцебыков (*Ovibos*) семейства Полорогих (*Bovidae*). Типичное травоядное животное, сумевшее приспособиться к скудным кормовым условиям Арктики. Арктическое лето длится всего несколько недель, из-за чего большую часть года овцебыкам приходится довольствоваться растительностью, которую они добывают из-под снега. Естественный ареал обитания *Ovibos moschatus* — арктические тундры Северной Америки и Гренландии. В России интродуцированы и акклиматизированы на Таймыре, о-ве Врангеля, Ямале. Новорожденные через 5–28 мин. после появления на свет встают на ноги. Масса новорожденного теленка колеблется от 8 до 10 кг и в течение первого месяца жизни удваивается. Первые два дня самка кормит детеныша 8–18 раз. В возрасте одной недели молодые овцебыки пробуют питаться растительной пищей, а спустя месяц переходят на подножный корм, дополняемый материнским молоком [96].

Концентрация белка в молоке мускусного быка достигает 8,7 %, что в 2,5 раза выше, чем в коровьем молоке [114]. Концентрация жира в молоке овцебыка выше, чем в молоке северного оленя, и составляет около 14,3 %. В базах NCBI отсутствуют данные о первичной структуре Хн овцебыка. Генно-инженерный химозин *Ovibos moschatus* до сих пор не получен.

С точки зрения потенциальных источников генов Хн интересными, но малоизученными являются морские млекопитающие, обитающие в водах и на побережье Арктики и Антарктики. На сегодняшний день не получено ни одного рХн с использованием генов отряда Китообразных (*Cetacea*) (киты, косатки, дельфины, кашалоты) и представителей морских млекопитающих, относящихся к отряду Хищные (*Carnivora*) (морские котика, морские слоны, нерпы, тюлени, моржи, морские леопарды). Известно, что для молока представителей этих таксономических групп млекопитающих характерны высокие концентрации белка, в несколько раз превосходящие содержание протеинов в молоке коровы [101, 107, 108].

Неизученными являются химозины наземных представителей отряда Хищных (*Carnivora*) (северные медведи, песцы, феньки, кустарниковые

кошки, львы, гепарды и другие), отряда Зайцеобразных (*Lagomorpha*) (зайцы, пищухи), отряда Грызунов (*Rodentia*) (крысы, бобры, суслики, мыши, лемминги и другие).

По-прежнему несомненный интерес в качестве видов источников Хн представляют животные, относящиеся к Парнокопытным (оронго, овцебыки, северные олени, благородные олени, лоси, снежные козы, черные антилопы, антилопы-прыгуны, такины и другие).

Для всех вышеперечисленных представителей Китообразных, Хищных, Зайцеобразных, Грызунов и Парнокопытных характерен как минимум один из критериев отбора: суровые условия обитания, быстрая адаптация молодняка к окружающей среде, высокое содержание белка в молоке.

Таким образом, в качестве критериев выбора видов — источников Хн могут быть использованы: 1) жесткие природно-климатические условия обитания; 2) короткий период адаптации новорожденных к факторам окружающей среды или зрелорождаемость; 3) высокое содержание протеинов в молоке.

Глава 6

ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ НУТРИЕНТОВ В МОЛОКЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Вариации состава основных нутриентов молока млекопитающих являются результатом естественного отбора, связанного с адаптацией к природно-климатическим условиям обитания, пищевым ресурсам и филогенетической историей [100, 105].

На примере нескольких видов млекопитающих (северный олень, одногорбый верблюд, альпака) мы показали, что одним из вариантов адаптации к суровым условиям обитания является сокращение периода взросления молодняка, которое сопровождается увеличением относительного содержания белков в молоке. Период только молочного вскармливания в этом случае должен быть коротким, но чрезвычайно эффективным. Молоко видов, вынужденных приспосабливаться к обитанию в суровых природно-климатических условиях, как правило, имеет повышенное по сравнению с молоком коровы содержание нутриентов, в том числе основных молочных белков — казеинов, что предполагает синтез в желудках новорожденных высокоэффективных МФ, которые могут обладать технологическими свойствами, привлекательными для сыроделия.

***Авторская ремарка:** количественное содержание нутриентов в коровьем молоке берется за точку отсчета, поскольку именно оно формирует основную сырьевую базу сыроделия, а рХн коровы является одним из эталонных МФ с самой богатой практикой использования в сыроделии.*

Фактически единственные данные, позволяющие провести умозрительную параллель между концентрацией белка в молоке и ферментативной эффективностью Хн, представлены в работе Vallejo et al. [12]. Авторы данного исследования показали, что константа специфичности, или каталитическая эффективность (k_{cat}/K_m , $mM^{-1}s^{-1}$) генно-инженерных химозинов по отношению к к-казеину коровы в ряду: рХн козы (*Capra hircus*), рХн водяного буйвола (*Bubalus arnee bubalis*), рХн коровы (*Bos taurus*) и рХн одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) — повышалась, составляла соответственно 8,49; 1,37; 0,76; 0,53 и положительно коррелировала с относительным содержанием к-казеинов в молоке этих видов животных [12].

В этой связи представляет интерес сравнение количественного состава основных нутриентов молока различных видов млекопитающих.

Молоко млекопитающих содержит два типа белков: сывороточные белки (собирательное название большой группы протеинов, основными из кото-

рых являются альбумины, ферменты, иммуноглобулины, β -лактоглобулины и α -лактальбумины) и казеины (α -, β -, и κ -казеины). Сывороточные белки в массе своей являются функциональными и выполняют регуляторные, каталитические, транспортные, защитные и некоторые другие функции [115–121]. Казеины выполняют роль основных питательных белков и обеспечивают новорожденного кальцием, фосфором, аминокислотами и энергией (по энергетической ценности уступают только липидам). Уникальная структура казеинов обеспечивает свертывание молока и образование молочного сгустка под действием молокосвертывающих гастральных протеиназ, прежде всего химозина [45]. Относительное содержание сывороточных белков и казеинов в молоке различных видов млекопитающих варьирует в широком диапазоне. В коровьем молоке содержание казеинов и сывороточных белков составляет $\approx 2,6\%$ и $\approx 0,7\%$. Напротив, в молоке человека концентрация казеинов равна $\approx 0,2\%$, а сывороточных белков — $\approx 0,6\%$. По сравнению с другими нутриентами белки молока, не считая человека и нескольких видов одомашненных млекопитающих, изучены слабо [58, 100].

Аминокислотные последовательности и близкие физико-химические свойства α - и β -казеинов предполагают происхождение этих белков от общего предшественника. Филогенетическая история, структура и свойства κ -КЗ отличаются от других представителей семейства казеинов. В частности, κ -КЗ растворим в присутствии Ca^{2+} , содержит остатки углеводов, в меньшей степени фосфорилирован, причем сайты фосфорилирования не группируются в кластеры. Но главное свойство κ -КЗ, выделяющее его среди всех других казеинов, — высокая чувствительность к протеолитическому действию Хн [65]. Химозин коровы с высокой скоростью и специфичностью гидролизует коровий κ -КЗ по связи Phe105-Met106, что инициирует образование молочного сгустка [122, 123].

В зависимости от видового происхождения и физико-химических свойств — степени гидрофобности, содержания углеводов, а.к. состава и, самое главное, структуры сайта протеолитической деградации химозином, Mercier et al. (1976) [124] и Nakhasi et al. (1974) [125] предложили условно разделить κ -КЗ млекопитающих на две основные группы. По данным этих авторов, κ -КЗ группы № 1 характеризуются низкой гидрофобностью и уровнем гликозилирования, гидролизуются по связи Phe105-Met106 и обнаруживаются преимущественно в подотряде Жвачные (*Ruminantia*) у представителей семейств: Полорогие (*Bovidae*), Кабарговые (*Moschidae*), Оленьковые (*Tragulidae*), Вилороговые (*Antilocapridae*), Оленевые (*Cervidae*), а также в отрядах Зайцеобразные (*Lagomorpha*) и у некоторых Грызунов (*Rodentia*).

У κ -КЗ группы № 2 Хн гидролизует связь Phe105-Ile106 или Phe105-Leu106. Каппа-казеины этой группы более гидрофобны, содержат больше

остатков Pro, в большей степени гликозилированы и характерны для представителей отрядов Приматы (*Primates*), Китообразные (*Cetacea*), Непарнокопытные (*Perissodactyla*), семейств Свины (*Suidae*), Пекариевые (*Tayassuidae*), Верблюдовые (*Camelidae*) [100]. При этом, как замечают Osthoff et al., четкой групповой принадлежности к-КЗ к определенному таксону нет. Например, в отряде Грызуны (*Rodentia*) у морской свинки (семейство Свинковые, *Caviidae*) наблюдается к-КЗ группы № 1, тогда как у мыши и крысы (семейство Мышиные, *Muridae*) выявлены к-КЗ группы № 2 [100]. В 2000 г. Stasiuk et al. показали, что к-КЗ лисьего кузу (*Trichosurus vulpecula*), возможно, гидролизуетс химозином по связи Phe-Ala [126]. Таким образом, не исключено, что к-КЗ Сумчатых (*Marsupialia*) образуют отдельную группу (№ 3).

Авторская ремарка: как будет показано ниже (в гл. II), вероятно, существуют к-КЗ, относящиеся к четвертой и пятой группе, у которых в положении 105–106 присутствуют а.к. остатки, отличные от групп № 1, № 2 и № 3.

Если рассматривать молоко как среду, в которой происходит взаимодействие к-КЗ и Хн, то кроме концентрации белка любопытно оценить содержание в нем и других нутриентов. Прежде всего это касается содержания жиров и углеводов, поскольку увеличение концентрации сухих веществ в молоке приводит к увеличению его вязкости. Повышенная вязкость молока затрудняет диффузию и замедляет образование фермент-субстратного комплекса Хн — к-КЗ, что сказывается на параметрах ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментен [127].

Скорость гидролиза связи Phe105-Met106 в молекуле к-КЗ примерно в 1000 раз выше, чем скорость гидролиза любой другой пептидной связи в молекулах α -, β - и к-казеинов, а концентрация субстрата при свертывании молока в сырodelии многократно превосходит концентрацию вносимого молоко-свертывающего фермента. Время достижения стационарного равновесия для реакции к-КЗ с химозином $\ll 1$ секунды, а K_m , по данным разных авторов, составляет $1,0 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-4}$ М [128, 129]. Концентрация к-КЗ в молоке коровы составляет $1,0$ – $1,5 \times 10^{-4}$ М. По данным [128], кинетика гидролиза к-КЗ химозином имеет нулевой порядок при низких значениях K_m ($\approx 10^{-6}$ М) и стремится к кинетике первого порядка при $K_m = 5,0 \times 10^{-4}$ М. При этом низкие значения K_m были получены для изолированного к-КЗ, а высокие — при использовании в качестве субстрата казеиновых мицелл.

Большая аффинность химозина к очищенному субстрату, по сравнению с мицеллярным, может объясняться повышенной вязкостью коллоидного раствора мицелл и затрудненной стерической доступностью к-КЗ. Молекулы к-КЗ локализованы в периферическом, поверхностном слое мицелл, поэтому гидролитической атаке химозина должно предшество-

вать его связывание с поверхностью казеиновой мицеллы. Для того чтобы связаться с субстратом, молокосвертывающему ферменту необходимо приблизиться к мицелле и внедриться в волосковый слой. В случае гомогенного и водорастворимого к-КЗ такой необходимости нет. Этим и объясняются различия в кинетических параметрах реакций гидролиза очищенного и мицеллярного к-казеина. Кроме того, величина температурного коэффициента Q_{10} для ферментативного свертывания молока составляет не 2, а $\sim 1,4$, что указывает на диффузионную зависимость процесса гидролиза к-КЗ химозином [130]. Поэтому можно предполагать, что виды, для которых характерно высокое содержание сухих веществ в молоке, должны экспрессировать химозины, способные эффективно гидролизовать связь Phe105-Met106 (или ее аналог) в молекуле к-КЗ и вызывать коагуляцию молока в условиях повышенной вязкости. Если это предположение справедливо, то химозины, полученные от видов, секретирующих концентрированное молоко, с содержанием сухих веществ $>15\%$ должны эффективнее свертывать молоко коровы (концентрация сухих веществ $\approx 12\%$), чем коровий Хн.

Одним из важных факторов, влияющих на количественный и качественный состав молока, является стадия лактации [51, 100, 101, 114, 131, 132]. Известно, что на протяжении лактации состав молока может значительно варьировать. Примером краткосрочной вариабельности может быть изменение состава молозива и молока жвачных (табл. 3), при котором изначально высокие концентрации белков в течение непродолжительного периода постепенно понижаются.

Таблица 3

Изменение состава молозива и молока у коров породы Holstein
(по данным [133])

Компоненты	Дни получения образцов с момента родов			
	молозиво			молоко
	1-й	2-й	3-й	6-й
Сухие в-ва (%)	23,9	17,9	14,1	12,9
Общий белок (%)	14,0	8,4	5,1	3,1
Казеины (%)	4,8	4,3	3,8	2,5
Альбумины (%)	6,0	4,2	2,4	0,5
Иммуноглобулины (%)	6,0	4,2	2,4	0,09
Иммуноглобулин G (г/л)	32	25	15	0,6
Лактоза (%)	2,7	3,9	4,4	5,0
Жир (%)	6,7	5,4	3,9	4,0

Для различных видов сумчатых млекопитающих характерны долгосрочные изменения концентрации основных нутриентов молока в процессе выкармливания детенышей [51, 134–141]. В отличие от большинства плацентарных животных, молоко Сумчатых в процессе лактации постоянно изменяется от разбавленного (с низким содержанием жиров и белков) до концентрированного (высокожирного и высокобелкового). В качестве примера можно привести изменение состава молока крапчатой сумчатой куницы (*Dasyurus viverrinus*), трехпалого потору (*Potorous tridactylus*), короткомордого кенгуру (*Bettongia gaimardi*) и большого бандикута (*Isodon macrourus*) (Приложение Б), у которых концентрация белка от начала к концу лактации увеличивается в 2,8–3,5 раза. При этом на различных стадиях лактации можно наблюдать экспрессию различных белков, основными из которых являются: казеины, α -лактальбумин, β -лактоглобулин, Ig, неонатальные Fc α -рецепторы Ig, лактоферрин, ферритин, трансферрин, β -галактозидаза и некоторые другие. Кроме того, на разных стадиях лактации экспрессируется ряд протеинов, чьи функции в полном объеме не изучены: белок ранней лактации (ELP = early-lactation protein (англ.)), А-белок поздней лактации (LLP-A = late-lactation protein A (англ.)), сывороточный кислый протеин (WAP = whey acidic protein (англ.)) [51].

Это создает определенные сложности при сравнении данных о составе молока, полученного от разных видов, поскольку зачастую информация о том, на какой стадии лактации получен исследуемый образец, отсутствует. Для сопоставления отдельных отрядов необходимо максимально возможное увеличение числа видов, их представляющих, что может хотя бы отчасти нивелировать неоднородность, фрагментарность и противоречивость данных, имеющих в научной литературе.

Нарастание концентрации белка в молоке Сумчатых в процессе лактации может быть связано с механизмом передачи новорожденному факторов пассивного иммунитета. В частности, было показано, что белки молока, обеспечивающие пассивный иммунитет Сумчатых, передаются новорожденному в течение длительного периода [51, 134, 140]. Это позволяет предположить возможность обнаружения у Сумчатых химозинов (или других гастральных протеиназ) с низкой общей ПА, обеспечивающих «протеолитическую безопасность» факторов пассивного иммунитета и потому привлекательных для сыроделия. По состоянию на 2020 г. данных о технологических и биохимических свойствах химозинов Сумчатых нет, рекомбинантные аналоги этих ферментов не получены, несмотря на то что в базах NCBI есть информация о четырех Хн-подобных структурах, гомологичных коровьему Хн на 65,2–72,4 % (табл. 1).

Немногочисленные данные о структуре к-КЗ аплацентарных указывают на то, что Хн-чувствительная связь в этих белках отличается от Хн-чувствительной связи в к-КЗ коровы [126]. Как-либо прогнозировать способность Хн-подобных ферментов Сумчатых коагулировать молоко коровы сложно. Необходимо получить и исследовать хотя бы один рХн представителя Сумчатых и после этого с учетом уже известных данных о молекулярной структуре и степени гомологии Хн-подобных белков и к-казеинов пытаться экстраполировать полученные данные на другие виды, принадлежащие к данной группе млекопитающих.

Рассматривая представителей отряда Парнокопытных, можно прийти к заключению, что **молоко диких и полудомашних** (як, северный олень, лось, овцебык, белохвостый олень, благородный олень, газель-доркас, черная антилопа, антилопа-прыгун и др.) млекопитающих, как правило, **содержит больше белка** и жира, чем молоко полностью одомашненных видов (корова, коза, овца), что подтверждается данными литературы [114, 131]. На эту тенденцию следует обратить внимание при выборе потенциального продуцента Хн по критерию содержания белка в молоке.

Сравнивая нутриентный состав молока различных отрядов (Приложение Б), можно сделать вывод, что в целом молоко Приматов (за исключением некоторых видов низших приматов и обезьян Нового Света) и Непарнокопытных (за исключением тапиров) — это относительно разбавленное молоко с низким содержанием сухих веществ, жиров и белков, но, как правило, богатое углеводами. Представители остальных отрядов Млекопитающих секретируют молоко с более высоким содержанием жира и белка. У Хищных, Парнокопытных, Китообразных и Сумчатых можно отметить виды с исключительно высоким содержанием белка (>10 %) и жира (>20 %), а также очень низкими концентрациями углеводов (вплоть до их полного отсутствия у некоторых морских млекопитающих), что связано с адаптацией к условиям обитания, а также с особенностями репродукции и стратегией лактации [51, 100, 101, 114, 131].

В случае Хищных, Парнокопытных и Китообразных насыщенность молока белками и жирами наблюдается, как правило, на ранних стадиях лактации и обусловлена необходимостью обеспечить новорожденного факторами пассивного иммунитета и высококалорийным питанием. Детеныши многих видов, относящихся к этим отрядам, появляются на свет высокоразвитыми и начинают рано потреблять твердые корма [101]. В молоке большинства млекопитающих, относящихся к этим отрядам, на ранних стадиях лактации регистрируются максимальные концентрации сухих веществ, которые впоследствии постепенно снижаются.

Иная динамика изменения содержания нутриентов в молоке наблюдается у Сумчатых и Однопроходных.

У представителей инфракласса Сумчатых новорожденные появляются на свет малоразвитыми, значительную часть неонатального периода проводят в сумке, и главным источником энергии на этом этапе для них являются углеводы. В качестве классической модели стратегии репродукции и лактации Сумчатых принято считать таммара, или кустарникового валлаби (он же — кенгуру Евгении) [51]. Период беременности у Сумчатых очень короткий (в зависимости от вида — 8–40 дней), новорожденный появляется на свет почти в эмбриональном состоянии, и его доразвитие происходит в материнской сумке. Беременность у кустарникового валлаби длится около 26 дней, за которыми следует длительный, 300–350-дневный период лактации (для сравнения: беременность у мыши длится 20 дней, а период лактации — 20–24 дня) [142]. Динамика изменения концентрации белков, жиров и углеводов в процессе лактации кустарникового валлаби представлена на рисунке 1. В период, который соответствует фазам 2А и 2В, основным источником энергии для детеныша являются сахара. И только после набора новорожденным определенной массы тела, формирования ферментных систем, позволяющих использовать в качестве источников энергии и аминокислот липиды и белки, концентрация этих нутриентов в молоке начинает возрастать (фаза 3) и достигает максимальных значений к тому времени, когда молодой кенгуру начинает покидать сумку [51].

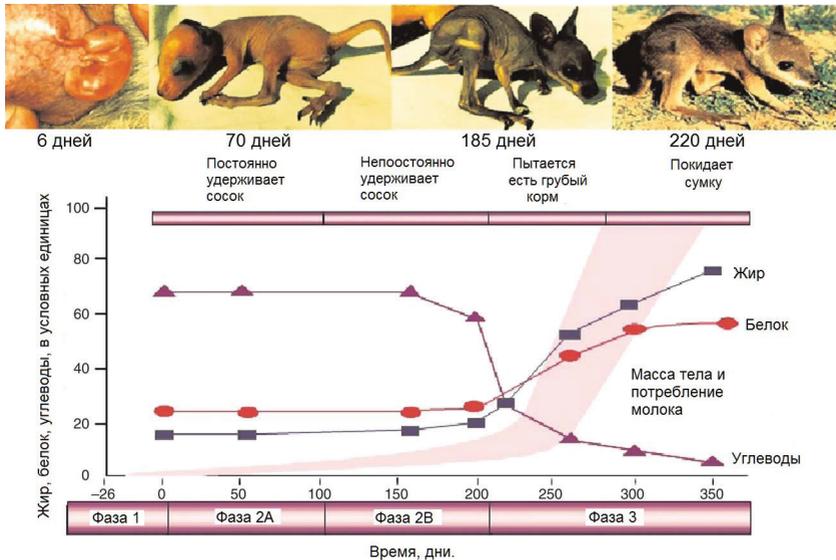


Рис. 1. Модель репродукции и лактации Сумчатых на примере таммара (кенгуру Евгении). Изменение концентрации белков, жиров и углеводов в процессе лактации (взято из работы [51])

Детеныши Сумчатых рождаются не только недоразвитыми, но и с практически несформированной иммунной системой. Чтобы защитить новорожденных от микробных патогенов окружающей среды, до формирования собственной системы защиты с молоком секретируются белковые факторы пассивного иммунитета. В целом концентрация Ig в молоке Сумчатых намного ниже, чем в молоке плацентарных животных. Но в отличие от Плацентарных, адсорбция различных изотипов Ig и других белков осуществляется у Сумчатых не только на ранних стадиях молочного вскармливания, а на протяжении всего периода лактации. А это означает, что синтезируемые в это же время молокосвертывающие гастральные протеиназы, в частности Хн, должны обладать низкой неспецифической ПА.

Интересно, что в молочной железе кенгуру Евгении в процессе лактации наблюдается два пика повышенной экспрессии генов Ig, которые совпадают с рождением детеныша и его первыми попытками покинуть материнскую сумку. Повышенная экспрессия факторов пассивного иммунитета в процессе молочного вскармливания, совпадающая с периодами контакта новорожденного и детеныша с внешней средой, является адаптационным механизмом материнской иммунологической защиты молодняка у Сумчатых [143]. Поэтому, несмотря на изначально низкие концентрации белков в молоке Сумчатых, нельзя исключить вероятность обнаружения в отрядах этого инфракласса химозинов, представляющих технологический интерес.

Для трех отрядов Сумчатых (Ценолесты (*Paucituberculata*), Микробиотерии (*Microbiotheria*), Сумчатые кроты (*Notoryctemorphia*)) и четырех отрядов плацентарных млекопитающих (Афросорициды (*Afrosoricida*), Прыгунчиковые (*Macroscelidea*), Дамановые (*Hyracoidea*) и Панголины (*Pholidota*)) данные о содержании основных нутриентов в молоке не найдены.

Несмотря на отсутствие данных о составе молока, хотелось бы отметить некоторых представителей семейства Тенреки, или Щетинковые ежи (Tenrecidae), входящего в состав отряда Афросорициды. Один из видов этого семейства — обыкновенный тенрек (*Tenrec ecaudatus*) — необычен тем, что самки приносят максимальное для высших млекопитающих число детенышей в помете — до 32 штук (!). Для тенреков характерно быстрое развитие новорожденных, которые рождаются слепыми и безволосыми. Например, у детенышей малого ежового тенрека (*Echinops telfairi*) глаза открываются через 7–9 дней, в 10-дневном возрасте они следуют за матерью, с 14-го дня начинают употреблять твердый корм. У некоторых видов, например равнинных полосатых тенреков, темпы взросления настолько

высоки, что самки могут принести потомство в возрасте 25 дней от роду. Продолжительность жизни в неволе — 13 лет. Все это позволяет предполагать высокое содержание сухих веществ в молоке, в том числе казеинов, и, следовательно, вероятность экспрессии химозинов с высокой МА. Никаких данных о структуре или биохимических свойствах к-КЗ и химозинов этих животных нет.

Таким образом, можно предполагать, что высокие концентрации белков и сухих веществ в молоке связаны с экспрессией высокоактивных химозинов. Если выдвинутое предположение верно, то по данным критериям (концентрация сухих веществ и концентрация белка в молоке) представители по крайней мере двух отрядов Млекопитающих — Приматов и Непарнокопытных — не представляют интереса в качестве продуцентов Хн. Во всех остальных отрядах, для представителей которых известно содержание основных нутриентов, есть виды, которые по данному критерию могут рассматриваться в качестве потенциальных претендентов на получение рекомбинантных химозинов и исследование их технологических свойств.

Глава 7

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОХИМИЧЕСКИХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗВЕСТНЫХ ВИДОВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМОЗИНОВ

В современной научной периодике имеются данные о получении и исследовании ряда биохимических и технологических свойств генно-инженерных Хн различных видов, претендовавших или претендующих на роль МФ для сыроделия: коровы, одногорбого верблюда, овцы, козы, буйвола, яка и альпака. Для получения рХн могут использоваться системы экспрессии бактерий (*Escherichia coli*), дрожжей (*Komagataella (panee — Pichia) pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*), плесневых грибов (*Aspergillus niger*), высших млекопитающих (трансгенные овцы) и растений (рапс, лен, кукуруза) [12–20, 22, 24–28, 164–180]. В настоящее время в производстве сыров официально используются рХн коровы и одногорбого верблюда, синтезируемые в системах экспрессии высшего плесневого гриба *Aspergillus niger var. Awamori* и молочных дрожжей *Kluveromyces lactis* [176]. Источниками генов всех вышеперечисленных рекомбинантных химозинов являются виды из отряда Парнокопытные (*Artiodactyla*). Технологические и биохимические свойства Хн животных, не относящихся к отряду Парнокопытные, в настоящее время остаются *terra incognita*, их получение и исследование является одной из актуальных задач биотехнологии.

Стоит отдельно отметить статью Т. Кэгеуама [181], в которой сообщается о получении рХн игрунки обыкновенной (*Callithrix jacchus*), экспрессированного в системе *Saccharomyces cerevisiae*, с целью исследования его субстратной специфичности на синтетических пептидах, отличающихся по структуре от Хн-чувствительного участка к-КЗ коровы. Никаких данных о МА или других технологических свойствах рХн *Callithrix jacchus* в указанной работе не представлено (за исключением рН оптимума протеолитической активности, равного $\approx 4,0$). В другой статье того же автора [182] сообщалось, что исследованные им натуральные химозины ряда обезьян Нового Света (кроме игрунки это: эдипов тамарин (*Saguinus oedipus*), белчий саймири (*Saimiri sciureus*), капуцин-фавн (*Cebus apella*)) экспрессируются не как неонатальные гастральные молокосвертывающие протеиназы, а как пепсиноподобные ферменты взрослых млекопитающих с высокой общей ПА, что делает их малопривлекательными для использования в сыроделии. Поэтому свойства хи-

мозинов обезьян Нового Света, исследованных Т. Кагеуата, в дальнейшем не рассматриваются.

После получения нового вида рХн в первую очередь оценивается его молокосвертывающая (специфическая) активность на коровьем молоке, которое является основным сырьем для промышленной выработки сыров [12–20, 22, 24–28, 164–177], и только после этого — другие биохимические и технологические параметры, вплоть до определения остаточных количеств нового фермента в сыре [183].

Несколько реже исследуются параметры кинетики Михаэлиса-Ментен [12, 14, 19, 31, 166, 171, 184, 185]: константа Михаэлиса (K_m), число оборотов фермента (k_{cat}), каталитическая эффективность, или константа специфичности (k_{cat} / K_m), — хотя, казалось бы, именно они важны для глубокой биохимической характеристики нового рекомбинантного фермента. В настоящее время параметры кинетики Михаэлиса-Ментен определены для рекомбинантных химозинов четырех видов Парнокопытных — коровы, одnogорбого верблюда, козы и буйвола (табл. 4).

Отсутствие единой стандартизированной методики, использование химозинов, синтезированных в про- и эукариотических системах экспрессии, и применение различных хромогенных субстратов дает настолько противоречивую картину кинетических свойств ферментов, что сравнение данных, полученных разными научными группами (порой на одних и тех же рХн и субстратах), превращается в решение нерешаемой головоломки. Например, константы Михаэлиса, полученные с использованием одного и того же субстрата (флюоресцеин тиокарбамоил-к-казеин [185]), для препаратов рХн буйвола, экспрессированного в *P. pastoris*, различаются более чем в 15 раз [19, 12] (табл. 4).

По данным портала BRENDA, K_m для натуральных и рекомбинантных химозинов 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?esno=3.4.23.4>]. Вместе с тем, исходя из результатов, представленных в работе Jensen et al., можно сделать вывод, что такая посттрансляционная модификация, как гликозилирование, незначительно влияет на основные параметры ферментативной кинетики рХн верблюда и коровы [31] (табл. 4).

Таблица 4

Параметры кинетики Михаэлиса-Ментен натуральных (видовое название выделено жирным шрифтом) и рекомбинантных химозинов

Вид Хн	Продуцент	K _m (мМ)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} / K _m (мМ ⁻¹ s ⁻¹)	Субстрат	Литература
Натуральный Хн В коровы	<i>Bos taurus</i>	0,87	22,2	25,5	1	[184]
рХн В коровы	<i>Escherichia coli</i>	0,38	18,9	49,7	1	[166]
рХн В коровы (мутант: +His-Gly на С-конце)	<i>Escherichia coli</i>	0,67	2,52	3,8	1	[166]
рХн В коровы (мутант: Thr77→Asp)	<i>Escherichia coli</i>	0,79	16,8	21,3	1	[166]
рХн коровы	<i>Aspergillus niger</i>	0,165	44,3	268,0	2	[14]
рХн одногорбого верблюда	<i>Aspergillus niger</i>	0,077	11,7	152,0	2	[14]
рХн коровы	<i>Aspergillus niger</i>	0,134	4,3	32,2	3	[14]
рХн одногорбого верблюда	<i>Aspergillus niger</i>	0,056	5,1	91,3	3	[14]
Натуральный Хн буйвола	<i>Bubalus bubalis</i>	2,108	-	-	4	[185]
рХн коровы (Pfizer)	<i>Escherichia coli</i>	2,280	-	-	4	[185]
рХн буйвола	<i>Pichia pastoris</i>	0,012	-	-	4	[19]
рХн козы	<i>Pichia pastoris</i>	0,0178	-	-	4	[171]
рХн буйвола	<i>Pichia pastoris</i>	0,00076	0,00104	1,37	4	[12]

Вид Хн	Продуцент	Км (мМ)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat} / K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Субстрат	Литература
рХн козы	<i>Pichia pastoris</i>	0,00039	0,00331	8,49	4	[12]
рХн коровы (ChyMax, Chr. Hansen)	<i>Aspergillus niger</i>	0,00819	0,00621	0,76	4	[12]
рХн одногорбого верблюда (ChyMax M, Chr. Hansen)	<i>Aspergillus niger</i>	0,00060	0,00032	0,53	4	[12]
рХн коровы (ChyMax Plus, Chr. Hansen), негликозилированный	<i>Aspergillus niger</i>	0,038 (pH 6,65) 0,026 (pH 6,00) 0,022 (pH 5,50)	8 (pH 6,65) 28 (pH 6,00) 28 (pH 5,50)	0,20 (pH 6,65) 1,1 (pH 6,00) 1,3 (pH 5,50)	5	[31]
рХн коровы (ChyMax Plus, Chr. Hansen), 1-гликозилированный	<i>Aspergillus niger</i>	0,037 (pH 6,65) 0,028 (pH 6,00) 0,026 (pH 5,50)	7 (pH 6,65) 27 (pH 6,00) 28 (pH 5,50)	0,18 (pH 6,65) 1,0 (pH 6,00) 1,1 (pH 5,50)	5	[31]
рХн одногорбого верблюда (ChyMax M, Chr. Hansen), негликозилированный	<i>Aspergillus niger</i>	0,018 (pH 6,65) 0,011 (pH 6,00) 0,007 (pH 5,50)	11 (pH 6,65) 53 (pH 6,00) 47 (pH 5,50)	0,6 (pH 6,65) 5,0 (pH 6,00) 6,8 (pH 5,50)	5	[31]
рХн одногорбого верблюда (ChyMax M, Chr. Hansen), 2-гликозилированный	<i>Aspergillus niger</i>	0,020 (pH 6,65) 0,011 (pH 6,00) 0,008 (pH 5,50)	14 (pH 6,65) 65 (pH 6,00) 59 (pH 5,50)	0,7 (pH 6,65) 5,8 (pH 6,00) 7,4 (pH 5,50)	5	[31]

Примечание: 1 — *Leu-Ser-Phe(NO₂)-Nle-Ala-Leu-OMe*; 2 — *NH₂-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-(p-NO₂)Phe-Met-Ala-Ile-COOH* (имитация κ-КЗ коровы); 3 — *NH₂-Arg-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Ser-(p-NO₂)Phe-Ile-Ala-Ile-COOH* (имитация κ-КЗ верблюда); 4 — флюоресцеин тиокарбамоил-κ-казеин коровы (FTC-κ-Casein); 5 — *Dabcyl-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Lys(5-FAM)-Lys-Lys-NH₂* (*Dabcyl* = 4-(dimethylaminoazo) benzene-4-carboxylic acid, *5-FAM* = 5-carboxyfluorescein).

Более информативными и поддающимися сравнительному анализу выглядят результаты, полученные на одном и том же субстрате в рамках одного исследования [12, 14, 166, 183]. Но даже в этом случае мы иногда сталкиваемся с труднообъяснимыми противоречиями. Согласно данным Kappeler et al. [14], рХн верблюда превосходит рХн коровы по основным технологическим параметрам, за исключением термостабильности. Действительно, параметры кинетики Михаэлиса-Ментен указывают на примерно вдвое более высокую аффинность рХн верблюда к используемому хромогенному субстрату (имитирующему к-КЗ коровы). Но 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. 4). И если бы мы оценивали способность рХн верблюда гидролизовать к-КЗ коровы исключительно по его кинетическим параметрам, полученным на модельном субстрате, он бы вчистую проиграл рекомбинантному химозину коровы. Однако совокупность технологических свойств [14] и практика использования этих ферментов в сыроделии [186–188] свидетельствуют о высокой биохимической и технологической эффективности как рХн коровы, так и рХн одногорбого верблюда.

Это заставляет задуматься о значимости результатов, полученных с использованием хромогенных субстратов, имитирующих изолированный водорастворимый к-КЗ, при оценке технологических перспектив новых рХн. Согласно поликонденсационной модели D.S. Horne, 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» [44, 45]. Внедриться в этот слой и добраться до ключевой связи к-казеина химозину гораздо сложнее, чем в случае водорастворимого субстрата. Именно поэтому кинетические параметры, полученные на водорастворимых аналогах к-КЗ и на препаратах мицеллярного к-КЗ, различаются [128, 130]. И именно поэтому методика определения параметров кинетики Михаэлиса-Ментен для оценки ферментативной эффективности рекомбинантных химозинов требует унификации. Наиболее подходящим искусственным субстратом для изучения кинетики Михаэлиса-Ментен химозинов мог бы стать C-терминальный фрагмент к-КЗ (например, f 96-169), закрепленный N-концевым участком на поверхности белковых (α -, β -казеиновых)

или фосфолипидных мицелл или связанный с искусственной гидрофобной поверхностью.

Более сопоставимыми выглядят данные исследования технологических характеристик новых рХн. Но для того чтобы говорить о перспективах использовании нового рХн в сыроделии, необходимо исследовать не отдельные технологические параметры, а **комплекс технологических свойств**, непосредственно влияющих на процесс выработки сыров: молокосвертывающую активность, общую протеолитическую активность и специфичность, термостабильность, зависимость МА от рН и концентрации ионов кальция.

Парадоксально, но в полном объеме технологические и биохимические свойства исследованы только для двух коммерческих рекомбинантных МФ: рХн коровы и одногорбого верблюда. Для рХн яка, альпака и овцы неизвестны параметры кинетики Михаэлиса-Ментен, для рХн козы и буйвола нет данных о зависимости МА от концентрации ионов кальция. Для рХн яка предстоит установить общую ПА, специфичность и зависимость коагуляционной активности от концентрации хлорида кальция в молоке.

Молокосвертывающая активность, общая протеолитическая активность и специфичность. Молокосвертывающая активность является главной технологической характеристикой любого нового рХн, поскольку указывает на его способность гидролизовать Хн-чувствительную пептидную связь в молекуле к-КЗ и вызывать коагуляцию молока. Специалистам в области сыроделия хорошо известен так называемый «парадокс химозина коровы и молока верблюда», который заключается в неспособности коровьего Хн свертывать молоко верблюда, при этом верблюжий фермент способен эффективно коагулировать молоко коровы. Поэтому исследование любого нового МФ для сыроделия начинается с определения его МА по отношению к коровьему молоку как основному сырью для производства сыров. Только убедившись в способности нового фермента свертывать коровье молоко, целесообразно приступить к исследованию остальных технологических свойств.

Характеризуя новый рХн и оценивая его пригодность для выработки сыров, наряду с коагуляционной крайне важно учитывать его протеолитическую активность [189, 190]. В сыроделии различают два типа ПА: 1) специфическую, или молокосвертывающую активность — способность гидролизовать **одну** пептидную связь в молекуле к-КЗ (для рХн коровы и верблюда — это связь Phe105-Met106 в коровьем к-КЗ); 2) общую ПА — способность гидролизовать **любые** пептидные связи в α -, β - и к-казеинах молока [190].

Высокая общая протеолитическая активность МФ считается крайне негативным фактором в сыроделии, поскольку приводит к снижению выхода сыра из-за потерь продуктов протеолиза с сывороткой [191]. Остающийся в сырном зерне коагулянт с высокой общей ПА становится причиной формирования пороков текстуры и вкуса (горечь) в длительно созревающих и хранящихся сырах [192]. Кроме того, применение МФ с высокой ПА ухудшает технологические характеристики подсырной сыворотки, используемой при производстве некоторых молочных продуктов. Поэтому идеальный рХн для сыроделия должен при максимальной МА иметь минимальную общую ПА [4, 190].

Химозин способен гидролизовать пептидные связи не только в к-КЗ, но и в других белках, в частности, в α - и β -казеинах. Для оценки способности МФ гидролизовать единственную, «ключевую» связь к-КЗ рассчитывается его **специфичность**, которая определяется как отношение молокосвертывающей и общей ПА (МА/ПА). В соответствии с классификацией М. Harboe et al. [4], коммерческие МФ ранжируются по мере уменьшения специфичности следующим образом: рХн верблюда > рХн коровы, химозин теленка > говяжий пепсин > мукопепсины > эндотиапепсин. Данный ряд отражает технологическую универсальность МФ (чем выше специфичность, тем шире спектр сыров, для выработки которых он может быть рекомендован) и указывает на возрастающую вероятность пороков вкуса и консистенции при использовании коагулянта с высокой общей ПА для выработки сыров с длительными сроками созревания и хранения [20].

Для сравнения МА общей ПА и специфичности химозинов различного генеза можно экстраполировать методику Kappeler et al. [14] на литературные данные определения ПА и МА (табл. 5).

Видно, что по специфичности рХн альпака превосходит рХн коровы, буйвола, козы и натуральный Хн свиньи, но уступает рХн верблюда. Химозины одногорбого верблюда и альпака — не единственные молокосвертывающие ферменты, превосходящие рХн коровы по специфичности. Лучшие, чем у коровьего фермента, соотношения МА и ПА имеют рХн буйвола и козы, но общая ПА этих ферментов и рХн коровы почти совпадают [12]. Противоречивые данные о МА, общей ПА и специфичности рХн верблюда и рХн коровы, публикуемые в работах [12] и [14], по-видимому, объясняются различными методическими подходами к определению этих параметров. Вместе с тем информация от Kappeler et al. [14] о более высокой специфичности рХн верблюда по сравнению с рХн коровы вызывает большее доверие, поскольку подтверждается данными других авторов, изучавших общую ПА этих ферментов непосредственно в сырах [186, 187].

Натуральный Хн свиньи также имеет более высокую специфичность, чем рХн коровы, однако в 4 раза уступает ему по МА (табл. 5). Это означает, что для свертывания одного и того же объема молока свиного химозина потребуется примерно в 4 раза больше, чем коровьего, что делает промышленное применение Хн свиньи экономически невыгодным.

Таблица 5

Молокосвертывающая активность (МА), общая протеолитическая активность (ПА) и специфичность (МА/ПА) натуральных и рекомбинантных химозинов (по данным [20], с дополнениями)

Тип химозина	МА ¹⁾	ПА ²⁾	МА/ПА	Примечания
рХн альпака ³⁾	102	34	3,0	¹⁾ — МА по отношению к молоку коровы, в % от МА рХн коровы. ²⁾ — общая ПА, в % от общей ПА рХн коровы. ³⁾ — по данным [20], рХн коровы и альпака экспрессированы в <i>E. coli</i> . ⁴⁾ — по данным [14], рХн коровы и верблюда экспрессированы в <i>A. niger</i> . ⁵⁾ — по данным [17], рХн коровы экспрессирован в <i>K. lactis</i> , рХн овцы экспрессирован в <i>E. coli</i> . ⁶⁾ — по данным [12], рХн коровы и верблюда экспрессированы в <i>A. niger</i> , рХн буйвола и козы — в <i>P. pastoris</i> . ⁷⁾ — по данным [27], рХн яка экспрессирован в <i>P. pastoris</i> . * — результаты исследования ПА и МА представлены в виде графиков, цифровых данных нет. ** — абсолютные значения МА, IMCU/мл
рХн коровы ³⁾	100	100	1,0	
рХн одногорбого верблюда ⁴⁾	170	25	7,0	
Натуральный Хн свиньи ⁴⁾	25	12	2,1	
рХн коровы ⁴⁾	100	100	1,0	
рХн овцы ⁵⁾	≈100*	≈98*	≈1,0*	
рХн коровы ⁵⁾	100	100	1,0	
рХн буйвола ⁶⁾	105	96	1,1	
рХн одногорбого верблюда ⁶⁾	99	110	0,9	
рХн коровы ⁶⁾	100	100	1,0	
рХн козы ⁶⁾	148	106	1,4	
рХн яка ⁷⁾	214**	-	-	

Получению рХн яка посвящены публикации [28] и [27]. Авторы первой работы сосредоточились на процедуре получения рХн яка и оценили только МА полученного препарата, которая составила ≈15 единиц Сокслета/мл [28]. Вторая статья [27] посвящена «крупномасштабному получению рХн А яка (*Bos grunniens*)». К сожалению, технологические свойства полученного в работе [27] фермента изучены неполно: МА определена, но нет ее сравнения с активностью рХн коровы (или другого контрольного препарата), изучены термостабильность, температурный оптимум, оптимум рН для МА и рН-стабильность. Общая ПА не определена, поэтому нет

возможности рассчитать специфичность, нет данных о зависимости МА от концентрации ионов кальция. Тем не менее авторы работы [27] выработали опытную партию «белого сыра» (white cheese) с применением рХн яка и провели контрольную выработку с использованием коммерческого рХн коровы (RENMAX 600 IMCU/ml, «Mayasan» (Istanbul, Turkey). Выход сыра в контроле составил 12,5 %, в опыте — 12,0 %. Меньший выход сыра в опытной выработке свидетельствует о потерях белка с сывороткой, что косвенно указывает на более высокую общую ПА рХн яка по сравнению с контрольным рХн коровы.

В 2001 г. Rogelj et al. сообщали о получении рХн овцы [17]. Протеолитическую активность овечьего рХн исследовали методом Кьельдала по изменению соотношения небелкового и общего азота. В сырах, выработанных с применением рХн овцы, через 60 дней с момента выработки общая ПА была на 28 % ниже, чем в контроле с рХн коровы. В работе [17] нет данных о содержании или активности рХн овцы и рХн коровы в исследованных сырах. Вместе с тем известно, что в зависимости от типа коагулянта, рН, температуры и содержания влаги в сырном зерне может оставаться до 30 % от внесенного МФ [193]. Согласно данным Bansal et al., в сырах типа Cheddar остается 10–17,5 % рХн коровы [194]. Поэтому не исключено, что наблюдаемые отличия в содержании продуктов протеолиза в сырах были обусловлены различной концентрацией рХн овцы и рХн коровы, оставшихся в сыре, а не разной общей ПА используемых коагулянтов. Данные Rogelj et al. о соотношении МА (при 4 мМ CaCl₂, 35°C, рН 6,0) и общей ПА (через 50 мин. инкубации) рХн овцы и коровы, полученные в процессе коагуляции молока, указывают на то, что специфичность этих ферментов примерно одинакова (табл. 5).

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

Термостабильность. Температурная стабильность определяется как температурный диапазон, в котором МФ проявляет высокую (≥ 80 %) МА. Порог термоинактивации — это температура, при которой раствор МФ начинает терять МА. Термостабильность (ТС) наряду с МА, общей ПА и специфичностью является важнейшей технологической характеристикой МФ. На стадии свертывания молока под воздействием Хн, α - и β -казеины не гидролизуются. Протеолитическая деградация пара-к-казеина (f Glu1-Phe105) α s1-, α s2- и β -казеинов за счет активности фермента, остающегося в сгустке, начинается позже, в процессе созревания сыра [186, 193]. 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 [20].

Сравнивая технологические свойства генно-инженерных химозинов, Kappeler et al. [14] сделали вывод о том, что верблюжий рХн имеет более высокий порог термоинактивации, чем рХн коровы. Кроме того, этими же авторами было показано, что общая ПА рХн коровы и верблюда при повышении температуры возрастает. Аналогичные результаты получены в работе Беленькой с соавт. [20] для рХн коровы и альпака, экспрессированных в *E. coli*. Таким образом, термостабильный МФ может увеличивать нежелательную ПА после разрезания молочного сгустка на технологических стадиях обработки сырного зерна, связанных с повышением температуры нагревания.

Результаты, полученные Kappeler et al. [14], согласуются с данными Costabel et al. [186], которые установили, что интенсивность протеолиза в сырах типа Reggianito зависит от ТС используемого коагулянта и температуры нагревания сгустка. Авторы исследовали термолабильные коагулянты молока с низкой общей ПА — рХн коровы и одногорбого верблюда. Известно, что в молекуле α s1-казеина химозины атакуют связь Phe23-Phe24 с образованием двух продуктов: α s1 (f1-23) и α s1-I (f24-199), которые используются в качестве маркеров общей ПА в сырах. При выработке сыров типа Reggianito с применением рХн коровы было показано, что увеличение температуры нагревания сгустка с 50 °С до 56 °С приводит к значительному снижению концентрации продуктов протеолиза α s1-казеина, в частности, водонерастворимого (гидрофобного) полипептида α s1-I (f24-199). Происходит это за счет более полной инактивации МФ при увеличенной температуре обработки сгустка. В сырах, выработанных с применением более термостабильного рХн верблюда [14, 12], интенсивность протеолиза при температуре второго нагревания 56 °С была выше, чем при использовании рХн коровы [186]. Данное исследование — пример того, что МФ (в данном случае — рХн верблюда), имеющий вчетверо меньший уровень общего протеолиза, чем рХн коровы, но превосходящий его по ТС, может проявлять более высокую неспецифическую ПА в созревающих и хранящихся сырах.

В сыроделии сформировались определенные подходы к использованию МФ с различной ТС. Термолабильные ферменты предпочтительно применять при выработке сыров с высокой температурой второго нагре-

вания (52–58 °С) и длительными сроками созревания и хранения. Если термолабильный МФ полностью инактивируется при высокой температуре второго нагревания, это приведет к замедлению протеолиза в процессе созревания и хранения сыров. Примером реализации такой тактики может быть производство сыров с термолабильным МФ в летний период. Выработанную продукцию закладывают на длительное хранение и реализуют в осенне-зимний период, когда объемы выработки сыров снижаются. Термостабильные МФ, сохраняющие ферментативную активность при 60–70 °С, используются для производства быстрореализуемых мягких сыров с короткими сроками созревания и хранения или для выработки сыров без созревания [20].

Данные литературы о ТС химозинов различного генеза, представленные в таблице 6, свидетельствуют, что рХн одной и той же видовой принадлежности, но экспрессированные разными продуцентами, могут иметь разные показатели терморезистентности. В частности, температуры полной инактивации рХн верблюда, экспрессированного в высших плесневых грибах (*A. niger*) [14] и дрожжах (*P. pastoris*) [13], различаются на 10 °С, а по данным [12], верблюжий рХн даже после инкубации при 70 °С сохранял ≈35 % от исходной МА. Рекомбинантный Хн буйвола, экспрессированный в *P. pastoris*, по данным Vallejo et al. [12], при 60 °С полностью инактивируется, а согласно исследованиям Tuagi et al. [173], рХн буйвола, полученный в той же системе экспрессии при 60 °С, сохранял 37 % МА. Наблюдаемые вариации могут объясняться различными условиями определения ТС: значениями МА исследуемых ферментов, величинами рН, концентрациями ионов Ca²⁺, белковыми добавками, продолжительностью прогревания. По мнению автора данной работы, при постановке функционального теста определения термостабильности оптимальная длительность прогревания раствора исследуемого рХн равна 30 минутам, поскольку этот временной интервал имитирует среднюю продолжительность стадии второго нагревания и последующей обработки сырного зерна [20].

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 статье Jensen et al. [24] для двух коммерческих коагулянтов молока — рХн коровы и одногорбого верблюда, экспрессированных в *A. niger*. Также в этой работе изучено влияние степени гликозилирования рекомбинантных Хн на ТС. Авторы выделяли из про-

мышленных препаратов рХн одnogорбого верблюда варианты фермента с различной степенью насыщения карбогидратами и определяли их температуры плавления. Негликозилированные формы верблюжьего рХн характеризовались самыми низкими T_m в диапазоне 59,05–59,35 °С, формы с одним сайтом гликозилирования (Asn100) проявляли повышенную устойчивость при нагревании — T_m увеличивалась до 61,25 °С, формы с двумя сайтами гликозилирования (Asn100, Asn291) имели промежуточные точки плавления в диапазоне 59,85–60,45 °С [24].

Анализируя данные таблицы 6, можно отметить, что натуральные химозины имеют более высокий порог термоинактивации, чем их генно-инженерные аналоги.

В общем массиве данных особняком стоит работа Espinoza-Molina et al. [26], в которой ТС рХн коровы оценивали не по остаточной МА, а по реологическому параметру — модулю упругости (G').

Таблица 6

Термостабильность (ТС) натуральных и рекомбинантных химозинов различного генеза (по данным [20], с дополнениями)

Тип химозина, продуцент	Диапазон ТС	Комментарии
Натуральный Хн коровы, <i>Bos taurus</i> ¹⁾	20–60 °С	При 60 °С — 50 % МА
Натуральный Хн козы, <i>Capra hircus</i> ¹⁾	30–60 °С	При 60 °С — 40 % МА
рХн коровы, <i>Aspergillus niger</i> ²⁾	5–52,5 °С	Полная инактивация при >55 °С
рХн одnogорбого верблюда, <i>Aspergillus niger</i> ²⁾	5–55,0 °С	Полная инактивация при 60 °С
рХн одnogорбого верблюда, <i>Pichia pastoris</i> ³⁾	45–50 °С	Полная инактивация при 70 °С
рХн овцы, <i>Escherichia coli</i> ⁴⁾	≈25–50 °С*	При 40 °С ≈100 % МА, при 50 °С ≈30 % МА
рХн козы, <i>Pichia pastoris</i> ⁵⁾	≈35–45 °С*	При 50 °С ≈45 % МА, при 70 °С ≈10 % МА
рХн буйвола, <i>Pichia pastoris</i> ⁵⁾	≈30–37 °С*	При 50 °С ≈20 % МА, при 60 °С ≈0 % МА
рХн одnogорбого верблюда, <i>Aspergillus niger</i> ⁵⁾	≈25–40 °С*	При 50 °С ≈45 % МА, при 70 °С ≈35 % МА
рХн коровы <i>Aspergillus niger</i> ⁵⁾	≈35–40 °С*	При 50 °С ≈20 % МА, при 65 °С ≈0 % МА
рХн коровы, <i>Escherichia coli</i> ⁶⁾	35–50 °С	При 60 °С — 23,1 % от исходной МА

Тип химозина, продуцент	Диапазон ТС	Комментарии
рХн альпака, <i>Escherichia coli</i> ⁶⁾	35–55 °С	При 55 °С — 164 % МА, при 60 °С — 144 % МА
Коммерческий рХн коровы (ChyMax, «Chr. Hansen»), <i>Aspergillus niger</i> ⁶⁾	35–40 °С	При 45 °С ≈ 56 % МА, при 55 °С — <1 % МА
рХн яка, <i>Pichia pastoris</i> ⁷⁾	30–40 °С	Полная инактивация при 70 °С
рХн коровы (ChyMax, "Chr.Hansen"), <i>Aspergillus niger</i> ⁸⁾	57,65 °С	Указан порог (°С) тепловой денатурации
рХн одногорбого верблюда (ChyMax М, «Chr.Hansen»), <i>Aspergillus niger</i> ⁸⁾	60,65 °С	Указан порог (°С) тепловой денатурации
рХн козы, <i>Pichia pastoris</i> ⁹⁾	≈30–40 °С*	Полная инактивация при 70 °С
рХн коровы, <i>Pichia pastoris</i> ¹⁰⁾	30–40 °С	Измеряемый параметр — модуль упругости (G'). При 30 °С — 68,7 Па, при 40 °С — 77,1 Па, 50 °С — 50,7 Па
рХн буйвола, <i>Pichia pastoris</i> ¹¹⁾	30–42 °С	При 35–38 °С — 100 % МА, при 60 °С — 37 % МА
рХн коровы, <i>Pichia pastoris</i> ¹²⁾	25–37 °С	При 37 °С — 100 % МА, при 42 °С — 25 % МА

Примечания: ¹⁾ — по данным BRENDA [<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?esno=3.4.23.4>]; ²⁾ — по данным Kappeler et al. [14], время прогревания — 12,5 часа, в присутствии бычьего сывороточного альбумина; ³⁾ — по данным Wang et al. [13], время прогревания — 10 мин.; ⁴⁾ — по данным Rogelj et al. [17], время прогревания не указано; ⁵⁾ — по данным Vallejo et al. [12], время прогревания — 60 мин.; ⁶⁾ — по данным Беленькой с соавт. [20], время прогревания — 30 мин.; ⁷⁾ — по данным Ersöz & İnan [27], время прогревания — 60 мин.; ⁸⁾ — по данным Jensen et al. [24], калориметрия, температура фазового перехода нативный — денатурированный фермент (T_m); ⁹⁾ — по данным Tuagi et al. [171], время прогревания — 60 мин.; ¹⁰⁾ — по данным Espinoza-Molina et al. [26], время прогревания — 30 мин., измеряемый параметр — G' модуль упругости (storage modulus); ¹¹⁾ — по данным Tuagi et al. [173], время прогревания — 60 мин.; ¹²⁾ — по данным Nosedá et al. [178], время прогревания — нет данных; * — результаты исследования представлены в виде графиков, цифровые данные отсутствуют.

Возможно, наблюдаемая в работе [20] высокая термостабильность экспериментальных рХн коровы и альпака связана с особенностями экспрессии этих белков в системе *E. coli*. Как известно, у про- и эукариотов фолдинг и посттрансляционный процессинг синтезируемых *de novo* рекомбинантных белков протекает по-разному [13, 167–170]. Именно этим могут быть обусловлены наблюдаемые различия в ТС между коммерческим рХн коровы, получаемым в эукариотической системе (*A. niger*), и экспериментальными рХн коровы и альпака, экспрессированными в прокариотической системе (*E. coli*). С одной стороны, высокая ТС существенно ограничивает сферу промышленного применения коагулянта альпака и предполагает его использование только при производстве сыров с короткими сроками созревания и хранения. В то же время 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, — необходима апробация фермента при выработке сыра.

Исключительно термолabile вариант рХн В коровы получен группой Nosedá et al. в экспрессионной системе *Komagataella (Pichia) pastoris* (штамм GS115) в 2014 г. [178]. По данным авторов работы, полученный рХн имел очень низкий порог термоинактивации — около 37 °С.

Авторская ремарка: в последнее десятилетие большинство новых рХн продуцируются в эукариотических системах экспрессии метилотрофных дрожжей *Komagataella* (ранее — *Pichia*) *pastoris*. Как правило, генно-инженерные химозины, полученные в данной системе экспрессии, обладают интересными технологическими свойствами. Главным недостатком данной экспрессионной системы является работа под контролем метанол-индуцируемого промотра АOX1, что снижает перспективы ее использования в промышленном производстве рекомбинантных химозинов (по крайней мере в России). Привлекательность использования дрожжей рода *Komagataella* связана с поисками новых штаммов, способных эффективно экспрессировать гетерологичные рекомбинантные ферменты под контролем нетоксичных индукторов [170].

Зависимость МА от концентрации ионов кальция. Ионы кальция стимулируют сычужное свертывание молока. Нативное коровье молоко содержит ≈30 мМ кальция, при этом его бóльшая часть (~68 %) связана с казеиновыми мицеллами в виде коллоидного или аморфного моноги-

дрофосфата (CaHPO_4), а из оставшихся 10 мМ в ионизированной форме находится около 10 %, т.е. порядка 1 мМ [195].

При промышленном производстве большинства видов сыров молоко проходит стадию пастеризации (например, при температуре 71 °С–76 °С, с выдержкой 20–25 сек.). С повышением температуры растворимость кальциевых солей фосфорной кислоты снижается. Поэтому при пастеризации молока часть присутствующих в нем солей и ионов кальция необратимо преципитирует в форме нерастворимого фосфата кальция ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Это приводит к снижению концентрации Ca^{2+} , что ведет к увеличению продолжительности сычужного свертывания. Для компенсации этого феномена после пастеризации в молоко вносится CaCl_2 до конечной концентрации 0,1–0,5 г/л (≈ 1 –5 мМ).

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 к-казеина Phe105-Met106, расположенная в «волосковом» слое, становятся более доступной для гидролиза молокосвертывающим ферментом. Во-вторых, Ca^{2+} участвует в образовании ионных мостиков между дестабилизированными мицеллами, что ускоряет их агрегацию и формирование молочного сгустка [196]. В результате продолжительность сычужного свертывания молока уменьшается. Внесение дополнительного количества хлорида кальция также применяется в практике сыроделия с целью улучшения коагуляционных и технологических свойств сычужно-вялого молока [197].

Но увеличение концентрации CaCl_2 на 1–5 мМ вызывает не только повышение МА, но и общей ПА фермента, особенно на стадии коагуляции.

По данным Wang et al., ферментативная активность рХн одногорбого верблюда возрастает примерно в 5 раз в диапазоне 0–20 мМ CaCl_2 , а максимальная свертывающая активность наблюдалась при 20–40 мМ CaCl_2 [13]. Поэтому при использовании МФ, высокочувствительного к концентрации Ca^{2+} , всегда следует учитывать опасность и негативные последствия увеличения общей ПА. Исходя из этого, при производстве сыров из пастеризованного молока стремятся использовать минимально необходимые дозы CaCl_2 . Чувствительность МФ к содержанию Ca^{2+} , эквивалентная или меньшая, чем чувствительность эталонных ферментов — рХн коровы и одногорбого верблюда, является положительным фактором, так как позволяет варьировать количество вносимого хлорида кальция, не беспокоясь о значительных изменениях МА и ПА.

По сравнению с коммерческим рХн коровы коагуляционная активность рХн альпака менее чувствительна к повышению концентрации Ca^{2+}

в стандартизированном молочном субстрате (рис. 2А). С увеличением концентрации вносимого CaCl_2 от 1 до 5 мМ молокосвертывающая активность рХн альпака возрастает на 19–52 %. В том же диапазоне концентраций хлорида кальция увеличение МА коммерческого рХн составило 27–66 %. При концентрации CaCl_2 , равной 3 мМ (чаще всего используется в отечественном сыроделии), коагуляционная активность рХн альпака увеличивается на 42 %, а активность коммерческого рХн коровы — на 54 % [20].

По данным Rogelj et al., рХн овцы проявлял умеренную чувствительность к концентрации Ca^{2+} , близкую к чувствительности рХн коровы [17].

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 [14].

Таким образом, зависимость МА от концентрации хлорида кальция определена для четырех рекомбинантных Хн (коровы, одногорбого верблюда, овцы, альпака) из семи полученных на сегодняшний день.

Зависимость МА от рН субстрата. Технология производства большинства сыров предусматривает определенную процедуру подготовки молока перед внесением в него МФ. В исходное цельное молоко, имеющее рН $\approx 6,7$, добавляют концентрат молочнокислых бактерий (стартер) и инкубируют полученную смесь в течение 30–40 мин. при температуре 32–35 °С. Развивающаяся микрофлора закваски начинает «утилизировать» лактозу с образованием молочной кислоты. В результате рН смеси снижается. Чаще всего МФ вносится в молочную смесь при рН 6,5–6,6. Поэтому одно из основных технологических требований к МФ — способность эффективно свертывать молоко в слабокислом диапазоне рН [20].

Даже незначительные колебания рН молочной смеси 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^+ время коагуляции зависит не только от нарастающей активности молокосвертывающих ферментов, оптимумы ферментативной активности которых лежат в кислом диапазоне рН (табл. 7), но и от электростатических и гидрофобных параметров мицелл казеина. Подкисление молока приводит к уменьшению отрицательного заряда казеинов за счет приближения рН к значениям pI казеинов. Снижение суммарного отрицательного заряда уменьшает силы электростатического отталкивания между мицеллами и одновременно усиливает казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия, что ускоряет образование молочного сгустка [4, 196].

Таблица 7

Оптимумы рН натуральных и рекомбинантных химозинов различной видовой принадлежности (по данным [20], с дополнениями)

Тип химозина (вид), продуцент	рН-оптимум	Субстрат
Натуральный Хн коровы (<i>Bos taurus</i>) ¹⁾	5,0	к-КЗ коровы
Натуральный Хн козы (<i>Capra hircus</i>) ¹⁾	5,5	Обезжиренное молоко (12 %)
рХн буйвола, <i>Pichia pastoris</i> ²⁾	≈4,6	Обезжиренное молоко (26 %)
рХн козы, <i>Pichia pastoris</i> ³⁾	5,5	Обезжиренное молоко (26 %)
рХн одногорбого верблюда, <i>Pichia pastoris</i> ⁴⁾	5,0	Обезжиренное молоко (26 %)
рХн коровы, <i>Pichia pastoris</i> ⁵⁾	5,0	Цельное молоко коровы
рХн альпака, <i>Escherichia coli</i> ⁶⁾	≤5,5	Обезжиренное молоко (10 %)
рХн овцы, <i>Escherichia coli</i> ⁷⁾	≤6,0	Обезжиренное молоко (11 %)
рХн яка, <i>Pichia pastoris</i> ⁸⁾	6,0	Обезжиренное молоко (26 %)
рХн коровы, <i>Aspergillus niger</i> ⁹⁾	4,9	Синтетический аналог к-КЗ
рХн одногорбого верблюда, <i>Aspergillus niger</i> ⁹⁾	5,1	Синтетический аналог к-КЗ
рХн коровы, <i>Pichia pastoris</i> ¹⁰⁾	5,5	Обезжиренное молоко (26 %)
рХн буйвола, <i>Pichia pastoris</i> ¹¹⁾	5,5	Восстановленное обезжиренное молоко коровы

Примечания: ¹⁾ — по данным BRENDA [<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?espno=3.4.23.4>]; ²⁾ — по данным Vallejo et al. [19]; ³⁾ — по данным Tyagi et al. [171]; ⁴⁾ — по данным Wang et al. [13]; ⁵⁾ — по данным Espinoza-Molina et al. [26]; ⁶⁾ — по данным Беленькой с соавт. [20]; ⁷⁾ — по данным Rogelj et al. [17]; ⁸⁾ — по данным Ersöz & İnan [27]; ⁹⁾ — по данным Kappeler et al. [14]; ¹⁰⁾ — по данным Noseda et al. [178]; ¹¹⁾ — по данным Tyagi et al. [173].

Напротив, при нарастании рН и его удалении от рI казеинов увеличиваются их суммарные отрицательные заряды. В результате силы межмицеллярного электростатического отталкивания нарастают, что препятствует сближению казеиновых мицелл. Одновременно ослабевают казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия. Суммируясь, эти физико-химические изменения тормозят образование сгустка при ферментативной коагуляции молока. Поэтому при увеличении рН молочной смеси в диапазоне 5,0–7,0 продолжительность сычужного свертывания должна увеличиваться [196].

Зависимость МА от рН молочного субстрата для коммерческого рХн коровы и экспериментальных рХн коровы и альпака исследована в работе [20]. При рН 6,0 коммерческий (экспрессирован в *A. niger*) и экспериментальный (экспрессирован в *E. coli*) рХн коровы демонстрировали высокую МА, поряд-

ка 82–6 % от максимальной. По мере приближения к нейтральным значениям рН коагуляционная активность обоих препаратов начинала быстро снижаться. При рН 7,0 активность коровьих рХн снижалась более чем на 96 % от исходных значений (при рН 5,5). Эти результаты согласуются с данными Karpeler et al. [14] и Vallejo et al. [12], наблюдавшими аналогичную зависимость МА от рН субстрата для рХн коровы и показавшими, что верхняя граница его ферментативной активности находится в районе рН 6,7.

Динамика снижения МА рХн альпака (экспрессирован в системе *E. coli*) при повышении рН отличалась от поведения коровьих рХн. При рН 6,0 МА рХн альпака составляла ≈ 27 % и была меньше МА коровьих рХн на 55–59 %. 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 %. На практике это означает, что для свертывания молочной смеси с рН 6,5 расход рХн альпака может быть выше по сравнению с рХн коровы. Разброс МА фермента в диапазоне ± 20 % от активности рХн коровы является допустимым и не ограничивает использование коагулянта в сыроделии. При рН 7,0 все три фермента почти полностью утрачивали МА (рис. 2Б).

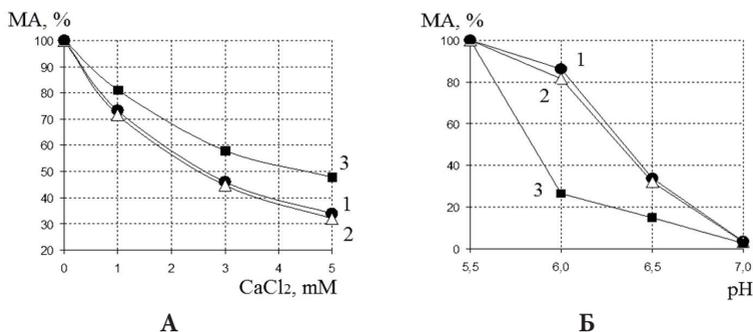


Рис. 2. Зависимость молокосвертывающей активности трех рекомбинантных химозинов (%) от концентрации хлорида кальция (А) и рН молочного субстрата (Б) [20]. Условные обозначения: 1 — коммерческий рХн коровы, экспрессированный в *A. niger*; 2 — рХн коровы, экспрессированный в *E. coli*; 3 — рХн альпака, экспрессированный в *E. coli*

По динамике изменения МА в зависимости от рН субстрата рХн альпака очень похож на рХн верблюда, считающегося наряду с рХн коровы эталонным МФ для сыроделия. По данным Wang et al. [13], коагуляционная активность рХн верблюда, экспрессированного в *P. pastoris*, при рН 6,0 и 6,5 составляла соответственно ≈ 18 % и ≈ 16 % от максимальных значений, наблюдавшихся при рН 5,0.

Аналогичную зависимость МА от рН демонстрировал и рХн овцы, полученный в 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 ≈ 90 % исходной максимальной МА [17].

Tuagi et al. [173] на восстановленном обезжиренном молоке коровы наблюдали максимальную МА рХн буйвола при рН 5,5, а при подщелачивании субстрата до рН 6,5 коагуляционная активность фермента снижалась на 34 %. По данным Vallejo et al. [19], рН-оптимум рХн буйвола составлял $\approx 4,6$, в диапазоне рН 5,5-6,5 фермент сохранял ≈ 90 % МА, при рН $>7,0$ — быстро утрачивал свертывающую активность и при рН 7,5 проявлял не более 5 % от исходной МА.

Обращает на себя внимание зависимость МА от рН рекомбинантного Хн яка, полученного в системе экспрессии *P. pastoris*. В отличие от большинства рХн парнокопытных рХн яка сохраняет высокую (более 80 %) коагуляционную активность в диапазоне рН, равном 5,5–7,0, и начинает терять способность свертывать молоко коровы при рН $>7,0$ (однако сохраняя при рН 7,5 ≈ 40 % МА) [27].

Схожую с рХн яка зависимость МА от рН субстрата проявлял и рХн козы (также полученный в дрожжевой системе *P. pastoris*) с близкой к ≈ 100 % МА в диапазоне рН 3,5–5,5 и плавным ее снижением до ≈ 50 % при рН 8,0–9,0 [12].

Можно предполагать, 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 $\geq 6,5$. Поэтому наиболее перспективными по параметру 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 нахождение таких коагулянтов.

Таким образом, в настоящее время получено 7 генно-инженерных химозинов видов, относящихся к отряду Парнокопытные. Полная биохимическая и технологическая характеристика дана для рХн коровы и одногорбого верблюда, широко применяемых в сыроделии. Рекомбинантные химозины 5 оставшихся видов охарактеризованы не полно, и, несмотря на наличие у некоторых из них привлекательных единичных технологических параметров, по совокупности свойств уступают рХн коровы и верблюда. Поэтому актуальными являются поиски новых рХн не только внутри отряда Парнокопытные, но и среди представителей других отрядов Млекопитающих (ни один из рХн этих отрядов не получен).

Глава 8

ЭКСПРЕССИЯ ХИМОЗИНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУППАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ПСЕВДОГЕНИЗАЦИЯ И УТРАТА ГЕНОВ ХИМОЗИНА

Псевдогены — нефункциональные аналоги структурных генов, которые утратили способность к экспрессии в результате мутаций: появления стоп-кодонов, вставок или делеций нуклеотидов (не кратных 3), которые приводят к сдвигу рамки считывания.

Псевдогенизация и утрата генов считается одним из важных механизмов эволюции [39, 198]. Изучение гастральных протеиназ позвоночных указывает на решающую роль утраты генов и следующих за ними морфофункциональных изменений в формировании адаптивного фенотипического разнообразия. Среди наземных тетрапод известны случаи дупликации (экспансии), псевдогенизации и утраты генов, относящихся к семейству пепсиноподобных эндопептидаз. Например, у человека ген пепсиногена А представлен тремя копиями, тогда как у каролинского анолиса и шпорцевой лягушки — только одной копией; у домового опоссума пепсиноген А псевдогенизирован, а у домашней мыши ген этого фермента не обнаружен. Предполагается, что такое видоспецифичное распределение генов гастральных протеиназ является результатом пищевой адаптации. Известно, что, в отличие от всеядных и плотоядных видов, в слизистой оболочке желудка растительноядных животных обнаруживаются более высокие уровни пепсиногенов [38, 199].

В семейство гастральных пепсиновых аспартатных эндопептидаз млекопитающих входит пять ферментов, характеризующихся филогенетической близостью и похожей субстратной специфичностью: пепсины А, В, С, F и Хн [38, 47, 53, 200]. В отличие от других членов семейства пепсиноподобных аспартатных протеиназ, эволюционная история, распространение и функции Хн в различных таксономических группах млекопитающих изучены крайне слабо.

В настоящее время на наличие Хн или Хн-гомологичных последовательностей исследовано порядка сотни видов, которые охватывают основные таксономические группы млекопитающих. При анализе последовательностей, доступных в GenBank, было выявлено 26 видов с достоверно подтвержденными псевдогенами Хн [39].

MNE — свинохвостый макак (*Macaca nemestrina*), **MMUL** — макак-резус (*Macaca mulatta*), **MFA** — макак-крабоед (*Macaca fascicularis*), **RRO** — ринопитек (*Rhinopithecus roxellana*), **RBI** — черный ринопитек (*Rhinopithecus bieti*), **CAT** — дымчатый мангобей (*Cercocebus atys*), **CSA** — зеленая мартышка (*Chlorocebus sabaeus*), **CAN** — колобус (*Colobus angolensis*), **PAN** — павиан (*Papio Anubis*), **ANA** — мирикина (*Aotus nancymaae*), **GVA** — шерстокрыл (*Galeopterus variegates*), **HGL** — голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), **CPO** — морская свинка (*Cavia porcellus*), **MMA** — альпийский сурок (*Marmota marmota marmota*), **MAU** — сирийский хомячок (*Mesocricetus auratus*), **ECA** — лошадь (*Equus caballus*), **EPR** — лошадь Пржевальского (*Equus przewalskii*), **CSI** — белый носорог (*Ceratotherium simum*), **OOR** — котатка (*Orcinus orca*). По данным [39, 57, 201]

Анализ структуры известных псевдогенов Хн (рис. 3) указывает на ряд индивидуальных особенностей, характерных для различных таксономических групп.

Для человека и человекообразных обезьян (*Hominoidea*), кроме делеций и вставок, приводящих к сдвигу открытой рамки считывания (ОРС), характерно наличие стоп-кодона в 5-м экзоне. Для всех изученных видов родственного гоминоидам семейства Мартышкообразных (*Cercopithecoidea*) в соответствующих геномных областях наблюдается отсутствие экзонов 3 и 4, и почти у всех выявлены терминирующие кодоны в 5-м и 9-м (одно исключение — зеленая мартышка (*Chlorocebus sabaeus*)) экзонах. Псевдоген Хн у одного из представителей приматов Нового Света — западноамазонской мирикины (семейство Ночные обезьяны (*Aotidae*)) — несет стоп-кодона в 4-м и 8-м экзонах.

Утрата 5 экзонов из 9, приводящая к существенной эрозии гена Хн, наблюдается у популярного представителя отряда Грызунов (*Rodentia*) — голого землекопа (*Heterocephalus glaber*). Кроме того, предполагается, что еще у трех видов из этого отряда — дегу, или кустарниковой крысы (*Octodon degus*), дамарского пескороя (*Fukomys damarensis*) и длиннохвостой шиншиллы (*Chinchilla lanigera*) — отсутствуют даже псевдогены Хн, так как Хн-подобные последовательности достоверно подтвердить не удалось [39]. Причина возможного отсутствия генов Хн у этих видов неизвестна. В то же время псевдогенизация Хн у альпийского сурка (*Marmota marmota*) предположительно связана с наличием единственного терминирующего кодона.

В Хн-гомологических последовательностях трех представителей отряда Непарнокопытных (*Perissodactyla*) также можно видеть утрату двух (экзона 7–8 у белого носорога) и даже трех экзонов (экзоны 2–4 у домашней лошади и лошади Пржевальского) и делеции, приводящих к сдвигу рамки считывания.

У единственного представителя отряда Шерстокрылов (*Dermoptera*), для которого доступна информация о геномной последовательности, — малайского шерстокрыла (*Galeopterus variegatus*) — в псевдогене Хн не удалось идентифицировать экзон 1 и стоп-кодоны, но во 2-м и 6-м экзонах обнаружены мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания.

В псевдогене Хн косатки (*Orcinus orca*) из отряда Китообразных (*Cetacea*) стоп-кодоны не обнаружены и присутствуют только мутации сдвига ОРС.

Авторская ремарка: возможно, данные о псевдогенизации Хн у косатки являются ошибочными, подробнее об этом — в главе 9.

Имеются признаки того, что Хн может быть псевдогенизирован у двух представителей отряда Хищных (*Carnivora*) — белого медведя (*Ursus maritimus*) и тюленя Уэдделла (*Leptonychotes weddellii*) и одного вида из отряда Однопроходные (*Monotremata*) — утконоса (*Ornithorhynchus anatinus*), однако эти данные требуют уточнения.

Поскольку ген Хн присутствует у всех исследованных представителей отрядов Хищные (*Carnivora*) (вероятно, за исключением белого медведя и тюленя Уэдделла), Рукокрылые (*Chiroptera*), Тупайи (*Scandentia*), Броненосцы (*Cingulata*), Панголины (*Pholidota*), Зайцеобразные (*Lagomorpha*), Насекомоядные (*Eulipotyphla*), Прыгунчиковые (*Macroscelidea*), Афросорициды (*Afrosoricida*), Сирены (*Sirenia*), Хоботные (*Proboscidea*), Трубнозубы (*Tubulidentata*), Сумчатые (*Marsupialia*), Парнокопытные (*Artiodactyla*), Китообразные (*Cetacea*) (за исключением косатки, псевдогенизация Хн у которой под вопросом и требует независимого подтверждения) [39] — одним из критериев поиска новых видов Хн может быть принадлежность к данным таксономическим группам.

Напротив, у изученных представителей отрядов Непарнокопытных (*Perissodactyla*), Шерстокрылов (*Dermoptera*), некоторых видов Грызунов (*Rodentia*) и высших Приматов (*Primates*) последовательности, гомологичные Хн, отсутствуют или псевдогенизированы, что дает основание исключить их из круга поиска видов — продуцентов Хн.

Таким образом, статус гена Хн (отсутствует, псевдогенизирован или экспрессируется) является **абсолютным** критерием выбора вида — продуцента этого фермента.

Глава 9

**ПСЕВДОГЕНИЗАЦИЯ И УТРАТА ГЕНОВ ХИМОЗИНА
МОЖЕТ БЫТЬ СВЯЗАНА С МЕХАНИЗМАМИ
ПЕРЕДАЧИ ПОТОМСТВУ ФАКТОРОВ ПАССИВНОГО
ИММУНИТЕТА («ИММУННАЯ ГИПОТЕЗА»)**

*Дело, однако, оказалось совершенно простым, и только
извечная убежденность человечества в изотропности
Вселенной помешала доктору Мёбиусу обнаружить то,
что удалось нащупать мне.*

20 марта 99 года. Отчет Тойво Глумова, инспектора.

Тема 009: «Визит старой дамы».

А. Стругацкий, Б. Стругацкий. «Волны гасят ветер»

Считается, что основной функцией Хн является свертывание молока в желудке новорожденного. Вместе с тем существуют данные, указывающие на связь уникальных биохимических свойств Хн с двумя механизмами передачи потомству материнских гуморальных факторов **приобретенного пассивного иммунитета**:

- 1) в фетальном периоде — через гемоплацентарный барьер [39, 53];
- 2) в неонатальном периоде — с молозивом и молоком [38, 47, 53, 200].

Данные литературы свидетельствуют, что под действием естественного отбора у млекопитающих сформировался адаптационный механизм, предотвращающий интрагастральную протеолитическую деградацию антител (Ig G, Ig M, Ig A) и, возможно, других защитных белков молозива и молока. В случае реализации второго механизма передачи пассивного иммунитета низкая общая протеолитическая активность Хн обеспечивает слабый протеолитический фон в желудке новорожденного, а содержащиеся в молозиве ингибиторы панкреатических протеаз предохраняют Ig от повреждения трипсином и химотрипсином, что повышает эффективность их адсорбции клетками кишечного эпителия и переноса в лимфу и кровь [39, 47, 202, 203].

Ранее, при исследовании прохимозина кошки [204] и пепсиногена F крысы [37], уже выдвигалось предположение о том, что биологическая роль неонатальных гастральных протеиназ с низкой неспецифической протеолитической активностью заключается в защите от протеолитической деградации факторов приобретенного пассивного иммунитета [202]. Но только в последние годы появляются данные о том, что псевдогенизация и утрата генов Хн коррелирует со стратегиями передачи пассивного иммунитета. С легкой руки М. Lopes-Marques et al. (2017) этот феномен получил название «иммунной гипотезы» псевдогенизации Хн [39].

Чем может быть вызвана псевдогенизация и утрата генов Хн? Открытие псевдогена Хн у человека — вида с плацентарным переносом Ig G — позволило задаться вопросом: не связана ли псевдогенизация Хн с эволюцией стратегии передачи эмбрионам или новорожденным факторов пассивного иммунитета? Если да, то из круга поиска новых химозинов следует исключить виды (таксономические группы) с материнским (плацентарным) переносом антител. Таким видам Хн в форме «нежной» протеазы с узкой специфичностью и низкой общей ПА в раннем постнатальном периоде уже не нужен, так как нет необходимости защитить Ig и другие белки молока, проявляющие бактериостатические, бактерицидные и бактериосвязывающие свойства, от протелиза в желудке и кишечнике.

По данным [39], эффективность переноса гуморальных факторов приобретенного пассивного иммунитета, а также защитных белков сыворотки и ММЖГ зависит от типа плаценты, характерного для данной таксономической группы млекопитающих, и коррелирует с псевдогенизацией Хн.

У млекопитающих плацента образуется в месте контакта хориона (внешняя оболочка плода, состоящая из трех зародышевых слоев — соединительнотканной мембраны (серозы), аллантоиса и амниона) и слизистой оболочки стенки матки. Эволюция структуры плацент шла параллельно с установлением все более тесной связи хориона развивающегося зародыша с организмом матери.

Взаимоотношения плода и материнского организма минимальны у сумчатых млекопитающих. Хорион у этих животных не образует ворсинок и своей поверхностью просто соприкасается со слизистой оболочкой матки. В результате у сумчатых плацента не образуется или развита слабо (т.н. «неполная плацента») и неспособна обеспечить эффективный перенос питательных веществ и факторов иммунитета от матери к зародышу. Эмбриональный период короткий, беременность длится 8–40 дней. Детеныши сумчатых рождаются плохо развитыми, неспособными самостоятельно сосать молоко, их вес составляет несколько граммов, длина — 3–4 см, доразвитие происходит в материнской сумке. Иногда представителей инфракласса Сумчатых (*Marsupialia*) и отряда Однопроходных (яйцекладущих млекопитающих) (*Monotremata*) относят к аплацентарным животным. В молочной железе сумчатых млекопитающих наблюдается два пика экспрессии факторов пассивного иммунитета в процессе продолжительного молочного вскармливания, которые совпадают с периодами контакта новорожденного и детеныша с внешней средой и считаются адаптационным механизмом материнской иммунологической защиты молодняка [143].

У большинства млекопитающих при формировании плаценты хорион образует ворсинки, которые состоят из эпителия эктодермального происхождения (трофобласта), соединительнотканной основы и кровеносных сосудов, лежащих в соединительной ткани. Материнская часть плаценты, куда внедряются ворсинки, изначально также состоит из эпителия, соединительной ткани и находящихся в ней кровеносных сосудов. Однако внедрившиеся в слизистую оболочку матки ворсинки выделяют протеолитические ферменты, которые в той или иной степени нарушают целостность слизистой оболочки. По характеру связи ворсинок хориона плода со слизистой оболочкой матки различают несколько типов плацент: эпителиохориальные, десмохориальные, эндотелиохориальные, гемохориальные (рис. 4) [205].

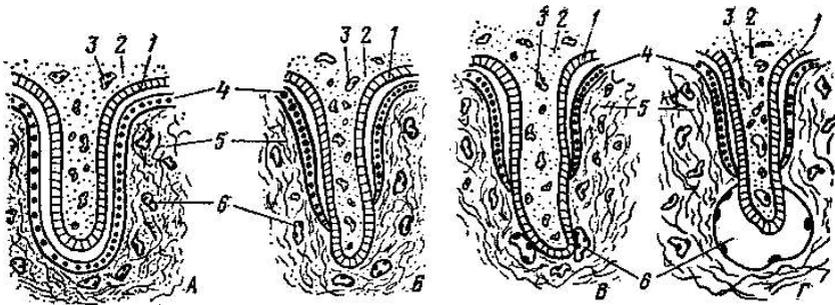


Рис. 4. Типы гистологического строения плацент [205].

А — эпителиохориальная; Б — десмохориальная; В — эндотелиохориальная; Г — гемохориальная; 1 — эпителий ворсинок хориона; 2 — соединительная ткань, ворсинки хориона; 3 — эндотелий кровеносного сосуда, ворсинки хориона; 4 — эпителий слизистой оболочки матки; 5 — соединительная ткань слизистой оболочки матки; 6 — кровеносные сосуды и лакуны стенки матки

Эпителиохориальная плацента характеризуется тем, что слизистая оболочка матки сохраняет все свои гистологические элементы. При ее образовании на поверхности хориона появляются ворсинки в форме небольших бугорков или выростов, которые погружаются в углубления слизистой оболочки матки, не производя никаких разрушений в ее тканях. Поэтому питательные вещества и кислород, необходимые для зародыша, должны пройти через эндотелий сосудов матери, соединительную ткань слизистой оболочки матки, эпителий слизистой оболочки матки, эпителий, соединительную ткань и эндотелий кровеносных сосудов ворсинки хориона (рис. 4А) [205].

Такой тип плаценты не позволяет осуществлять значительный внутриутробный перенос материнских антител плоду [206]. Поэтому новорожденный получает факторы пассивного иммунитета в основном с молозивом и молоком [207].

Эпителиохориальная плацента характерна для представителей подотряда Нежвачных (*Nonruminantia*) (свиньи, бегемоты, пекари), отряда Непарнокопытных (*Perissodactyla*) (лошади, носороги, тапиры), подотряда Мозолоногих (*Tylopoda*) (верблюды, ламы, викуньи), отряда Китообразных (*Cetacea*) и некоторые других млекопитающих.

Десмохориальная (синэпителиохориальная) плацента. При данном типе плаценты после внедрения хориона в стенку матки эпителий слизистой оболочки разрушается под действием ферментов, выделяемых ворсинками. Следовательно, ворсинка своим эпителием соприкасается прямо с соединительной тканью матки. Путь переноса питательных веществ из сосудов матки в сосуды ворсинки плода становится на одно звено короче по сравнению с эпителиохориальной плацентой (рис. 4Б) [205].

Плацента десмохориального типа не обеспечивает эффективный перенос антител от матери к эмбриону, и передача факторов приобретенного иммунитета, как правило, осуществляется через молозиво и молоко [208].

Десмохориальная плацента распространена в подотряде Жвачных (оленьки, олени, жирафы, быки, буйволы, козы, антилопы). Некоторыми исследователями существование такого типа плацент оспаривается, так как ультрамикроскопическое изучение позволяет обнаружить на поверхности эндометрия очень уплощенные эпителиоциты (признак эпителиохориального типа плаценты), которые на светооптическом уровне не выявляются.

Эндотелиохориальная плацента обеспечивает еще более тесную связь плода и матери. При ее образовании ферменты ворсинок хориона разрушают не только эпителий, но и соединительную ткань слизистой оболочки матки, так что эпителий ворсинки непосредственно прилегает к эндотелию кровеносных сосудов слизистой матки. По сравнению с эпителиохориальным, эндотелиохориальный тип плаценты обеспечивает более совершенное снабжение зародыша нутриентами и кислородом (рис. 4В) [205].

Несмотря на это, фетальный перенос антител при таком типе плаценты незначителен, и основным источником IgG (и других защитных белков) для новорожденного является молозиво и молоко [53].

Эндотелиохориальный тип плаценты характерен для отряда Хищные (*Carnivora*) (кошки, собаки, медведи, моржи, тюлени и др.).

Гемохориальная плацента обеспечивает максимально тесную связь плода и матери. При ее образовании разрушаются не только эпителий и соединительная ткань, но и эндотелий кровеносных сосудов, так что ворсинки хориона оказываются погружены в лакуны, заполненные материнской кровью. Путь переноса нутриентов и факторов иммунитета от матери плоду максимально короткий. Из крови лакун слизистой оболочки матки питательные вещества и кислород должны пройти эпителий (который может содержать от одного до трех слоев клеток), соединительную ткань и эндотелий сосудов ворсинки хориона (рис. 4Г) [205].

Гемохориальный тип плаценты способен обеспечить перенос факторов пассивного приобретенного иммунитета в пренатальном периоде.

В зависимости от количества слоев трофобласта (эпителия) гемохориальные плаценты подразделяются на три вида: гемотрихориальная, гемодихориальная и гемомонохориальная [210]. По мере уменьшения слоев трофобласта плацентарный перенос антител от матери к плоду упрощается. Гемомонохориальный тип плаценты (один слой трофобласта) обнаруживается у ряда представителей Приматов (*Primates*), в том числе — у человека (гемомонохориальная на последних стадиях беременности) и грызунов подотряда Дикобразообразные [53, 209]. Гемодихориальная (два слоя трофобласта) плацента наблюдается в отряде Зайцеобразные (*Lagomorpha*). И, наконец, гемотрихориальная (три слоя трофобласта) плацента обнаруживается у грызунов из семейства Мышиные (*Muridae*) и семейства Хомяковые (*Cricetidae*) [53].

Пытаясь сформулировать критерии поиска новых видов химозинов среди млекопитающих, невозможно игнорировать вопросы, связанные с эволюционной историей гена Хн и его корреляции с питанием и способами передачи пассивного иммунитета. Ответ на вопрос о том, следует ли псевдогенизация Хн за приобретением стратегии передачи иммунитета от матери на последних стадиях беременности или в раннем постнатальном периоде, может значительно сузить круг поиска новых Хн для технологических нужд человека за счет исключения из него видов с плацентарным переносом факторов пассивного иммунитета.

Основная теза иммунной гипотезы псевдогенизации Хн у млекопитающих заключается в следующем: **чем эффективнее осуществляется перенос факторов приобретенного пассивного иммунитета в пренатальном периоде, тем выше вероятность псевдогенизации Хн** [39]. Отметим, что число изученных видов млекопитающих, для которых твердо установлены типы и виды плацент, способы переноса факторов иммунитета и статус гена Хн крайне ограничено. Для большинства видов совокупность этих свойств неизвестна или фрагментарна.

Для высших приматов (семейство Гоминиды (*Hominidae*) и видов, относящихся к семейству Мартышковые (*Cercopithecidae*), характерен гемо-монохориальный тип плаценты и плацентарный перенос IgG, который происходит на заключительных стадиях беременности. У эволюционно более развитых представителей *Hominidae*, включая человека, концентрация IgG у доношенных новорожденных составляет не менее 75–100 % от показателей взрослых особей [211, 212]. Соответственно, 100 % псевдогенизация Хн наблюдается у всех изученных видов, относящихся к семействам Гоминид и Мартышковые. У менее развитых приматов Старого Света с эпителиохориальным типом плаценты перенос факторов иммунитета, по-видимому, осуществляется с молоком матери. Даже несмотря на то что у галаго Гарнетта (*Otolemur garnettii*) наблюдается незначительный перенос факторов пассивного иммунитета в пренатальном периоде, Хн у этого вида экспрессируется [39, 212, 213, 214] (Приложение В).

У обезьян Нового Света, например у боливийского саймири (*Saimiri boliviensis*), уровень пренатального переноса IgG за счет гемохориального типа плаценты составляет около 40 % [211], но часть антител и факторы неспецифического иммунитета (например белки, обладающие неспецифической антибактериальной активностью) передаются с материнским молоком, и поэтому Хн у большинства изученных видов парвотряда Широконосых обезьян экспрессируется.

На первый взгляд, является парадоксом то, что у имеющих гемохориальный тип плаценты представителей семейства Долгопятовые (*Tarsiidae*) и в парвотряде Широконосых обезьян, или обезьян Нового Света (*Platyrrhini*), ген Хн интактен и экспрессируется. Для Долгопятовых и Широконосых обезьян нет данных о виде плаценты (количестве слоев трофобласта), но поскольку Хн экспрессируется, можно предполагать, что, несмотря на возможность плацентарного транспорта антител, преобладает все же перенос факторов пассивного приобретенного иммунитета с молоком (как в случае саймири). Исключение составляет один вид обезьян Нового Света — мирикина (*Aotus nancymaae*), у которого Хн псевдогенизирован [38, 39, 215, 216] (Приложение В). Причины псевдогенизации Хн у мирикины не имеют на сегодняшний день внятного объяснения. Данные о видах плацент для обезьян Нового Света обнаружить не удалось. Можно лишь предполагать, что псевдогенизация Хн у мирикины обусловлена высоким уровнем плацентарного переноса материнских антител в позднем пренатальном периоде, что отменяет необходимость экспрессировать вариант Хн с низкой общей ПА.

Удивительным открытием оказалось то, что Хн, экспрессируемый в желудках некоторых видов взрослых обезьян Нового Света (за исключением

мирикины), обладает очень высокой неспецифической ПА [37] и фактически выполняет функции пепсинов. Химозин с такой же высокой общей протеолитической активностью, как и у пепсинов, не имеет широких технологических перспектив в сыроделии, так как может приводить к потерям белка с сывороткой и формированию пороков вкуса и консистенции в сырах с длительными сроками созревания и хранения. Предполагается, что использование Хн в качестве пищеварительного фермента у взрослых животных (наряду с пепсинами) обусловлено смешанным типом питания, в котором присутствуют и насекомые, и растения [37], однако прямого подтверждения данному предположению нет.

Для каждой таксономической группы приматов характерен индивидуальный механизм «выключения» гена Хн (рис. 3). Данные филогенетического анализа указывают на то, что псевдогенизация Хн у приматов произошла примерно 40 млн лет назад, после расхождения эволюционных линий обезьян Старого и Нового Света [217, 218].

Несмотря на то что для отряда Грызуны (*Rodentia*) характерен гемохориальный тип плаценты, псевдогены Хн обнаружены у одного представителя подотряда Белкообразных (*Sciuromorpha*) — альпийского сурка (*Marmota marmota marmota*), одного представителя подотряда Мышеобразных (*Myomorpha*) — сирийского хомячка (*Mesocricetus auratus*), а также у всех изученных видов из подотряда Дикобразообразных (*Hystricomorpha*)

Дикобразообразные — единственный подотряд Грызунов с гемомохориальным типом плаценты, который может обеспечивать высокоэффективный пренатальный перенос IgG [53]. В данном таксоне наблюдается четкая корреляция между вероятностью псевдогенизации (или полной утраты гена Хн) и способом передачи пренатального иммунитета. По сравнению с другими изученными млекопитающими мутации и делеции в генах Хн Дикобразообразных настолько разрушительны, что Хн-подобные последовательности в геномах некоторых видов выявить невозможно [39] (Приложение В).

В другом подотряде Грызунов — Мышеобразные — ген Хн интактен и экспрессируется, что можно объяснить гемотрихориальным типом плаценты, при котором фетальный транспорт Ig из материнской крови в кровь плода затруднен из-за тройного слоя эпителиальных клеток хориона. При этом постнатальный перенос IgG с материнским молоком доказан лишь для мыши и крысы, для остальных изученных представителей подотряда данных о механизмах передачи пассивного приобретенного иммунитета нет. Предполагается, что пренатальный перенос факторов иммунитета у изученных видов подотряда Мышеобразные минимален

и поэтому дополняется постнатальным переносом с материнским молоком [53, 219], при котором для защиты факторов иммунитета от протеолиза требуется синтез Хн с низкой общей протеолитической активностью (Приложение В).

Эндотелиохориальный тип плаценты наблюдается у кошек и собак (отряд Хищные — *Carnivora*), для которых сообщалось об экспрессии химозина в раннем постнатальном периоде [47, 220, 221]. По данным [39], у большинства изученных представителей отряда Хищные гены Хн также экспрессируются (Приложение В).

Информация о состоянии гена Хн в отряде Зайцеобразные (*Lagomorpha*) противоречива. Данные о том, что у кролика вместо ПроХн синтезируется фетальный пепсиноген F, предполагают инактивацию гена химозина [222], но не подтверждаются результатами [39], согласно которым Хн у кролика экспрессируется. В 2018 г. Alihanoglu et al. сообщили о получении молокосвертывающего препарата из желудка кролика, при этом авторами был использован термин «rennet», т.е. «натуральный сычужный фермент», что предполагает наличие в его составе химозина и пепсина [223]. Несмотря на то что гемодихориальная плацента Зайцеобразных способна обеспечивать трансплацентарный перенос IgG и IgM [220, 224], считается, что факторы пассивного иммунитета передаются с молоком, что и определяет экспрессию Хн [39] (Приложение В).

Отряд Непарнокопытные (*Perissodactyla*) насчитывает 17 видов и состоит из трех семейств: Тапировые (*Tapiridae*), Лошадиные (*Equidae*), Носороговые (*Rhinocerotidae*), но геномные последовательности (на октябрь 2019 г.) доступны только для двух последних [225]. Ни у одного из исследованных представителей этого отряда не найден функциональный ген Хн. Кроме того, из-за сильной эрозии генов Хн не удалось выявить общие для данного семейства мутационные события, приводящие к его инактивации [39]. Плаценты Непарнокопытных относятся к эпителиохориальному типу, что исключает пренатальную передачу материнских антител [220, 224]. Казалось бы, это противоречит «иммунной гипотезе» псевдогенизации Хн. Но в данном случае следует обратить внимание на исключительные особенности качественного состава молока у представителей двух семейств Непарнокопытных, а именно, на низкое содержание белка (что уже обсуждалось при характеристике стратегии лактации *Perissodactyla*). Молоко Лошадиных и Носороговых отличается от других млекопитающих крайне низким содержанием общего белка (1–2 %) с высоким относительным содержанием сывороточных протеинов, в том числе Ig и, соответственно, незначительным содержанием α -, β - и каппа-казеинов.

Таким образом, в отряде Непарнокопытные обеспечение новорожденных факторами приобретенного пассивного иммунитета, по-видимому, достигается сочетанием нескольких условий: высоким относительным содержанием Ig G в молозиве и Ig M в молоке, а также высокой частотой кормления [39, 200, 226]. Нельзя также исключать наличие особого механизма прямого всасывания Ig в кишечнике Непарнокопытных.

Авторская ремарка: представляет интерес изучение спектра экспрессируемых гастральных протеиназ Непарнокопытных в фетальном и раннем постнатальном периоде, а также их общей ПА и специфичности. Если принимать во внимание существование «пепсиноподобных» Хн у некоторых видов обезьян Нового Света [37], то почему бы не предположить наличие у Непарнокопытных «Хн-подобных» пепсинов?

Все изученные представители отряда Парнокопытные (*Artiodactyla*) характеризуются десмохориальным типом плаценты, осуществляют перенос факторов приобретенного пассивного иммунитета преимущественно с молозивом и молоком и в полном соответствии с «иммунной гипотезой» экспрессируют Хн (Приложение В).

Три случая утраты гена Хн были найдены у таксономических групп, для которых информация о механизмах переноса пассивного иммунитета от матери потомству отсутствует или отрывочна. Гены Хн не обнаружены у следующих видов: шерстокрыл (*Galeopterus variegates*) — отряд Шерстокрылов (*Dermoptera*); косатка (*Orcinus orca*) — отряд Китообразные (*Cetacea*); альпийский сурок (*Marmota marmota marmota*) — подотряд Белкообразные (*Sciuromorpha*). В случае малайского шерстокрыла и сирийского хомячка псевдогенизацию Хн можно связать с гемохориальным типом плаценты и возможностью трансплацентарного переноса антител от матери плоду. Если это предположение подтвердится в дальнейшем, то два этих случая можно рассматривать как подтверждение «иммунной гипотезы» псевдогенизации Хн. Данные о псевдогенизации Хн у косатки [39], имеющей эпителиохориальный тип плаценты и доказанный постнатальный перенос факторов иммунитета с молоком, возможно, являются ошибкой и требуют независимого подтверждения или обоснования (как в случае с непарнокопытными).

Ситуация, наблюдаемая в отрядах Афросорициды (*Afrosoricida*), Прыгунчики (*Macroscelidea*), Броненосцы (*Cingulata*), представители которых имеют гемохориальный тип плаценты и экспрессируют Хн (Приложение В), требует дальнейших исследований, направленных на установление в каждом конкретном случае количества слоев трофобласта и типа переноса материнских антител плоду или новорожденному.

У изученных представителей отрядов Насекомоядных (*Eulipotyphla*), Сирен (*Sirenia*), Хоботных (*Proboscidea*) и Трубкозубых (*Tubulidentata*) экспрессия Хн обусловлена эндотелиохориальным типом плаценты и переносом Ig с молозивом или молоком (Приложение В).

Виды с эпителиохориальным типом плацент из отрядов Хищные сумчатые (*Dasyuromorphia*) и Опоссумы (*Didelphimorphia*) прогнозируемо экспрессируют Хн (Приложение В).

«Парадоксальные» случаи экспрессии Хн и Хн-подобных ферментов при гемохориальных типах плацент могут быть связаны с тем, что в качестве ранней постнатальной гастральной протеиназы у таких видов используются его аналоги, такие как, например, фетальный пепсин F кролика, обладающий низкой общей ПА [38], или же Хн экспрессируется не как ранний постнатальный фермент, а как гастральная протеаза с широкой специфичностью и высокой общей ПА (как у некоторых видов обезьян Нового Света). Другое возможное объяснение экспрессии Хн при гемохориальном типе плаценты — ее вид, а именно, количество слоев трофобласта, при увеличении числа которых вероятность фетального переноса факторов пассивного иммунитета плоду уменьшается.

Таким образом, даже не имея информации о статусе гена Хн, но зная механизм переноса гуморальных факторов приобретенного пассивного иммунитета, который определяется типом плаценты, можно прогнозировать синтез данным видом активного Хн или псевдогенизацию последовательностей, кодирующих этот фермент. Следовательно, информация о типе плаценты и механизме переноса приобретенного пассивного иммунитета является одним из критериев выбора видов потенциальных источников Хн.

Глава 10

ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА В МОЛОЗИВЕ И МОЛОКЕ — ОТРАЖЕНИЕ СТРАТЕГИИ ПЕРЕНОСА ПАССИВНОГО ИММУНИТЕТА

Имеющиеся в литературе данные указывают на то, что количественный состав молозива и молока отражает различия в механизмах передачи гуморальных факторов пассивного иммунитета [227]. В свою очередь, стратегия передачи антител связана с типом плаценты и коррелирует с частотой псевдогенизации Хн в некоторых таксономических группах млекопитающих [39]. Повышенная концентрация протеинов в молоке и молозиве связана со стратегией переноса пассивного иммунитета и нередко (но не всегда!) является маркером экспрессии Хн у данного вида. Чаще всего высокое относительное содержание общего белка в молозиве наблюдается у видов с исключительно постнатальным переносом факторов приобретенного пассивного и неспецифического иммунитета, например, у представителей Парнокопытных и Китообразных и сопровождается экспрессией Хн.

*Авторская ремарка: после обнаружения в 1981 г. на территории Пакистана останков ископаемого (возраст около 48 млн лет) млекопитающего пакицета, имевшего строение уха (слуховой буллы), как у современных китообразных, была выделена клада **Китопарнокопытных (Cetartiodactyla)**, объединяющая Китообразных и Парнокопытных [28a].*

Напротив, у приматов и некоторых грызунов с плацентарным (материнским) переносом иммунитета Хн псевдогенизирован [39, 227]. Парадоксальное исключение составляют изученные виды отряда Непарнокопытные (*Perissodactyla*) с постнатальным переносом пассивного иммунитета, но псевдогенизированными химозинами, что, скорее всего, обусловлено особенностями развития желудочно-кишечного тракта новорожденных, частотой кормления и сопровождается низким содержанием общего белка и казеинов в молоке [39, 200, 226]. Причины псевдогенизации Хн у представителей отряда Непарнокопытные требуют дополнительного изучения.

Высокое содержание белка в молоке может быть связано с двумя адаптационными механизмами: 1) стратегией передачи новорожденному антител (у видов с типами плацент, исключая пренатальный перенос Ig и других защитных белков); 2) стратегией лактации, призванной максимально сократить период взросления молодняка и адаптировать его к среде обитания. Логично предположить, что высокая концентрация белка (в том числе Ig) в молоке сопровождается экспрессией Хн. Не исключе-

но, что виды с постнатальным переносом факторов пассивного иммунитета и высокой концентрацией белка в молозиве и молоке синтезируют Хн, обладающие привлекательными для технологических нужд человека параметрами — высокой МА и низкой общей ПА. В этой связи интересен сравнительный анализ относительного содержания протеинов в молоке и молозиве Млекопитающих.

В данном разделе не рассматриваются млекопитающие из отряда Однопроходных и инфракласса Сумчатых. Данные о содержании факторов пассивного иммунитета и других защитных белков в секрете молочных желез Однопроходных не обнаружены. Стратегия переноса факторов пассивного иммунитета у Сумчатых рассмотрена в главе 6.

Сразу после рождения детеныши млекопитающих попадают в среду, богатую антигенами. До полного формирования собственной иммунной системы смертельно опасными для новорожденного могут быть любые тривиальные инфекции. В процессе эволюции у плацентарных млекопитающих сформировались адаптационные механизмы передачи факторов иммунитета от матери новорожденному либо трансплацентарно (с кровью) в фетальном периоде, либо постнатально с молозивом и молоком.

Молозиво — секрет молочной железы, вырабатываемый в последние дни беременности и в первые несколько дней после родов. Через 3–5 дней после родов сменяется переходным, а позднее — зрелым молоком. У некоторых млекопитающих, в частности, у представителей отрядов Хищных, Китобразных, Грызунов, Зайцеобразных и надотряда Копытных (*Ungulata*) молозиво особенно богато сывороточными белками и Ig [227, 200].

Из данных, представленных в таблице 8, следует, что у видов, частично или полностью использующих перенос факторов иммунитета постнатально, концентрация белков в молозиве и молоке намного выше, чем у видов с исключительно пренатальной передачей антител от матери к плоду.

Согласно литературным данным [53, 234], перенос материнских антител проще всего осуществляется через гемохориальные типы плацент. При этом из пяти классов Ig млекопитающих (A, D, E, M и G) у большинства изученных видов только IgG может передаваться через плаценту от матери к плоду (исключением, по-видимому, являются кролики, у которых отмечается трансплацентарный перенос Ig M [220]).

Способность к трансплацентарному переносу именно IgG связана с его относительно небольшой (для иммуноглобулинов) молекулярной массой (ММ) (≈ 150 кДа). Активный и селективный трансплацентарный перенос всех четырех подклассов IgG (IgG1–IgG4) осуществляется путем связывания Fc фрагмента материнских антител со специфическим рецептором — FcRn [235, 236].

Таблица 8

Тип переноса иммуноглобулинов (Ig) и относительное содержание (%) основных нутриентов в молозиве и зрелом молоке представителей различных отрядов млекопитающих (по данным [39, 227, 200, 231–233])

Вид	Тип переноса Ig	Содержание (%) основных нутриентов в молозиве (Мз) и зрелом молоке (Мл)					
		белки		жиры		углеводы	
		Мз	Мл	Мз	Мл	Мз	Мл
Отряд Приматы							
Человек разумный	П	2,29	1,06	2,95	4,54	5,70	7,10
Бабуин	П	2,30	1,60	5,10	5,00	6,80	7,30
Отряд Хищные							
Волк обыкновенный	П+М	13,80	8,00	7,80	9,00	2,70	3,00
Кошка домашняя	П+М?	4,00	6,05*	3,40	5,15*	3,60	4,05*
Отряд Китообразные							
Гренландский кит	М?	86,60	9,40	4,90	19,40	6,30	0,00
Отряд Хоботные							
Саванный слон	П+М?	2,10	2,50	5,60	7,60	6,18	1,89
Отряд Непарнокопытные							
Лошадь домашняя	М	19,10	2,05*	0,70	2,00	4,60	6,50
Отряд Парнокопытные							
Свинья дикая	М	14,30*	5,10*	6,50*	6,65*	2,90*	5,45*
Ошейниковый пекари	М?	6,00	5,30	4,80	4,60	5,20	6,50
Однгорбый верблюд	М	13,03*	3,30*	1,50	4,10	3,60	4,40
Двугорбый верблюд	М	19,17*	4,28*	0,30	5,30	5,90	4,90
Лама	М	16,50	5,00	1,00	5,50	6,30	6,60
Серый мазама	М	9,52	6,50	8,70	4,82	1,11	5,53
Бык домашний	М	13,00	3,36*	3,60	3,80	3,10	5,00
Як домашний	М	16,10	5,30	14,00	7,00	1,90	4,60
Овца домашняя	М	13,00	5,77*	12,40	6,00	3,40	4,30
Коза домашняя	М	8,00	3,38*	9,00	3,40	2,50	4,50
Отряд Грызуны							
Серая крыса	П+М	8,90	12,10	14,70	12,20	2,50	1,50
Отряд Зайцеобразные							
Дикий кролик	П?	13,50	12,70	14,70	14,80	1,60	0,90

Условные обозначения: П — пренатальный перенос; П+М — смешанный, пре- и постнатальный перенос; М — постнатальный перенос Ig с молозивом и молоком; ? — данные требуют уточнения; * — усредненные данные из 2 и более независимых источников.

Наибольшее значение для новорожденного представляют Ig классов G, M и A, которые различаются по своим функциям. Иммуноглобулины класса G участвуют во вторичном иммунном ответе и обеспечивают антитоксический иммунитет. У взрослых животных со сформированной системой иммунитета IgM (ММ ≈970 кДа) начинают вырабатываться сразу после попадания чужеродного агента в организм и являются «первой линией» защиты от неизвестных антигенов. Основная функция IgA (ММ ≈500 кДа) — защита слизистых оболочек дыхательных, мочеполовых путей и желудочно-кишечного тракта от патогенных микроорганизмов и токсинов [237]. При постнатальном переносе факторов иммунитета с молозивом и молоком, кроме Ig класса G, новорожденному дополнительно передаются Ig классов A и M. Для видов с постнатальным переносом факторов иммунитета (отряд Парнокопытные) характерно не только высокое относительное содержание белка в молозиве и молоке, но и присутствие в этих секретах трех основных классов иммуноглобулинов — G, A и M. Для сравнения: у человека (отряд Приматов) основной перенос IgG осуществляется трансплацентарно, поэтому в молоке и молозиве *Homo sapiens* концентрация иммуноглобулиновой фракции ниже, чем у представителей Парнокопытных и Непарнокопытных, и в ней преобладают IgA и IgM (рис. 5) [200, 238–240].

Насколько эффективен перенос факторов пассивного иммунитета у млекопитающих и обеспечивает ли он защиту новорожденного?

Использование иммунного коровьего молока и молозива, а также концентратов коровьих антител способно обеспечить пассивную иммунную защиту от инфекционных заболеваний ЖКТ человека [241–244]. Антитела, содержащиеся в молозиве и молоке естественно иммунизированных матерей, обеспечивают защиту ребенка от кишечных и ряда других заболеваний [245].

Например, повышенные концентрации антител к кишечным патогенным микроорганизмам, таким как *Vibrio cholerae*, в грудном молоке матери предотвращают развитие диареи у новорожденных [246]. При грудном вскармливании детей раннего возраста частота возникновения диареи, вызванной бактериями рода *Campylobacter*, снижена по сравнению с новорожденными, которых не кормят грудью [247]. Пренатальная иммунизация беременных женщин однократной дозой менингококковой вакцины вызывает увеличение антиген-специфичных IgG в сыворотке крови младенца [248].

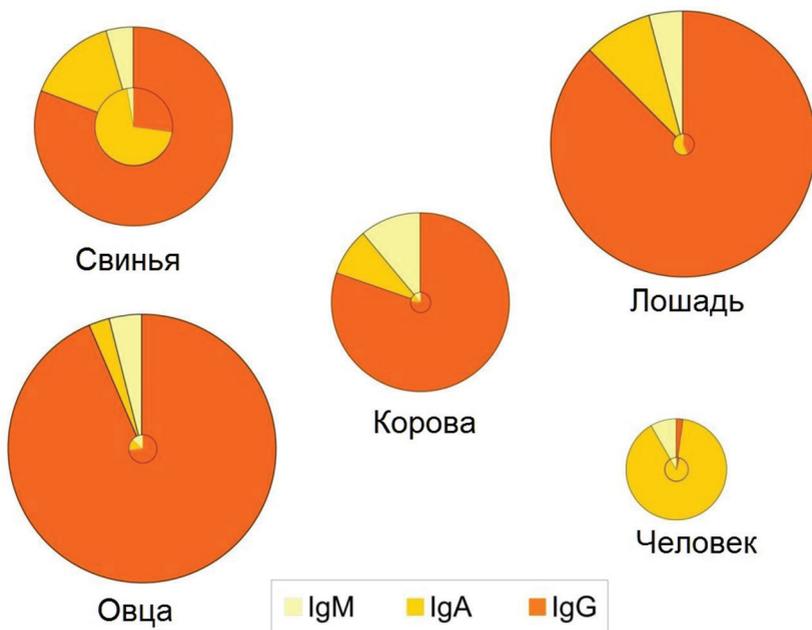


Рис. 5. Относительное содержание IgG, IgA и IgM в молозиве (внешние окружности) и молоке (внутренние окружности) пяти видов млекопитающих. Относительный диаметр окружностей отражает концентрацию отдельных фракций Ig в молозиве и молоке (по данным [200, 238–240])

Авторская ремарка: в данном случае мы сталкиваемся с парадоксом, связанным с тем, что у человека (и некоторых высоко развитых приматов с гемомонохориальным типом плаценты) Хн псевдогенизирован [39] и вместо него в качестве гастральной протеиназы синтезируется пепсин, обладающий высокой общей ПА. Тем не менее, несмотря на то что пепсин способен эффективно гидролизовать антитела, содержащиеся в материнском молоке, очевидно, что часть из них попадает в кишечник и в кровь новорожденного и обеспечивает его пассивную защиту. Возможно, инкорпорирование в молочный сгусток предохраняет антитела от тотальной протеолитической деградации в желудке. Вопрос о механизме защиты Ig человеческого молока от протеолиза гастральными протеазами в настоящее время открыт и требует изучения.

Известна технология иммунизации сельскохозяйственных животных для снижения заболеваемости и смертности приплода [249]. Вакцинация или естественная иммунизация беременных коров, овец и свиноматок

против энтеротоксигенной *Escherichia coli* [248–251] или кишечных вирусов [252, 253] снижают уровень заболеваемости новорожденных животных. Вышеизложенные факты свидетельствуют о том, что перенос пассивного иммунитета с молоком и молозивом эффективен и способен обеспечить защиту новорожденных млекопитающих от бактериальных и вирусных инфекций.

У видов с постнатальной передачей иммунитета (с эпителиохориальными, эндотелиохориальными и частично гемоди- и гемотрихориальными типами плацент) новорожденному молозиво является основным источником Ig (прежде всего класса G), обеспечивающих приобретенный пассивный иммунитет, тогда как молоко содержит нутриенты (казеины) и защитные белки не иммуноглобулинового ряда. Для того чтобы в первые дни лактации и молочного вскармливания предотвратить протеолитическую деградацию Ig и других защитных белков молока и молозива, желудок новорожденного должен синтезировать гастральную протеиназу с низкой общей ПА — химозин. При строгом трансплацентарном переносе антител, например у высших Приматов, концентрация белков и Ig в молозиве и молоке ниже, чем у видов с постнатальным переносом пассивного иммунитета, что сопровождается псевдогенизацией Хн [39].

Таким образом, у видов с постнатальным переносом факторов пассивного иммунитета с материнским молоком концентрация белка в молозиве может быть использована в качестве критерия выбора вида — источника Хн.

Глава 11

МОГУТ ЛИ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ КАППА-КАЗЕИНОВ БЫТЬ КРИТЕРИЯМИ ВЫБОРА ВИДА — ИСТОЧНИКА ХИМОЗИНА?

Каппа-казеин (к-КЗ) — главный биологический субстрат Хн. Основные функции и свойства казеинов (КЗ) — эффективное связывание и транспорт Ca^{2+} , а также способность к самоассоциации, приводящая к образованию стабильных коллоидных систем, — исследованы достаточно подробно [254, 255]. В отличие от функций, пространственная организация КЗ во многом остается *terra incognita*. Ранние работы с использованием методов оптического рассеивания показали, что в КЗ отсутствуют α -спиральные структуры, поэтому их стали считать белками с нерегулярной (случайной, хаотической, статистической) структурой. Это так называемый «старый взгляд» на структуру КЗ [254].

В основе нового взгляда на пространственную организацию КЗ лежит концепция нативно-неупорядоченной структуры некоторых белков. Принято считать, что нерегулярные белковые структуры образуются при действии определенных денатурирующих факторов — критических температур, хаотропных агентов, УФ-излучения и др. Но в последние годы становится очевидным, что белки, имеющие нерегулярную структуру, существуют и при физиологических условиях. То, что такие белки могут выполнять важные биологические функции, заставляет по-иному взглянуть на их структурно-функциональные характеристики [256]. В настоящее время к белкам с нативно-неупорядоченной структурой относят фосфофорины кости и фосвитины яичного желтка, ингибиторы протеаз Боумана-Бирка, металлотионеины, протимозин α , бактериальный фибронектин-связывающий белок, синуклеины мозга, а также α -, β - и **к-казеины** [257].

Как правило, белки с нативно-неупорядоченной структурой, в том числе и к-КЗ, богаты остатками Pro (или оксипролина) и характеризуются наличием особенного элемента вторичной структуры, который получил название поли-L-пролиновая спираль, или *транс*-спираль II типа. *Транс*-спираль II не образует водородных связей (стабилизацию структуры обеспечивают силы стерического отталкивания пирролидоновых колец в остатках Pro). Участки с высоким содержанием R-групп пролина (или оксипролина) придают молекуле пластичные, подвижные свойства и делают пространственную структуру белка более открытой или рыхлой.

Такая структура лучше описывается как реоморфная (греч. *rheos* — поток, *morphe* — форма), а не как случайный клубок. Открытая и относительно подвижная конформация к-КЗ позволяет протеолитическим и молоко-свертывающим ферментам легко гидролизовать эти белки [254, 258].

Уникальность Хн заключается в том, что, в отличие от других гастральных аспартатных протеиназ, этот фермент обладает исключительно высокой специфичностью к единственной связи к-КЗ — Phe105-Met106. Высока вероятность того, что в ходе эволюции изменения структур к-КЗ и Хн (узкоспециализированного фермента и его субстрата) шли «параллельными курсами». Поэтому, зная структуру фермента, можно прогнозировать структуру и свойства его субстрата *et vice versa*. Кроме того, на сегодняшний день массив данных о первичных структурах к-КЗ намного обширнее, чем для Хн (табл. 1).

Необходимость учета первичной структуры к-КЗ при поиске новых рекомбинантных коагулянтов коровьего молока вытекает из парадокса «Хн коровы — молоко верблюда». Суть парадокса в следующем: Хн коровы не коагулирует верблюжье молоко (или коагулирует, но очень медленно), что делает невозможным использование коровьего фермента для производства сыров из молока верблюда [24, 176, 259–262]. Для решения этой проблемы и выработки сыров из верблюжьего молока был получен верблюжий СФ, а позднее и рХн одногорбого верблюда. При исследовании последнего обнаружилось, что верблюжий рХн не только эффективно свертывает коровье молоко, но и превосходит рХн коровы по удельной МА и низкому уровню неспецифической ПА [14]. Было выдвинуто предположение о том, что причина парадокса кроется в различиях первичной структуры к-КЗ коровы и верблюда на участке 98-112 [263–265].

Авторская ремарка: фактически рХн верблюда, один из современных высокоэффективных ферментов для сыроделия, был открыт случайно — его создатели не искали новый сыродельный эталон, а просто пытались решить проблемы регионального сыроделия, сырьевую базу которого составляет верблюжье молоко.

Парадокс «Хн коровы — молоко верблюда» наиболее известный, но не единственный случай конфликта гетерологичных химозинов и к-КЗ среди Млекопитающих. Можно ожидать, что по мере получения новых данных о различных видах Хн число таких конфликтов будет увеличиваться. Согласно данным литературы, кроме верблюжьего молока, Хн коровы не способен коагулировать молоко лошади (*Equus caballus*) [176] и одного из представителей инфракласса Сумчатых млекопитающих — лисьего кузу (*Trichosurus vulpecula*) [126]. Кроме того, Хн коровы, по-видимому, намного медленнее свертывает молоко крысы (*Rattus*

norvegicus) и кролика (*Oryctolagus cuniculus*), чем молоко коровы (*Bos taurus*), козы (*Capra hircus*) и северного оленя (*Rangifer tarandus*) [266].

Химозин коровы **высокочувствителен** к аминокислотному составу к-КЗ в районе ключевой связи Phe105-Met106. Критичными для успешного взаимодействия коровьего Хн и к-КЗ, а также для гидролиза связи Phe105-Met106 являются аминокислоты, расположенные в ее непосредственной близости, на Хн-чувствительном участке 96-119 (рис. 6) [183]. Согласно результатам исследования [267], последовательность His98-Lys111 в молекуле к-КЗ отвечает за способность Хн гидролизовать ключевую пептидную связь Phe105-Met106. Подтверждая эти данные, Gilliland et al. также указывают на то, что положительно заряженные остатки His98, His100 и His102 взаимодействуют с отрицательно заряженными радикалами Glu288, Asp279, Asp280 химозина, расположенными на расстоянии 20-25 аминокислотных остатков от его активного центра [268].

Роль неполярных гетероциклических R-групп Pro99, Pro101, Pro109 и Pro110 заключается в стабилизации «правильной» конформации участка к-КЗ, расположенного в активном центре Хн [263]. Предполагается, что в момент протеазной атаки гидрофобный участок Leu103-Ile108 молекулы к-КЗ должен быть ассоциирован с гидрофобными аминокислотами, окружающими активный центр Хн [268]. Некоторые исследователи считают, что гистидин-пролиновый кластер (His98-Pro-His-Pro-His102) в молекуле к-КЗ является аллостерическим активатором превращения Хн из самоингибируемой формы в активную за счет взаимодействия с «комплементарными» а.к. последовательностями фермента, что повышает эффективность гидролиза связи Phe105-Met106 (механизм «активации фермента субстратом») [269–272]. Высокое содержание R-групп Pro на участке 99-110 (33,3 %) указывает на то, что этот участок может иметь подвижную пространственную организацию, характерную для белков с реоморфной структурой [257].



Рис. 6. Аминокислотная последовательность Хн-чувствительного участка к-КЗ коровы вблизи ключевой пептидной связи Phe105-Met106 [183]. Синим цветом обозначены щелочные (положительно заряженные а.к. радикалы), красным — кислые (а.к. радикалы, заряженные отрицательно)

Третичная структура аспарагиновых протеиназ представляет из себя два тандемных домена, степень гомологии которых составляет около 20 %. Каждый домен содержит один каталитический сайт (участок), в центре которого расположен остаток аспарагиновой кислоты — **Asp32** и **Asp215** (нумерация полипептидной цепи пепсина) [38, 268, 273]. Аминокислотная последовательность каждого каталитического участка выглядит следующим образом: [гидрофобный участок]-**Asp**-Thr-Gly-[Ser/Thr]. В областях, прилегающих к активным сайтам, полипептидная цепь образует ϕ -образную петлю таким образом, что остаток **Asp** оказывается окруженным преимущественно гидрофобными R-группами. Каталитические сайты расположены друг напротив друга (face-to-face), образуя один активный центр так, что расстояние между двумя остатками **Asp** составляет 3,5Å. Активный центр Хн расположен внутри складки (борозды) длиной около 40Å, которая разделяет два домена [268, 273]. Субстратная специфичность Хн диктуется свойствами специфических участков, или субсайтов связывания, расположенных вдоль борозды активного центра. Как правило, субсайт связывания образуют несколько непоследовательных а.к. остатков Хн (табл. 9), которые пространственно ориентированы так, что способны за счет ионных, водородных, гидрофобных связей взаимодействовать с определенными R-группами субстрата, непосредственно прилегающими к гидролизуемой пептидной связи [274].

Таблица 9

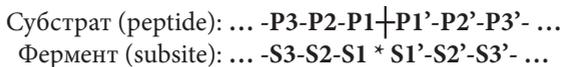
Взаимодействие аминокислотных остатков к-казеина и химозина [269]

Субсайты химозина	Аминокислотные остатки к-казеина	Аминокислотные остатки химозина, взаимодействующие с а.к. остатками к-казеина
S4	His102	Ser219, Lys220, Gln288
S3	Leu103	Ser12, Gln13, Tyr75, Phe117, Gly217, Thr218, Ser219
S2	Ser104	Gly76, Thr77, Gly217, Thr218, Lys220
S1	Phe105	Leu30, Asp32 , Gly34, Tyr75, Gly76, Phe117, Ile120, Asp215, Gly217
S1'	Met106	Gly34, Tyr189, Asp215 , Thr218, Glu289, Ile301
S2'	Ala107	Gly34, Ser35, Tyr189
S3'	Ile108	Tyr189

Для характеристики специфичности пептидаз по отношению к гидролизуемой пептидной связи и расположенных в непосредственной близости от нее последовательности а.к. остатков применяется терминология,

предложенная I.Schechter & A. Berger, первоначально использованная для описания специфичности папаина [275].

Специфичность пептидазы описывается при помощи концептуальной модели, в которой каталитические субсайты фермента способны пространственно «подгонять» (расставлять, аккомодировать) боковые цепи отдельных а.к. остатков субстрата таким образом, что гидролизуемая пептидная связь субстрата точно «подгоняется» к каталитическому сайту фермента. Субсайты протеазы были обозначены символом S (subsite), а соответствующие а.к. остатки субстрата обозначены как P (peptide). Обозначения P1 и P1' относятся к а.к. остаткам, расположенным возле расщепляемой связи, а сама связь обозначается значком †. Каталитические субсайты N-концевого участка протеазы обозначаются как S1, S2...Sn, а C-концевого — как S1', S2'...Sn'. Аминокислотные остатки, которые они аккомодируют (расставляют), обозначаются, соответственно, как P1, P2 ... Pn и P1', P2' ... Pn'. Например, в данной схеме:



каталитический сайт фермента обозначен символом *, а гидролизуемая пептидная связь значком †. Для коровьего к-КЗ, являющегося субстратом Хн, а.к. остатки, участвующие во взаимодействиях с субсайтами фермента, обозначаются как:

His102	Leu103	Ser104	Phe105	†	Met106	Ala107	Ile108	Pro109
P4	P3	P2	P1		P1'	P2'	P3'	P4'

Субстратная специфичность Хн по отношению к к-казеину. Гидролиз связи Phe105-Met106 в молекуле к-казеина приводит к образованию двух продуктов: гидрофобного N-терминального фрагмента, называемого *пара*-к-КЗ (fGln1-Phe105), который остается связанным с казеиновой мицеллой, и гидрофильного отрицательно заряженного C-терминального фрагмента — гликомакропептида (ГМП), или казеинмакропептида (КМП) (fMet106-Val169), который отходит в сыворотку [176]. *Пара*-к-КЗ имеет несколько потенциальных сайтов гидролиза химозином, но, по данным [276], ни в сыре типа Чеддар, ни в растворе протеолиз по этим связям не реализуется. Coolbear et al. сообщали, что им удалось идентифицировать два минорных продукта протеолиза *пара*-к-казеина химозином при pH 6,6 с N-терминальными остатками Phe18 и Ser33. При pH 5,5–4,5 *пара*-к-казеин достаточно быстро «разрезается» химозином по меньшей мере на 6 фрагментов, N-терминус одного из которых содержит Trp76 [277]. Таким образом, идентифицированными сайтами гидролиза *пара*-к-КЗ являются связи: Phe17-Phe18 и Leu32-Ser33 и Gln75-Trp76.

В отличие от *para*-κ-КЗ, ГМП при рН 6,6–4,5 устойчив к протеолитическому действию Хн и только при рН 2,3 гидролизует по связям: Thr124-Phe125, Glu137-Ala138, Ala138-Val139, Ala144-Thr145, Leu146-Glu147 [277]. Таким образом, при понижении рН субстратная специфичность Хн коровы по отношению к КМП расширяется.

Субстратная специфичность Хн по отношению к α- и β-казеинам. Кроме специфической активности, мишенью которой служит последовательность Phe105-Met106 в молекуле κ-КЗ, Хн коровы гидролизует некоторые другие пептидные связи в молекулах α- и β-казеинов [176, 278].

В слабокислой среде при рН 5,4 Хн коровы способен с различной скоростью гидролизовать 7 пептидных связей в молекуле β-КЗ: Leu192-Tyr193>Ala189-Phe190>Leu165-Ser166>Gln167-Ser168>Leu163-Ser164>Leu193-Leu194>Leu127-Thr128. При 5 % NaCl гидролиз в значительной степени ингибируется, а при 10 % — полностью подавляется [279].

При рН свертывания молока (≈6,5) Хн атакует 8 связей в молекуле α1-КЗ: Phe23-Phe24, Phe28-Phe29, Leu40-Ser41, Leu149-Phe150, Phe153-Tyr154, Leu156-Asp157, Tyr159-Pro160 и Tyr164-Tyr165. В отличие от β-КЗ, гидролиз α1-КЗ при повышении ионной силы ускоряется, при 5 % NaCl дополнительно гидролизует 5 связей: Leu11-Pro12, Phe32-Gly33, Leu101-Lys102, Leu142-Ala143, Phe179-Ser180 [280].

По данным McSweeney et al., при рН 6,5 в молекуле α2-КЗ химозин гидролизует 7 связей: Phe88-Tyr89, Tyr95-Leu96, Gln97-Tyr98, Tyr98-Leu99, Leu99-Tyr100, Phe163-Leu164, Phe174-Ala175, и Tyr179-Leu180 [281].

Таким образом, Хн коровы способен при различных условиях (рН, ионная сила) гидролизовать пептидные связи, расположенные между следующими R-группами:

- двумя гидрофобными (Phe-Met, Phe-Phe, Ala-Val, Ala-Phe, Leu-Leu, Leu-Pro, Leu-Phe, Leu-Ala, Phe-Leu, Phe-Ala);
- гидрофобной и незаряженной полярной (Leu-Ser, Gln-Trp, Thr-Ile, Ala-Thr, Leu-Tyr, Leu-Thr, Phe-Tyr, Tyr-Pro, Phe-Gly, Phe-Ser, Tyr-Leu);
- двумя незаряженными полярными (Gln-Ser, Tyr-Tyr, Gln-Tyr);
- гидрофобной и анионной (Leu-Glu, Glu-Ala, Leu-Asp);
- гидрофобной и катионной (Leu-Lys).

Несмотря на то что спектр пептидных связей, которые способен гидролизовать Хн коровы, достаточно широк, эффективность неспецифической

ПА этого фермента на 2–3 порядка ниже, чем скорость его специфической (молокосвертывающей) ПА. Например, каталитическая эффективность (k_{cat}/K_m) гидролиза пептидных связей Phe105-Met106 (κ -КЗ), Leu192-Tyr193 (β -КЗ) и Phe23-Phe24 (α -КЗ) составляет, соответственно, 1402,0, 20,6 и 1,8 ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$) [278].

Гидролиз химозином казеинов различных видов. Как мы уже говорили, существует гипотеза о том, что нативный Хн находится в неактивном конформационном состоянии и его активация происходит непосредственно в момент связывания с субстратом (κ -казеином) [272, 276]. Авторы гипотезы предположили, что важную роль в конформационной активации химозина играет аминокислотный состав участка 98-102 в молекуле κ -КЗ коровы. Различия в а.к. последовательности этого участка в молекулах κ -КЗ среди млекопитающих, по-видимому, определяет особенности свертывания молока различной видовой принадлежности под действием Хн коровы.

Из данных, представленных в таблице 10, видно, что κ -КЗ коровы, козы, овцы и буйвола имеют идентичные последовательности 98-102. А вот κ -КЗ лошади, верблюда, свиньи, крысы и человека имеют на этом же участке (98-102) совершенно другие структуры [282, 283].

Противоречивые данные о способности молока верблюда коагулировать в присутствии химозина коровы, объясняются тем, что S.R. Carreler et al. [14] использовали рекомбинантный (100 %) химозин (ChyMax®, «Chr. Hansen A/S»), а Z. Farah [284] применял препараты натурального сычужного фермента, обязательно содержащие примесь пепсина, который и вызывал медленное образование сгустка.

Известно, что натуральный Хн коровы не свертывает (или свертывает очень медленно) молоко лошади, верблюда, свиньи, крысы и человека [193]. Вероятно, это может объясняться тем, что в молоке этих видов Хн коровы не активируется (или активируется, но очень медленно) из-за различий в структуре последовательности 98-102 в молекулах κ -казеинов. В то же время существует успешная практика коммерческого применения натурального и рекомбинантного Хн коровы в сыроделии с использованием молока овец, коз и буйволов. И этот факт свидетельствует в пользу гипотезы о важной роли а.к. остатков 98-102 молекулы κ -КЗ в активации химозина субстратом.

Таблица 10

Влияние аминокислотной последовательности участка 98-102 в молекуле κ-казеина различных млекопитающих на видовые особенности взаимодействия молока с химозином коровы [14, 193, 282–284]

Вид	Структура участка 98-102 в молекуле каппа-казеина	Реакция молока данного вида на химозин коровы
Корова	-His98- Pro99-His100- Pro101-His102-	Свертывается
Коза	-His98- Pro99-His100- Pro101-His102-	Свертывается
Овца	-His98- Pro99-His100- Pro101-His102-	Свертывается
Буйвол	-His98- Pro99-His100- Pro101-His102-	Свертывается
Лошадь	-His98- Pro99-Arg100-Pro101-His102-	Не свертывается
Верблюд	-Arg98-Pro99-Arg100-Pro101-Arg102-	Свертывается* очень медленно
Свинья	-Arg98-Pro99-Arg100-Pro101-His102-	Свертывается очень медленно
Крыса	-His98- Pro99- Ile 100-Asn101-Pro102-	Не свертывается
Человек	-Arg98-Pro99-Asn100-Leu101-His102-	Не свертывается

* — литературные данные противоречивы: согласно S.R. Kappeler et al. (2006), химозин коровы не сворачивает молоко верблюда [14], Z. Farah (1993) утверждает, что под действием химозина коровы в верблюжьем молоке очень медленно образуется слабый сгусток [284]; однако в работе [284] использовался не чистый химозин, а препарат сычужного фермента, который наряду с химозином ВСЕГ-ДА содержит примесь пепсина, который, вероятно, и был причиной образования слабого сгустка.

По-видимому, тонкие физико-химические механизмы свертывания молока различных видов животных и коровьего молока химозином коровы имеют существенные отличия. Так, например, коровий Хн способен коагулировать свиное молоко при температуре 4 °С, тогда как при этой же температуре в коровьем молоке сгусток не образуется. Этот феномен до настоящего времени не имеет объяснения.

Особенности гидролиза химозином КЗ различных видов Млекопитающих изучены в основном для представителей отряда Парнокопытных. Известна способность рХн одногорбого верблюда, альпака, козы, овцы, яка, свиньи и буйвола коагулировать молоко коровы [12, 14, 20, 27, 47]. О парадоксе «Хн коровы — молоко верблюда» и других примерах «конфликта» гетерологичных химозинов и κ-казеинов сказано выше. Сведения о способности натурального Хн кольчатой нерпы и натурального Хн-подобного фермента гренландского тюленя свертывать молоко коровы рассмотрены в главе 5.

По данным разных авторов, продукты гидролиза химозином коровы β -КЗ коровы, козы и свиньи имеют очень близкий [285] или идентичный [286, 287] а.к. состав.

В ходе изучения протеолитической активности рХн коровы по отношению к КЗ коровы, козы и буйвола показано, что специфичность к пептидным связям этих белков была похожей и приводила к образованию идентичных продуктов гидролиза α s1-КЗ (f24-199) и β -КЗ (f1163/4/5, f1-192, f1-139) [288].

Интересно взаимодействие Хн и молока Непарнокопытных, для которых характерно низкое содержание общего белка и к-КЗ. При рН 6,5 в β -КЗ лошади Хн коровы «режет» связь Leu190-Tyr191, а в к-КЗ — очень медленно гидролизует связь Phe-Ile в положении 97-98 (соответствует связи Phe105-Met106 в к-КЗ коровы). Снижение рН до значений <6,2 приводит к увеличению продуктов гидролиза [289]. При этом молоко лошади химозином коровы не свертывается [290]. Молоко ослицы под действием Хн коровы хоть и коагулирует, но формирует очень слабый сгусток, модуль упругости (G') которого в 13–18 раз меньше, чем G' сгустка коровьего молока, полученного в тех же условиях [290]. Такой слабый сгусток не позволяет получать и обрабатывать сырное зерно, поэтому сыры из ослиного молока не производятся [291]. В отличие от Хн коровы рХн одnogорбого верблюда коагулирует молоко ослицы и даже позволяет выработать из полученного сгустка сыр, правда, с очень низким выходом (3,32 %) [290].

По данным Foltmann, натуральный Хн кошки способен свертывать молоко коровы, но делает это примерно в 6 раз медленнее, чем Хн коровы [47]. Kotts & Jenness сообщали, что «к-КЗ-подобные белки», выделенные методом изоэлектрического осаждения из молока лошади (к-КЗ группы № 2 — Phe105-Ile106), крысы (к-КЗ группы № 2 — Phe105-Leu106) и кролика (к-КЗ группы № 1 — Phe105-Met106), гидролизуются высокоочищенным натуральным химозином коровы намного медленнее, чем аналогичные препараты, полученные из молока северного оленя, коровы и козы (все к-КЗ также относятся к группе № 1 — Phe105-Met106) [266].

Сравнение а.к. последовательностей к-КЗ различных таксономических групп с к-КЗ коровы. До сих пор ни один из видов млекопитающих за пределами отряда Парнокопытных не стал источником рХн для потенциального использования в сыроделии.

Сравнение гомологии первичных последовательностей семи видов рХн представителей отряда Парнокопытных указывает на то, что данный критерий в случае поиска новых технологически значимых коагулянтов коровьего молока вряд ли можно использовать по принципу «чем выше —

тем лучше». Скорее, наоборот. Например, если а.к. последовательность Хн коровы взять в качестве референтной (100 %), то гомология первичной структуры Хн козы, буйвола, яка и овцы составит соответственно 94,0, 98,4, 99,2 и 94,2 % (Приложение А). Несмотря на высокую степень гомологии, химозины этих видов не превосходят рХн коровы по главным технологическим показателям.

Напротив, по сравнению с Хн коровы гомология а.к. последовательности Хн одногорбого верблюда и альпака почти на 10 % ниже и составляет «всего» 83,7 и 84,0 % (Приложение А). Однако один из этих ферментов — рХн одногорбого верблюда — является признанной коммерческой альтернативой коровьему ферменту и фактически одним из двух эталонных МФ в сыроделии, а другой (рХн альпака) превосходит рХн коровы по важнейшему технологическому показателю — специфичности [20].

Исходя из современных представлений о детерминированности структуры ферментов и субстратов, а именно о комплементарности определенных участков субстрата субсайтам специфичности фермента, интересно хотя бы приблизительно попытаться предсказать (оценить) свойства еще не изученных ферментов на основе сравнительного анализа Хн-чувствительных участков к-КЗ коровы и представителей различных таксономических групп млекопитающих.

В данном разделе рассмотрены результаты сравнительного анализа структуры основных биологических субстратов химозинов — к-казеинов коровы и представителей семейства Верблюдовых (получены и исследованы два вида рХн), семейства Оленевых (структура гена устанавливается для трех видов, но рХн не получены), отряда Тупайи (установлена а.к. последовательность Хн 1-го вида, рХн — не получен), отряда Хищные (известны структуры 18и Хн-подобных ферментов, но ни один из них не получен), отряда Китообразные (известны структуры пяти Хн и четырех Хн-подобных ферментов, но ни один из них также не синтезирован), рода Овцебыки (нуклеотидная последовательность гена Хн не установлена), рода Оронго (структура гена Хн известна, рХн не получен) и инфракласса Сумчатые (известны а.к. последовательности Хн четырех видов, ни один из них не получен). При необходимости подобный анализ может быть выполнен для любых групп млекопитающих с известными а.к. последовательностями к-КЗ. Это первая попытка такого исследования.

Последовательность а.к. к-КЗ коровы взята в качестве референтной по двум причинам. Во-первых, Хн коровы хронологически является первым эталонным ферментом для сыроделия. Во-вторых, основная масса сыров вырабатывается из коровьего молока. Для приводимого ниже ана-

лиза может быть использована а.к. последовательность к-КЗ одногорбого верблюда, поскольку верблюжий Хн по двум технологическим параметрам (удельная МА и специфичность) превосходит Хн коровы и в настоящее время также считается эталонным молокосвертывающим ферментом.

Отряд Парнокопытные (*Artiodactyla*), семейство Верблюдовые (*Camelidae*). Итак, Хн коровы с высокой скоростью коагулирует коровье молоко, но не свертывает (или свертывает очень медленно) молоко другого представителя Парнокопытных — верблюда [14]. Данный факт позволяет говорить о Хн коровы как о ферменте с «узкой специализацией», «неуниверсальном». Неспособность коровьего Хн эффективно свертывать молоко верблюда может быть связана с различиями в а.к. последовательностях к-КЗ коровы и верблюда.

Доступные для сравнения а.к. последовательности к-КЗ коровы и представителей семейства Верблюдовых гомологичны всего на 53,8–59,7 % (рис. 7). Эти значения являются промежуточными для Млекопитающих (табл. 1) и одними из самых низких в отряде Парнокопытные.

Анализ локальных выравниваний к-КЗ коровы и Верблюдовых позволяет выявить не только замену Met→Ple в положении 106, но и значительные различия а.к. последовательностей в районе 96-119, вблизи ключевой пептидной связи P1-P1'. На коротком участке, состоящем из 24 аминокислот (96-119), мы наблюдаем от 8 до 9 замен, что составляет 33,3–37,5 % (рис. 4). Остатки Pro99, Pro101, Pro109, Pro110 в к-КЗ *Bos taurus* и Верблюдовых консервативны, и это указывает на их значимость для взаимодействия с Хн. Во всех известных к-КЗ Верблюдовых в положении 103 наблюдается замена Leu→Pro, которая усиливает реоморфность Хн-чувствительной области. Эти замены, а также замена неполярного (гидрофобного) серосодержащего радикала на гидрофобный алифатический (Met106→Ple) оказываются критическими для Хн коровы, который в итоге не способен гидролизовать верблюжий к-КЗ и коагулировать молоко одногорбого верблюда.

Гомология участков 96-119 к-казеинов коровы и представителей семейства Верблюдовых составляет 62,5–66,7 %.

Но если в качестве референтной взять последовательность к-КЗ одногорбого верблюда и сравнить ее с последовательностью к-КЗ коровы, можно прийти к обратному выводу: замены Ple106→Met (обе R-группы — неполярные (гидрофобные)), Pro103→Leu (оба а.к. остатка — неполярные), а также замещение Arg в положении 98, 100 и 102 на His (т.е. замены одного гидрофильного положительно заряженного а.к. остатка на другой) не влияют на способность рХн одногорбого верблюда эффективно коагулировать коровье молоко.

96

119

ARHPRPHLSF-MAIPPKKKQDKTEI Bos taurus (●)
 ERRPRPRPSF-IAIPPKKTQDKTVI Lama glama (59,7 %)
 ERRPRPRPSF-IAIPPKKTQDKTVN Camelus bactrianus (59,0 %)
 ERRPRPRPSF-IAIPPKKTQDKTVN Camelus dromedarius (58,4 %) (●)
 ERRPRPRPSF-IAIPPKKTQDKTVN Camelus ferus (53,8 %)

Рис. 7. Аминокислотные последовательности к-КЗ коровы и некоторых представителей семейства Верблюдовых (на Хн-чувствительном участке, соответствующем а.к. последовательности 96-119 в молекуле к-КЗ коровы). В скобках после видовых названий указана степень гомологии первичной структуры к-КЗ данного вида по отношению к к-КЗ коровы.

Красным цветом выделена последовательность 105-106 в молекуле к-КЗ коровы. Виды, рекомбинантные химозины которых получены, обозначены значком (●). Зеленым цветом выделены полярные заряженные R-группы. Желтым цветом выделены аминокислотные замены.

Серым цветом выделен гидрофобный мотив Leu103-Pro110.

Пептидная связь последовательностей 105-106 обозначена знаком «-».

Аминокислотные последовательности взяты из баз данных BLAST

Это позволяет утверждать, что в природе существуют химозины более универсального типа (чем Хн коровы), т.е. менее чувствительные к аминокислотной последовательности к-КЗ в районе 96-119 и, в частности, в положении P1-P1'. Примером такого МФ является Хн одногорбого верблюда. Несмотря на значительные различия в последовательности а.к. коровьего и верблюжьего к-казеинов, рХн верблюда не только эффективно свертывает коровье молоко, но и превосходит рХн коровы по удельной МА и специфичности (соотношению МА и общей ПА) [14]. Другой представитель семейства Верблюдовых — альпака — также не уступает рХн коровы по удельной МА и превосходит коровий фермент по соотношению МА и общей ПА [201].

Химозины верблюдов и альпака гомологичны Хн коровы на 83,7 и 84,0 %. Кладограммы, представленные на рисунке 8, свидетельствуют, что и к-КЗ ламы и Хн альпака в эволюционном плане ближе к коровьим, чем белки и ферменты одногорбого и двугорбого верблюда. Не исключено, что лама и гуанако наряду с альпака являются источниками перспективных Хн для сыроделия.

Вышеизложенные факты позволяют предполагать, что по биохимическим и технологическим свойствам химозины еще не исследованных представителей Верблюдовых является такими же универсальными, как и Хн

Прецедент высокой специфичности и каталитической эффективности рХн одногорбого верблюда по отношению к к-КЗ коровы (а.к. последовательность которого заметно отличается от последовательности к-КЗ верблюда) позволяет надеяться на существование аналогичных МФ, способных коагулировать гетерологичное молоко, и в других таксономических группах млекопитающих.

Отряд Парнокопытные (*Artiodactyla*), семейство Оленевые (*Cervidae*). Ранее полученный и охарактеризованный натуральный молокосвертывающий фермент из сычугов северного оленя имеет высокую МА и низкую ПА по сравнению с СФ коровы [9–11], что позволяет предполагать наличие в семействе Оленевых химозинов с привлекательными для сыроделия технологическими свойствами.

Аминокислотные последовательности к-казеинов коровы и 13 представителей семейства Оленевых гомологичны на 78–85 % (рис. 9). Это одни из самых высоких показателей среди всех млекопитающих, не относящихся к роду *Bos*. Гомология к-КЗ Оленевых с к-КЗ коровы на участке 96-119 примерно вдвое выше, чем у представителей Верблюдовых. При анализе выравниваний последовательностей к-КЗ коровы и Оленевых выявлено от 2 до 4 аминокислотных замен в районе 96-119, что составляет 8,3–16,7 %. В основном это замены His→Arg (замена одной положительно заряженной полярной аминокислоты на другую) в положении 102 и Glu→Asp в положении 118 (рис. 6). При этом два вида — индийский болотный олень (барасинга) (*Rucervus duvaucelii*) и индийский замбар (*Rusa unicolor*) — имеют на участке 96-119 по одной а.к. замене (Glu→Asp в положении 118, оба а.к. радикала заряжены отрицательно). Последовательность аминокислот в непосредственной близости от связи P1-P1' — консервативный гидрофобный мотив Leu103-Pro110 — полностью совпадает в к-КЗ *Bos taurus* и во всех известных последовательностях семейства Оленевых.

Гомология участков 96-119 к-казеинов коровы и представителей семейства Оленевых составляет 83,3–95,8 %.

Все эти данные позволяют предполагать, что химозины Оленевых должны эффективно свертывать коровье молоко.

Структура гена Хн (на I квартал 2020 г.) известна лишь для единственного представителя Оленевых — белохвостого оленя (*Odocoileus virginianus texanus*). Рекомбинантный Хн этого вида не получен. Гомология а.к. последовательности Хн *Bos taurus* и *Odocoileus virginianus texanus* составляет 93,4 %.

ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTEI *Bos taurus* (●)
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Odocoileus virginianus* (84,7 %)
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Cervus nippon* (sika deer) (82,6 %)
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Alces alces* (85,3 %)*
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Rangifer tarandus* (85,3 %)*
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Capreolus capreolus* (83,6 %)
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Odocoileus hemionus* (84,4 %)
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Mazama americana* (83,6 %)
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Rucervus duvaucelii* (82,0 %)
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Odocoileus virginianus* (83,6 %)
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Rusa unicolor* (sambar) (82,0 %)
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Cervus elaphus* (red deer) (82,0 %)*
ARHHPHRLSE-MAIPPKKNQDKTDI *Elaphurus davidianus* (82,0 %)
ARHHPHRLSE-MAIPPKKSQDKTDH *Muntiacus reevesi* (77,9 %)

Рис. 9. Аминокислотные последовательности к-К3 коровы и некоторых представителей семейства Оленевых (на Хн-чувствительном участке, соответствующем а.к. последовательности 96-119 в молекуле к-К3 коровы). В скобках после видовых названий указана степень гомологии первичной структуры к-К3 данного вида по отношению к к-К3 коровы.

Вид, рекомбинантный химозин которого получен, обозначен значком (●). Красным цветом выделена последовательность 105-106 в молекуле к-К3 коровы. Зеленым цветом выделены полярные заряженные R-группы. Желтым цветом выделены аминокислотные замены. Серым цветом выделен консервативный гидрофобный мотив Leu103-Pro110. Звездочкой (*) отмечены виды, структура генов Хн которых в настоящее время устанавливается. Пептидная связь последовательностей 105-106 обозначена знаком «-».

Аминокислотные последовательности взяты из баз данных BLAST

Не считая результаты исследования МФ из сычугов северного оленя (который не был идентифицирован как Хн или пепсин), данные о технологических свойствах натуральных или генно-инженерных химозинов семейства Оленевых в научной периодике отсутствуют. Рекомбинантные химозины ни одного из представителей этого семейства (по состоянию на начало 2020 г.) не получены. А.к. последовательности к-К3 и Хн коровы и Оленевых позволяет предполагать высокую коагуляционную эффективность оленьих химозинов по отношению к коровьему молоку. Поэтому актуальной биотехнологической задачей является установление структуры генов химозинов семейства Оленевых, что позволит получить и исследовать технологические свойства этих ферментов.

Отряд Тупайи (*Scandentia*). Тупайи представляют интерес в связи с высоким содержанием белка в молоке (8–15 %) [74] и необычной стратегией выкармливания новорожденных — интервал между кормлениями достигает 48 часов. Сочетание этих особенностей позволяет предполагать, что тупайи экспрессируют Хн с низкой общей ПА.

Степень гомологии первичной структуры Хн коровы и Хн тупайи достаточно высока, составляет 81,6 % и может свидетельствовать о значительной гомологии первичных структур субстратов этих ферментов. В базах данных NCBI присутствует одна а.к. последовательность к-КЗ для китайского подвида малайской тупайи (*Tupaia belangeri chinensis*) (на сегодня это единственный представитель отряда с известной а.к. последовательностью Хн). Удивительно, но при высокой гомологии первичных последовательностей химозинов тупайи и коровы гомология а.к. последовательностей к-КЗ этих животных одна из самых низких среди известных последовательностей млекопитающих — 41,9 % (табл. 1). Может быть, это свидетельство «универсальности» Хн *Tupaia belangeri chinensis*?

Анализ локального выравнивания последовательностей к-КЗ коровы и тупайи указывает на крайне низкую гомологию на участке 96-119 (рис. 10), которая составляет 25,0 % (совпадают 6 остатков из 24). В первую очередь отметим две замены на участке «ключевой» пептидной связи: Phe105→Leu (неполярный ароматический радикал заменен на неполярный алифатический) и Met106→Lys (гидрофобный серосодержащий радикал заменен на гидрофильный, заряженный положительно).

На участке гистидин-пролинового кластера 98-102 (-Н-Р-Н-Р-Н-) заменены 3 аминокислоты из 5: His98→Tyr (гидрофильный остаток со слабо ионизированной имидазольной группой→полярная, гидроксилсодержащая R-группа), His100→Thr (→полярная гидроксилсодержащая R-группа), Pro101→Ser (гидрофобная R-группа→гидрофильная, гидроксилсодержащая R-группа). Таким образом, последовательность а.к. на участке 98-102, который в молекуле к-КЗ коровы представлен гистидин-пролиновым кластером, вероятно, ответственным за аллостерическую активацию Хн, в к-КЗ тупайи в значительной степени изменена, за исключением консервативных Pro99 и His102. Характер и объем а.к. замен в последовательности 98-102, к-КЗ тупайи ставит под сомнение возможность функционирования этого участка в качестве аллостерического активатора для Хн коровы или верблюда. Можно полагать, что Хн тупайи или не активируется субстратом, или активируется за счет других участков к-КЗ.

В целом на Хн-чувствительном участке 96-119 обращает на себя внимание консервативность остатков Pro99, Lys111, Lys112, Thr 117, что характерно не только для к-КЗ тупайи, но и для каппа-казеинов Оленевых и Верблюдовых (рис. 7, 9).

На участке 103-108, который является гидрофобным мотивом в к-КЗ коровы, мы наблюдаем 100 % замен: Leu103→Pro (обе а.к. — гидрофобные), Ser104→Gln (обе а.к. — полярные незаряженные), замены в положении 105-106 обсуждались выше, Ala107→Gly (R-группа -CH₃ → -H), Ile108→Met (обе а.к. — гидрофобные). Отметим, что R-группы аминокислот на участке 103-108 в к-КЗ тупайи и коровы в основном (не считая замены Met106→Lys) имеют близкие физико-химические характеристики.

Согласно классификации, предложенной Mercier et al. и Nakhasi et al., к-КЗ млекопитающих условно можно разделить на две группы. В к-КЗ, относящихся к группе № 1, сайтом гидролиза, химозином является связь Phe105-Met106. Каппа-КЗ первой группы характерен для представителей подотряда Жвачные (*Ruminantia*). В к-КЗ, относящихся к группе № 2, Met в положении 106 заменен на Ile или Leu, и Хн-чувствительный сайт имеет структуру Phe105-Ile106 или Phe105-Leu106. Каппа-казеины группы № 2 характерны для представителей отрядов Приматы (*Primates*), Китообразные (*Cetacea*), Непарнокопытные (*Perissodactyla*), некоторых Парнокопытных (*Artiodactyla*), в частности семейств Свиньи (*Suidae*), Пекариевые (*Tayassuidae*), Верблюдовые (*Camelidae*) [124, 125]. Согласно результатам, опубликованным Stasiuk et al., у некоторых представителей Сумчатых (*Marsupialia*) связь 105-106 в молекуле к-КЗ имеет структуру Phe-Ala, что позволяет выделить эти белки в группу № 3 [126]. Вместе с тем данные о сайте гидролиза химозинами Сумчатых, гомологичными к-КЗ, в научной периодике не найдены.

Каппа-КЗ тупайи в положении 105-106 несет остатки Leu-Lys — т.е. полностью отличается от структуры к-КЗ групп № 1, № 2 и № 3, состоящих из тандема гидрофобных а.к. остатков. В то же время нужно принимать во внимание способность Хн коровы гидролизовать связи типа Leu-Lys, например, связь Leu101-Lys102 в молекуле αS1-КЗ коровы [18в]. Литературных данных о сайте гидролиза к-КЗ тупайи каким-либо видом Хн нет. Таким образом, в случае *Tupaia belangeri chinensis* мы либо имеем дело с к-КЗ новой, 4-й группы, у которого не только связь 105-106, но и весь участок вблизи Хн-чувствительной связи почти полностью отличается от структуры к-КЗ коровы и верблюда (рис. 7), либо к-КЗ тупайи гидролизуется химозином не в положении 105-106.

96

ARRHRPHLSF-MAIPPKKNQDKTEI Bos taurus (●)

VHYPTSHPQL-KGMSLKKIPTKTNT Tupaia belangeri chinensis (41,9 %)

119

ERRRPRRPSF-IAIPPKKTQDKTVN Camelus dromedarius (58,4 %) (●)

Рис. 10. Аминокислотные последовательности к-КЗ коровы и представителя отряда Тупайи (на Хн-чувствительном участке, соответствующем а.к. последовательности 96-119 в молекуле к-КЗ коровы). В скобках после видового названия указана степень гомологии первичной структуры к-КЗ данного вида по отношению к к-КЗ коровы. Виды, рекомбинантные химозины которых получены, обозначены значком (●). Красным цветом отмечена последовательность 105-106 в молекуле к-КЗ коровы.

Зеленым цветом выделены аминокислотные замены. Серым цветом выделен гидрофобный мотив Leu103-Pro110. Пунктирной линией отделен участок последовательности к-КЗ одногорбого верблюда, в которой сиреневым цветом выделены а.к. остатки, совпадающие с а.к. к-КЗ тупайи.

Пептидная связь последовательностей 105-106 обозначена знаком «-».

Аминокислотные последовательности взяты из баз данных BLAST

Авторская ремарка: в качестве примера в пользу такого предположения можно привести одну из пепсиноподобных аспартатных эндопептидаз, ограниченно используемых в сыроделии, — эндотиапепсин (ЕС 3.4.23.22). Этот фермент гидролизует в молекуле к-КЗ коровы не ключевую связь Phe105-Met106, а предшествующую ей последовательность — Ser104-Phe105, где в положении P1 находится незаряженная полярная R-группа серина. И это несмотря на то, что специфичность эндотиапепсина близка к специфичности свиного пепсина, т.е. предпочтительными для гидролиза являются гидрофобные R-группы аминокислот в положении P1 и P1' [292, 293].

Различия в первичной структуре к-КЗ коровы и тупайи составляют 58,1 %, а на Хн-чувствительном участке 96-119 — 75,0 %. Это является основанием для того, чтобы усомниться в способности Хн *Tupaia belangeri chinensis* свертывать молоко коровы, даже несмотря на высокую гомологию а.к. последовательности химозинов тупайи и коровы (81,6 %). Подтвердить или опровергнуть эти сомнения можно только экспериментально, получив рХн тупайи и исследовав его МА на коровьем молоке (в данном случае, как и в ситуации с Оленевыми, нам не хватает данных о биохимических и технологических свойствах Хн хотя бы для одного представителя отряда *Scandentia*).

Выше мы уже обращали внимание на то, что различия в а.к. последовательностях к-КЗ *Bos taurus* и одногорбого верблюда не отменяют способ-

ность верблюжьего Хн свертывать коровье молоко [14]. Однако стоит отметить, что в случае к-КЗ Верблюдовых количество а.к. замен на участке 96-119 почти вдвое меньше, чем в к-КЗ тупайи (8–9 против 18), и в большинстве случаев заменяемые R-группы имеют аналогичные или близкие физико-химические свойства. В то же время а.к. последовательности химозинов тупайи и одногорбого верблюда гомологичны на 81,1 %.

Получение и исследование рХн тупайи представляет фундаментальный интерес с точки зрения специфичности МФ, эволюционно отдаленных от *Bos taurus* видов, по отношению к к-КЗ коровы. Для начала достаточно будет получить рХн *Tupaia belangeri chinensis* (а в идеале — нескольких представителей данного отряда) и оценить его МА с использованием коровьего молока. Негативный результат будет означать, что сильно отличающаяся от структуры к-КЗ коровы первичная структура Хн-чувствительного участка к-КЗ представителя отряда Тупайи служит весомым критерием оценки неспособности химозинов млекопитающих данного отряда свертывать коровье молоко. Позитивный результат потребует изучения основных технологических свойств.

В главе 4 (табл. 1) мы уже отмечали, что во всех отрядах млекопитающих, кроме Парнокопытных, процент гомологии первичной структуры химозинов (и Хн-подобных последовательностей) химозину *Bos taurus* выше, чем гомология между к-КЗ коровы и к-КЗ других видов. Это, вероятно, указывает на то, что структура к-КЗ не так жестко детерминирована структурой Хн (или наоборот), как это принято считать. Если так, то вероятность нахождения универсальных химозинов не коровьего происхождения повышается.

Если окажется, что рХн тупайи способен коагулировать молоко коровы, то это: во-первых, изменит представления о субстратной специфичности Хн млекопитающих; во-вторых, позволит делать выводы о свойствах химозинов, полученных от видов, к-КЗ которых не относятся к 1-й, 2-й или 3-й группе по классификации Mercier et al., Nakhasi et al. и Stasiuk et al.; в-третьих, прояснит возможность использования гомологии к-КЗ на участке 96-119 в качестве дополнительного критерия выбора вида — источника Хн; в-четвертых, позволит более уверенно искать потенциально привлекательные для сыроделия универсальные химозины среди видов, эволюционно отдаленных от Парнокопытных.

Отряд Хищные (Carnivora), семейство Настоящие тюлени (Phocidae). Интерес к представителям Настоящих тюленей обусловлен необычно короткими сроками лактации (у одного из видов — тюленя-хохлача (*Cystophora cristata*) — 4 дня (!)), по сравнению с другими морскими млекопитающими из отрядов Хищные (*Carnivora*) и Китообразные (*Cetacea*), а также высоким относительным содержанием белков и жиров в мо-

локе [101]. Кроме того, есть фрагментарные и неподтвержденные литературные данные, указывающие на перспективные биохимические свойства Хн-подобного фермента гренландского тюленя (*Pagophilus groenlandicus*) [102] и натурального Хн, выделенного из желудка кольчатой нерпы (*Pusa hispida*) [47]. К сожалению, базы NCBI не содержат данные о структуре к-КЗ именно этих животных. В противном случае, зная а.к. последовательность Хн-чувствительного участка 96-119 и структуру связи 105-106 в молекуле к-КЗ этих видов, можно было бы делать предположения о степени универсальности Хн гренландского тюленя (по аналогии с рХн верблюда), который не только способен коагулировать молоко коровы, но и делает это на 30 % эффективнее, чем Хн *Bos taurus* [102].

На ресурсах NCBI есть информация о первичной структуре к-КЗ двух других видов семейства *Phocidae*, один из них — тюлень Уэдделла (*Leptonychotes weddellii*) — обитает в прибрежной зоне Антарктиды, воды которой почти круглый год покрыты льдом, а другой — гавайский тюлень-монах (*Neomonachus schauinslandi*) — в теплых водах островов и атоллов Гавайского архипелага (19–29° с.ш.).

Локальные выравнивания а.к. последовательностей Хн-чувствительных участков к-казеинов этих видов и коровьего к-КЗ представлены на рисунке 11. Гомология первичной структуры к-КЗ *Leptonychotes weddellii* и *Neomonachus schauinslandi* с к-КЗ коровы составляет около 61 %. Первичные структуры Хн тюленя Уэдделла и гавайского тюленя-монаха гомологичны химозину *Bos taurus* на 80,6 и 80,8 %.

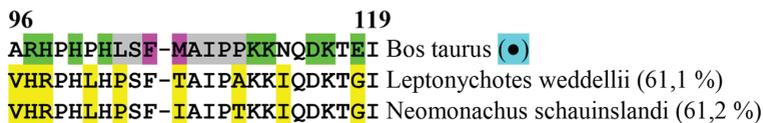


Рис. 11. Аминокислотные последовательности к-КЗ коровы и некоторых представителей семейства Настоящие тюлени (на Хн-чувствительном участке, соответствующем а.к. последовательности 96-119 в молекуле к-КЗ коровы). В скобках после видовых названий указана степень гомологии первичной структуры к-КЗ данного вида по отношению к к-КЗ коровы.

Вид, рекомбинантный химозин которого получен, обозначен значком (●). Красным цветом отмечена последовательность 105-106 в молекуле к-КЗ коровы. Зеленым цветом выделены полярные заряженные R-группы. Желтым цветом выделены аминокислотные замены. Серым цветом выделен гидрофобный мотив Leu103-Pro110. Пептидная связь последовательностей 105-106 обозначена знаком «-». Аминокислотные последовательности взяты из баз данных BLAST

Прежде всего обращают на себя внимание различия в последовательности а.к. к-КЗ на участке ключевой связи — 105-106. И если у тюленя-монаха присутствует вполне обычная для многих млекопитающих замена Met106→Phe, то в к-КЗ *Leptonychotes weddellii* замена необычная — Met106→Thr (неполярная гидрофобная R-группа→полярная незаряженная). Это означает, что по структуре Хн-чувствительной связи 105-106 к-КЗ тюленя Уэдделла нельзя отнести ни к уже известным группам № 1–3 (Phe105-Met106, Phe105-Leu (Ile)106, Phe105-Ala106) [124–126], ни к предполагаемой группе № 4 (Leu105-Lys106), обнаруженной нами у тупайи (см. выше). Таким образом, вероятно, к-КЗ тюленя Уэдделла образует еще одну, пятую, группу (Phe105-Thr106) или гидролизуетсa химозинoм не по связи 105-106. Если окажется, что рХн тюленя Уэдделла и гавайского тюленя-монаха способны коагулировать не только гомологичное (тюлень), но и гетерологичное (коровье) молоко, то эти ферменты, так же как и рХн верблюда, можно будет отнести к категории универсальных.

Замену Met106→Thr в положении P1' в молекуле к-КЗ тюленя Уэдделла не следует рассматривать как критическую для способности его Хн гидролизовать связь 105-106 в коровьем к-КЗ. Достаточно привести пример эндотиапепсина, гидролизующего к-КЗ коровы по связи Ser104-Phe105, в которой только один а.к. остаток гидрофобный, а другой — незаряженный полярный [292, 293]. Кроме того, рХн верблюда эффективно свертывает коровье молоко, несмотря на то что структуры гидролизуемой связи 105-106 в к-казеинах Полорогих и Мозолоногих различаются [14, 124, 125].

В положении 110, Phe замещен на Ala (обе R-группы — гидрофобные) в к-КЗ тюленя Уэдделла и на Thr (незаряженный полярный остаток) у гавайского тюленя.

Остальные изменения в структуре к-казеинов рассматриваемых видов Настоящих тюленей идентичны. Последовательность из трех а.к. — Ala96-Arg-His98 — заменена на Val96-His-Arg98, что, однако, не влияет на катионные свойства этого участка. В положениях 101 и 103 произошли зеркальные замены одной гидрофобной R-группы на другую: Pro101→Leu и Leu103→Pro. Вместо незаряженной полярной R-группы Asn113 в к-КЗ коровы у тюленей мы наблюдаем неполярную группу Ile, а вместо анионного остатка Glu118 — незаряженный полярный Gly. Таким образом, большинство а.к. замен в к-КЗ тюленей не приводит к значительным изменениям физико-химических свойств участка 96-119 по сравнению с к-КЗ коровы.

Гомология первичной структуры к-КЗ двух рассматриваемых видов отряда Настоящие тюлени и к-КЗ коровы на Хн-чувствительном участке 96-119 составляет 62,5 % (из 24 а.к. заменены 9).

С учетом данных [47, 102], высокой (>80 %) гомологии химозинов *Leptonychotes weddellii* и *Neomonachus schauinslandi* с Хн коровы, а также того, что характер а.к. замен на Хн-чувствительном участке к-КЗ не приводит к значительному изменению его физико-химических свойств, можно предполагать, что Хн представителей семейства Настоящие тюлени не только способны коагулировать молоко коровы, но и могут быть носителями технологических свойств, полезных для сыроделия. Рекомбинантные химозины ни одного из представителей данного семейства в настоящее время не получены.

Отряд Китообразные (Cetacea). В эволюционном плане представители Китообразных настолько родственны Парнокопытным, что некоторые исследователи считают необходимым объединить эти отряды в одну кладу — Китопарнокопытные (*Cetartiodactyla*) [294]. Первичная структура химозинов Китообразных имеет наиболее высокий процент гомологии с химозинами Парнокопытных по сравнению с другими отрядами Млекопитающих. При филогенетическом анализе химозин *Bos taurus* попадает в одну кладу с большинством известных химозинов и Хн-подобных последовательностей Китообразных (рис. 12).

По ряду физиологических, биохимических и молекулярно-генетических критериев виды отряда *Cetacea* могут представлять интерес в качестве потенциальных источников технологически значимых химозинов. Представители Китообразных характеризуются эпителиохориальным типом плаценты, который предполагает постнатальный перенос факторов приобретенного пассивного иммунитета с материнским молоком [39, 213].

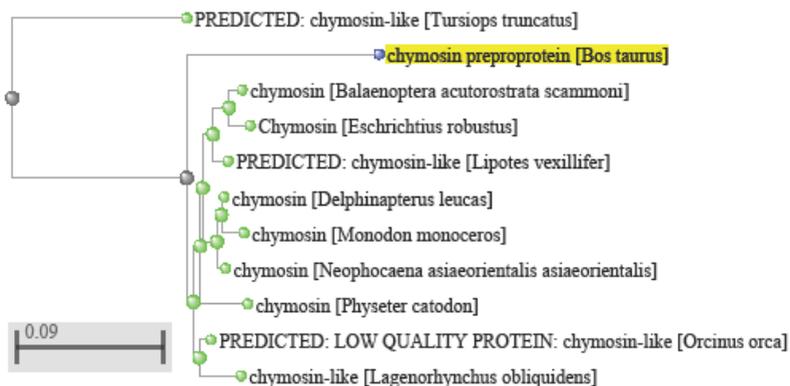


Рис. 12. Кладограмма аминокислотных последовательностей химозинов коровы (*Bos taurus*) и химозинов представителей отряда Китообразные (*Cetacea*). Кладограмма получена с использованием сервисов BLAST

ARHRPHPLHSF-MAIPPKKNQDKTEI *Bos taurus* (●)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Neophocaena asiaeorientalis* (66,8 %)
 ANHRHPCPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Lipotes vexillifer* (67,7 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Tursiops truncatus* (66,3 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKAVI *Orcinus orca* (66,3 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Balaenoptera acutorostrata* (66,8 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Lagenorhynchus obliquidens* (66,8 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Delphinapterus leucas* (66,8 %)
 ANHRHPRPSF-TAIPPKKTQDKTAI *Physeter catodon* (66,5 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Inia geoffrensis* (64,1 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Phocoena phocoena* (63,4 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Eschrichtius robustus* (64,1 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Grampus griseus* (62,8 %)
 AXHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Caperea marginata* (63,4 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Mesoplodon peruvianus* (62,8 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Tasmacetus shepherdii* (61,6 %)
 ANHRHPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Monodon monoceros* (66,3 %)

 ERRRPRPSF-LAIPPKKTQDKTVI *Lama glama* (59,7 %)

Рис. 13. Аминокислотные последовательности к-К3 коровы и некоторых представителей отряда Китообразных (на Хн-чувствительном участке, соответствующем а.к. последовательности 96-119 в молекуле к-К3 коровы). В скобках после видовых названий указана степень гомологии первичной структуры к-К3 данного вида по отношению к к-К3 коровы. Вид, рекомбинантный химозин которого получен, обозначен значком (●). Красным цветом отмечена последовательность 105-106 в молекуле к-К3 коровы. Зеленым цветом выделены полярные заряженные R-группы. Желтым цветом выделены аминокислотные замены. Серым цветом выделен гидрофобный мотив Leu103-Pro110. Синим цветом выделен остаток Thr106 в последовательности кашалота (*Physeter catodon*). Пунктирной линией отделен участок последовательности к-К3 представителя семейства Верблюдовых. Пептидная связь последовательностей 105-106 обозначена знаком «-». Аминокислотные последовательности взяты из баз данных BLAST

Химозины изученных видов Китообразных не псевдогенизированы (за исключением неподтвержденного псевдогена Хн косатки — *Orcinus orca*), а концентрация белков в молоке и молозиве исключительно высока [39, 227, 295]. Китообразные реализуют вторую стратегию лактации — с высоким содержанием сухих веществ в молоке, в котором иногда практически полностью отсутствуют углеводы при высоких концентрациях жиров и белков [227]. В этой связи интересно сравнить а.к. последовательности Хн-чувствительных участков к-К3 *Cetacea* и *B. taurus*.

Аминокислотные последовательности к-К3 коровы и 15 представителей отряда Китообразных гомологичны на 62–67 % (рис. 13). Интерес-

ным фактом является то, что большое количество а.к. замен в к-КЗ Китообразных совпадает с заменами, наблюдаемыми в семействе Верблюдовые (совпадение наблюдается по остаткам 102, 103, 106 (частично), 113, 118). Первое, что следует отметить, — замены в ключевой пептидной связи: гидрофобный серосодержащий остаток Met106 замещен аминокислотами, несущими гидрофобные R-группы с разветвленной алифатической цепью — Leu или Ile. Вспомним, что замена Met106→Ile в молекулах «родного» к-КЗ не лишает Хн верблюда и альпака способности коагулировать молоко коровы.

У одного из видов — кашалота (*Physeter catodon*) — находим необычный для отряда Китообразных вариант к-КЗ, относящийся к группе № 5 (Phe105-**Thr**106), который также характерен для тюленя Уэдделла (*Leptonychotes weddellii*). Это позволяет предполагать, что такая структура связи 105-106 может быть и у других представителей отрядов Хищные и Китообразные.

Как и у Верблюдовых, у всех сравниваемых к-КЗ Китообразных наблюдается замена одного гидрофобного остатка на другой в положении 103 (Leu→Pro), которая усиливает реоморфность Хн-чувствительного участка. В положении 102 происходит замена положительно заряженной группы His на аналогичную R-группу Arg. Несмотря на эту замену, структура гистидин-пролинового кластера (98-102) во всех сравниваемых к-казеинах Китообразных и коровы почти совпадает. Не исключено, что, как и у *Bos taurus*, гистидин-пролиновый кластер к-КЗ Китообразных может выполнять роль аллостерического активатора Хн. Замену незаряженных полярных R-групп Asn→Thr мы наблюдаем в положении 113, в положении 118 происходит замена отрицательно заряженной R-группы Glu на гидрофобный остаток Val. Гистидин-пролиновый мотив на участке 98-101 консервативен в к-КЗ коровы и Китообразных, что свидетельствует о его роли во взаимодействии с Хн. Каппа-казеин косатки (*Orcinus orca*), в отличие от других представителей Китообразных, несет замену Thr118→Ala (замена незаряженного полярного а.к. остатка на гидрофобный).

Гомология а.к. последовательностей участков 96-119 к-казеинов коровы и представителей отряда Китообразных составляет 70,8–75,0 %.

Таким образом, большинство а.к. замен в области Хн-чувствительного участка к-КЗ Китообразных совпадает с заменами в семействе Верблюдовых. Особняком стоит к-КЗ кашалота, в котором обнаруживается замена Met106→Thr. Первичные структуры к-КЗ Китообразных и Верблюдовых на участке 96-119 высокогомологичны, а участки 101-119 для некоторых видов идентичны. Аминокислотные последовательности к-КЗ Китообраз-

ных и к-КЗ единственного представителя Верблюдовых, чей Хн используется в сыроделии, — одногорбого верблюда [29, 186, 295] — гомологичны на 72,0–78,7 %. Этот показатель намного выше, чем гомология к-КЗ коровы с к-КЗ Верблюдовых (53,8–59,7 %) и Китообразных (61,6–67,7 %). Высокая степень гомологии Хн Китообразных и Верблюдовых (84,8–87,3 %) свидетельствует о возможности обнаружения в отряде *Cetacea* таких же универсальных и представляющих интерес для сыроделия химозинов, какие мы наблюдаем в семействе *Camelidae*.

Отряд Парнокопытные (*Artiodactyla*), семейство Полорогие (*Bovidae*), род Овцебыки (*Ovibos*). Единственный современный представитель рода — овцебык, или мускусный бык (*Ovibos moschatus*). Как потенциальный вид — источник Хн овцебык интересен, поскольку обитает в жестких природно-климатических условиях Крайнего Севера, характеризуется высоким содержанием белка в молоке и быстрой адаптацией новорожденных к окружающей среде [96, 295]. В базах NCBI представлена а.к. последовательность к-КЗ этого вида, и мы имеем возможность сравнить ее с к-КЗ коровы (рис. 14).

Каппа-казеины *Bos taurus* и *Ovibos moschatus* имеют высокую степень гомологии (>81 %), что характерно для отряда Парнокопытных. Основные различия в структуре к-КЗ коровы и овцебыка приходится на С-терминальный участок. На первый взгляд три из них — Asn113→Asp (полярная незаряженная R-группа→отрицательно заряженная), Ala144→Asp, Ala168→Glu (в обоих случаях неполярная R-группа→полярная отрицательно заряженная) — могут приводить к усилению анионных свойств участка к-КЗ, формирующего стабилизирующий «волосковый» слой мицелл. Однако они компенсируются заменами Glu140→Val, Asp148→Ala, Glu154→Val (во всех случаях анионные R-группы заменяются на неполярные), так что суммарные анионные свойства С-терминала, по-видимому, не изменяются.

На участке 96-119 мы наблюдаем единственную а.к. замену Asn113→Asp (незаряженная полярная R-группа амида аспарагиновой а.к.→отрицательно заряженный остаток Asp). Очевидно, что такая замена вносит вклад в усиление анионных свойств С-терминального участка Хн-чувствительной области к-КЗ овцебыка и, вероятно, отражается на а.к. последовательности его Хн (которую еще предстоит установить). Структуры гистидин-пролинового кластера (His98-His102) и гидрофобного мотива Leu103-Pro110 в к-КЗ коровы и овцебыка идентичны.

Гомология участков 96-119 к-казеинов коровы и овцебыка составляет 95,8 %.

Высокая гомология первичной структуры к-КЗ коровы и овцебыка позволяет предполагать сходство третичной структуры Хн этих видов. По состоянию на октябрь 2019 г. ресурсы NCBI не содержат информации о химозине *Ovibos moschatus*. Установление структуры гена Хн овцебыка, его а.к. последовательности и совокупности технологических свойств является актуальной задачей биотехнологии.

Отряд Парнокопытные (*Artiodactyla*), семейство Полорогие (*Bovidae*), род Оронго (*Pantholops*). Род представлен одним исчезающим видом — оронго, или чиру (*Pantholops hodgsonii*), который обитает в жестких природно-климатических условиях Тибетского плато (4500–4700 м н.у.м.). Первичная структура к-КЗ *B. taurus* и *P. hodgsonii* гомологична более чем на 85 %. Основная часть а.к. замен в молекуле к-КЗ оронго приходится на С-терминальный участок. Количественно и качественно они почти полностью совпадают с заменами в молекуле к-КЗ овцебыка и не приводят к изменению суммарных анионных свойств гликомакропептидного участка (f 106-169).

Сравнение локальных а.к. последовательностей Хн-чувствительных участков к-КЗ оронго и коровы представлено на рисунке 14. Как и в случае с к-КЗ овцебыка, на участке 96-119 к-КЗ оронго выявляется одна замена: Asn113→Asp (незаряженная полярная R-группа амида аспарагиновой а.к. →отрицательно заряженный остаток Asp).

Гомология участков 96-119 к-казеинов коровы и оронго составляет 95,8 %.

Из рисунка 14 видно, что последовательности гистидин-пролинового кластера (98-102) и гидрофобного мотива (103-110) вблизи связи Phe105-Met106 в к-казеинах *Ovibos moschatus*, *Pantholops hodgsonii* и *Bos taurus* консервативны. Это позволяет предполагать общность структуры активных центров Хн данных видов. Сравнение полных а.к. последовательностей к-КЗ овцебыка и оронго свидетельствует о 95,5 % гомологии.

Гомология первичной структуры к-КЗ *B. taurus* и *P. hodgsonii* подразумевает сходство а.к. последовательностей химозинов данных видов, что и подтверждается результатами сравнительного анализа первичных структур этих ферментов. Аминокислотные последовательности Хн коровы и оронго гомологичны на 93,7 %, что позволяет предполагать близкие биохимические свойства этих ферментов. Получение рХн *P. hodgsonii* и изучение совокупности его технологических свойств является актуальным и перспективным в рамках поиска новых коагулянтов молока для сыроделия.

ARHRPHLSE-MAIPPKKQDKTEI Bos taurus (●)
 ARHRPHLSE-MAIPPKKQDKTEI Ovis moschatus (81,3 %)
 ARHRPHLSE-MAIPPKKQDKTEI Pantholops hodgsonii (85,4 %)

Рис. 14. Аминокислотные последовательности к-КЗ коровы, овцебыка и оронго (на Хн-чувствительном участке, соответствующем а.к. последовательности 96-119 в молекуле к-КЗ коровы). В скобках после видового названия указана степень гомологии первичной структуры к-КЗ данного вида по отношению к к-КЗ коровы. Вид, рекомбинантный химозин которого получен, обозначен значком (●). Красным цветом отмечена последовательность 105-106 в молекуле к-КЗ коровы. Зеленым цветом выделены полярные заряженные R-группы. Желтым цветом выделена аминокислотная замена. Серым цветом выделен консервативный гидрофобный мотив Leu103-Pro110. Пептидная связь последовательностей 105-106 обозначена знаком «-». Аминокислотные последовательности взяты из баз данных BLAST

Инфракласс Сумчатые (Marsupialia). Анализ Хн-чувствительных участков к-КЗ сумчатых млекопитающих интересен в связи с тем, что до сих пор рХн ни одного из представителей инфракласса Сумчатые не получен. Известны структуры Хн четырех видов Сумчатых, гомологичных Хн коровы на 65,2–72,4 % (табл. 1).

В базах NCBI доступны а.к. последовательности к-КЗ двух видов сумчатых млекопитающих: лисьего кузу (*Trichosurus vulpecula*) (структура Хн неизвестна) и домового опоссума (*Monodelphis domestica*), а.к. последовательность Хн которого совпадает с Хн коровы на 72,4 %. Аминокислотная последовательность к-КЗ лисьего кузу установлена в 2000 г. Stasiuk et al. [126]. Авторы обратили внимание на то, что последовательность а.к. в положении 105-106 отличается от двух известных групп к-казеинов (№ 1 — Phe105-Met106, № 2 — Phe105-Ile106 или Phe105-Leu106) [124, 125], имеет вид Phe105-Ala106, и выделили ее в отдельную группу (№ 3). Пример сравнительного исследования к-КЗ Сумчатых мы приводим, поскольку после 2000 г. такая же последовательность — Phe105-Ala106 — была обнаружена в к-КЗ домового опоссума (рис. 15).

Кажется маловероятным, чтобы замена длинноцепочечных гидрофобных R-групп Met, Leu, Ile на короткоцепочечную неполярную R-группу Ala стала критической для способности Хн гидролизовать к-КЗ по сайту Phe105-Ala106. С одной стороны, это подтверждается данными о том, что коровий Хн при определенных условиях способен гидролизовать связь Phe-Ala в α 2-казеине коровы и α 1-казеине козы [281, 296]. С другой — не смотря на то что в желудке новорожденного лисьего кузу образуется молоч-

ный сгусток, что предполагает гидролиз к-КЗ, молоко *Trichosurus vulpecula* не свертывается коровьим Хн *in vitro* [126]. Поэтому не исключено, что химозины *Trichosurus vulpecula* и *Monodelphis domestica*, так же как и рХн одногорбого верблюда, являются универсальными молокосвертывающими ферментами и способны гидролизовать к-КЗ *Bos taurus* по связи Phe105-Met106. Но в настоящее время нет никаких экспериментальных данных о специфичности Хн Сумчатых по отношению к к-КЗ коровы.

Однако структура Хн-чувствительной связи — не единственное условие, играющее роль в способности Хн коагулировать молоко коровы. Важна а.к. последовательность всего Хн-чувствительного участка к-КЗ, отвечающего за взаимодействие с субсайтами молокосвертывающей эндопептидазы. Даже к-КЗ, относящиеся к одной и той же группе, взаимодействуют с Хн коровы по-разному. По данным Kotts & Jenness, «к-КЗ-подобные белки», выделенные из молока дикого кролика (*Oryctolagus cuniculus*) (к-КЗ группы № 1 — Phe105-Met106), гидролизуются гомогенным натуральным Хн коровы намного медленнее, чем аналогичные препараты, полученные из молока северного оленя (*Rangifer tarandus*), коровы (*Bos taurus*) и козы (*Capra hircus*), чьи к-КЗ также относятся к группе № 1 (Phe105-Met106) [266].

Результаты локального выравнивания, представленные на рисунке 15, показывают, что на Хн-чувствительном участке 96-119 к-КЗ *Trichosurus vulpecula* и *Monodelphis domestica* очень много а.к. замен, которые ставят под сомнение способность Хн этих животных гидролизовать к-КЗ коровы. Низкая степень гомологии к-КЗ рассматриваемых видов Сумчатых и *Bos taurus*, которая не превышает 30 %, укрепляет эти сомнения.

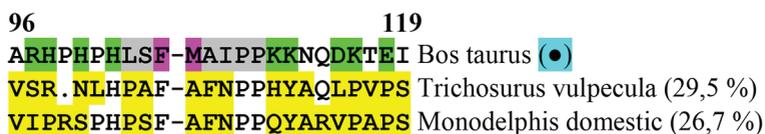


Рис. 15. Аминокислотные последовательности к-КЗ коровы и лисьего кузу и домового опоссума (на Хн-чувствительном участке, соответствующем а.к. последовательности 96-119 в молекуле к-КЗ коровы). В скобках после видового названия указана степень гомологии первичной структуры к-КЗ данного вида по отношению к к-КЗ коровы. Вид, рекомбинантный химозин которого получен, обозначен значком (●). Красным цветом отмечена последовательность 105-106 в молекуле к-КЗ коровы.

Зеленым цветом выделены полярные заряженные R-группы. Желтым цветом выделены аминокислотные замены. Серым цветом выделен консервативный гидрофобный мотив Leu103-Pro110. Пептидная связь последовательностей 105-106 обозначена знаком «-». Делеция в положении 99 в последовательности *Trichosurus vulpecula* обозначена точкой. Аминокислотные последовательности взяты из баз данных BLAST

Гомология участка 96-119 к-казеинов *Trichosurus vulpecula* и *Monodelphis domestica* с аналогичной последовательностью к-КЗ коровы составляет 20,8 % (из 24 а.к. заменены 19, это больше, чем у к-КЗ тупайи, где наблюдается 18 замен).

Кроме Phe105, можно отметить консервативную для трех сравниваемых к-КЗ последовательность Pro109-Pro110 и остаток His в положении 102. С к-КЗ коровы совпадает также Pro101 в белке *Monodelphis domestica* и His102 в к-КЗ *Trichosurus vulpecula*.

Так же как и в случае с к-КЗ тупайи, многочисленные а.к. замены на Хн-чувствительном участке ставят под сомнение способность Хн сумчатых гидролизовать коровий к-КЗ и коагулировать молоко коровы. Как и в случае с тупайей, подтвердить или опровергнуть эти сомнения можно только практически — получив Хн сумчатых и исследовав его МА на коровьем молоке. Значимость такого исследования для понимания механизма работы химозинов Млекопитающих обсуждалась нами выше при исследовании к-КЗ тупайи.

Таким образом, сравнительное исследование а.к. последовательностей к-КЗ представителей различных отрядов и семейств млекопитающих позволяет нам сформулировать гипотезу существования «универсальных» химозинов, которые, в отличие от Хн коровы, менее чувствительны к структуре ключевой (гидролизуемой) связи к-КЗ и а.к. составу прилегающих к ней участков. Подтвержденным примером такого «универсального» фермента является рХн одnogорбого верблюда. Потенциальными претендентами на статус «универсального» Хн могут быть ферменты представителей отрядов Тупайи, Китообразные и Хищные и, возможно, Двурезцовые сумчатые.

В ходе изучения структуры Хн-чувствительных участков нами выявлено в дополнение к трем уже известным группам предположительно две новые группы к-КЗ — № 4 и № 5, — которые имеют необычный а.к. состав связи 105-106, отличающийся от связи Phe105-Met106 в к-КЗ коровы. Это к-КЗ китайского подвида малайской тупайи (группа № 4 — Leu105-Lys106), тюленя Уэдделла (группа № 5 — Phe105-Thr106) и кашалота (группа № 5 — Phe105-Thr106). Интересно, что в четырех из пяти известных на сегодняшний день группах к-КЗ в положении 105 находится Phe, а положение 106 допускает вариации гидрофобных или незаряженных полярных R-групп. Консервативность Phe105 в к-КЗ млекопитающих указывает на важную роль этого а.к. остатка в механизме взаимодействия с активным центром химозина. Данные о сайте гидролиза химозином к-КЗ группы № 3 (Сумчатые) отсутствуют. Установление сайтов гидролиза к-КЗ групп № 3–5 под действием видоспецифичных и гетерологичных хими-

зинов имеет фундаментальное значение и должно стать задачей ближайших исследований.

Ответ на вопрос, вынесенный в заголовок раздела. Не исключено, что а.к. последовательность Хн-чувствительного участка к-КЗ может быть использована в качестве вспомогательного критерия выбора вида — продуцента Хн, но исключительно в сочетании с информацией о биохимических свойствах и степени универсальности химозина (или химозинов) других представителей данного таксона. Очевидно, что проверить справедливость данного предположения можно только практически — получая и исследуя новые виды рХн. Поскольку источником всех полученных на сегодняшний день технологически значимых рХн служат виды, которые относятся к отряду Парнокопытные, одной из первостепенных задач является изучение генно-инженерных Хн животных, не относящихся к отряду *Artiodactyla*.

Глава 12

КРИТЕРИИ ВЫБОРА ВИДОВ — ИСТОЧНИКОВ ГЕНОВ ХИМОЗИНОВ

На основании изученных литературных данных допустимо сформулировать следующие **критерии выбора видов млекопитающих**, которые потенциально могут быть источниками технологически значимых химозинов:

1. Природно-климатические условия обитания, характеризующиеся экстремально высокими или низкими температурами, скудными пищевыми ресурсами, коротким летним периодом, гипоксией (Арктика, Антарктика, пустыни, полупустыни, высокогорье).

2. Степень зрелости новорожденного и короткий послеутробный период адаптации. Зрелорождающиеся детеныши — положительный критерий, незрелорождающиеся — отрицательный.

*Авторская ремарка: применение данного критерия является спорным или, по меньшей мере, дискуссионным в случае инфракласса **Сумчатые** (включающего 7 отрядов). Поскольку низкая степень зрелости новорожденного компенсируется длительным периодом его доразвития в сумке, стратегией лактации и особым механизмом передачи факторов пассивного иммунитета новорожденному с молоком, для которого характерен продолжительный период прямой адсорбции антител и других защитных белков в ЖКТ детеныша.*

3. Вторая стратегия лактации с высоким (>15 %) содержанием сухих веществ в молоке на ранних этапах лактации.

4. Высокое содержание белка в молозиве и молоке. Пороги отбора: концентрация белка в молозиве, превышающая 8,0 %, в молоке — превышающая 3,4 %.

5. Тип и вид плаценты. Положительные критерии — апплцентарные, эпителио-, эндотелио-, десмо-, гемоди-, гемотрихориальная; отрицательный критерий — гемомонохориальная плацента.

6. Механизм передачи пассивного иммунитета. Отрицательный критерий — трансплацентарный; положительные критерии — с молозивом, молоком или смешанный механизм — трансплацентарно и постнатально.

7. Степень гомологии а.к. последовательности Хн-чувствительного участка к-КЗ вида-претендента и к-КЗ коровы. Положительный критерий — при гомологии ≥ 60 %; при меньшей степени гомологии критерий положителен только в сочетании с данными о биохимических свойствах и степени «универсальности» Хн в данной таксономической группе (например, у Мозолоногих степень гомологии к-КЗ с коровой — менее 60 %, тем не менее установлено, что рХн верблюда и альпака — высокоспецифичны по отношению к к-КЗ коровы).

8. Статус гена Хн (отсутствует, псевдогенизирован или экспрессируется).

Подчеркнем, что ни один из вышеприведенных критериев не может считаться абсолютным, за исключением подтвержденных случаев псевдогенизации Хн. Например, природно-климатические условия ареала обитания длиннохвостой шиншиллы (*Chinchilla lanigera*) близки к таковым для альпака, викуньи и гуанако. Шиншиллы обитают в высокогорной зоне Анд (низкие температуры, скудная пищевая база, гипоксия), относятся к видам, у которых зрелорождающиеся детеныши, с коротким периодом их постнатальной адаптации. Однако ген Хн у *Chinchilla lanigera* до настоящего времени не обнаружен (возможно, из-за утраты его значительной части в результате делеций). Кроме того, у шиншиллы выявлен гемомонохориальный вид плаценты, обеспечивающий трансплацентарный перенос факторов пассивного иммунитета плоду, что в рамках «иммунной гипотезы» предполагает псевдогенизацию Хн [39]. Поэтому отбор видов млекопитающих для получения рХн следует вести с учетом комплекса критериев.

В отдельный критерий не выделена степень гомологии Хн или Хн-подобных последовательностей, и вот по какой причине. Изученные рХн буйвола (*Bubalus bubalis*), козы (*Capra hircus*), овцы (*Ovis aries*) и яка (*Bos grunniens*), несмотря на высокую степень гомологии с Хн коровы — 94,0–99,2 %, не продемонстрировали экстраординарных биохимических и технологических свойств, позволяющих использовать эти ферменты в сыроделии в качестве коммерческих заменителей рХн коровы. В то же время рХн «отдаленных родственников» — одnogорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) и альпака (*Vicugna pacos*), гомологичных коровьему Хн «всего» на 83,7 % и 84,0 %, обладают ценным технологическим свойством — более высокой, чем у Хн коровы, специфичностью (МА/ПА). Один из этих ферментов — рХн одnogорбого верблюда — широко используется в сыроделии в качестве полноценной альтернативы коровьему рХн. Вероятно, степень гомологии с Хн коровы может быть использована в качестве **вспомогательного** показателя в широком диапазоне значений от 65 % и выше.

Пример выбора перспективных источников генов для получения рХн по результатам балльной оценки сформулированных критериев представлен в таблице 11. Вероятность получения перспективного рХн у рассматриваемого вида млекопитающего возрастает по мере увеличения количества баллов (от 1 до 8).

Исходя из данных, представленных в таблице 3, вероятность обнаружения Хн у человека разумного (*Homo sapiens*) и лошади Пржевальского (*Equus przewalskii*) равна нулю из-за подтвержденной псевдогенизации фермента (абсолютный критерий, остальные критерии в этом случае не рассматривают-

ся). С очень высокой степенью вероятности можно говорить об обнаружении у овцебыка (*Ovibos moschatus*), северного оленя (*Rangifer tarandus*) и двугорбого верблюда (*Camelus ferus*) химозинов, высокоспецифичных по отношению к к-КЗ коровы. Не вызывает сомнения возможность получения Хн китайской тупайи (*Tupaia chinensis*), зайца-русака (*Lepus europaeus*) и утконоса (*Ornithorhynchus anatinus*), но прогнозировать бихимические или технологические свойства этих ферментов затруднительно, поскольку ни один из аналогов этих ферментов до сих пор не получен.

Очевидно, что все сформулированные критерии основаны на современном уровне знаний и в дальнейшем могут измениться по мере получения новых научных данных о биологии, физиологии, молекулярной генетике и адаптационных механизмах млекопитающих.

Таблица 11

Пример выбора видов — перспективных продуцентов рХн по результатам балльной оценки сформулированных критериев

Вид	Условия обитания	Период постнатальной адаптации	Стратегия лактации	Концентрация белка в молоке, молозиве	Тип плаценты	Передача пассивного иммунитета	Гомология к-КЗ с к-КЗ коровы	Статус гена Хн	Баллы
<i>Homo sapiens</i>	X	X	X	X	X	X	X	0	0
<i>Rangifer tarandus</i>	1	1	1	1	1	1	?	1	7
<i>Ovibos moschatus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	8
<i>Camelus ferus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	8
<i>Equus przewalskii</i>	X	X	X	X	X	X	X	0	0
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	0	0	1	1	1	?	0	1	4
<i>Lepus europaeus</i>	0	1	1	1	1	1	?	1	6
<i>Tupaia chinensis</i>	0	0	1	1	1	1	0	1	5

Примечание: перспективный — 1 балл; неперспективный — 0 баллов; отсутствуют точные данные — ?; нет смысла оценивать другие критерии, если Хн псевдогенезирован — X.

В соответствии с выбранными критериями перспективными для получения и исследования новых рХн следует считать следующие таксономические группы и виды (виды, первичная структура Хн или Хн-подобных белков которых уже известна, отмечены значком «▲», структуры, которые, по нашим данным, находятся в стадии установления, отмечены значком «Δ»).

Инфракласс Сумчатые. Включает 7 отрядов (для изученных представителей инфракласса характерны «неполная плацента» и постнатальный перенос факторов пассивного иммунитета с молоком с двумя максимумами экспрессии Ig в процессе лактации).

Отряд Двурезцовые сумчатые (2 вида):

— кенгуру Евгении (*Macropus eugeni*) — данных о структуре к-КЗ и Хн не найдено, подробно изучена стратегия лактации и экспрессия белков молока в различных фазах лактации (**модельный вид** для сумчатых млекопитающих при изучении эволюции и физиологии лактации); концентрация сухих веществ в молоке (к.с.в.м.) — 25 %, концентрация белка в молоке (к.б.м.) — 6,0 %;

— ▲ коала (*Phascolarctos cinereus*) — данных о структуре к-КЗ не найдено; известна первичная структура Хн-подобного фермента, гомологичного Хн коровы на 65,2 %; к.с.в.м. — 28,0–14,0 %, к.б.м. — 5,5–12,5 %.

Отряд Опоссумы (1 вид):

— ▲ домовый опоссум (*Monodelphis domestica*) — структура к-КЗ гомологична к-КЗ коровы на 26,7 %; известна первичная структура Хн-подобного фермента, гомологичного Хн коровы на 72,4 %; у родственного вида — виргинского опоссума (*Didelphis virginiana*) — к.с.в.м. — 23,2 %, к.б.м. — 8,4 %.

Отряд Хищные сумчатые (1 вид):

— ▲ тасманийский дьявол (*Sarcophilus harrisii*) — данных о структуре к-КЗ не найдено; известна первичная структура Хн-подобного фермента, гомологичного Хн коровы на 71,1 %; у родственного вида — крапчатой сумчатой куницы (*Dasyurus viverrinus*) — к.с.в.м. — 16,0–32,0 %, к.б.м. — 3,0–8,5 %.

Инфракласс Плацентарные. Включает 22 отряда (для изученных представителей инфракласса характерны различные типы и виды плацент, которые позволяют осуществлять различные варианты переноса факторов пассивного иммунитета от матери плоду или новорожденному: фетальный (трансплацентарный), постнатальный (с молозивом и молоком), смешанный (фетальный и постнатальный).

Отряд Трубказубовые (1 вид):

— ▲ трубказуб (*Orycteropus afer afer*) — эндотелиохориальная плацента, постнатальный перенос факторов пассивного иммунитета с молоком;

есть данные о структуре к-КЗ, гомология с к-КЗ коровы — 39,8 %; известна первичная структура Хн-подобного фермента, гомологичного Хн коровы на 78,2 %; к.с.в.м. — 30,2 %, к.б.м. — 12,3 %.

Отряд Сирены (1 вид):

— ▲ американский ламантин (*Trichechus manatus*) — эндотелиохориальная плацента, постнатальный перенос факторов пассивного иммунитета с молоком; есть данные о структуре к-КЗ, гомология с к-КЗ коровы — 45,0 %; известна первичная структура Хн-подобного фермента, гомологичного Хн коровы на 76,6 %; к.с.в.м. — 23,1 %, к.б.м. — 8,1 %.

Отряд Броненосцы (1 вид):

— ▲ девятипоясный броненосец (*Dasypus novemcinctus*) — гемомонохориальная плацента, нет данных о пути переноса пассивного иммунитета; не найдены данные о структуре к-КЗ; известна первичная структура Хн-подобного фермента, гомологичного Хн коровы на 76,9 %; к.с.в.м. — 21,6 %, к.б.м. — 9,8 %.

Отряд Неполнозубые (1 вид):

— гигантский муравьед (*Myrmecophaga tridactyla*) — не найдено сведений о структуре к-КЗ и Хн, к.с.в.м. — 27,0 %, к.б.м. — 11,0 %.

Отряд Ежеобразные (1 вид):

— обыкновенный еж (*Erinaceus europaeus*) — эндотелиохориальная плацента, перенос факторов пассивного иммунитета с молоком; данные о структуре Хн не найдены, гомология а.к. последовательности к-КЗ с к-КЗ коровы — 48,2 %; короткий период лактации (1 месяц); к.с.в.м. — 20,6 %, к.б.м. — 7,2 %.

Отряд Землеройковые (1 вид):

— ▲ обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus*) — эндотелиохориальная плацента, постнатальный перенос факторов пассивного иммунитета с молоком; есть информация о структуре Хн-подобного фермента, гомология с Хн коровы — 80,1 %, гомология а.к. последовательности к-КЗ с к-КЗ коровы — 37,0 %; сведения о составе молока не найдены, но у родственного вида — обыкновенной белозубки (*Crocidura russula*) — очень высокая к.с.в.м. — 51,0 %, к.б.м. — 9,4 %.

Отряд Парнокопытные (для представителей отряда характерна десмохориальная плацента, постнатальный перенос факторов пассивного иммунитета с молоком; **12 видов**):

— ▲ двугорбый верблюд (*Camelus ferus* — дикий, *Camelus bactrianus* — домашний) — жесткие природно-климатические условия обитания, зрелорождающиеся детеныши; структура Хн известна, гомология с Хн коровы — 83,7 %; близкородственный вид — одногорбый верблюд (*Camelus dromedarius*) — является продуцентом экстраординарного химозина,

используемого в сыроделии наряду с коровьим; структура к-КЗ гомологична к-КЗ коровы на 53,8 % и 59,0 %; к.с.в.м. — 15,5-15,9 %, к.б.м. — 4,4-5,2 %;

— ▲ альпака (*Vicugna pacos*) — рХн альпака, полученный в прокариотической системе, превосходит рХн коровы по специфичности, но уступает по термостабильности, что может быть связано с недостаточным уровнем посттрансляционной модификации при экспрессии в *E. coli*; не исключено, что экспрессия в эукариотической системе позволит получить рХн альпака с пониженной термостабильностью;

— лама (*Lama glama*) — ареал обитания — высокогорье (гипоксия), зрелорождающиеся детеныши, близкородственный вид — альпака (*Vicugna pacos*) — продуцент Хн, с высокой специфичностью по отношению к к-КЗ коровы; данных о структуре Хн не найдено; структура к-КЗ гомологична к-КЗ коровы на 59,7 %; структура Хн-чувствительного участка к-КЗ ламы и одногорбого верблюда гомологична на 95,8 %; к.с.в.м. — 15,2 %, к.б.м. — 4,1 %;

— гуанако (*Lama guanicoe*) — ареал обитания — высокогорье (гипоксия), зрелорождающиеся детеныши, близкородственный вид — альпака (*Vicugna pacos*) — является продуцентом Хн высокоспецифичного по отношению к к-КЗ коровы; данных о структуре Хн и к-КЗ нет; данных о составе молока нет;

— Δ северный олень (*Rangifer tarandus*) — жесткие природно-климатические условия обитания, зрелорождающиеся детеныши, очень быстрая адаптация новорожденных, продуцент натурального высокоэффективного МФ; данных о структуре Хн не найдено; структура к-КЗ гомологична к-КЗ коровы на 85,3 %; структура Хн-чувствительного участка к-КЗ северного оленя и коровы гомологична на 91,7 %; к.с.в.м. одна из самых высоких среди изученных Парнокопытных — 27,1 %, к.б.м. самая высокая среди изученных Парнокопытных — 11,1 %;

— Δ благородный олень (*Cervus elaphus*) — зрелорождающиеся детеныши, быстрая адаптация новорожденных; структура к-КЗ благородного оленя гомологична к-КЗ коровы на 82,0 %; структура Хн-чувствительного участка к-КЗ *Cervus elaphus* и коровы гомологична на 91,7 %; к.с.в.м. — 21,1 %, к.б.м. — 7,1 %;

— Δ лось (*Alces alces*) — зрелорождающиеся детеныши, быстрая адаптация новорожденных; данных о структуре Хн не найдено; структура к-КЗ гомологична к-КЗ коровы на 85,3 %; структура Хн-чувствительного участка к-КЗ лося и коровы гомологична на 87,5 %; высокая для Парнокопытных к.с.в.м. — 23,0 %, к.б.м. одна из самых высоких среди изученных Парнокопытных — 10,5 %;

— ▲ оронго (*Pantholops hodgsonii*) — жесткие природно-климатические условия обитания (высокогорье, гипоксия), зрелорождающиеся детеныши, очень быстрая адаптация новорожденных, известна структура Хн-подобного фермента, гомологичного Хн коровы на 93,7 %; структура к-КЗ оронго гомологична к-КЗ коровы на 85,4 %; структура Хн-чувствительного участка к-КЗ *Pantholops hodgsonii* и коровы гомологична на 93,7 %; данных о составе молока не найдено;

— овцебык (*Ovibos moschatus*) — суровые условия обитания (Арктика), зрелорождающиеся детеныши, исключительно быстрая адаптация новорожденных, структура Хн неизвестна; структура к-КЗ гомологична к-КЗ коровы на 81,3 %; структура Хн-чувствительного участка к-КЗ овцебыка и коровы гомологична на 93,7 %; самая высокая к.с.в.м. среди изученных Парнокопытных — 28,5 %, к.б.м. — 8,7 %;

— ▲ белохвостый олень (*Odocoileus virginianus*) — зрелорождающиеся детеныши; единственный представитель семейства Оленевых (*Cervidae*), для которого установлена структура Хн, гомологичного Хн коровы на 93,4 %; структура к-КЗ гомологична к-КЗ коровы на 83,6 %; структура Хн-чувствительного участка к-КЗ *Odocoileus virginianus* и *Bos taurus* совпадает на 93,7 %; высокая к.с.в.м. — 22,5 %, к.б.м. — 8,2 %;

— снежная коза (*Oreamnos americanus*) — обитает в труднодоступных горных массивах, выше границы лесов, на высоте до 3000 м н.у.м.; зрелорождающиеся детеныши; сведения о структуре Хн не найдены; первичная структура к-КЗ *Oreamnos americanus* гомологична коровьему к-КЗ на 82,8 % к.с.в.м. — 18,0 %, к.б.м. — 6,5 %;

— газель-доркас (*Gazella dorcas*) — адаптирована к обитанию в условиях аридного климата, пустынь Северной Африки; данные о структуре Хн не найдены; первичная структура к-КЗ *Gazella dorcas* гомологична коровьему к-КЗ на 96,3 %; высокая для Парнокопытных к.с.в.м. — 24,1 %, высокая к.б.м. — 8,8 %.

Отряд Хищные (для представителей отряда характерны эндотелиохориальная плацента и постнатальный перенос факторов пассивного иммунитета с молоком; **8 видов**):

— тюлень-хохлач (*Cystophora cristata*) — обитает в зоне дрейфующих льдов; зрелорождающиеся детеныши; данные о структуре к-КЗ и Хн не найдены; очень короткий период лактации — 4 (!) дня; высокая к.с.в.м. — 66,0 %, к.б.м. — 6,2 %;

— морской заяц (*Erignathus barbatus*) — обитает на побережье Северного Ледовитого океана и в примыкающих водах Атлантического и Тихого океанов; зрелорождающиеся детеныши; данные о структуре к-КЗ и Хн

не найдены; короткий период лактации — 24 дня; высокая к.с.в.м. — 59,0 %, высокая к.б.м. — 10,0 %;

— гренландский тюлень (*Pagophilus groenlandicus*) — адаптирован к жизни в водах Арктики; зрелорождающиеся детеныши; данные о структуре к-КЗ и Хн не найдены; короткий период лактации — 12 дней; есть данные о широком рН-оптimumе и высокой специфичности натурального Хн-подобного фермента гренландского тюленя по отношению к коровьему к-КЗ; высокая к.с.в.м. — 65,7 %, к.б.м. — 7,7 %;

— ▲ тюлень Уэдделла (*Leptonychotes weddellii*) — (?) есть неподтвержденные данные о псевдогенизации Хн [39]; адаптирован к жизни в водах Антарктики; зрелорождающиеся детеныши; есть данные о структуре Хн, гомологичного Хн коровы на 80,6 %; к-КЗ гомологичен к-КЗ коровы на 61,1 %; период лактации — 40–50 (?) дней; высокая к.с.в.м. — 66,2 %, высокая к.б.м. — 8,9 %;

— кольчатая нерпа (*Pusa hispida*) — адаптирована к жизни в водах Арктики; зрелорождающиеся детеныши; данные о структуре к-КЗ и Хн не найдены; период лактации — 39 дней; натуральный Хн кольчатой нерпы обладает высокой коагуляционной активностью по отношению к коровьему молоку; к.с.в.м. — 51,4 %, высокая к.б.м. — 9,9 %;

— лисица полярная (*Vulpes lagopus*) — обитает за Северным полярным кругом; в помете 7–12 детенышей — один из самых высоких показателей среди хищников; есть информация о структуре Хн и к-КЗ родственного вида — лисицы обыкновенной (*Vulpes vulpes*) — гомологичных Хн и к-КЗ коровы на 79,8 % и 57,6 %, к.с.в.м. — 28,6 %, очень высокая к.б.м. — 11,1 %;

— ▲ белый медведь (*Ursus maritimus*) — (?) есть неподтвержденные данные о псевдогенизации Хн [39]; обитает в приполярных областях Северного полушария; есть сведения о структуре Хн и к-КЗ, гомологичных Хн и к-КЗ коровы на 78,7 % и 56,6 %, к.с.в.м. — 48,0 %, очень высокая к.б.м. — 11,1 %;

— кустарниковая кошка (*Felis serval*) — данных о структуре Хн и к-КЗ не найдено; к.с.в.м. — 29,5 %, самая высокая к.б.м. среди хищников — 15,8 %.

Отряд Китообразные (для представителей отряда характерна эпителиохориальная плацента, постнатальный перенос факторов пассивного иммунитета с молоком, для некоторых изученных видов характерна очень высокая (более 80 %) концентрация белков в молозиве; **4 вида**):

— ▲ белуха (*Delphinapterus leucas*) — распространена циркумполярно, между 50° и 80° с.ш., адаптирована к обитанию в холодных арктических водах, зрелорождающиеся детеныши; есть данные о структуре Хн и к-КЗ,

гомологичных Хн и к-КЗ коровы на 86,4 % и 66,8 %; данные о к.с.в.м. и к.б.м. не обнаружены;

— ▲ нарвал (*Monodon monoceros*) — распространен циркумполярно, основной ареал — в районе 70° с.ш., адаптирован к обитанию в холодных арктических водах, зрелорождающиеся детеныши; есть данные о структуре Хн и к-КЗ, гомологичных Хн и к-КЗ коровы на 85,3 % и 66,3 %; данные о к.с.в.м. и к.б.м. не обнаружены;

— ▲ кашалот (*Physeter macrocephalus*, синоним — *Physeter catodon*) — зрелорождающиеся детеныши, новорожденный сразу способен следовать за матерью; есть данные о структуре Хн и к-КЗ, гомологичных Хн и к-КЗ коровы на 85,8 % и 66,5 %, к.с.в.м. — 36,2 %, к.б.м. — 8,5 %;

— гренландский кит (*Balaena mysticetus*) — распространен циркумполярно, выше 54° с.ш., обитает в полярных районах Северного полушария, адаптирован к жизни в холодной морской воде; зрелорождающиеся детеныши; информация о первичной структуре к-КЗ и Хн не найдена, есть данные о структуре Хн и к-КЗ родственного вида — северного малого полосатика (*Balaenoptera acutorostrata scammoni*), гомологичных Хн и к-КЗ коровы на 85,8 % и 66,8 %, очень высокая концентрация белка в **молозиве** — 86,6 %, данные о к.с.в.м. — не обнаружены, к.б.м. — 9,4 %.

Отряд Тупайи (1 вид):

— ▲ китайский подвид малайской тупайи (*Tupaia belangeri chinensis*) — эндотелиохориальная плацента, постнатальный перенос факторов пассивного иммунитета; известна а.к. последовательность Хн, совпадающая с последовательностью Хн коровы на 81,6 %; а.к. последовательность к-КЗ тупайи гомологична к-КЗ коровы на 41,9 %; гомология с к-КЗ коровы на Хн-чувствительном участке низкая — 25 %; предположительно к-КЗ тупайи относится к группе № 4 — в положении 105-106 находятся Leu-Lys; длительные интервалы между кормлением новорожденных — 1 раз в 48 часов; очень высокая к.с.в.м. — 40,4 %, к.б.м. — 10,4 %.

Отряд Грызуны (для большинства представителей отряда характерен гемохориальный тип плаценты, информация о виде плаценты в большинстве случаев отсутствует; перенос факторов пассивного иммунитета — смешанный: фетальный и постнатальный; **2 вида**):

— щетинистая крыса (*Thrichomys apereoides*) — зрелорождающиеся и быстроадаптирующиеся детеныши (через 10–12 дней питаются взрослой пищей); данные о структуре Хн и к-КЗ не найдены; высокое содержание белка в молоке — 11,0 %, информация о содержании сухих веществ в молоке не найдена;

— канадский бобр (*Castor canadensis*) — зрелорождающиеся детеныши (через 24 часа способны плавать), со второй недели питаются твердым кормом, известна структура Хн-подобного фермента, гомологичного Хн

коровы на 75,4 %, а.к. последовательность к-КЗ совпадает с к-КЗ коровы на 43,9 %; данных о составе молока не найдено, но молоко родственного вида — обыкновенного бобра (*Castor fiber*) — содержит 31,3 % сухих веществ и 11,2 % белка.

Отряд Зайцеобразные (для представителей отряда характерна гемодихориальная плацента, перенос факторов пассивного иммунитета — постнатальный; **2 вида**):

— заяц-русак (*Lepus europaeus*) — зрелорождающиеся детеныши; большие промежутки между кормлениями новорожденных — 1 раз в 24–96 часов; высокие темпы адаптации новорожденных — со второй недели питаются твердым кормом, в 3–4 недели становятся самостоятельными; данные о структуре Хн и к-КЗ не найдены; высокая к.с.в.м. — 32,5 %, высокая к.б.м. — 10,0 %;

— заяц-беляк (*Lepus timidus*) — зрелорождающиеся детеныши; большие промежутки между кормлениями новорожденных — не чаще 1 раза в сутки; высокие темпы адаптации новорожденных — в первый день жизни способны самостоятельно передвигаться, на 8–10 день могут питаться грубым кормом, полностью самостоятельными становятся в возрасте 2 недели; данные о структуре Хн и к-КЗ не найдены; высокая к.б.м. — 12,0 %.

Представленный выше список не является полным или окончательным из-за отсутствия для многих видов животных, не вошедших в него, данных, которые служат критериями отбора. Составленный нами список может быть как расширен, так и сокращен по мере получения и исследования новых видов рХн и накопления знаний о механизмах адаптации, биологии репродукции и стратегиях лактации Млекопитающих.

В заключение рассмотрим несколько отрядов и видов, имеющих такие особенности биологии, которые не попали в число критериев отбора, но изучение которых было бы интересным.

Отряд Однопроходные, или Яйцекладущие (плаценты нет, перенос факторов пассивного иммунитета предположительно с молоком; **2 вида**):

— ехидна австралийская (*Tachyglossus aculeatus*) — не найдены данные о структуре Хн, структура к-КЗ гомологична к-КЗ коровы на 28,6 %, к.с.в.м. >48 %, к.б.м. — 12,4 %;

— ▲(?) утконос (*Ornithorhynchus anatinus*) — информация о Хн противоречива: с одной стороны, есть неподтвержденные данные о псевдогенизации Хн [39], с другой — в базах NCBI содержится информация о Хн-подобном ферменте, который гомологичен коровьему Хн на 57 %; структура к-КЗ гомологична к-КЗ коровы на 35,7 %, к.с.в.м. >39 %, к.б.м. — 8,2 %.

Отряд Афросорициды (1 вид):

— обыкновенный тенрек (*Tenrec ecaudatus*) — гемомонохориальная плацента, сведения о количестве слоев трофобласта не найдены, нет дан-

ных о пути переноса пассивного иммунитета; не найдены данные о структуре Хн, к-КЗ (по этим параметрам есть информация для близкородственного вида — малого ежового тенрека (*Echinops telfairi*): структура Хн гомологична Хн коровы на 77,4 %, структура к-КЗ гомологична к-КЗ коровы на 39,9 %); не найдены данные о содержании в молоке основных нутриентов; самое большое среди млекопитающих количество детенышей в одном помете (до 32), что предполагает высокое содержание сухих веществ в молоке; детеныши незрелорождающиеся, но с высокими темпами адаптации.

Отряд Рукокрылые (у представителей отряда наблюдается как эндотелиохориальный тип плаценты с постнатальным переносом пассивного иммунитета, так и гемохориальный тип, для которого точный механизм переноса антител не установлен; **2 вида**):

— ▲ натальский длиннокрыл (*Miniopterus natalensis*) — эндотелиохориальный тип плаценты, перенос факторов пассивного иммунитета детенышу — с молоком; данные о степени зрелорождаемости не обнаружены; известна структура Хн-подобного белка, гомологичного Хн коровы на 80,8 %, последовательность а.к. к-КЗ совпадает с последовательностью к-КЗ коровы на 53,8 %, данные о составе молока не найдены;

— пещерная ночница (*Myotis velifer*) — данные о типе плаценты и механизме переноса факторов пассивного иммунитета новорожденному не найдены; данные о степени зрелорождаемости не обнаружены; данные о первичной структуре Хн и к-КЗ отсутствуют (известны первичные структуры Хн и к-КЗ двух родственных видов — малой бурой ночницы (*Myotis lucifugus*) и ночницы Брандта (*Myotis brandtii*), которые гомологичны Хн коровы на 78,8–78,5 % и к-КЗ коровы — на 53,2–51,8 %); высокая к.с.в.м. — 25,4 %, самая высокая среди изученных представителей отряда к.б.м. — 10,7 %.

Получение и исследование рХн представителей отрядов Однопроходных, Афросорицид и Рукокрылых не является первостепенной биотехнологической задачей, но, несомненно, представляет интерес с точки зрения фундаментальной науки.

Таким образом, на основе сформулированных критериев выбраны 39 видов, которые могут считаться перспективными для получения новых рХн и исследования их технологических и биохимических свойств. Определен дополнительный список из пяти видов, изучение Хн которых на данном этапе представляет общенаучный интерес.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые сформулированы следующие критерии выбора видов млекопитающих для получения и исследования новых рХн, которые могут быть потенциальными коагулянтами молока для сыроделия:

- адаптация к обитанию в жестких природно-климатических условиях;
- высокая степень зрелости новорожденных;
- стратегия лактации с высоким содержанием сухих веществ в молоке;
- высокая концентрация белка в молозиве и молоке;
- тип плаценты, который не обеспечивает перенос факторов пассивного иммунитета в фетальном периоде или обеспечивает такой перенос частично;
- механизм передачи факторов пассивного иммунитета либо постнатальный (с молоком и молозивом), либо смешанный — в фетальном (трансплацентарно) и постнатальном периоде;
- степень гомологии Хн-чувствительного участка (96-119) к-К3 вида — претендента каппа-казеину коровы;
- статус гена Хн.

На основании сформулированных критериев отбора составлен список из 39 видов животных, которые являются потенциальными источниками Хн для сыроделия. Список охватывает 15 из 29 отрядов класса Млекопитающие. Дополнительно составлен список из пяти видов (относящихся к трем отрядам Млекопитающих), изучение Хн которых в настоящее время представляет интерес для фундаментальной науки.

В процессе исследования структуры локальных участков к-К3 разных видов млекопитающих обнаружены два новых вида химозин-чувствительной последовательности в положении 105-106 (в дополнение к уже известным трем группам связей 105-106 в молекулах к-К3 Млекопитающих). Выявленные структуры — новые, ранее в научной периодике они не встречались. Это последовательности: **Leu105-Lys106** (отнесена к группе № 4) в молекуле к-К3 малайской тупайи и **Phe105-Thr106** (отнесена к группе № 5) в к-К3 тюленя Уэдделла и кашалота. Дальнейшие исследования должны быть направлены на идентификацию сайтов гидролиза к-казеинов этих видов под действием видоспецифичных и гетерологичных химозинов.

Критерии отбора позволяют более чем на два порядка (с ≈ 5500 известных видов млекопитающих до 39–44 видов) сузить спектр млекопитающих, которые могут быть потенциальными источниками новых химозинов, и сконцентрироваться на получении и изучении наиболее перспективных рекомбинантных коагулянтов молока для сыроделия.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ темы FZMW-2020-0002, «Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия»).

ПОСЛЕСЛОВИЕ

К моменту подачи данной рукописи в печать стали известны данные, касающиеся получения новых видов рХн и изучения их биохимических свойств.

1. Опубликован обзор биохимических свойств известных видов рекомбинантных химозинов [297].

2. Получены рХн трех представителей семейства Оленевые — лося (GenBank ID — MT542132), алтайского марала (GenBank ID — MT225406) и северного оленя (GenBank ID — MT518181). Исследованы биохимические и технологические свойства рХн марала [298, 299].

3. Получены рХн представителя отряда Тупайи (тупайя) и Хищные (белый медведь), показана способность этих ферментов свертывать молоко коровы (неопубликованные данные, личное сообщение Щербакова Д.Н.).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Горощенко, Т.И. Импорт и экспорт сыров и творога / Т.И. Горощенко // Сыроделие и маслоделие. — 2018. — № 1. — С. 4–7.
2. Рыбалова, Т.И. Импортозамещение. Плюсы и минусы / Т.И. Рыбалова // Молочная промышленность. — 2018. — № 3. — С. 10–13.
3. Горощенко, Л.Г. Динамика производства молока / Л.Г. Горощенко // Молочная промышленность. — 2018. — № 5. — С. 4–6.
4. Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. In: Technology of Cheesemaking. Law B.A., Tamime A.Y., Eds., Wiley-Blackwell., 2010, Ch. 3. The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants, p. 98–129.
5. Jacob, M. Recent advances in milk clotting enzymes / M. Jacob, D. Jaros, H. Rhom // Int. J. Dairy Technol. — 2011. — Vol. 64. — No. 1. — P. 14–33.
6. Feijoo-Siota, L. Recent patents on microbial proteases for the dairy industry/ L. Feijoo-Siota, L. Blasco, J.L.Rodríguez-Rama, J. Barros-Velázquez, T. De Miguel, A. Sánchez-Pérez, T.G. Villa // Recent Adv. in DNA and Gene Sequences. — 2014. — Vol. 8. — No. 1. — P. 44–55.
7. Kimberlin, R.H. Bovine spongiform encephalopathy and public health: some problems and solutions in assessing the risk. 3rd International Symposium on Transmissible Subacute Spongiform Encephalopathies: Prion Diseases, March 18–20, Paris. Elsevier, 1996. — P. 487–502.
8. Lebedev, L.R. Study of technological properties of milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.) / L.R. Lebedev, T.A. Kosogova, T.V. Teplyakova, A.V. Kriger, V.V. Elchaninov, A.N. Belov, A.D. Koval' // Foods and Raw Materials. — 2016. — Vol. 4. — No. 2. — P. 58–65.
9. Ельчанинов, В.В. Молокозвертывающий фермент из сычугов северного оленя / В.В. Ельчанинов // Сыроделие и маслоделие. — 2006. — № 4. — С. 42–44.
10. Ельчанинов, В.В. Практические аспекты использования молокозвертывающего фермента из сычугов северного оленя / В.В. Ельчанинов, А.Н. Белов, М.С. Уманский, А.Д. Коваль, Е.А. Авданина, В.П. Вистовская, А.В. Кригер // Сыроделие и маслоделие. — 2006. — № 5. — С. 5–7.
11. Ельчанинов, В.В. Исследование молокозвертывающего фермента из сычугов северных оленей: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04: защищена 23.01.06; утв. 07.04.06 / Ельчанинов В.В. — Кемерово, 2006. — 172 с. — Библиогр.: С. 121–147.
12. Vallejo, J.A. Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins / J.A. Vallejo, J.M. Ageitos, M. Poza, T.G. Villa // J. Dairy Sci. — 2012. — Vol. 95. — No. 2. — P. 609–613.
13. Wang, N. Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris* / N. Wang, K.Y. Wang, G. Li, W. Guo, D. Liu // Prot. Expr. Purif. — 2015. — Vol. 111. — P. 75–81.

14. Kappeler, S.R. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk / S.R. Kappeler, H. (J.) M. van den Brink, H. Rahbek-Nielsen, Z. Farah, Z. Puhan, E.B. Hansen, E. Johansen // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2006. — Vol. 2. — No. 342. — P. 647–654.
15. Uchiyama, H. Purification of prorennin mRNA and its translation *in vitro* / H. Uchiyama, T. Uozumi, T. Beppu, K. Arima // *Agric. Biol. Chem.* — 1980. — Vol. 44. — No. 6. — P. 1373–1381.
16. Pungerčar, J. Complete primary structure of lamb preprochymosin deduced from cDNA / J. Pungerčar, B. Strukelj, F. Gubensjek, V. Turk, I. Kregar // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — No. 18. — P. 4602–4608.
17. Rogelj, I. Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production / I. Rogelj, B. Perko, A. Francky, V. Penca, J. Purgenčar // *J. Dairy Sci.* — 2001. — Vol. 84 (5). — P. 1020–1026.
18. Vega-Hernandes, M.C. Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin / M.C. Vega-Hernandes, A. Gomes-Coello, J. Villar, F. Claverie-Martin // *J. Biotechnol.* — 2004. — Vol. 114. — No. 1–2. — P. 69–79.
19. Vallejo, J.A. Cloning and Expression of Buffalo Active Chymosin in *Pichia pastoris* / J.A. Vallejo, J.M. Ageitos, M. Poza, T.G. Villa // *J. Agric. Food Chem.* — 2008. — Vol. 56. — No. 22. — P. 10606–10610.
20. Беленькая, С.В. Некоторые биохимические свойства рекомбинантного химозина альпака (*Vicugna pacos* L.) / С.В. Беленькая, А.П. Рудометов, Д.Н. Щербakov, Д.В. Балабова, А.В. Кригер, А.Н. Белов, А.Д. Коваль, В.В. Ельчанинов // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2018. — Т. 54. — № 6. — С. 585–593.
21. Production of a recombinant industrial protein using barley cell cultures / A. Ritala, E.H. Wahlström, H. Holkeri, A. Hafren, K. Mäkeläinen, J. Baez, K. Mäkinen, A.M. Nuutila // *Protein Expr Purif.* — 2008. — Vol. 59 (2). — P. 274–281.
22. Nosedá, D.G. Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under AOX1 promoter / D.G. Nosedá, M.N. Recupero, M. Blasco, G.E. Ortiz, M.A. Galvagno // *Protein Expr. Purif.* — 2013. — Vol. 92. — No. 2. — P. 235–244.
23. Jiang, X.P. Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115 / X.P. Jiang, M.L. Yin, P. Chen, Q. Yang // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2012. — Vol. 28. — No. 5. — P. 2087–2093.
24. Jensen, J.L. Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties / J.L. Jensen, A. Mølgaard, J.-C.N. Poulsen, M.K. Harboe, J.B. Simonsen, A.M. Lorentzen, K. Hjernø, J. M. van den Brink, K.B. Qvist, S. Larsen // *Acta Cryst. (Section D, Biol. Crystallogr.)*. — 2013. — Vol. 69. — Pt. 5. — P. 901–913.

25. Nosedá, D.G. Production in stirred-tank bioreactor of recombinant bovine chymosin B by a high-level expression transformant clone of *Pichia pastoris* / D.G. Nosedá, M. Recúpero, M. Blasco, J. Bozzo, M.A. Galvagno // Protein Expr. Purif. — 2016. — Vol. 123. — P. 112–121.
26. Espinoza-Molina, J.A. Codon Optimization of the “Bos Taurus Chymosin” Gene for the Production of Recombinant Chymosin in *Pichia pastoris* / J.A. Espinoza-Molina, C.H. Acosta-Muñiz, D.R. Sepulveda, P.B. Zamudio-Flores, C. Rios-Velasco // Mol. Biotechnol. — 2016. — Vol. 58 (10). — P. 657–664.
27. Ersöz, F. Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris* / F. Ersöz, M. İnan // Prot. Expression Purification. — 2019. — Vol. 154. — P. 126–133.
28. Luo, F. Cloning and Expression of Yak Active Chymosin in *Pichia pastoris* / F. Luo, W.H. Jiang, Y.X. Yang, J. Li, M.F. Jiang // Asian-Australas. J. Anim. Sci. — 2016. — Vol. 29. — No. 9. — P. 1363–1370.
29. Bansal, N. Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese / N. Bansal, M.A. Drake, P. Piraino, M.L. Broe, M. Harboe, P.F. Fox, P.H.L. McSweeney // Int. Dairy J. — 2009. — Vol. 19. — P. 510–517.
30. Flamm, E.L. How FDA approved chymosin: a case history / E.L. Flamm // Nature Biotechnology. — 1991. — Vol. 9. — No. 4. — P. 349–351.
31. Jensen, J.L. The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay / J.L. Jensen, J. Jacobsen, M.L. Moss, F. Rasmussen, K.B. Qvist, S. Larsen, J. M. van den Brink // J. Dairy Sci. — 2015. — Vol. 98. — P. 2853–2860.
32. Mammal Species of the World. A taxonomic and geographic reference. Ed. 3, D.E. Wilson, D.M. Reeder, eds.— Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. — Vol. 1. — P. 743.
33. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition, Volume I. Cheese: an Overview / P.F. Fox, P.L.H. McSweeney; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, eds.— London, UK: Elsevier Academic Press, 2004. — P. 1–18.
34. Eskandari, M.H. Nucleotide sequence of cDNA encoding for preprochymosin in native goat (*Capra hircus*) from Iran / M.H. Eskandari, A. Hosseini, M. Aminlari // Iranian J. Veterinary Res. — 2008. — Vol. 9. — No. 3. — P. 262–265.
35. Altschul, S. Basic local alignment search tool / S. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. Myers, D. Lipman // J. Mol. Biol. — 1990. — Vol. 215 (3). — P. 403–410.
36. Richter, C. Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. Review article / C. Richter, T. Tanaka, R.Y. Yada // Biochem. J. — 1998. — Vol. 335. — P. 481–490.

37. Kageyama, T. Molecular Cloning of Neonate/Infant-Specific Pepsinogens from Rat Stomach Mucosa and Their Expressional Change during Development / Kageyama, T., Ichinose, M., Tsukada-Kato, S., Omata, M., Narita, Y., Moriyama, A., & Yonezawa, S. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 2000. — Vol. 267 (3). — P. 806–812.

38 Kageyama, T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development / T. Kageyama // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2002. — Vol. 59 (2). — P. 288–306.

39. Lopes-Marques, M. Unusual loss of chymosin in mammalian lineages parallels neo-natal immune transfer strategies / M. Lopes-Marques, R. Ruivo, E. Fonseca, A. Teixeira, L. F. C. Castro // *Mol. Phylogenetics and Evolution.* — 2017. — Vol. 116. — P. 78–86.

40. Andrén, A. Milk-feeding maintains the prochymosin production in cells of bovine abomasal mucosa / A. Andrén, L. Björck // *Acta Physiol. Scand.* — 1986. — Vol. 126. — P. 419–427.

41. Yamada, J. Electron immunocytochemical co-localization of prochymosin and pepsinogen in chief cells, mucous neck cells and transitional mucous neck/ chief cells of the calf fundic glands / J. Yamada, A. Andren, N. Kitamura, T. Yamashita // *Acta Anat. (Basel).* — 1988. — Vol. 132. — P. 246–252.

42. Andren, A. 1992. Production of prochymosin, pepsinogen and progastricsin, and their cellular and intracellular localization in bovine abomasal mucosa / A. Andren // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1992. — Vol. 210. — P. 59–64.

43. Caroli, A.M. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition / A.M.Caroli, S.Chessa, G.J. Erhardt // *J. Dairy Sci.* — 2009. — Vol. 92 (11). — P. 5335–5352.

44. Horne, D.S. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products / D.S. Horne // *Int. Dairy J.* — 1998. — Vol. 8. — P. 171–177.

45. Horne, D.S. Casein structure, self-assembly and gelation / D.S. Horne // *Current Opinion in Colloid and Interface Sci.* — 2002. — Vol. 7. — P. 456–461.

46. McMahon, D. J. Supramolecular Structure of the Casein Micelle. / D. J. McMahon, B. S. Oommen // *J. Dairy Sci.* — 2008. — Vol. 91. — P. 1709–1721.

47. Foltmann, B. Chymosin: a short review on foetal and neonatal gastric proteases / B. Foltmann // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 1992. — Vol. 210. — P. 65–79.

48. Holt, C. Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods / C. Holt, J.A. Carver, H. Ecroyd, D.C. Thorn // *J. Dairy Sci.* — 2013. — Vol. 96. — No. 10. — P. 1–20.

49. *Advanced Dairy Chemistry — Volume 1, Proteins, Part B.* 3rd ed. Functional milk proteins: production and utilization / D.M. Mulvihill, M.P. Ennis; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. — New York, NY: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2003. — P. 1175–1228.

50. Mokhber-Dezfooli, M.R. Effect of abomasal emptying rate on the apparent efficiency of colostral immunoglobulin G absorption in neonatal Holstein-Friesian calves / M.R. Mokhber-Dezfooli, M. Nouri, M. Rasekh, P.D. Constable // *J. Dairy Sci.* — 2012. — Vol. 95 (11). — P. 6740–6749.

51. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd Edition. Milk: Milk of Monotremes and Marsupials / J.A. Sharp, K. Menzies, C. Lefevre, K.R. Nicholas, J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. — Atlanta, GA, USA: Elsevier Ltd., Academic Press. — 2011. — P. 553–562.

52. Bessi, R. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. I. Estudo no intestino delgado proximal / R. Bessi, P.Pauletti, R.D. d'Arce, R. Machado Neto // *Revista Brasileira de Zootecnia.* — 2002. — Vol. 31. — P. 2314–2324.

53. Borghesi, J. Immunoglobulin Transport during Gestation in Domestic Animals and Humans — A Review / L.C. Mario, M.N. Rodrigues, P.O. Favaron, M.A. Miglino // *Open J. Animal Sci.* — 2014. — Vol. 4. — P. 323–336.

54. Food Structures, Digestion and Health, Chapter 4 — The Milk Fat Globule Membrane: Structure, Methodology for its Study, and Functionality / S. Gallier, A. Laubscher, R. Jiménez-Flores.; M. Boland, M. Golding, H. Singh, eds. — Waltham, USA: Elsevier Inc., 2014. — P. 107–142.

55. Peterson, J.A. Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breastfed infant against infections / J.A. Peterson, S. Patton, M. Hamosh // *Biol. Neonate.* — 1998. — Vol. 74. — P. 143–162.

56. Schrotten, H. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. / H. Schrotten, F.G. Hanisch, R. Plogmann, J. Hacker, G. Uhlenbruck, R. Nobis-Bosch, V. Wahn // *Infect. Immun.* — 1992. — Vol. 60. — P. 2893–2899.

57. Örd, T. Structure of the human genomic region homologous to the bovine prochymosin-encoding gene / T. Örd, M. Kolmer, R. Villems, M. Saarma // *Gene.* — 1990. — Vol. 91 (2). — P. 241–246.

58. Farrell, Jr., H.M. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk — Sixth Revision / H.M. Farrell Jr., R. Jimenes-Flores, G.T. Bleck, E.M. Brown, J.E. Butler, L.K. Creamer, C.L. Hicks, C.M. Hollar, K.F. Ng-Kwai-Hang, H.E. Swaisgood // *J. Dairy Sci.* — 2004. — Vol. 87. — P. 1641–1674.

59. Kumar, A. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions / A. Kumar, S. Grover, J. Sharma, V. K. Batish // *Critical Reviews in Biotechnology.* — 2010. — Vol. 30 (4). — P. 243–258.

60. Claeys, W.L. Review Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits / W.L. Claeys, C. Verraes, S. Cardoen, J. De Block, A. Huyghebaert, K. Raes, K. Dewettinck, L. Herman // *Food Control.* — 2014. — Vol. 42. — P. 188–201.

61. The Handbook of Milk Composition. Phylogenetic variation in the gross composition of milks / O.T. Oftedal, S.J. Iverson; R.G. Jensen, ed. — 1995. Orlando: Academic Press, Inc., 1995. — P. 749–789.

62. Jenness, R.J. Species variation in mammary gland function: lactational performance of various mammalian species / R.J. Jenness // J. Dairy Sci. — 1986. — Vol. 69. — P. 869–885.

63. Iverson, S.J. In: Proceedings of the Seventh Conference on Zoo and Wildlife Nutrition. Ward A, Hunt A, Maslanka M, Eds., AZA Nutrition Advisory Group, Knoxville, TN., 2007, Milk composition and lactation strategies across mammalian taxa: implications for hand-rearing neonates. P. 1–7.

64. Остроумова, Т.А. Химия и физика молока : учебное пособие / ред. Л.Г. Барашкова Кемерово : Изд. КемГИПП, 2004.— 196 С.

65. Ginger, M.R. Review — Comparative aspects of milk caseins / M.R. Ginger, M.R. Grigor // Comparative Biochem. Physiol. Part B. — 1999. — Vol. 124. — P. 133–145.

66. Осинцев, А.М. Развитие фундаментального подхода к технологии молочных продуктов / А.М. Осинцев. Кемерово : Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2004. — 152 с.

67. Осинцев, А.М. Теоретическое и экспериментальное исследование процессов, лежащих в основе свертывания молока / А.М. Осинцев. Кемерово : Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2003. — 120 с.

68. Holt, C. Structure and stability of bovine casein micelles / C. Holt // Adv. Prot. Chem. — 1992. — Vol. 43. — P. 63–151.

69. Lucey, J.A. Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels / J.A. Lucey // J. Dairy Sci. — 2002. — Vol. 85. — No. 2. — P. 281–294.

70. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1: Proteins. Part A. Casein micelle structure, functions, and interactions. / C.G. de Kruif, C. Holt.; P.F. Fox, P.L. H. McSweeney, eds. — New York, NY: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. — P. 233–270.

71. Cross, K.J. Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes / K.J. Cross, L. Huq, J.P. Palamara, J.W. Perich, E.C. Reynolds // J. Biological Chem. — 2005. — Vol. 280. — No. 15. — P. 15362–15369.

72. Kawasaki, K. Mineralized tissue and vertebrate evolution: The secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster / K. Kawasaki, K.M. Weiss // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2003. — Vol. 100 (7). — P. 4060–4065.

73. Jenness, R.J. Species variation in mammary gland function: lactational performance of various mammalian species / R.J. Jenness // J. Dairy Sci. — 1986. — Vol. 69. — P. 869–885.

74. Oftedal, O.T. Milk composition, milk yield and energy output at peak lactation: a comparative review / O.T. Oftedal // Symp. Zool. Soc. Lond. — 1984. — Vol. 51. — P. 33–85.

75. Kutila, T. Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens / T. Kutila, S. Pyorala, H. Saloniemi, L. Kaartinen // Acta Vet Scand. — 2003. — Vol. 44. — No. 1–2. — P. 35–42.

76. Ward, P.P. Lactoferrin and host defense / P.P. Ward, S. Uribe-Luna, O. M. Conneeley // Biochem. Cell Biol. — 2002. — Vol. 80. — P. 95–102.

77. Arnold, R.R. A bactericidal effect for human lactoferrin / R.R. Arnold, M.F. Cole, A. McGhee, Jr. // Science. — 1977. — Vol. 197. — P. 263–265.

78. Advanced Dairy Chemistry Third edition, Volume I, Proteins. Indigenous enzymes in milk / P.F. Fox, T. Olivecrona, S. Vilaro, G. Bengtsson-Olivecrona, A.L. Kelly, P.L.H. McSweeney, Shakeel-Ur-Reham, C.M. Fleming, L. Stepaniak, M. Gobetti, A. Corsetti, N.K. Pruitt, N.Y. Farkye.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. — New York, USA: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. — P. 465–601.

79. Ельчанинов, В.В. Белки мембраны молочной жировой глобулы. 1. Генез и структура жировой глобулы молока, номенклатура белков мембраны молочной жировой глобулы / В.В. Ельчанинов // Молочная промышленность. — 2019. — № 7. — С. 24–27.

80. Ельчанинов, В.В. Белки мембраны молочной жировой глобулы. 2. Муцин 1 (MUC 1) / В.В. Ельчанинов // Молочная промышленность. — 2019. — № 8. — С. 26–28.

81. Peterson, J.A. Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breastfed infant against infections / J.A. Peterson, S. Patton, M. Hamosh // Biol. Neonate. — 1998. — Vol. 74. — P. 143–162.

82. Schrotten, H. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. / H. Schrotten, F.G. Hanisch, R. Plogmann, J. Hacker, G. Uhlenbruck, R. Nobis-Bosch, V. Wahn // Infect. Immun. — 1992. — Vol. 60. — P. 2893–2899.

83. Parker, P. Bovine Muc1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells / P. Parker, L. Sando, R. Pearson, K. Kongsuwan, R. Tellam, S. Smith // Glycoconjugate J. — 2010. — Vol. 27. — P. 89–97.

84. McAuley, J.L. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection / J.L. McAuley, S.K. Linden, C.W. Png, R.M. King, H.L. Pennington, S.J. Gendler, T.H. Florin, G.R. Hill, V. Korolik, M.A. McGuckin // J. Clin. Invest. — 2007. — Vol. 117. — P. 2313–2324.

85. McGuckin, M.A. Muc1 mucin limits both *Helicobacter pylori* colonization of the murine gastric mucosa and associated gastritis / M.A. McGuckin, A.L. Every, C.D. Skene, S.K. Linden, Y.T. Chionh, A. Swierczak, J. McAuley, S. Harbour, M. Kaparakis, R. Ferrero, P. Sutton // *Gastroenterol.* — 2007. — Vol. 133. — P. 1210–1218.

86. The Handbook of Milk Composition. Phylogenetic and ecological variation in the fatty acid composition of milks. / O.T. Oftedal, S.J. Iverson; R.G. Jensen, ed. — 1995. Orlando: Academic Press, Inc., 1995. — P. 789–827.

87. Iverson, S. J. The effect of maternal size and milk energy output on pup growth in grey seals (*Halichoerus grypus*) / S.J. Iverson, W.D. Bowen, D.J. Boness, O.T. Oftedal // *Physiol. Zool.* — 1993. — Vol. 66. — P. 61–88.

88. Iverson, S.J. Milk secretion in marine mammals in relation to foraging: Can milk fatty acids predict diet? / S.J. Iverson // *Symp. Zool. Soc. Lond.* — 1993. — Vol. 66. — P. 263–291.

89. Hamosh, M. Milk lipids and neonatal fat digestion: relationship between fatty acid composition, endogenous and exogenous digestive enzymes and digestion of milk fat / M. Hamosh, S.J. Iverson, C.K. Kirk P. Hamosh // *World Rev. Nutr. Diet.* — 1994. — Vol. 75. — P. 86–91.

90. Lopez, C. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure / C. Lopez // *Curr. Opin. Colloid & Interface Sci.* — 2011. — Vol. 16. — P. 391–404.

91. Spitsberg, V.L. Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical / V.L. Spitsberg // *J. Dairy Sci.* — 2005. — Vol. 88. — P. 2289–2294.

92. The Handbook of Milk Composition. Phylogenetic and ecological variation in the fatty acid composition of milks / S.J. Iverson, O.T. Oftedal; R.G. Jensen, ed. — 1995. Orlando: Academic Press, Inc., 1995. — P. 789–827.

93. Jenness, R.J. Species variation in mammary gland function: lactational performance of various mammalian species / R.J. Jenness // *J. Dairy Sci.* — 1986. — Vol. 69. — P. 869–885.

94. Hamosh, M. Milk lipids and neonatal fat digestion: relationship between fatty acid composition, endogenous and exogenous digestive enzymes and digestion of milk fat / M. Hamosh, S.J. Iverson, C.K. Kirk, P. Hamosh // *World Rev. Nutr. Diet.* — 1994. — Vol. 75. — P. 86–91.

95. Основы биохимии : учебное пособие. В 3-х т. Т. 1. / А. Ленинджер; В.А. Энгельгардт, Я.М. Варшавский, ред. Пер с англ. М. : Мир, 1985. — 367 с.

96. Якушкин, Г.Д. Овцебыки на Таймыре. Новосибирск : РАСХН. Сибирское отделение НИИСХ Крайнего Севера, 1998. — 236 с.

97. Сыроечковский, Е.Е. Северный олень ; гл. 5. Размножение. Рост и развитие. Линька. М. : Агропромиздат, 1986. — С. 106–119.

98. Leslie, Jr., D.M. *Pantholops Hodgsonii* (Artiodactyla: Bovidae) / D.M. Leslie, Jr., G.B. Schaller // *Mammalian Species.* — 2008. — Iss. 817. — P. 1–13.

99. Schaller, G.B. Migratory and calving behavior of Tibetan antelope population / G.B. Schaller, A. Kang, I.X. Cai, Y. Liu // *Acta Theriologica Sinica*. — 2006. — Vol. 26. — P. 105–113.
100. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd Edition. Milks of Non-dairy Mammals / G. Osthoff; J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. Atlanta, GA, USA: Elsevier Ltd., Academic Press. — 2011. — P. 538–552.
101. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd Edition. Milk of Marine Mammals / O.T. Oftedal; J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. Atlanta, GA, USA: Elsevier Ltd., Academic Press. — 2011. — P. 563–580.
102. Shamsuzzaman, K. Purification and characterization of a chymo-sin-like protease from the gastric mucosa of harp seal (*Pagophilus groenlandicus*) / K. Shamsuzzaman, N.F. Haard // *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* — 1984. — Vol. 62. — P. 699–708.
103. Shamsuzzaman, K. Evaluation of Harp Seal Gastric Protease as a Rennet Substitute for Cheddar Cheese) / K. Shamsuzzaman, N.F. Haard // *J. Food Sci.* — 1983. — Vol. 48. — P. 179–182.
104. Официальный сайт компании «Chr. Hansen». URL: <http://www.chr-hansen.com/ru/food-cultures-and-enzymes/cheese/cards/product-cards/chymax-m> (дата обращения 29.08.2019).
105. Skibieli, A.L. The evolution of the nutrient composition of mammalian milks / A.L. Skibieli, L.M. Downing, T.J. Orr, W.R. Hood // *J. Animal Ecology*. — 2013. — Vol. 82. — P. 1254–1264.
106. Faye, B. Discriminant milk components of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*), dromedary (*Camelus dromedarius*) and hybrids / B. Faye, G. Konuspayeva, S. Messad, G. Loiseau // *Dairy Sci. Technol.* — 2008. — V. 88. — P. 607–617.
107. Handbook of Milk Composition. Comparative analysis of nonhuman milks. A. Phylogenetic variation in the gross composition of milks / Oftedal O.T., Iverson S.J.; R.G. Jensen, ed. — Academic Press, 1995. — P. 749–788.
108. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1, part B, Proteins. 3rd ed. 12. Nutritional aspects of milk proteins / L. Hambræus, B. Lönnerdal; P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. New York, NY : Kluwer Academic / Plenum, 2003. — P. 605–646.
109. Chad, E.K. Preliminary investigation of the composition of alpaca (*Vicugna pacos*) milk in California / E.K. Chad, E.J. De Peters, B. Puschner, S.J. Taylor, J. Robison // *Small Ruminant Research*. — 2014. — Vol. 117 (2–3). — P. 165–168.
110. Parraguez, V.H. Milk composition in alpaca (*Lama pacos*): Comparative study in two regions of Chile / V.H. Parraguez, M. Thénot, E. Latorre, G. Ferrando, L. Raggi // *Archivos de Zootecnia*. — 2003. — Vol. 52. — P. 431–439.
111. Ruan, X.-D. Evolutionary history and current population relationships of the chiru (*Pantholops hodgsonii*) inferred from mtDNA variation / X.-D. Ruan, P.-J. He, J.-L. Zhang, Q.-H. Wan, S.-G. Fang // *J. Mammal.* — 2005. — V. 86. — P. 881–886.

112. Fox, J.L. Density of Tibetan antelope, Tibetan wild ass and Tibetan gazelle in relation to human presence across the Chang Tang Nature Reserve of Tibet, China / J.L. Fox, B.-J. Bårdsen // *Acta Zoologica Sinica*. — 2005. — Vol. 51. — P. 586–597.
113. Fox, J.L. The mountain ungulates of Ladakh, India / J.L. Fox, C. Nurbu, R.S. Chundawat // *Biological Conservation*. — 1991. — Vl. 58. — P. 167–190.
114. Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals. 2nd Edition. Other Minor Species Milk / B. Coudre; Y.W. Park, G.F.W. Haenlein, W.L. Wendorff, eds. — Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Ltd., 2017. — P. 579–594.
115. Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1 Proteins. 3rd ed. Part A. β -Lactoglobulin / L. Sawyer; P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, ed. — New York, NY : Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. — P. 319–386.
116. Milk Proteins: Vol. II. A-Lactalbumin / W. G. Gordon.; H. A. McKenzie, ed. — New York, NY: Academic Press, 1971. — P. 331–363.
117. Albumin Structure, Function, and Uses. Structure and evolution of serum albumin / J.R. Brown.; V.M. Rosenoer, M. Oratz, and M.A. Rothschild, ed. — Oxford, UK: Pergamon Press, 1977. — P. 27–51.
118. Abdallah, F. B. Transferrins: Iron release from lactoferrin / F.B. Abdallah, J. M. El Hage Chahine // *J. Mol. Biol.* — 2000. — Vol. 303. — P. 255–266.
119. Van der Strate, B.W.A. Antiviral activities of lactoferrin (Review) / B.W.A. Van der Strate, L. Beljaars, G. Molema, M.C. Harmsen, D.K.F. Meijer // *Antiviral Res.* — 2001. — Vol. 52. — P. 225–239.
120. Progress in Veterinary Microbiology and Immunology. Vol. 2. Biochemistry and biology of ruminant immunoglobulins / J.E. Butler.; R. Pandey, S. Karger, ed. — Basel, Switzerland, 1985. — P. 1–53.
121. Fox, P.F. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects; Part 2. / P.F. Fox, A.L. Kelly // *Int. Dairy J.* — 2006. — Vol. 16. — P. 517–532.
122. Delfour, A. Caseino-glycopeptides. Characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence / A. Delfour, J. Jolles, C. Alais, P. Jolles // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1965. — Vol. 19. — P. 452–455.
123. Jolle`s, J. The tryptic peptide with rennin-sensitive linkage of cow's k-casein / J. Jolle`s, C. Alais, P. Jolle`s // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1968. — Vol. 168. — P. 591–593.
124. Mercier, J.-C. Comparative study of the amino acid sequences of the caseinomacropetides from seven species / J.-C. Mercier, J.-M. Chobert, F. Addeo // *FEBS Lett.* — 1976. — Vol. 72 (2). — P. 208–214.
125. Nakhasi. H.L. Expression of k-casein in normal and neoplastic rat mammary gland is under the control of prolactin / H.L. Nakhasi, F.H. Grantham, P.M. Gullino // *J. Biol. Chem.* — 1984. — Vol. 259. — P. 14894–14898.

126. Stasiuk, S.J. Cloning of a marsupial k-casein cDNA from the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) / S.J. Stasiuk, E.L. Summers, J. Demmer // *Reproduct. Fertility Development*. — 2000. — Vol. 12 (4). — P. 215–222.
127. Gatt, S. Rate equations and simulation curves for enzymatic reactions which utilize lipids as substrates, II. Effect of adsorption of the substrate or enzyme on the steady-state kinetics / S.Gatt, T. Bartfai // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1977. — Vol. 488. — P. 13–24.
128. *Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins*, 3rd ed., Part B. Enzymatic coagulation of milk. / D.B. Hyslop.; P. F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. — New York, NY: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. — P. 839–878.
129. Dalgleish, D.G. Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin / D.G. Dalgleish // *J. Dairy Res.* — 1979. — Vol. 46. — P. 653–661.
130. van Hooydonk, A.C.M. Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk / A.C.M. van Hooydonk, P. Walstra // *Neth.Milk Dairy J.* — 1987. — Vol. 41. — P. 19–47.
131. Medhammar, E. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective / E. Medhammar, R. Wijesinha-Bettoni, B. Stadlmayr, E. Nilsson, U.R. Charrondiere, B. Burlingame // *J. Sci. Food Agricult.* — 2011. — Vol. 92 (3). — P. 445–474.
132. *Handbook of Milk Composition. Comparative analysis of non-human milks: phylogenetic variation in the gross composition of milks* / O.T. Oftedal, S.J. Iverson; R.G. Jensen, Ed. — New York, USA: Academic Press. — 1995. — P. 749–788.
133. Godden, S. Colostrum management for dairy calves: A review — *The Veterinary Clinics of North America* / S. Godden // *Food Animal Practice*. — 2008. — Vol. 24. — P. 19–39.
134. Ikonomopoulou, M.P. Changes in milk composition during lactation in the eastern barred bandicoot (*Perameles gunnii*) (Marsupialia: Peramelidae) / M.P. Ikonomopoulou, A.P. Smolenski, R.W. Rose // *Austral. J. Zool.* — 2005. — Vol. 53. — P. 59–65.
135. Merchant, J. C. Lactation and energetics of growth in the brush-tailed bettong, *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae) in captivity / J.C. Merchant, J.A. Libke, M.J. Smith // *Australian J. Zool.* — 1994. — Vol. 42. — P. 267–277.
136. Merchant, J. C. Milk composition and estimates of growth energetics in pouch young of the northern brown bandicoot, *Isodon macrourus* (Peramelidae, Marsupialia), in captivity / J.C. Merchant, J.A. Libke, K. Newgrain // *J. Zool.* — 1996. — Vol. 283. — P. 483–494.
137. Merchant, J. C. Milk composition and production in free-living allied rock-wallabies, *Petrogale assimilis* / J.C. Merchant, H. Marsh, P. Spencer, G. De'ath // *Australian J. Zool.* — 1996. — Vol. 44. — P. 659–674.

138. Krockenberger, A.K. Composition of the milk of the koala, *Phascolarctos cinereus*, an arboreal folivore / A.K. Krockenberger // *Physiol. Zool.* — 1996. — Vol. 69. — P. 701–718.

139. Muths, E. Milk composition in a field population of red kangaroos, *Macropus rufus* (Desmarest) (Macropodidae: Marsupialia) / E. Muths // *Australian J. Zool.* — 1996. — Vol. 44. — P. 165–175.

140. Morris, K.M. Characterisation of the immune compounds in koala milk using a combined transcriptomic and proteomic approach / K.M. Morris, D. O’Meally, T. Zaw, X. Song, A. Gillett, M.P. Molloy, A. Polkinghorne, K. Belov // *Scientific Reports.* — 2016. — Vol. 6 (1). — P. 1–13.

141. Bergman, H.C. Chemical analyses of American opossum (*Didelphys virginiana*) milk. / H.C. Bergman, C. Housley // *Compar. Biochem. Physiol.* — 1968. — V. 25(1). — P. 213–218.

142. Guernsey, M.W. Molecular conservation of marsupial and eutherian placentation and lactation / M.W. Guernsey, E.B. Chuong, G. Cornelis, M.B. Renfree, J.C. Baker // *eLife.* — 2017. — Vol. 6. — P. 1–19 (e27450).

143. Daly, K.A. Analysis of the expression of immunoglobulins throughout lactation suggests two periods of immune transfer in the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) / K.A. Daly, M. Digby, C. Lefèvre, S. Mailer, P. Thomson, K. Nicholas, P. Williamson // *Veterinar. Immunol. Immunopathol.* — 2007. — Vol. 120 (3–4). — P. 187–200.

144. Osthoff, G. The composition of serval (*Felis serval*) milk / G.Osthoff, A. Hugo, M. De Wit // *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* — 2007. — Vol. 147. — P. 237–241.

145. *Advanced Dairy Chemistry — Volume 1, Proteins, Part B.* 3rd ed. *Nutritional aspects of milk proteins* / L.Hambraeus, B. Lönnerdal ; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, ed. — New York, NY: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2003. — P. 605–645.

146. Barłowska, J. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production / J. Barłowska, M. Sz wajkowska, Z. Litwińczuk, J. Król // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* — 2011. — Vol. 10. — P. 291–302.

147. Nixon, C. M. Composition of gray squirrel milk / C. M. Nixon, W.J. Harper // *The Ohio J. Sci.* — 1972. — Vol. 72 (1). — P. 3–6.

148. Martin, R.D. Reproduction and Ontogeny in tree-shrews (*Tupaia belangeri*), with reference to their general behaviour and taxonomic relationships / R.D. Martin // *Zeitschrift Für Tierpsychologie.* — 2010. — Vol. 25 (5). — P. 505–532.

149. Kunz, T.N. A Comparison of Milk Composition in *Myotis lucifugus* and *Eptesicus fuscus* (Chiroptera: Vespertilionidae) / T.N. Kunz, M.H. Stack, R. Jenness // *Biol. Reprod.* — 1983. — Vol. 28. — P. 229–234.

150. Boulière, F. The natural history of mammals / F. Boulière. — Alfred A. Knopf; New York. — 1956. — 375 p.

151. White, J.M. The composition of milk from captive aardvark (*Orycteropus afer*) / J.M. White, G. Williams, J.H. Samour, P.J.J. Drury, P. Cheeseman // *Zoo Biol.* — 1985. — Vol. 4 (3). — P. 245–251.

152. Wenker, E.S. Macronutrient composition of longitudinal milk samples from captive aardvarks (*Orycteropus afer*) / E.S. Wenker, E.A. Himschoot, B. Henry, B. Toddes, M.L. Power // *Zoo Biol.* — 2019. — In press. doi: 10.1002/zoo.21505. [Epub ahead of print].

153. Derrickson, E.M. Milk Composition of Two Precocial, Arid-Dwelling Rodents, *Kerodon rupestris* and *Acomys cahirinus* / E. M. Derrickson, N. Jerrard, O. Oftedal // *Physiol. — Zool.* — 1996. — Vol. 69. No. 6. — P. 1402–1418.

154. Miller, S.J. Composition of the milk of the quokka (*Setonix brachyurus*) / S.J. Miller, R. Bencini, P.E. Hartmann // *Australian J. Zool.* — 2009. — Vol. 57 (1). — P. 11–21

155. Van Nieuwenhove, C. Characterization of gross composition, energy value, and fatty acid profile of milk from lowland tapir (*Tapirus terrestris*) during different lactation periods / C. Van Nieuwenhove, M.E. Pérez, M. Hernández, P.L. Pizarro // *Canadian J. Zool.* — 2014. — Vol. 92 (9). — P. 803–809.

156. Osthoff, G. Milk composition of a free-ranging white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) during late lactation / G. Osthoff, A. Hugo, M. de Wit // *Mamm. Biol.* — 2008. — Vol. 73. — P. 245–248.

157. Kunz, T.H. Changes in milk composition during lactation in three species of insectivorous bats / T.H. Kunz, O.T. Oftedal, S.K. Robson, M.B. Kretzmann, C. Kirk // *J. Comp. Physiol. B.* — 1995. — Vol. 164. — P. 543–551.

158. Skibieli, A.L. Milk composition in a hibernating rodent, the Columbian ground squirrel (*Urocyon columbianus*) / A.L. Skibieli, W.R. Hood // *J. Mammalogy.* — 2013. — Vol. 94 (1). — P. 146–154.

159. Power, M.L. Macronutrient composition of milk of captive nine-banded armadillos (*Dasyurus novemcinctus*) / M.L. Power, S.M. Watts, K.L. Murtough, F.M. Knight // *J. Mammal.* — 2018. — Vol. 99 (2). — P. 498–504.

160. Katharine M. Taynton Handrearing Pigmy Hedgehog Tenrec *Echinops telfairi* at the Jersey Wildlife Preservation Trust / K.M. Taynton // *J. Jersey Wildlife Preservation Trust (Durrell Wildl. Conserv. Trust).* — 1979. — Vol. 16. — P. 64–69.

161. Liu, X.Z. Composition of captive giant panda milk / X.Z. Liu, M.X. Li, J.Q. Yu, Z.H. Zhang, X.M. Huang, J.C. Lan, Z. Yang // *Zoo Biol.* — 2005. — Vol. 24. — P. 393–398.

162. Khan, S. Milk composition and yield changes with advancing pregnancy in dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*) / S. Khan, M.S. Qureshi, I. Ahmed, S.M. Shah // Turk. J. Vet. Anim. Sci. — 2011. — Vol. 35 (6). — P. 375–380.

163. Oftedal, O.T. The composition of hooded seal (*Cystophora cristata*) milk: An adaptation for postnatal fattening / O.T. Oftedal, D.J. Boness, W.D. Bowen // Canad. J. Zool. — 1988. — Vol. 66 (2). — P. 318–322.

164. Emtage, J.S. Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli* / J.S. Emtage, S. Angal, M.T. Doel, T.J.R. Harris, B. Jenkins, G. Lilley, P.A. Lowe // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1983. — Vol. 80. — No. 12. — P. 3671–3675.

165. Cullen, D. Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans* / D. Cullen, G.L. Gary, L.J. Wilson, K.J. Hayenga, M.H. Lamsa, M.W. Rey, S. Norton, R.M. Berka // Nat. Bio/technol. — 1987. — Vol. 5. — P. 369–376.

166. Chitpinyol, S. Site-specific mutations of calf chymosin B which influence milk-clotting activity / S. Chitpinyol, D. Goode, M.J.C. Crabbet // Food Chem. — 1998. — Vol. 62 (2). — P. 133–139.

167. Daly, R. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production / R. Daly, M.T.W. Hearn // J. Mol. Recognit. — 2005. — Vol. 18. — No. 2. — P. 119–138.

168. Narhi, L.O. The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin / L.O. Narhi, T. Arakawa, T.W. Strickland // J. Biol. Chem. — 1991. — Vol. 266. — No. 34. — P. 23022–23026.

169. Macauley-Patrick, S. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system / S. Macauley-Patrick, M.L. Fazenda // Yeast. — 2005. — Vol. 22. — No. 4. — P. 249–270.

170. Тюрин, О.В. Разработка системы экспрессии генов на основе митотрофных дрожжей *Komagataella kurtzmanii*: дис ... канд. биол. наук: 03.01.03: защищена 16.12.14; утв. 16.02.15 / Тюрин Олег Владимирович. — М., 2014. — 122 с. — Библиогр.: С. 112–122.

171. Tyagi, A. Functional expression of recombinant goat chymosin in *Pichia pastoris* bioreactor cultures: A commercially viable alternate / A. Tyagi, A. Kumar, A.K. Yadav, A.C. Saklani, S. Grover, V.K. Batish // LWT — Food Sci. Technol. — 2016. — Vol. 69. — P. 217–224.

172. Liu, W.-G. Generation and characterization of caprine chymosin in corn seed / W.-G. Liu, Y.-P. Wang, Z.-J. Zhang, M. Wang, Q.-X. Lv, H.-W. Liu, M. Lu // Prot. Express. Purification. — 2017. — Vol. 135. — P. 78–82.

173. Tyagi, A. Expression of buffalo chymosin in *Pichia pastoris* for application in mozzarella cheese / A. Tyagi, A. Kumar, A.K. Mohanty, J.K. Kaushik, S. Grover, V.K. Batish // LWT — Food Sci. Technol. — 2017. — Vol. 84. — P. 733–739.

174. Беленькая, С.В. Разработка продуцента молокосвертывающего фермента для сыродельной промышленности на основе прохимозина *Vicugna pacos* / С.В. Беленькая, В.В. Ельчанинов, А.П. Рудометов, Д.Н. Щербаков // Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 23–25 мая 2018 г.) — 2018 : материалы форума. М. : Изд. ООО «РЭД ГРУПП», 2018. — Вып. 16. — С. 662–664.

175. Беленькая, С.В. Получение рекомбинантных аналогов прохимозина *Vicugna pacos* и *Camelus ferus* в системе *Escherichia coli* / С.В. Беленькая, В.В. Ельчанинов, Д.Н. Щербаков // IV Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2017 : сб. тез. Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2017. — С. 3–5.

176. Cheese: chemistry, physics and microbiology, 4th edn., Chapter 4 — Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties / T. Uniacke-Lowe, P.F. Fox.; P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, P.D. Cotter et al., eds. — Oxford, UK: Elsevier, Academic Press., 2017. — P. 69–113.

177. Kumar, A. Molecular Cloning and Expression of Goat (*Capra hircus*) Prochymosin in *E.coli* / A. Kumar, J. Sharma, S. Grover, A.K. Mohanty, V.K. Batish // Food Biotechnol. — 2007. — Vol. 21 (1). — P. 57–69.

178. Nosedá, D.G. Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia (Komagataella) pastoris* under methanol-inducible AOX1 promoter / D.G. Nosedá, M. Blasco, M. Recúpero, M.Á. Galvagno // Protein Expr. Purif. — 2014. — Vol. 104. — P. 85–91.

179. Wei, Z.-Y. Production of Bioactive Recombinant Bovine Chymosin in Tobacco Plants / Z.-Y. Wei, Y.-Y. Zhang, Y.-P. Wang, M.-X. Fan, X.-F. Zhong, N. Xu, F. Lin, S.-C. Xing // Int. J. Mol. Sci. — 2016. — Vol. 17. — No. 5. — P. 624.

180. Starovoitova, V.V. A comparative study of functional properties of calf chymosin and its recombinant forms / V.V. Starovoitova, T.I. Velichko, L.A. Baratova, I.Y. Filippova, G.I. Lavrenova // Biochemistry (Mosc). — 2006. — Vol. 71. — No. 3. — P. 320–324.

181. Kageyama, T. Role of S'1 Loop Residues in the Substrate Specificities of Pepsin A and Chymosin / T. Kageyama // Biochem. — 2004. — Vol. 43. — No. 48. — P. 15122–15130.

182. Kageyama, T. New World Monkey Pepsinogens A and C, and Prochymosins. Purification, Characterization of Enzymatic Properties, cDNA Cloning, and Molecular Evolution / T. Kageyama // J. Biochem. — 2000. — Vol. 127. — P. 761–770.

183. Baer, A. Determination of residual activity of milk-clotting enzymes in cheese. Specific identification of chymosin and its substitutes in cheese / A. Baer, J.C. Collin // Int. Dairy Fed. Bull. — 1993. — Vol. 284. — P. 18–23.

184. Martin, P. Kinetic studies on the action of *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* acid proteases and chymosins A and B on a synthetic chromophoric hexapeptide / P. Martin, M.N. Raymond, E. Bricas, B.R. Dumas // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1980. — Vol. 612. — P. 410–420.

185. Ageitos, J.M. Fluorescein Thiocarbamoyl-Kappa-Casein Assay for the Specific Testing of Milk-Clotting Proteases / J.M. Ageitos, J.A. Vallejo, M. Poza, T.G. Villa // *J. Dairy Sci.* — 2006. — Vol. 89. — P. 3770–3777.

186. Costabel, L.M. Influence of chymosin type and curd scalding temperature on proteolysis of hard cooked cheeses / L.M. Costabel, C.V. Bergamini, L. Pozza, F. Cuffia, M.C. Candioti, E. Hynes // *J. Dairy Res.* — 2015. — Vol. 82 (3). — P. 375–384.

187. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, 2-nd ed.: Rennets: their role in milk coagulation and cheese Ripening / P.F. Fox, P.L.H. McSweeney.; B.A. Law, ed. — London, UK: Blackie Academic and Professional, 1997. — P. 1–49.

188. Børsting, M.W. Impact of selected coagulants and starters on primary proteolysis and amino acid release related to bitterness and structure of reduced-fat Cheddar cheese / M.W. Børsting, K.B. Qvist, M. Rasmussen, J. Vindeløv, F.K. Vogensen, Y. Ardö // *Dairy Sci. Technol.* — 2012. — Vol. 92. — P. 593–612.

189. Белов, А.Н. Влияние молокосвертывающего препарата на органолептические показатели сыра / А.Н. Белов, А.Д. Коваль, Е.А. Авданина, В.В. Ельчанинов // *Сыроделие и маслоделие.* — 2009. — № 1. — С. 22–24.

190. Мурунова, Г.В. Принципы подбора молокосвертывающего фермента для производства сыра / Г.В. Мурунова, Ю.Я. Свириденко // *Сыроделие и маслоделие.* — 2006. — № 5. — С. 2–5.

191. Emmons, D.B. Milk-clotting enzymes. 1. Proteolysis during cheese making in relation to estimated losses of yield / D.B. Emmons, D.C. Beckett, M. Binns // *J. Dairy Sci.* — 1990. — Vol. 73. — No. 8. — P. 2007–2015.

192. Singh, T.K. Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective. / T.K. Singh, M.A. Drake, K.R. Cadwallader // *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety.* — 2003. — Vol. 2. No. 4. — P. 139–162.

193. *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition, Volume I: General Aspects. Proteolysis in Cheese during Ripening / V.K. Upadhyay, P.L.H. McSweeney, A.A.A. Magboul, P.F. Fox.; P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, eds. — London, UK: Elsevier Academic Press, 2004. — P. 391–433.

194. Bansal, N. Comparison of the level of residual coagulant activity in different cheese varieties / N. Bansal, P. Fox, P.H.L. McSweeney // *J. Dairy Res.* — 2009. — Vol. 76. — No. 3. — P. 290–293.

195. Cross, K.J. Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes / K.J. Cross, L. Huq, J.P. Palamara, J.W. Perich, E.C. Reynolds // *J. Biological Chem.* — 2005. — Vol. 280. — No. 15. — P. 15362–15369.
196. Lucey, J.A. Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels / J.A. Lucey // *J. Dairy Sci.* — 2002. — Vol. 85. — No. 2. — P. 281–294.
197. Майоров, А.А. Проблемы повышения выхода сыра / А.А. Майоров, И.М. Мироненко, А.А. Байбикова // *Сыроделие и маслоделие.* — 2011. — № 2. — С. 19–23.
198. Albalat, R. Evolution by gene loss / R. Albalat, C. Cañestro // *Nature Reviews Genetics.* — 2016. — Vol. 17. — P. 379–391.
199. Castro, L.F.C. Recurrent gene loss correlates with the evolution of stomach phenotypes in gnathostome History / L.F.C. Castro, O. Gonçalves, S. Mazan, B.-H. Tay, B. Venkatesh, J.M. Wilson // *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* — 2014. — Vol. 281. — P. 1–9.
200. Hurley, W.L. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. Review / W. L. Hurley, P. K. Theil // *Nutrients.* — 2011. — Vol. 3. — P. 442–474.
201. Kolmer, M. Assignment of human prochymosin pseudogene to chromosome 1 / M. Kolmer, T.Örd, L. Alhonen, J.-M. Hyttinen, M. Saarma, R. Viljems, J. Jänne // *Genomics.* — 1991. — Vol. 10 (2). — P. 496–498.
202. Handbook of Proteolytic Enzymes — Vol. 1, 3rd ed., Ch. 5. Chymosin / P.B. Szecsi, M. Harboe; N.D. Rawlings, G. Salvesen, ed. — Amsterdam: Elsevier Ltd., 2013. — P. 37–42.
203. Carlsson, L.C.T. Intestinal Absorption of Proteins by the Neonatal Piglet Fed on Sow's Colostrum with either Natural or Experimentally Eliminated Trypsin-Inhibiting Activity / L.C.T. Carlsson, B.R. Weström, B.W. Karlsson // *Neonatology.* — 1980. — Vol. 38 (5–6). — P. 309–320.
204. Jensen, T. Isolation and partial characterization of prochymosin and chymosin from cat / T. Jensen, N.H. Axelsen, B. Foltmann // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Protein Structure and Molecular Enzymology.* — 1982. — V. 705(2). — P. 249–256.
205. Анатомия сельскохозяйственных животных с основами гистологии и эмбриологии : учебник ; 4-е изд., перераб. и доп. / П.А. Глаголев, В.И. Ипполитова; И.А. Спириухов, В.Ф. Вракин, ред. М. : Колос, 1977. — 450 с.
206. Moffett, A. Immunology of Placentation in Eutherian Mammals / A. Moffett, C. Loke // *Nature.* — 2006. — Vol. 6. — P. 584–594.
207. Acworth, N.R.J. The Healthy Neonatal Foal: Routine Examinations and Preventative Medicine / N.R.J. Acworth // *Equine Veterinary Education.* — 2003. — Vol. 15. — P. 207–211.

208. Enders, A.C. Comparative Placental Structure / A.C. Enders, T.N. Blankenship // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 1999. — Vol. 38. — P. 3–15.
209. Oliveira, M.F. Development of Yolk Sac Inversion in *Galea spixii* and *Cavia porcellus* (Rodentia, Caviidae) / M.F. Oliveira, A.M. Vale, P.O. Favaron, G.B. Vasconceles, G.B. Oliveira, M.A. Miglino // *Placenta*. — 2012. — Vol. 33. — P. 878–881.
210. Enders, A.C. A Comparative Study of the Fine Structure in Several Hemochorial Placentas / A.C. Enders // *American J. Anatomy*. — 1965. — Vol. 118. — P. 29–67.
211. Coe, C.L. Brief Report — Progressive improvement in the transfer of maternal antibody across the order Primates / C.L. Coe, G.R. Lubach, K.M. Izard // *American J. Primatol.* — 1994. — Vol. 32 (1). — P. 51–55.
212. Coe, C.L. Review — Vital and vulnerable functions of the primate placenta critical for infant health and brain development / C.L. Coe, G.R. Lubach // *Frontiers in Neuroendocrinol.* — 2014. — Vol. 35 (4). — P. 439–446.
213. Mess, A. Evolution of the placenta during the early radiation of placental mammals / A. Mess, A.M. Carter // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* — 2007. — Vol. 148 (4). — P. 769–779.
214. Wildman, D.E. Evolution of the mammalian placenta revealed by phylogenetic analysis / D.E. Wildman, C. Chen, O. Erez, L.I. Grossman, M. Goodman, R. Romero // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2006. — Vol. 103 (9). — P. 3203–3208.
215. Kageyama, T. Development-dependent expression of isozymogens of monkey pepsinogens and structural differences between them / K. Tanabe, O. Koiwa // *Eur. J. Biochem.* — 1991. — Vol. 202. — P. 205–215.
216. *Aotus: the Owl Monkey* — 1st Ed., Ch. 5. Husbandry and Medical Management of the Owl Monkey / J.F. Baer; J. Baer, R. Weller, I. Kakoma, eds. — San Diego: Academic Press, 1994. — P. 133–164.
217. Schrago, C.G. Timing the origin of new world monkeys / C.G. Schrago, C.A.M. Russo // *Mol. Biol. Evol.* — 2003. — Vol. 20. — P. 1620–1625.
218. Nei, M. The Wilhelmine E. Key 2001 Invitational Lecture. Estimation of Divergence Times for a Few Mammalian and Several Primate Species / M. Nei, G.V. Glazko // *J. Heredity*. — 2002. — Vol. 93 (3). — P. 157–164.
219. Pentsuk, N. Review Article — An Interspecies Comparison of Placental Antibody Transfer: New Insights Into Developmental Toxicity Testing of Monoclonal Antibodies / N. Pentsuk, J. W. van der Laan // *Birth Defects Research (B)*. — 2009. — Vol. 86. — P. 328–344.

220. Baintner, K. Review — Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment / K. Baintner // *Veterinary Immunol. Immunopathol.* — 2007. — Vol. 117 (3–4). — P. 153–161.
221. Yoon, J-O. 강아지 프로카이모신의 전 아미노산 서열 (The Complete Amino Acid Sequence of Newborn Dog Prochymosin) / J.-O. Yoon, H.-K. Kim // *동아시아식생활학회지* (East Asian Society of food and life). — 1997. — Vol. 7 (3). — P. 289–300.
222. Kageyama, T. Structure and development of rabbit pepsinogens: stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development / T. Kageyama, K. Tanabe, O. Koiwai // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 17031–17038.
223. Alihanoglu, S. Effect of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) rennet on the texture, rheology, and sensory properties of white cheese / S. Alihanoglu, D. Ek-tiren, Ç. Akbulut Çakır, H. Vardin, A. Karaaslan, M. Karaaslan // *Food Sci. & Nu-trition.* — 2018. — Vol. 6 (4). — P. 1100–1108.
224. Furukawa, S. A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals / S. Furukawa, Y. Kuroda, A. Sugiyama // *J. Toxicol. Pathol.* — 2014. — Vol. 27 (1). — P. 11–18.
225. Steiner, C.C. Molecular phylogeny and evolution of the Perissodactyla / C.C. Steiner, O.A. Ryder // *Zool. J. Linnean Soc.* — 2011. — Vol. 163 (4). — P. 1289–1303.
226. Uniacke-Lowe, T. Equine milk proteins: Chemistry, structure and nutritional significance / T. Uniacke-Lowe, T. Huppertz, P. F. Fox // *Int. Dairy J.* — 2010. — Vol. 20 (9). — P. 609–629.
227. Langer, P. Differences in the Composition of Colostrum and Milk in Eutherians Reflect Differences in Immunoglobulin Transfer / P. Langer // *J. Mammalogy.* — 2009. — Vol. 90 (2). — P. 332–339.
228. Thewissen, J.G.M. Skeletons of terrestrial cetaceans and the relationship of whales to artiodactyls / J.G.M. Thewissen, E.M. Williams, L.J. Roe, & S.T. Hus-sain // *Nature.* — 2001. — Vol. 413 (6853). — P. 277–281.
229. Carter, A.M. Comparative aspects of trophoblast development and placentation / A.M. Carter, A.C. Enders // *Reproductive Biol. Endocrinol.* — 2004. — Vol. 2 (46). — P. 1–15.
230. Carter, A.M. Structure of the definitive placenta of the tenrec *Echinops telfairi* / A.M. Carter, T.N. Blankenship, H. Künzle, A.C. Enders // *Placenta.* — 2004. — Vol. 25 (2–3). — P. 218–232.
231. Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals. Second Edition. Overview of Milk of Non-Bovine Mammals / Y.W. Park, G. F.W. Haenlein, W.L. Wendorff; Y.W. Park, G.F.W. Haenlein, W.L. Wendorff, eds. — Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Ltd., 2017. — P. 1–10.

232. Barłowska, J. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production / J. Barłowska, M. Szwajkowska, Z. Litwińczuk, J. Król // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* — 2011. — Vol. 10. — P. 291–302.

233. Claeys, W.L. Review — Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits / W.L. Claeys, C. Verraes, S. Cardoen, J. De Block, A. Huyghebaert, K. Raes, K. Dewettinck, L. Herman // *Food Control.* — 2014. — Vol. 42. — P. 188–201.

234. Kane, S.V. Placental Transport of Immunoglobulins: A Clinical Review for Gastroenterologists Who Prescribe Therapeutic Monoclonal Antibody Estowomen during Conception and Pregnancy / S.V. Kane, L.A. Acquah // *Am. J. Gastroenterol.* — 2009. — Vol. 104. — P. 228–233.

235. Roopenian, D. FcRN: the Neonatal Fc Receptor Comes of Age / D. Roopenian, S. Akilesh // *Nature Rev. Immunol.* — 2007. — Vol. 7. — P. 715–725.

236. Baker, K. Immune and Non-Immune Functions of the (Not So) Neonatal Fc Receptor, FcRn / K. Baker, S.W. Qiao, T. Kuo, K. Kobayashi, M. Yoshida, W.I. Lencer, R.S. Blumberg // *Seminars Immunopathol.* — 2009. — Vol. 31. — P. 223–236.

237. Иммунология : учебное пособие ; 5-е изд., перераб. и доп. ; пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Брюсстофф, Д. Мейл. М. : Мир, 2000. — 592 с.

238. *Mucosal Immunology*, Vol. 2, 3rd ed. Immunoglobulins and immunocytes in the mammary gland and its secretions / J.E. Butler, M.E. Kehrl (Jr.); J. Mestecky, M. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J.R. McGhee, L. Mayer, Eds. — Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press, 2005. — P. 1764–1793.

239. *Lactation: A Comprehensive Treatise*, Vol. 3. Immunoglobulins of the mammary secretions. J.E. Butler; B.L. Larson, V.R. Smith, Eds. — New York, NY, USA: Academic Press, 1974. — P. 217–255.

240. Rouse, B.T. The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk / B.T. Rouse, D.G. Ingram // *Immunology.* — 1970. — Vol. 19. — P. 901–.

241. Struff, W.G. Bovine colostrum as a biologic in clinical medicine; a review — Part I: Biotechnological standards, pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics and principles of treatment / W.G. Struff, G. Sprotte // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* — 2007. — Vol. 45. — P. 193–202.

242. Struff, W.G. Bovine colostrum as a biologic in clinical medicine; a review — Part II: Clinical studies / W.G. Struff, G. Sprotte // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* — 2008. — Vol. 46. — P. 211–225.

243. Weiner, C. Passive immunity against human pathogens using bovine antibodies / C. Weiner, Q. Pan, M. Hurtig, T. Borén, E. Bostwick, L. Hammarstrom // *Clin. Exp. Immunol.* — 1999. — Vol. 116. — P. 193–205.

244. Zinkernagel, R. Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases / R. Zinkernagel // *N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 345. — P. 1331–1335.

245. Lilius, E.-M. The role of colostral antibodies in prevention of microbial infections / E.-M.Lilius, P. Marnila // *Curr. Opin. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 14. — P. 295–300.

246. Glass, R.I. Protection against cholera in breast-fed children by antibodies in breast milk / R.I. Glass, A.-M. Svennerholm, B.J. Stoll, M.R. Khan, K.M.B. Hossain, M.I. Huq, J. N. Holmgren // *Engl. J. Med.* — 1983. — Vol. 398. — P. 1389–1392.

247. Ruiz-Palacios, G.M. Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk / G.M. Ruiz-Palacios, J.J. Calva, L.K. Pickering, Y. Lopez-Vidal, P. Volkow, H. Pezzarossi, M.S. West // *J. Pediatr.* — 1990. — Vol. 116. — P. 707–713.

248. Shahid, N.S. Placental and breast transfer of antibodies after maternal immunization with polysaccharide meningococcal vaccine: A randomized, controlled evaluation / N.S. Shahid, M.C. Steinhoff, E. Roy, T. Begum, C.M. Thompson, G.R. Siber // *Vaccine.* — 2002. — Vol. 20. — P. 2404–2409.

249. Moon, H.W. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals / H.W. Moon, T.O. Bunn // *Vaccine.* — 1993. — Vol. 11. — P. 213–220.

250. Wilson, M.R. Immunity to *Escherichia coli* in pigs: Antibody secretion by the mammary gland after intramammary or intramuscular vaccination with *E. coli* vaccine / M.R. Wilson, P. Brown, J. Svendsen // *Can. J. Comp. Med.* — 1972. — Vol. 36. — P. 44–48.

251. Kortbeek-Jacobs, J.M.C. The effect of oral immunization on the population of lymphocytes migrating to the mammary gland of the sow / J.M.C. Kortbeek-Jacobs, P.J.S. J.A. van Kooten, van der Donk, J.E. van Dijk, V.P. Rutten // *Vet. Microbiol.* — 1984. — Vol. 9. — P. 287–299.

252. Saif, L.J. Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization / L.J. Saif, K.L. Smith, B.J. Landmeier, E.H. Bohl, K.W. Theil // *Am. J. Vet. Res.* — 1984. — Vol. 45. — P. 49–58.

253. Lanza, I. Lactogenic immunity and milk antibody isotypes to transmissible gastroenteritis virus in sows exposed to porcine respiratory coronavirus during pregnancy / I. Lanza, D.I. Shoup, L.J. Saif // *Am. J. Vet. Res.* — 1995. — Vol. 56. — P. 739–748.

254. Farrell, H. M., Jr. Molten globule structures in milk proteins: Implications for potential new structure-function relationships / H.M.Farrell, Jr., P.X. Qi, E.M. Brown, P.H. Cooke, M.H. Tunick, E.D. Wickham, J.J. Unruh // *J. Dairy Sci.* — 2002. — Vol. 85. — P. 459–471.

255. Developments in Dairy Chemistry. Chemistry of milk proteins. / H.E. Swaisgood.; P.F. Fox, ed. — London, United Kingdom.: Applied Science, 1982. — P. 1–60.

256. Uversky, V.N. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? / V.N. Uversky, J.R. Gillespie, A.L. Fink // Proteins. — 2000. — Vol. 41. — P. 415–427.

257. Syme, C.D. A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. New insight into the structure and behavior of natively unfolded proteins / C.D. Syme, E. W. Blanch, C. Holt, R. Jakes, M. Goedert, L. Hecht, L.D. Barron // Eur. J. Biochem. — 2002. — Vol. 269. — P. 148–156.

258. Holt, C. Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α s1-, β - and κ -caseins / C.Holt, L.Sawyer // J. Chem. Soc. Faraday Trans. — 1993. — Vol. 89. — P. 2683–2692.

259. Bayoumi, S. Studies on composition and rennet coagulation of camel milk / S. Bayoumi // Kieler Milchwirtschaft Forschungsberichte. — 1990. — Vol. 42. — P. 3–8.

260. Wangoh, J. Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract / J. Wangoh, Z. Farah, Z. Puhan // Milchwissenschaft. — 1993. — Vol. 48. — P. 322–325.

261. Boudjenah-Haroun, S. 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 / S. Boudjenah-Haroun, C.L. Laleye, F. Moulti-Mati, A.S. Si, N. Mahboub, O.E. Siboukeur, A. Mati // Emir. J. Food Agric. — 2011. — Vol. 23 (4). — P. 301–310.

262. Farah, Z. Rennet coagulation properties of camel milk / Z. Farah, M.R. Bachmann // Milchwissenschaft. — 1987. — Vol. 42. — P. 689–692.

263. Kappeler, S. Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins / S. Kappeler, Z. Farah, Z. Puhan // J. Dairy Res. — 1998. — Vol. 65. — P. 209–222.

264. Sørensen, J. 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. Sørensen, D.S. Palmer, K.B. Qvist, B. Schiøtt // J. Agric. Food Chem. — 2011. — Vol. 59. — P. 5636–5647.

265. Sørensen, J. Hot-Spot Mapping of the Interactions between Chymosin and Bovine κ -Casein / J. Sørensen, D.S. Palmer, B. Schiøtt // J. Agric. Food Chem. — 2013. — Vol. 61 (33). — P. 7949–7959.

266. Kotts, C. Isolation of κ -casein-like proteins from milks of various species / C. Kotts, R. Jenness // J. Dairy Sci. — 1976. — Vol. 59. — P. 816–822.

267. Visser, S. Peptide substrates for chymosin (rennin). Isolation and sub-strate behaviour of two tryptic fragments of bovine κ -casein / S. Visser, P.J. van Rooijen, C.J.Slangen // Eur. J. Biochem. — 1980. — Vol. 108. — P. 415–421.

268. Plowman, J.E. Restrained molecular dynamics study of the interaction between bovine κ -casein peptide 98-111 and bovine chymosin and porcine pepsin / J.E. Plowman, L.K. Creamer // *J. Dairy Res.* — 1995. — Vol. 62. — P. 451–467.
269. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition, Volume I: General Aspects. Rennets: General and Molecular Aspects / M.J.C. Grabbe.; P.F.Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, eds. — London, UK: Elsevier Academic Press, 2004. — P. 19–45.
270. Ansari, S.M. Allosteric-Activation Mechanism of Bovine Chymosin Revealed by Bias-Exchange Metadynamics and Molecular Dynamics Simulations / S.M. Ansari, A. Coletta, K.K. Skeby, J. Sørensen, B. Schiøtt, D.S. Palmer // *J. Phys. Chem. B.* — 2016. — Vol. 120(40). — P. 10453–10462.
271. Andreeva, N. Can enzymes adopt a self-inhibited form? Results of X-ray crystallographic studies of chymosin / N. Andreeva, J. Dill, G.L. Gilliland // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 1992. — Vol. 184. — P. 1047–1081.
272. Gustchina, E. Post X-ray crystallographic studies of chymosin: the existence of two structural forms and the regulation of activity by the interaction with the histidine-proline cluster of κ -casein / E. Gustchina, L. Rumsh, L. Ginodman, P. Majer, N. Andreeva // *FEBS Lett.* — 1996. — Vol. 379 (1). — P. 60–62.
273. Gilliland, G. L. The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution / G.L. Gilliland, E. L. Winborne, J. Nachman, A. Wlodawer // *Proteins.* — 1990. — No. 8. — P. 82–101.
274. Ansari, S.M. On the effect of mutations in bovine or camel chymosin on the thermodynamics of binding κ -caseins / S.M. Ansari, J. Sørensen, B. Schiøtt, D.S. Palmer // *Proteins.* — 2018. — Vol. 86. — No. 1. — P. 75–87.
275. Schechter, I. On the size of the active site in proteases. I. Papain / I. Schechter, A. Berger // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 1967. — Vol. 27. — P. 157–162.
276. Green, M.L. Comparison of the rate of proteolysis during ripening of Cheddar cheeses made with calf rennet and swine pepsin as coagulants / M.L. Green, P.D.M. Foster // *J. Dairy Res.* — 1974. — Vol. 41. — P. 269–282.
277. Coolbear, K.P. Comparative study methods for the isolation and purification of bovine kappa-casein and its hydrolysis by chymosin / K.P. Coolbear, D.F. Elgar, T. Coolbear, J.S. Ayers // *J. Dairy Res.* — 1996. — Vol. 63. — P. 61–71.
278. Carles, C. Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide bond of bovine α 1-casein: Comparison of the behaviour of this substrate with that of β - and κ ₀-caseins / C. Carles, B.R. Dumas // *FEBS Lett.* — 1985. — Vol. 185 (2). — P. 282–286.

279. Visser, S. On the specificity of chymosin (rennin) in its action on bovine β -casein / S.Visser, K.J.Slangen // Neth. Milk Dairy J. — 1977. — Vol. 31. — P. 16–30.

280. McSweeney, P.L.H. Proteolytic specificity of chymosin on bovine α s1-casein / P.L.H. McSweeney, N.F. Olson, P.F. Fox, A. Healy, P. Højrup // J. Dairy Res. — 1993. — Vol. 60. — P. 401–412.

281. McSweeney, P.L.H. Proteolysis of bovine α s2-casein by chymosin / P.L.H. McSweeney, N.F. Olson, P.F. Fox, A.Healy // Z. Lebensm. Unters Forsch. 1994. — Vol. 119. — P. 429–432.

282. Lametti, S. Primary structure of κ -casein isolated from mare's milk. / S. Lametti, G. Tedeshi, E. Oungre, F. Bonomi // J.Dairy Res. — 2001. — Vol. 68. — P. 53–61.

283. Advanced Dairy Chemistry, Third edition, Vol. I: Proteins. Non-bovine caseins: quantitation variability and molecular diversity / P. Martin, P. Ferranti, C. Leroux, F. Addeo.; P.F.Fox, P.L.H. McSweeney, eds. — New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003. — P. 277–317.

284. Farah, Z. Composition and characteristics of camel milk. / Z. Farah // J. Dairy Res. — 1993. — Vol. 60. — P. 603–626.

285. Mulvihill, D.M. Specificity of chymosins and pepsins on β -caseins / D.M. Mulvihill, P.F. Fox // Milchwissenschaft. — 1979. — Vol. 34. — P. 680–683.

286. Trujillo, A.-J. Proteolysis of goat β - casein by calf rennet under various factors affecting the cheese ripening process / A.-J. Trujillo, B. Guamis, C. Carretero // J. Agric. Food Chem. — 1995. — Vol. 43. — P. 1472–1478.

287. Gallagher, D.P. Hydrolysis of porcine β -casein by bovine plasmin and bovine chymosin / D.P. Gallagher, T.K. Singh, D.M. Mulvihill // Z. Lebensm Unters Forsch A. — 1999. — Vol. 208. — P. 83–89.

288. Awad, S. Proteolytic activities of chymosin and porcine pepsin on buffalo, cow and goat whole and β -casein fractions / S. Awad, Q.-Q. Lüthi-Peng, Z. Puhan, // J. Agric. Food Chem. — 1998. — Vol. 46. — P. 4997–5007.

289. Egito, A.S. Susceptibility of equine κ - and β -caseins to hydrolysis by chymosin / A.S. Egito, J.-M. Girardet, L. Miclo, D. Mollé, G. Humbert, J.-L. Gaillard // Int. Dairy J. — 2001. — Vol. 11. — P. 885–893.

290. Iannella, G. Donkey cheese made through pure camel chymosin / G. Iannella // African J. Food Sci. — 2015. — Vol. 9 (7). — P. 421–425.

291. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd Edition., Vol. 3. Equid Milk / J.W. Fuquay, P.F. Fox; J.W. Fuquay, P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, eds. — San Diego, CA, USA: Academic Press. — 2011. — P. 518–529.

292. Whitaker, J.R. Protease of *Endothia parasitica* / J.R.Whitaker // Methods Enzymol. — 1970. — Vol. 19. — P. 436–445.

293. Bailey, D. X-ray crystallographic studies of complexes of pepstatin A and a statine-containing human renin inhibitor with endothiapepsin / D. Bailey, J.B. Cooper, B. Veerapandian, T.L. Blundell, B. Atrash, D.M. Jones, M. Szelke // *Biochem. J.* — 1993. — Vol. 289. — P. 363–371.

294. Agnarsson, I. The phylogeny of *Cetartiodactyla*: The importance of dense taxon sampling, missing data, and the remarkable promise of cytochrome b to provide reliable species-level phylogenies / I. Agnarsson, L.J. May-Collado // *Mol. Phylogen. Evolution.* — 2008. — Vol. 48 (3). — P. 964–85.

295. Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals. Second Edition. Comparative Aspects of Lactation and Milk Compositions of Minor Species / B. Coudre ; Y.W. Park, G.F.W. Haenlein, W.L. Wendorff, eds.— Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Ltd., 2017. — P. 588.

296. Trujillo, A.J. Proteolytic specificity of chymosin on caprine alpha s1-caseins A and F / A.J. Trujillo, G. Miranda, D. Lebars, A. Delacroix-Buchet // *J. Dairy Res.* — 1988. — Vol. 65. — P. 233--241.

297. Belenkaya, S.V. Basic Biochemical Properties of Recombinant Chymosins (Review) / S.V. Belenkaya, D.V. Balabova, A.N. Belov, A.D. Koval, D.N. Shcherbakov, V.V. Elchaninov // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 2020. — Vol. 56. — No. 4. — P. 363–372.

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

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

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Видовой состав Хн и Хн-подобных аминокислотных последовательностей млекопитающих в базах NCBI (по состоянию на 1-е полугодие 2020 г.)

Отряд	Хн (видов)	Хн-подобный (видов)	Вид (процент гомологии с Хн коровы)
Одно-проходные (Monotremata)	–	1	Утконос — <i>Ornithorhynchus anatinus</i> (57,0)
Опоссумы (Didelphimorphia)	–	1	Домовой опоссум — <i>Monodelphis domestica</i> (72,4)
Хищные сумчатые (Dasyuromorphia)	–	1	Тасманийский дьявол — <i>Sarcophilus harrisi</i> (71,1)
Двурезцовые сумчатые (Diprotodontia)	–	2	Короткошерстый вомбат — <i>Vombatus ursinus</i> (66,4) Коала — <i>Phascolarctos cinereus</i> (65,2)
Афросорициды (Afrosoricida)	–	2	Малый ежовый тенрек — <i>Echinops telfairi</i> (77,4) Капский златокрот — <i>Chrysochloris asiatica</i> (79,5)
Трубказубовые (Tubulidentata)	–	1	Африканский трубказуб — <i>Orycteropus afer</i> (78,2)
Прыгунчиковые (Macroscelidea)	–	1	Прыгунчик Эдварда — <i>Elephantulus edwardii</i> (77,5)
Сирены (Sirenia)	–	1	Американский ламантин — <i>Trichechus manatus latirostris</i> (76,6)
Хоботные (Proboscidea)	–	1	Саванный слон — <i>Loxodonta africana</i> (76,4)
Броненосцы (Cingulata)	–	1	Девятипоясный броненосец — <i>Dasyurus novemcinctus</i> (76,9)
Тупайи (Scandentia)	1	–	Малайская тупайя (китайский подвид) — <i>Tupaia belangeri chinensis</i> (81,6)
Шерстокрылы (Dermoptera)	–	1	Малайский шерстокрыл — <i>Galeopterus variegatus</i> (60,8)

Приматы (Primates)	4	7	<p>Западноамазонская мирикина — <i>Aotus nancy-mae</i> (79,8) Западная равнинная горилла — <i>Gorilla gorilla gorilla</i> (76,6) Сифака Коккереля — <i>Propithecus coquereli</i> (76,6) Галаго Гарнетта — <i>Otolemur garnettii</i> (69,3) Серый мышинный лемур — <i>Microcebus murinus</i> (69,5) Белощекий хохлатый гиббон — <i>Nomascus leucogenys</i> (70,1) Колобус красный угандийский — <i>Ptilocolobus tephrosceles</i> (62,2)</p> <p>Обыкновенный капуцин — <i>Cebus capucinus imitator</i> (81,4) Обыкновенная игрунка — <i>Callithrix jacchus</i> (81,6) †* Боливийский саймири — <i>Saimiri boliviensis</i> (81,4) Филиппинский долгопят — <i>Carlito syrichta</i> (79,5)</p>
Грызуны (Rodentia)	2	14	<p>Кенгуровый прыгун Орда — <i>Dipodomys ordii</i> (73,0) Канадский бобр — <i>Castor canadensis</i> (75,4) Мышь Кароли — <i>Mus caroli</i> (71,9) Сиккимская мышь — <i>Mus pahari</i> (71,1) Когтистая песчанка — <i>Meriones unguiculatus</i> (71,7) Палестинский слепыш — <i>Nannospalax galili</i> (69,6) Египетский тушканчик — <i>Jaculus jaculus</i> (72,1) Альпийский сурок — <i>Marmota marmota marmota</i> (73,2) Желтобрюхий сурок — <i>Marmota flaviventris</i> (73,5) Тринадцатиполосный суслик — <i>Ictidomys tridecemlineatus</i> (72,7) Олений хомячок — <i>Peromyscus maniculatus bairdii</i> (70,9) Арктический суслик — <i>Urocitellus parryii</i> (72,4) Прерийная полевка — <i>Microtus ochrogaster</i> (65,1) Сирийский хомячок — <i>Mesocricetus auratus</i> (63,4)</p> <p>Китайский хомячок — <i>Cricetulus griseus</i> (71,4) Серая крыса — <i>Rattus norvegicus</i> (71,7)</p>
Зайце-образные (Lagomorpha)	1	-	<p>Дикий кролик — <i>Oryctolagus cuniculus</i> (72,7)</p>

Землеройкообразные (Soricomorpha)	–	3	Обыкновенная бурозубка — <i>Sorex araneus</i> (80,1) Крот звездорыл — <i>Condylura cristata</i> (78,5) Обыкновенный еж — <i>Erinaceus europaeus</i> (76,1)
Рукокрылые (Chiroptera)		8	Натальский длиннокрыл — <i>Miniopterus natalensis</i> (80,8) Бледный копыенос — <i>Phyllostomus discolor</i> (78,7) Обыкновенный вампир — <i>Desmodus rotundus</i> (78,2) Гигантская летучая лисица — <i>Pteropus vampyrus</i> (71,9) Большой бурый кожан — <i>Eptesicus fuscus</i> (68,8) Египетская летучая собака — <i>Rousettus aegyptiacus</i> (76,0) Малая бурая ночница — <i>Myotis lucifugus</i> (78,8) Листонос гималайский — <i>Hipposideros armiger</i> (81,1)
		3	Баванская летучая лисица — <i>Pteropus alecto</i> (79,0) Ночница Брандта — <i>Myotis brandtii</i> (78,5) Ночница степная — <i>Myotis davidii</i> (78,0)
Панголины (Pholidota)	–	1	Яванский ящер — <i>Manis javanica</i> (77,7)
Хищные (Carnivora)	–	18	Северный морской котик — <i>Callorhinus ursinus</i> (81,9) Калифорнийский морской лев — <i>Zalophus californianus</i> (81,6) Северный морской лев (сивуч) — <i>Eumetopias jubatus</i> (81,4) Морж — <i>Odobenus rosmarus divergens</i> (81,4) Домашний хорек (фуро) — <i>Mustela putorius furo</i> (80,3) Морской бобр (морская выдра, калан) — <i>Erehya lutris kenyonii</i> (80,1) Обыкновенная лисица — <i>Vulpes vulpes</i> (79,8) Гавайский тюлень-монах — <i>Neomonachus schauinslandi</i> (80,8) Тюлень Уэдделла — <i>Leptonychotes weddellii</i> (80,6) Собака домашняя — <i>Canis lupus familiaris</i> (79,5) Кошка домашняя — <i>Felis catus</i> (79,8) Амурский тигр — <i>Panthera tigris altaica</i> (79,5) Пиренейская рысь — <i>Lynx pardinus</i> (79,5) Гепард — <i>Acinonyx jubatus</i> (79,0) Гризли — <i>Ursus arctos horribilis</i> (79,8) Большая панда — <i>Ailuropoda melanoleuca</i> (79,5) Белый медведь — <i>Ursus maritimus</i> (78,7) Пума — <i>Puma concolor</i> (70,8)

Парнокопытные (Artiodactyla)	14	1	Тибетская антилопа (оронго, чиру) — <i>Pantholops hodgsonii</i> (93,7) Домашний бык — <i>Bos taurus</i> (100,0) ▲* Зебу — <i>Bos indicus</i> (99,5) Домашняя овца — <i>Ovis aries</i> (94,2)* Дикий як — <i>Bos mutus</i> (99,2) Домашний як — <i>Bos grunniens</i> (99,2)* Американский бизон — <i>Bison bison bison</i> (99,0) Азиатский буйвол — <i>Bubalus bubalis</i> (98,4)* Белохвостый олень — <i>Odocoileus virginianus texanus</i> (93,4) Домашняя коза — <i>Capra hircus</i> (94,0)* Тур — <i>Bos primigenius</i> (93,4) Альпака — <i>Vicugna pacos</i> (84,0)* Верблюд двугорбый дикий — <i>Camelus ferus</i> (83,7) Верблюд одногорбый — <i>Camelus dromedarius</i> (83,7) ▲* Дикая свинья — <i>Sus scrofa</i> (81,4)
		4	Китайский речной дельфин — <i>Lipotes vexillifer</i> (86,9) Косатка — <i>Orcinus orca</i> (87,1) Тихоокеанский белобокий дельфин — <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> (86,1) Большой дельфин (афалина) — <i>Tursiops truncatus</i> (70,2)
Китообразные (Cetacea)	6	6	Нарвал — <i>Monodon monoceros</i> (85,3 %) Северный малый полосатик — <i>Balaenoptera acutorostrata scammoni</i> (85,6) Белуха — <i>Delphinapterus leucas</i> (86,4) Бесперая морская свинья — <i>Neophocaena asi-aeorientalis</i> (86,4) Кашалот — <i>Physeter catodon</i> (85,8) Кит серый — <i>Eschrichtius robustus</i> (86,0)
ВСЕГО	31	69	

Условные обозначения: ▲ — рХн используется в сыроделии; * — получен рХн; † — рХн, который экспрессируется у взрослых особей как пепсиноподобная эндопептидаза с высокой общей ПА.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Относительное содержание основных нутриентов в молоке различных видов млекопитающих [51, 100, 101, 105, 106, 132–139, 141, 143–149, 150–163]

Отряд / Вид	Сухие в-ва (%)	Жир (%)	Белок (%)	Сахар (%)
Отряд MONOTREMATA — Однопроходные				
Ехидна австралийская — <i>Tachyglossus aculeatus</i>	48,9	31,0	12,4	2,3
Утконос — <i>Ornithorynchus anatinus</i>	39,1	22,2	8,2	3,7
Отряд DASYUROMORPHIA — Хищные сумчатые				
Сумчатая куница — <i>Dasyurus viverrinus</i> (E)	16,0	4,0	3,0	4,0
Сумчатая куница — <i>Dasyurus viverrinus</i> (M)	32,0	42,0	8,0	7,0
Сумчатая куница — <i>Dasyurus viverrinus</i> (L)	32,0	46,0	8,5	2,0
Отряд DIPROTODONTIA — Двурезцовые сумчатые				
Восточный куксус — <i>Pseudocheirus peregrinus</i>	23,0	3,0	4,5	12,5
Трехпалый потору — <i>Potorous tridactylus</i> (E)	17,0	2,0	5,0	9,0
Трехпалый потору — <i>Potorous tridactylus</i> (M)	35,0	11,0	12,0	15,0
Трехпалый потору — <i>Potorous tridactylus</i> (L)	50,0	26,0	15,0	2,0
Кенгуру Евгении (таммар) — <i>Macropus eugeni</i>	25,0	4,0	6,0	12,5
Короткомордый кенгуру — <i>Bettongia gaimardi</i> (E)	25,0	3,0	8,0	10,0
Короткомордый кенгуру — <i>Bettongia gaimardi</i> (M)	25,0	6,0	11,0	12,0
Короткомордый кенгуру — <i>Bettongia gaimardi</i> (L)	40,0	20,0	16,0	2,0
Горный кенгуру — <i>Macropus robustus</i>	23,5	8,1	9,8	1,4
Большой рыжий кенгуру — <i>Macropus rufus</i>	24,1	10,3	7,0	6,2
Коала — <i>Phascolarctos cinereus</i> (E)	28,0	10,0	5,5	8,8
Коала — <i>Phascolarctos cinereus</i> (M)	33,6	16,6	8,3	3,5
Коала — <i>Phascolarctos cinereus</i> (L)	14,0	14,0	12,5	1,1
Короткохвостый кенгуру — <i>Setonix brachyurus</i>	23,8	10,4	10,3	2,5
Рыже-серый валлаби — <i>Macropus rufogriseus</i> (E)	16,0	3,0	4,0	8,0
Рыже-серый валлаби — <i>Macropus rufogriseus</i> (M)	25,0	7,0	7,0	11,0
Рыже-серый валлаби — <i>Macropus rufogriseus</i> (L)	27,0	14,0	10,0	2,0

Тасманийский филандер — <i>Thylogale billardieri</i>	н.д.	7,1	8,0	8,1
Лисовидный поссум — <i>Trichosurus vulpecula</i> (M)	24,0	4,4	7,0	9,0
Лисовидный поссум — <i>Trichosurus vulpecula</i> (L)	24,5	6,1	9,2	3,2
Отряд PERAMELEMORPHIA — Бандикуты				
Большой бандикут — <i>Isodon macrourus</i> (E)	7,0	1,0	4,0	2,0
Большой бандикут — <i>Isodon macrourus</i> (M)	26,0	12,0	10,0	8,0
Большой бандикут — <i>Isodon macrourus</i> (L)	45,0	26,0	14,0	2,0
Тасманийский бандикут — <i>Perameles gunnii</i> (E)	28,0	3,1	4,5	2,0
Тасманийский бандикут — <i>Perameles gunnii</i> (M)	36,0	8,4	10,2	5,5
Тасманийский бандикут — <i>Perameles gunnii</i> (L)	54,0	17,4	12,0	2,5
Отряд DIDELPHIMORPHIA — Опоссумы				
Виргинский опоссум — <i>Didelphys virginiana</i>	23,2	11,3	8,4	1,6
Отряд PAUCITUBERCULATA — Ценоlestы				
н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Отряд MICROBIOTHERIA — Микробиотерии				
н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Отряд NOTORYSTEMORPHIA — Сумчатые кроты				
н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Отряд TUBULIDENTATA — Трубказубовые (1 вид)				
Африканский трубказуб — <i>Orycteropus afer</i>	30,2	13,6	12,3	2,5
Отряд SIRENIA — Сирены				
Американский ламантин — <i>Trichechus manatus</i>	23,1	14,8	8,1	0,4
Отряд AFROSORICIDA — Афросорициды				
	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Отряд MACROSCELIDEA — Прыгунчиковые				
н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Отряд HYRACOIDEA — Дамановые				
н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Отряд CINGULATA — Броненосцы				
Девятипоясный броненосец — <i>Dasyurus novemcinctus</i>	21,6	11,7	9,8	2,7
Отряд PILOSA — Неполнозубые				
Гигантский муравьед — <i>Myrmeocophaga tridactyla</i>	27,0	20,0	11,0	0,3

Отряд DERMOPTERA — Шерстокрылы				
н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Отряд ERINACEOMORPHA — Ежеобразные				
Обыкновенный еж — <i>Erinaceus europaeus</i> .	20,6	10,1	7,2	2,0
Отряд PHOLIDOTA — Панголины, или Ящеры				
н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Отряд SORICOMORPHA — Землеройкообразные				
Обыкновенная белозубка — <i>Crocidura russula</i>	51,0	30,0	9,4	3,0
Отряд SCANDENTIA — Тупайи				
Малайская тупайя — <i>Tupaia belangeri</i>	40,4	25,6	10,4	1,5
Отряд CHIROPTERA — Рукокрылые				
Сероголовая летучая лисица — <i>Pteropus poliocephalus</i>	11,2	2,0	2,5	6,2
Гигантская летучая лисица — <i>Pteropus vampyrus</i>	16,5	7,2	3,1	5,7
Малая летучая лисица — <i>Pteropus hypomelanus</i>	18,5	8,5	2,7	5,7
Летучая лисица — <i>Pteropus rodricensis</i>	19,1	6,7	3,4	6,4
Ямайский листонос — <i>Artibeus jamaicensis</i>	17,8	9,0	3,6	6,1
Малая бурая ночница — <i>Myotis lucifugus</i>	27,1	15,8	8,5	4,0
Большой копыенос — <i>Phyllostomus hastatus</i>	25,9	13,1	9,1	4,0
Пещерная ночница — <i>Myotis velifer</i>	25,4	19,9	10,7	4,4
Бразильский складчатогуб — <i>Tadarida brasiliensis</i>	36,5	25,8	7,7	3,4
Большой бурый кожан — <i>Eptesicus fuscus</i>	н.д.	16,4	6,2	2,52
Отряд PRIMATES — Приматы				
Человек разумный — <i>Homo sapiens</i>	12,3	4,0	1,2	6,9
Шимпанзе обыкновенный — <i>Pan troglodytes</i>	12,1	3,7	1,2	7,0
Горная горилла — <i>Gorilla beringei beringei</i>	10,7	1,9	1,4	6,8
Желтый павиан (бабуин) — <i>Papio cynocephalus</i>	14,2	5,0	1,6	7,3
Павиан анубис — <i>Papio anubis</i>	14,0	4,5	1,5	7,8
Галаго Гарнетта — <i>Otolemur garnettii</i>	18,5	7,3	5,2	6,6
Толстохвостый галаго — <i>Otolemur crassicaudatus</i>	18,6	8,0	4,8	6,4
Ангольская крошечная мартышка — <i>Miopithecus talapoin</i>	12,3	3,0	2,1	7,2
Золотистая львиная игрунка — <i>Leontopithecus rosalia</i>	19,4	10,2	3,0	6,8
Черный лемур — <i>Eulemur macaco</i>	10,1	1,1	1,5	8,4
Рыжебрюхий лемур — <i>Eulemur rubriventer</i>	10,3	0,8	1,1	8,9

Бурый лемур — <i>Eulemur fulvus</i>	9,6	0,9	1,3	8,5
Мангустовый лемур — <i>Eulemur mongoz</i>	9,8	0,7	1,3	7,9
Лемур вари — <i>Varecia variegata</i>	14,0	3,2	4,2	7,7
Толстохвостый галаго — <i>Otolemur crassicaudatu</i>	18,6	8,0	4,8	6,4
Медленный лори — <i>Nycticebus coucang</i>	16,3	7,0	3,9	6,6
Обыкновенная игрунка — <i>Callithrix jacchus</i>	12,7	2,3	2,2	8,0
Боливийская саймири — <i>Saimiri boliviensis</i>	16,6	4,6	3,6	7,0
Рыжий реву — <i>Aloutta seniculus</i>	11,3	1,1	1,9	6,6
Колумбийский реву — <i>Alouatta palliata</i>	11,7	1,6	2,2	6,7
Макак-крабод — <i>Macaca fascicularis</i>	12,2	5,2	1,6	н.д.
Японский макак — <i>Macaca fuscata</i>	14,0	4,2	1,6	6,2
Макак-резус — <i>Macaca mulatta</i>	15,2	4,4	1,8	7,5
Верветка — <i>Chlorocebus pygerythrus</i>	9,9	3,1	1,3	8,6
Отряд CARNIVORA — Хищные				
Собака (домашняя) — <i>Canis familiaris</i>	22,7	9,5	7,5	3,8
Лисица полярная (песец) — <i>Vulpes lagopus</i>	28,6	13,5	11,1	3,0
Лисица обыкновенная — <i>Vulpes vulpes</i>	18,1	5,8	6,7	4,6
Енотовидная собака — <i>Nyctereutes procyonoides</i>	18,6	3,4	7,8	н.д.
Черный медведь — <i>Ursus americanus</i>	37,6	25,1	7,0	3,0
Бурый медведь — <i>Ursus arctos</i>	31,9	17,1	9,2	2,2
Белый медведь — <i>Ursus maritimus</i>	48,0	33,0	11,1	0,3
Большая панда — <i>Ailuropoda melanoleuca</i>	н.д.	н.д.	6,8	н.д.
Полосатый скунс — <i>Mephitis mephitis</i>	30,6	13,3	9,9	3,0
Хорек обыкновенный — <i>Mustela putorius</i>	н.д.	9,7	6,9	3,8
Американская норка — <i>Neovison vison</i>	21,7	7,3	5,6	4,5
Кошка (домашняя) — <i>Félis silvéstris cátus</i>	н.д.	10,8	10,6	3,7
Африканский лев — <i>Panthera leo</i>	26,8	8,7	11,8	3,2
Гепард — <i>Acinonyx jubatus</i>	16,6	6,5	10,1	4,0
Кустарниковая кошка (сервал) — <i>Felis serval</i>	29,5	15,2	15,8	0,7
Морская выдра (калан) — <i>Enhydra lutris</i>	40,2	23,7	11,7	0,9
Капский морской котик — <i>Arctocephalus pusillus</i>	42,0	23,2	10,8	н.д.
Северный морской котик — <i>Callorhinus ursinus</i>	63,3	50,7	10,3	0,1
Субантарктический морской котик — <i>Arctocephalus tropicalis</i>	61,8	47,1	12,8	н.д.
Кергеленский морской котик — <i>Arctocephalus gazella</i>	55,9	24,4	5,9	0,05

Морской котик Х. Фернандеса — <i>Arctocephalus philippii</i>	55,1	41,4	11,9	1,2
Южноамериканский морской котик — <i>Arctocephalus australis</i>	57,7	42,4	10,5	0,1
Калифорнийский морской лев — <i>Zalophus californianus</i>	41,0	31,7	8,6	0,3
Австралийский морской лев — <i>Neophoca cinerea</i>	37,6	25,4	10,5	н.д.
Тихоокеанский морж — <i>Odobenus rosmarus</i>	39,0	24,1	9,2	0,0
Гренландский тюлень — <i>Pagophilus groenlandicus</i>	65,7	53,5	7,7	0,8
Кольчатая нерпа — <i>Pusa hispida</i>	51,4	38,1	9,9	н.д.
Южный морской слон — <i>Mirounga leonina</i>	63,0	47,9	9,6	2,6
Северный морской слон — <i>Mirounga angustirostris</i>	65,8	51,9	10,2	<0,03
Обыкновенный тюлень — <i>Phoca vitulina</i>	62,1	49,9	9,0	0,0
Тюлень Уэдделла — <i>Leptonychotes weddellii</i>	66,2	53,6	8,9	0,0
Серый тюлень — <i>Halichoerus grypus</i>	71,1	59,8	8,9	н.д.
Морской заяц (лахтак) — <i>Erignathus barbatus</i>	59,0	48,0	10,0	н.д.
Тюлень хохлач — <i>Cystophora cristata</i> (E)	66,0	56,3	6,2	0,86
Гренландский тюлень — <i>Phoca groenlandica</i>	65,7	53,5	7,7	0,8
Отряд CETACEA — Китообразные				
Дельфин-белобочка — <i>Delphinus delphis</i>	41,4	30,0	10,3	н.д.
Горбатый дельфин — <i>Sousa chinensis</i>	23,3	10,2	11,3	н.д.
Узкорылый прodelфин — <i>Stenalla attenuata</i>	н.д.	22,5	8,4	1,2
Большой дельфин — <i>Tursiops truncatus</i>	27,0	12,8	8,9	1,0
Ла-платский дельфин — <i>Pontoporia blainvillei</i>	н.д.	15,6	10,3	2,5
Карликовый кашалот — <i>Kogia breviceps</i>	25,7	15,3	8,2	2,2
Малый карликовый кашалот — <i>Kogia sima</i>	37,8	18,5	10,6	н.д.
Кашалот — <i>Physeter macrocephalus</i>	36,2	25,7	8,5	н.д.
Острорылый кит — <i>Balaenoptera acutorostrata</i>	48,1	30,2	13,6	н.д.
Синий кит — <i>Balaenoptera musculus</i>	54,5	39,4	11,3	1,3
Горбатый кит — <i>Megaptera novaeangliae</i>	57,1	43,8	9,1	0,7
Сельдяной кит (финвал) — <i>Balaenoptera physalus</i>	46,5	33,2	10,5	2,3

Отряд PROBOSCIDEA — Хоботные				
Азиатский слон — <i>Elephas maximus</i>	17,7	7,3	4,5	5,2
Саванный слон — <i>Loxodonta africana</i>	17,3	5,0	4,0	5,3
Отряд PERISSODACTYLA — Непарнокопытные				
Лошадь (домашняя) — <i>Equus ferus caballus</i>	10,1	1,2	2,1	6,4
Саванная зебра — <i>Equus burchelli</i>	11,3	2,2	1,6	7,0
Горная зебра — <i>Equus zebra</i>	10,0	1,0	1,6	6,9
Лошадь Пржевальского — <i>Equus ferus przewalskii</i>	10,5	1,5	1,6	6,7
Домашний осел — <i>Equus asinus asinus</i>	9,1	1,0	1,6	6,2
Равнинный тапир — <i>Tapirus terrestris</i>	15,0	3,9	4,4	5,3
Равнинный тапир — <i>Tapirus terrestris</i> (C)	н.д.	12,5	19,5	2,5
Равнинный тапир — <i>Tapirus terrestris</i> (T)	н.д.	5,8	7,4	3,7
Равнинный тапир — <i>Tapirus terrestris</i> (M)	н.д.	2,5	6,3	5,4
Тапир Бэрда — <i>Tapirus bairdii</i>	13,3	1,9	4,6	5,3
Белый носорог — <i>Ceratotherium simum</i>	8,0	0,7	1,6	7,6
Черный носорог — <i>Diceros bicornis</i>	8,8	0,2	1,4	6,6
Отряд ARTIODACTYLA — Парнокопытные				
Корова (домашняя) — <i>Bos taurus taurus</i>	11,9	3,7	3,4	5,0
Коза (домашняя) — <i>Capra hircus</i>	12,0	3,8	2,9	4,7
Овца (домашняя) — <i>Ovis aries</i>	18,4	7,1	5,7	4,6
Свинья (домашняя) — <i>Sus scrofa</i>	20,1	8,3	5,6	5,0
Гаур (гаял) — <i>Bos frontalis</i>	20,0	7,0	6,3	5,2
Азиатский буйвол — <i>Bubalus bubalis</i>	17,0	7,0	4,3	5,1
Африканский буйвол — <i>Syncerus caffer</i>	17,6	7,7	4,2	4,9
Жираф — <i>Giraffa camelopardalis</i>	14,5	4,8	4,0	н.д.
Филиппинский буйвол — <i>Bubalus mindorensis</i>	21,4	10,4	5,9	4,3
Черная антилопа — <i>Hippotragus niger</i>	17,9	5,0	6,2	5,3
Гималайский тар — <i>Hemitragus jemlahicus</i>	н.д.	7,9	5,4	3,1
Снежная коза — <i>Oreamnos americanus</i>	18,0	7,0	6,5	4,5
Ошейниковый пекари — <i>Pecari tajacu</i>	16,2	4,2	5,1	6,2
Испанский благородный олень — <i>Cervus elaphus hispanicus</i>	28,0	12,6	7,8	5,8
Благородный олень — <i>Cervus elaphus</i>	21,1	8,5	7,1	4,5
Белохвостый олень — <i>Odocoileus virginianus</i>	22,5	7,7	8,2	4,6
Канадский вапити — <i>Cervus elaphus canadensis</i>	19,0	6,7	5,7	4,2
Чернохвостый олень — <i>Odocoileus hemionus</i>	18,5	5,5	7,0	4,5
Жираф сомалийский — <i>Giraffa camelopardalis</i>	14,5	4,8	4,0	н.д.

Антилопа-прыгун — <i>Antidorcas marsupialis</i>	25,5	14,5	7,4	4,3
Альпийский козел (ибекс) — <i>Capra ibex</i>	23,3	12,4	5,7	н.д.
Обыкновенная канна — <i>Taurotragus oryx</i>	21,9	9,9	6,3	4,4
Белохвостый гну — <i>Connochaetes gnou</i>	12,0	5,5	4,3	4,1
Голубой гну — <i>Connochaetes taurinus taurinus</i>	13,4	7,5	4,1	5,3
Газель-доркас — <i>Gazella dorcas</i>	24,1	8,8	8,8	н.д.
Беломордый бубал — <i>Damaliscus pygargus</i>	16,0	8,6	5,6	4,9
Черная антилопа — <i>Hippotragus niger</i>	13,4	7,8	5,3	8,7
Тонкорогий баран — <i>Ovis dalli</i>	22,9	9,5	7,2	5,3
Овцебык (мускусный бык) — <i>Ovibos moschatus</i>	28,5	14,3	8,7	3,6
Северный олень — <i>Rangifer tarandus</i>	27,1	11,1	11,1	3,0
Лось — <i>Alces alces</i>	23,0	8,6	10,5	2,6
Американский бизон — <i>Bison bison</i>	13,7	1,7	4,2	4,7
Альпака — <i>Vicugna pacos</i>	16,3	3,2	5,8	5,1
Лама — <i>Lama glama</i>	15,2	4,2	4,1	6,3
Викунья — <i>Vicugna vicugna</i>	н.д.	4,6	3,7	7,4
Верблюд двугорбый — <i>Camelus bactrianus</i>	15,5	5,4	4,4	4,8
Верблюд одногорбый — <i>Camelus dromedarius</i>	12,2	3,8	3,2	4,5
Верблюд двугорбый (KZ) — <i>Camelus bactrianus</i>	15,87	6,67	5,2	2,77
Верблюд одногорбый (KZ) — <i>Camelus dromedarius</i>	15,63	5,94	4,8	3,12
Як (ALT) — <i>Bos mutus</i>	18,08	6,49	5,2	5,23
Як — <i>Bos mutus</i>	16,2	5,1	5,3	5,5
Отряд RODENTIA — Грызуны				
Голый землекоп — <i>Heterocephalus glaber</i>	17,2	4,5	4,8	5,7
Сирийский хомячок — <i>Mesocricetus auratus</i>	22,6	4,9	9,4	4,9
Северная тушканчиковая мышь — <i>Notomys alexis</i>	29,3	15,0	5,5	2,6
Коричневая тушканчиковая мышь — <i>Notomys cervinus</i>	30,2	10,3	5,6	2,3
Тушканчиковая мышь Митчелла — <i>Notomys mitchellii</i>	33,3	7,5	6,5	2,7
Пунаpec — <i>Thrichomys apereoides</i>	н.д.	22,3	11,0	4,4
Австралийский псевдомис — <i>Pseudomys australis</i>	25,4	12,1	6,4	3,6

Обыкновенный бобр — <i>Castor fiber</i>	34,1	19,0	11,2	1,7
Серая крыса — <i>Rattus norvegicus</i>	22,1	8,8	8,1	3,8
Морская свинка — <i>Cavia porcellus</i>	17,5	5,7	6,3	4,8
Кустарниковая белка — <i>Octodon degus</i>	30,5	20,1	4,4	2,7
Каролинская серая белка — <i>Sciurus carolinensis</i>	25,4	12,1	9,0	3,0
Горная свинка (мокко) — <i>Kerodon rupestri</i>	19,5	6,9	6,7	5,3
Каирская иглистая мышь — <i>Acomys cahirinus</i>	40,5	21,0	12,3	2,9
Колумбийский суслик — <i>Uroditellus columbianus</i>	29,9	9,2	10,7	3,4
Олений хомячок — <i>Peromyscus maniculatus</i>	32,0	21,0	9,9	2,4
Сосновый бурундук — <i>Tamias amoenus</i>	36,7	23,4	8,5	4,8
Японская полевка — <i>Microtus montebelli</i>	23,3	11,8	9,9	1,6
Домовая мышь — <i>Mus musculus</i>	40,8	27,0	12,5	2,6
Длиннохвостая шиншилла — <i>Chinchilla lanigera</i>	20,2	11,2	7,3	1,7
Отряд LAGOMORPHA — Зайцеобразные				
Заяц-русак — <i>Lepus europaeus</i>	32,5	15,6	10,0	1,5
Заяц-беляк <i>Lepus timidus</i>	н.д.	15,0	12,0	н.д.
Флоридский кролик — <i>Sylvilagus floridanus</i>	35,2	14,4	15,8	2,7
Дикий кролик — <i>Oryctolagus cuniculus</i>	31,2	15,2	10,3	1,8

Условные обозначения: KZ — популяция, обитающая на территории Республики Казахстан; ALT — популяция, обитающая в горных и предгорных районах на территории Республики Алтай, РФ (неопубликованные данные, личное сообщение А.Д. Ковалю); н.д. — нет данных. Обозначения для Сумчатых: E — ранняя стадия лактации (Early-lactation); M — средняя стадия лактации (Mid-lactation); L — поздняя стадия лактации (Late-lactation). Обозначения для Непарнокопытных: C — молозиво (Colostrum, 0–5 дней лактации); T — промежуточное молоко (Transitional, 7–12 дней лактации); M — зрелое молоко (Mature, 17–25 дней лактации).

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Стратегии переноса пассивного иммунитета (Ig G), тип плаценты и статус гена химозина в различных таксономических группах млекопитающих

Таксон / Вид	Статус гена Хн	Перенос Ig	Тип плаценты	Литература
Отряд Приматы (Primates), семейство Гоминиды (Hominidae)				
Человек (<i>Homo sapiens</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	[39, 53, 212, 214, 224]
Горилла (<i>Gorilla gorilla gorilla</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Шимпанзе (<i>Pan troglodytes</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Бонобо (<i>Pan paniscus</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Орагутан (<i>Pongo abelii</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Гиббон (<i>Nomascus leucogenys</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Отряд Приматы, семейство Мартышковые (Cercopithecidae)				
Макак-резус (<i>Macaca mulatta</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	[39, 53, 212, 214, 219, 224]
Макак-крабоед (<i>Macaca fascicularis</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Свинохвостый макак (<i>Macaca nemestrina</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Дрил (<i>Mandrillus leucophaeus</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Дымчатый мангобей (<i>Cercocebus atys</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Павиан (<i>Papio anubis</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Зеленая мартышка (<i>Chlorocebus sabaues</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Ринопитек (<i>Rhinopithecus roxellana</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Черный ринопитек (<i>Rhinopithecus bieti</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Колобус (<i>Colobus angolensis palliatus</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Отряд Приматы, инфраотряд Широконосые обезьяны (Platyrrhini)				
Игрунка (<i>Callithrix jacchus</i>)	▲	–	ГЕМО(-)	[39, 212]
Мирикина (<i>Aotus nancymae</i>)	О	–	ГЕМО(-)	
Саймири (<i>Saimiri boliviensis</i>)	▲	М	ГЕМО(-)	
Капуцин (<i>Cebus capucinus</i>)	▲	–	ГЕМО(-)	
Отряд Приматы (Primates), семейство Долгопятовые (Tarsiidae)				
Филиппинский долгопят (<i>Carlito syrichta</i>)	▲	–	ГЕМО(-)	[229]
Отряд Приматы, подотряд Мокроносые обезьяны (Strepsirrhini)				
Галаго Гарнетта (<i>Otolemur garnettii</i>)	▲	–	ЭПИ	[39, 212–214]
Сифака Кокереля (<i>Propithecus coquereli</i>)	▲	–	ЭПИ	
Мышиный лемур (<i>Microcebus murinus</i>)	▲	–	ЭПИ	

Отряд Шерстокрылы (Dermoptera)				
Шерстокрыл (<i>Galeopterus variegatus</i>)	О	–	ГЕМО(д)	[39, 229]
Отряд Тупайи (Scandentia)				
Тупайя малайская (<i>Tupaia belangeri chinensis</i>)	▲	М	ЭНДО	[39, 213, 214]
Отряд Грызуны (Rodentia), подотряд Мышеобразные (Myomorpha)				
Крыса серая (<i>Rattus norvegicus</i>)	▲	М	ГЕМО(т)	[39, 53, 220, 224]
Мышь домовая (<i>Mus musculus</i>)	▲	М	ГЕМО(т)	
Хомячок сирийский (<i>Mesocricetus auratus</i>)	О	–	ГЕМО(-)	[39, 53, 220]
Хомячок китайский (<i>Cricetulus griseus</i>)	▲	–	ГЕМО(т)	
Полевка прерийная (<i>Microtus ochrogaster</i>)	▲	–	ГЕМО(-)	
Хомячок олений (<i>Peromyscus maniculatus</i>)	▲	–	ГЕМО(т)	
Слепыш верхнегалилейский горный (<i>Nannospalax galili</i>)	▲	–	ГЕМО(-)	
Тушканчик египетский (<i>Jaculus jaculus</i>)	▲	–	ГЕМО(-)	
Кенгуровый прыгун Орда (<i>Dipodomys ordii</i>)	▲	–	ГЕМО(-)	
Отряд Грызуны, подотряд Белкообразные (Sciuromorpha)				
Белка земляная (<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>)	▲	–	ГЕМО(-)	[39, 53, 220]
Сурок альпийский (<i>Marmota marmota</i>)	[O]	–	ГЕМО(-)	
Отряд Грызуны, подотряд Дикообразообразные (Hystricomorpha)				
Землекоп голый (<i>Heterocephalus glaber</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	[39, 53, 220]
Пескорой дамарский (<i>Fukomys damarensis</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Свинка морская (<i>Cavia porcellus</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Кустарниковая крыса (<i>Octodon degus</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Шиншилла (<i>Chinchilla lanigera</i>)	О	PL	ГЕМО(м)	
Отряд Зайцеобразные (Lagomorpha)				
Кролик дикий (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	▲	М	ГЕМО(д)	[53, 224]
Пищуха американская (<i>Ochotona princeps</i>)	▲	М	ГЕМО(д)	[213, 220]

Отряд Парнокопытные (Artiodactyla)				
Альпака (<i>Vicugna pacos</i>)	▲	М	ДЕСМО	[39, 53, 220, 224]
Верблюд одногорбый (<i>Camelus dromedarius</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Верблюд двугорбый (дикий) (<i>Camelus ferus</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Верблюд двугорбый (домашний) (<i>Camelus bactrianus</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Свинья дикая (кабан) (<i>Sus scrofa</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Буйвол азиатский (<i>Bubalus bubalis</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Бык дикий (<i>Bos taurus</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Як дикий (<i>Bos mutus</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Як домашний (<i>Bos grunniens</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Бизон степной (<i>Bison bison bison</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Коза домашняя (<i>Capra hircus</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Овца домашняя (<i>Ovis aries</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Оронго (чиру) (<i>Pantholops hodgsonii</i>)	▲	М	ДЕСМО	
Отряд Китообразные (Cetacea)				
Малый полосатик (<i>Balaenoptera acutorostratas</i>)	▲	М	ЭПИ	[39, 213]
Кашалот (<i>Physeter catodon</i>)	▲	М	ЭПИ	
Китайский речной дельфин (<i>Lipotes vexillifer</i>)	▲	М	ЭПИ	
Косатка (<i>Orcinus orca</i>)	[O]	М	ЭПИ	
Отряд Хищные (Carnivora)				
Тигр амурский (<i>Panthera tigris altaica</i>)	▲	М	ЭНДО	[39, 220, 224]
Кошка домашняя (<i>Felis catus</i>)	▲	М	ЭНДО	
Гепард (<i>Acinonyx jubatus</i>)	▲	М	ЭНДО	
Собака домашняя (<i>Canis lupus familiaris</i>)	▲	М	ЭНДО	
Хорек домашний (<i>Mustela putorius furo</i>)	▲	М	ЭНДО	
Морж тихоокеанский (<i>Odobenus rosmarus divergens</i>)	▲	М	ЭНДО	
Тюлень Уэддела (<i>Leptonychotes weddellii</i>)	▲±	М	ЭНДО	
Панда большая (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	▲	М	ЭНДО	
Медведь белый (<i>Ursus maritimus</i>)	▲±	М	ЭНДО	

Отряд Панголины (Pholidota)				
Яванский ящер (<i>Manis javanica</i>)	▲	М	ЭПИ	[224, 229]
Отряд Непарнокопытные (Perissodactyla)				
Носорог белый (<i>Ceratotherium simum simum</i>)	О	М	ЭПИ	[39, 220, 224]
Лошадь домашняя (<i>Equus caballus</i>)	О	М	ЭПИ	
Лошадь Пржевальского (<i>Equus przewalskii</i>)	О	М	ЭПИ	
Отряд Рукокрылые (Chiroptera)				
Гигантская летучая лисица (<i>Pteropus vampyrus</i>)	▲?	М	ЭНДО	[214]
Черная летучая лисица (<i>Pteropus alecto</i>)	▲	М	ЭНДО	
Большая бурая летучая мышь (<i>Eptesicus fuscus</i>)	▲?	-	-	[39]
Ночница Брандта (<i>Myotis brandtii</i>)	▲	-	-	
Малая бурая ночница (<i>Myotis lucifugus</i>)	▲?	-	ГЕМО(-)	[39, 213]
Степная ночница (<i>Myotis davidii</i>)	▲	-	-	
Натальский длиннокрыл (<i>Miniopterus natalensis</i>)	▲	М	ЭНДО	
Отряд Насекомоядные (Eulipotyphla)				
Еж обыкновенный (<i>Erinaceus europeraeus</i>)	▲	М	ЭНДО	[213]
Бурозубка обыкновенная (<i>Sorex araneus</i>)	▲	М	ЭНДО	
Звездорыл (<i>Condylura cristata</i>)	▲	М	ЭНДО	
Отряд Сирены (Sirenia)				
Ламантин американский (<i>Trichechus manatus latirostris</i>)	▲	М	ЭНДО	[213]
Отряд Хоботные (Proboscidea)				
Слон саванный (<i>Loxodonta africana</i>)	▲	М	ЭНДО	[213]
Отряд Афросорициды (Afrosoricida)				
Малый ежовый тенрек (<i>Echinops telfairi</i>)	▲	-	ГЕМО	[229]
Златокрот капский (<i>Chrysochloris asiatica</i>)	▲	-	ГЕМО	
Отряд Прыгунчики (Macroscelidea)				
Прыгунчик Эдварда (<i>Elephantulus edwardii</i>)	▲	-	ГЕМО	[214]

Отряд Трубкозубовые (Tubulidentata)				
Трубкозуб африканский (<i>Orycteropus afer</i>)	▲	М	ЭНДО	[229]
Отряд Броненосцы (Cingulata)				
Броненосец девятипоясный (<i>Dasyus novemcinctus</i>)	▲	-	ГЕМО	[214]
Отряд Хищные сумчатые (Dasyuromorphia)				
Тасманийский дьявол (<i>Sarcophilus harrisii</i>)	▲	-	ЭПИ	[220, 214]
Отряд Опоссумы (Didelphimorphia)				
Домовой опоссум (<i>Monodelphis domestica</i>)	▲	М	ЭПИ	[220, 214]

Условные обозначения: О — Хн псевдогенизирован, [О] — псевдогенизация Хн требует уточнения; ▲ — Хн кодируется, ? — неполная последовательность Хн, PL — плацентарный перенос, М — перенос с молозивом или молоком, типы плацент: ГЕМО(-) — гемохориальная (вид плаценты — неизвестен); ГЕМО(м) — гемомонохориальная; ГЕМО(д) — гемодихориальная; ГЕМО(т) — гемотрихориальная; ЭПИ — эпителиохориальная; ЭНДО — эндотелиохориальная; ДЕСМО — десмохориальная; (±) — неподтвержденные признаки псевдогенизации Хн; (-) — нет данных.

Научное издание

Ельчанинов Вадим Валентинович

**ПРОБЛЕМА ПОИСКА НОВЫХ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ
ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ СЫРОДЕЛИЯ:
КРИТЕРИИ ВЫБОРА ИСТОЧНИКОВ ГЕНОВ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМОЗИНОВ**

Монография

Редактор Т. Б. Беломестнова
Подготовка оригинал-макета,
оформление обложки А. А. Карпов

Издательская лицензия ЛР 020261 от 14.01.1997.

Подписано в печать 27.01.2021.

Формат 60×84/16. Бумага офсетная.

Усл.-печ. л. 9,88. Тираж 100 экз. Заказ.

Типография Алтайского государственного университета
656049, Барнаул, ул. Димитрова, 66