




Научная статья

05.18.15 – Технология и товароведение пищевых продуктов и функционального и специализированного назначения и общественного питания (технические науки)

УДК 577:582.28(045)

doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2022.03.024

 EDN: LFMEJT

## СКРИНИНГ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ СРЕДИ КУЛЬТУР ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Минаков Денис Викторович<sup>1</sup>, Уразова Яна Валерьевна<sup>2</sup>,  
Минакова Анастасия Александровна<sup>3</sup>

<sup>1, 2, 3</sup> Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

<sup>1, 2</sup> Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск, Россия

<sup>1</sup> minakovd-1990@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4286-7783>

<sup>2</sup> urazova.iav@bti.secna.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6847-8487>

<sup>3</sup> nastya.sinitsyna.1994@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3850-3132>

**Аннотация.** Молокоисвертывающие ферменты находят широкое применение при производстве сыров и кисломолочных продуктов, таких как творог, йогурт, сметана. Выбор фермента определяется выходом и вкусовыми характеристиками получаемого продукта. При этом важнейшими характеристиками фермента являются субстратная специфичность, уровень общей молокоисвертывающей и протеолитической активности. В связи с дефицитом и дорогостоящей сычужного фермента в пищевой промышленности практикуют ферменты, полученные из грибных культур. Целью исследования являлись скрининг и изучение продуцентов молокоисвертывающих ферментов из культур высших базидиальных грибов. В статье представлены результаты исследований по отбору продуцентов ферментов молокоисвертывающего действия. Наиболее высокий показатель молокоисвертывающей активности (МСА) выявлен у культуры грибов *Piptoporus betulinus* (19,4 ед/мл) в сравнении с *Hericium coralloides* (13,4 ед/мл), *Hericium erinaceus* (5,7 ед/мл), *Coprinus comatus* (3,4 ед/мл) и *Grifola frondosa* (3,2 ед/мл). Установлен оптимальный состав питательной среды для культивирования мицелия грибов с наибольшей МСА, в который входят следующие компоненты, %: свекловичная меласса (30), нитрат аммония (1,5), дигидрофосфат калия (0,4), магниевый сернокислый семиводный (0,05), вода дистиллированная (до 1000 мл). Установлено, что микро- и ультрафильтрация культуральной жидкости позволяет повысить уровень молокоисвертывающей активности *P. betulinus* – на 26,8 и 96,4 %, *H. coralloides* – на 13,4 и 67,9 %, соответственно. Показатель отношения молокоисвертывающей к протеолитической активности составляет от 298 до 568, что позволяет рекомендовать культуральную жидкость для получения ферментных препаратов, применимых к использованию в сыроделии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Алтайского края в рамках научного проекта № 19-48-220008.

**Ключевые слова:** высшие грибы, культуральная жидкость, ферменты, молокоисвертывающая активность, протеолитическая активность, микрофильтрация, ультрафильтрация, питательная среда, глубинное культивирование.

---

**Для цитирования:** Минаков Д. В., Уразова Я. В., Минакова А. А. Скрининг и исследование продуцентов молокоисвертывающих ферментов среди культур высших базидиальных грибов// Ползуновский вестник. № 3, 2022. С. 173 – 180. doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2022.03.024. EDN: <https://elibrary.ru/LFMEJT>.

---

Original article

## SCREENING AND RESEARCH OF PRODUCERS OF MILK-COAGULATING ENZYMES AMONG CULTURES OF HIGHER BASIDIOMYCETES

Denis V. Minakov <sup>1</sup>, Yana V. Urazova <sup>2</sup>, Anastasiya A. Minakova <sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Altai State University, Barnaul, Russia

<sup>1,2</sup>Biysk Technological Institute (branch) FSBEI HE "Altai State University named after I.I. Polzunov", Biysk, Russia

<sup>1</sup> minakovd-1990@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4286-7783>

<sup>2</sup> urazova.iav@bti.secna.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6847-8487>

<sup>3</sup> nastya.sinitsyna.1994@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3850-3132>

**Abstract.** Milk-coagulating enzymes are widely used in the production of cheeses and fermented milk products, such as cottage cheese, yogurt, sour cream. The choice of the enzyme is determined by the yield and taste characteristics of the resulting product. At the same time, the most important characteristics of the enzyme are substrate specificity, the level of total milk-coagulating and proteolytic activity. Due to the shortage and high cost of rennet, enzymes obtained from mushroom cultures are practiced in the food industry. The aim of the work is to screen and study producers of milk-coagulating enzymes among cultures of higher basidial fungi. The article presents the results of research on the selection of producers of milk-coagulating enzymes. The highest indicator of milk-coagulating activity was found in the culture of *Piptoporus betulinus* (19.4 units/ml) compared to *Hericium coralloides* (13.4 units/ml), *Hericium erinaceus* (5.7 units/ml), *Coprinus comatus* (3.4 units/ml) and *Grifola frondosa* (3.2 units/ml). The composition of the nutrient medium for the cultivation of mycelium of fungi with the highest MCA has been established, which includes the following components, %: beet molasses (30),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1.5),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.4),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0.05), distilled water (up to 1000 ml). It was found that micro- and ultrafiltration of culture fluid allows to increase the level of milk-coagulating activity of *P. betulinus* by 26.8 % and 96.4 %, *H. coralloides* by 13.4 % and 67.9 %, respectively. The ratio of milk-coagulating to proteolytic activity ranges from 298 to 568, which makes it possible to recommend a culture liquid for the development of an enzyme preparation used in cheese making.

**Keywords:** higher fungi, culture liquid, enzymes, milk-coagulating activity, proteolytic activity, microfiltration, ultrafiltration, nutrient medium, deep cultivation.

**For citation:** Minakov, D. V., Urazova, Ya. V. & Minakova, A. A. (2022). Screening and research of producers of milk-coagulating enzymes among cultures of higher basidiomycetes. *Polzunovskiy vestnik*, 3, 173-180. (In Russ.). doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2022.03.024.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия из-за нецелесообразности забоя молодняка с целью получения сычужного фермента широко применяются ферменты микробиологического происхождения, близкие по свойствам к сычужному. В качестве продуцентов таких ферментов производители используют, в основном, культуры микроскопических мицелиальных грибов родов *Mucor*, *Endothia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* [1]. Однако использование в технологии производства ферментов спорообразующих микроскопических грибов сопровождается повышенным риском профзаболеваний персонала

(микозы, аллергические реакции), связанным с биологической природой применяемых продуцентов. Помимо этого, использование ферментов из микроскопических грибов часто приводит к получению сыров более низкого качества, с легким или выраженным привкусом горечи, обусловленным интенсивностью общего неспецифического протеолиза белков молока [2].

Требования к заменителям сычужного фермента являются достаточно строгими и их специфическая ферментативная активность должна быть максимально приближена к принятому за эталон сычужному ферменту, то есть при высокой молокосвертывающей активности такие препараты должны обла-

## СКРИНИНГ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ СРЕДИ КУЛЬТУР ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

дать незначительной общей протеолитической активностью [3].

Успех скрининга ферментов свертывания молока в различных группах организмов разного уровня организации осложняется вышеупомянутыми жесткими требованиями. Активные протеазы с таким же действием, как у сычужного фермента, обнаружены у высших базидиомицетов. Известны продуценты ферментов среди культур высших базидиальных грибов родов *Irpex*, *Trametes*, *Fomitopsis*, *Ganoderma*, *Russula*, *Coprinus* [4, 5]. Мицелий высших грибов, в отличие от микроскопических, не проходит стадию спорообразования, что значительно упрощает технологию его культивирования, в том числе выделения и очистки фермента.

Анализ литературных данных показывает, что продолжение поиска в этой группе макромицетов может оказаться успешным. В связи с выше сказанным целью работы являлись скрининг и исследование продуцентов молокосвертывающих ферментов среди культур высших базидиальных грибов.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования в работе использовались культуры высших базидиальных грибов: ежевик гребенчатый (*Hericium erinaceus*), ежевик коралловидный (*Hericium coralloides*), навозник белый (*Coprinus comatus*), трутовик берёзовый (*Piptoporus betulinus*), грифола курчавая (*Grifola frondosa*), собранные в естественных местообитаниях Томской области, Алтайского и Уссурийского края. Коллекция из данных видов грибов формировалась при участии в XV и XVI Международном рабочем совещании по изучению макромицетов (г. Томск – 2018, г. Уссурийск – 2021).

Чистые культуры грибов получали споровым способом, включающим помещение спор из базидий на питательную среду сусло-агар. Для этого верхнюю часть чашки Петри смазывали небольшим количеством вазелина и приклеивали часть шляпки плодовых тел, содержащих споры. Через 12 ч происходило осаждение спор на поверхность питательной среды сусло-агар [6].

После помещения спор на поверхность сусло-агара через 3...5 суток, в зависимости от вида грибов, происходило образование воздушного мицелия. Далее воздушный мицелий пересевали в чашки Петри для получения чистой культуры. Количество пересе-

вов составляло 5–7 раз. Контроль чистоты культуры осуществляли методом световой микроскопии на наличие/отсутствие прядек и микофильных грибов.

Культуры грибов выращивали поверхностно на чашках Петри при температуре  $24 \pm 2$  °С в термостате в течение 10...14 суток до полного зарастания поверхности питательной среды. Хранение культур осуществляли при температуре  $+4...6$  °С.

Для наработки посевного материала в жидкой питательной среде использовали колбы Эрленмейера объемом 250 мл. Инокуляционные блоки мицелия в диаметре 5...10 мм вырезали с помощью скальпеля из чашек Петри и помещали в качалочные колбы с объемом среды 125 мл.

Питательные среды для глубинного культивирования биомассы грибов разделялись на натуральные и полусинтетические. В качестве натуральной среды использовали неохмеленное пивное сусло 4° по Баллингу. В состав полусинтетических питательных сред входили следующие компоненты, г/л:

1) глюкоза – 10,0, пептон – 2,5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5, дистиллированная вода – до 1 л;

2) свекловичная меласса – 30,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1,5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,4,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05, дистиллированная вода – до 1 л.

Питательную среду разливали по коническим колбам и стерилизовали в автоклаве ВК-75 при давлении 1,0 атм. в течение 30 минут. Нарботку содержащей фермент культуральной жидкости осуществляли методом глубинного культивирования в качалочных колбах объемом 250 мл на термостатируемом шейкер-инкубаторе (Biosan ES-20) при  $27 \pm 1$  °С и перемешивании со скоростью 180 об/мин.

Потребление сахаров в процессе культивирования биомассы мицелия определяли по методу Бертрана [7].

Прирост биомассы оценивали весовым методом после высушивания до постоянной массы при температуре 50 °С в сушильном электрическом шкафу.

После культивирования биомассу мицелия отделяли от культуральной жидкости центрифугированием и фильтрованием через складчатый фильтр. Микрофильтрацию культуральной жидкости проводили под вакуумом с помощью мембранных фильтров Владипор марки МФАС-ОС-2 с размером пор 0,45 мкм. Для ультрафильтрации использовали хроматографические фильтры с размером пор 0,1 мкм. Фильтраты культуральной жидкости

(КЖ) помещали в холодильную камеру (4...6 °С) до дальнейших исследований.

Определение общей молокосвертывающей активности (МСА) проводили по методу N. Mukai и M. Kawai [4, 8]. В пробирки объемом 20 мл вносили по 10 мл коровьего молока жирностью 3,2%, добавляли 1,7 мл 10% раствора хлорида кальция. Полученную смесь нагревали до температуры 35 °С на водяной бане в течение 1–2 минут. Далее в опытные пробирки вносили по 2 мл культурального фильтрата. В контрольные пробирки с молочным субстратом и хлоридом кальция добавляли 2 мл предварительно прокипяченного культурального фильтрата. Смеси в пробирках встряхивали, ставили в термостат при температуре 35 °С и начинали отсчет времени до момента образования молочного сгустка.

За единицу МСА принимали количество культурального фильтрата, которое сворачивает 100 мл коровьего молока за 40 минут при температуре 35 °С.

Общую молокосвертывающую активность рассчитывали по формуле:

$$MSA=40 \times 100 \times K / П \times 2, \text{ ед./мл,}$$

где К – коэффициент разведения изучаемого фермента;

П – время, за которое образуется плотный молочный сгусток, в минутах;

40 – среднее время производства сыра;

2 – количество внесенного фермента мл.

Определение общей протеолитической активности (ПА) проводили по стандартному методу, рекомендованному ГОСТ 20264.2-88. Для проведения анализа 0,5% раствор казеината натрия (Casein sodium salt, С8654, Sigma) растворяли в 20 мМNa-ацетатном буфере (рН=5,6). В пробирки вносили 6,0 мл субстрата и инкубировали в течение 15 минут на водяной бане при температуре 35 °С. Затем в пробирки внесли 1,5 мл исследуемого фермента. Содержимое пробирок тщательно

перемешивали и отмечали время начала инкубации при 35 °С. Через 30, 90 и 180 минут из пробирок отбирали аликвоты по 2,0 мл и вносили в 4 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты для остановки реакции. Полученную смесь снова тщательно перемешивали, выдерживали в течение 30 минут при 25 °С и фильтровали через складчатый бумажный фильтр. Фильтрат помещали в кварцевые кюветы (l=1 см) и определяли оптическую плотность на спектрофотометре (Shimadzu UV-1800, производство Япония) при длине волны 280 нм (A<sub>280</sub>).

В качестве контроля использовали состав: 5,0 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты + 0,5 мл исследуемого фермента + 2,0 мл субстрата. Протеолитическую активность выражали в единицах A<sub>280</sub>. Для расчета протеолитической активности строили график зависимости оптической плотности (A<sub>280</sub>) от продолжительности прогревания [9].

### Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлена молокосвертывающая активность (МСА) в культуральном фильтрате исследуемых штаммов грибов (таблица 1). Наибольшая МСА 19,4 ед/мл обнаружена в культуральном фильтрате (КФ) штамма *Piptoporus betulinus*. Продолжительность культивирования данного штамма составила 10 суток, выход биомассы 6,7 г/л.

При сравнении с другими видами грибов высокая МСА 13,4 ед/мл обнаружена также у штамма *Hericium coralloides*, выход биомассы которого составил 7,2 г/л через 14 суток культивирования. У штаммов грибов *H. erinaceus*, *S. comatus*, *G. frondosa* МСА составила 5,7, 3,4 и 3,2 ед/мл, что ниже МСА штамма *Piptoporus betulinus* в 3,4, 5,7 и 6,0 раза, соответственно. Выход биомассы у этих видов грибов составил от 6,8 до 14,2 г/л, с продол-

Таблица 1 – Молокосвертывающая активность, выход биомассы и продолжительность культивирования высших базидиальных грибов

Table 1 – Milk-clotting activity, biomass yield and duration of cultivation of higher basidiomycetes

Виды грибов	Продолжительность культивирования, сутки	Выход биомассы, г/л	Время коагуляции молока, минут	Молокосвертывающая активность, Ед/мл
<i>Hericiumerinaceus</i>	10	12,1±0,2	35,0±0,6	5,7±0,2
<i>Hericiumcoralloides</i>	14	7,2±0,2	15,2±0,4	13,4±0,1
<i>Coprinuscomatus</i>	10	6,8±0,2	56,0±0,4	3,4±0,2
<i>Piptoporusbetulinus</i>	10	6,7±0,2	10,5±0,2	19,4±0,1
<i>Grifolafrondosa</i>	7	14,2±0,2	62,2±0,2	3,2±0,2

## СКРИНИНГ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ СРЕДИ КУЛЬТУР ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

жительностью культивирования от 7 до 10 суток. Таким образом, по степени убывания МСА исследуемые виды грибов расположились в следующем порядке: *Piptoporus betulinus* > *Hericium coralloides* > *Hericium erinaceus* > *Coprinus comatus* > *Grifola frondosa*.

В литературе встречается очень немного публикаций, посвященных исследованию МСА у данных видов грибов. Информации по *Piptoporus betulinus* в литературных источниках не представлено. Известно, что виды грибов *Hericium coralloides*, *Hericium coralloides*, *Coprinus comatus*, *Grifola frondosa* обладают относительно высокой МСА, составляющей, согласно разным источникам, от 3,1 ед/мл до 9,2 ед/мл [10, 11]. Многие штаммы из представленных видов обладают тромболитической и фибринолитической активностью, что неразрывно связано с МСА [4, 12–14].

Из исследуемых видов базидиомицетов наибольший практический интерес с точки зрения высокой МСА представляют грибы *Piptoporus betulinus* и *Hericium coralloides*. Поэтому дальнейшие исследования по исследованию МСА и ПА культуральных фильтратов проводились с этими культурами грибов. Следовательно, по уровню МСА исследуемые виды грибов могут представлять значительный практический интерес для организации производства ферментных препаратов.

Культивирование на питательной среде с мелассой сравнивали со стандартными средами, наиболее часто используемыми для выращивания мицелия высших грибов – глюкозо-пептонной средой и пивным суслом 4° по Баллингу.

Результаты определения МСА на различных питательных средах представлены в таблице 2. Следует отметить, что наибольшая МСА составила 19,4 ед/мл у штамма *P. betulinus* на питательной среде с мелассой, в то время как активность *H. coralloides* на этой среде была ниже в 1,44 раза. МСА куль-

туральной жидкости мицелия исследуемых видов грибов, выращенных на глюкозо-пептонной среде (ГПС) и пивном сусле, составила 16,2–18,6 и 12,1–13,4 ед/мл.

При проведении сравнительной характеристики по исследованию МСА между штаммами *P. betulinus*, *H. coralloides* и вида *Coprinus lagopides*, описанного в литературе, установлено, что МСА *P. betulinus* незначительно выше активности *C. lagopides* на ГПС. Однако активность культуры *H. coralloides* оказалась ниже в 1,3 раза на ГПС и в 1,8 раза на пивном сусле.

В глубинной культуре мицелий представлял собой крупные шарообразные скопления кремового цвета, так называемые пеллеты. Существенных различий по внешним признакам между культивируемыми видами не обнаружено.

На рисунке 1 представлены результаты исследований по изменению МСА культурального фильтрата и потреблению сахаров в процессе глубинного культивирования мицелия грибов *P. betulinus* и *H. coralloides* на среде с мелассой. Установлено, что уровень МСА продуцентов в условиях культуры зависит от содержания сахаров в питательной среде. При потреблении сахаров в субстрате 82-83% мицелием грибов *P. betulinus* и *H. Coralloides* наблюдается максимальный уровень МСА.

При сравнении с литературными данными обнаружено, что у культуры грибов *C. lagopides* также не происходит 100% утилизации сахаров в питательном субстрате, при этом наблюдается максимальный уровень МСА 13,3 ед/мл [4].

Для очистки культуральной жидкости проводили микро- и ультрафильтрацию с использованием фильтров с размером пор 0,45 мкм и 01, мкм. В таблице 3 представлены результаты исследований. Из представленных данных следует, что фильтрование культуральной жидкости *P. betulinus* под ваку-

Таблица 2 – Молокосвертывающая активность культуральной жидкости грибов на разных питательных средах

Table 2 – Milk-clotting activity of culture liquid of fungi on different nutrient media

Культуры грибов	МСА, ед/мл		
	Среда с мелассой	Глюкозо-пептонная среда	Пивное сусло 4° по Баллингу
<i>P. betulinus</i>	19,4±0,1	16,2±0,1	18,6±0,1
<i>H. coralloides</i>	13,4±0,1	12,1±0,1	13,4±0,1
<i>C. lagopides</i> *	–	16,0	24,4

\*Примечание – литературные данные [28].

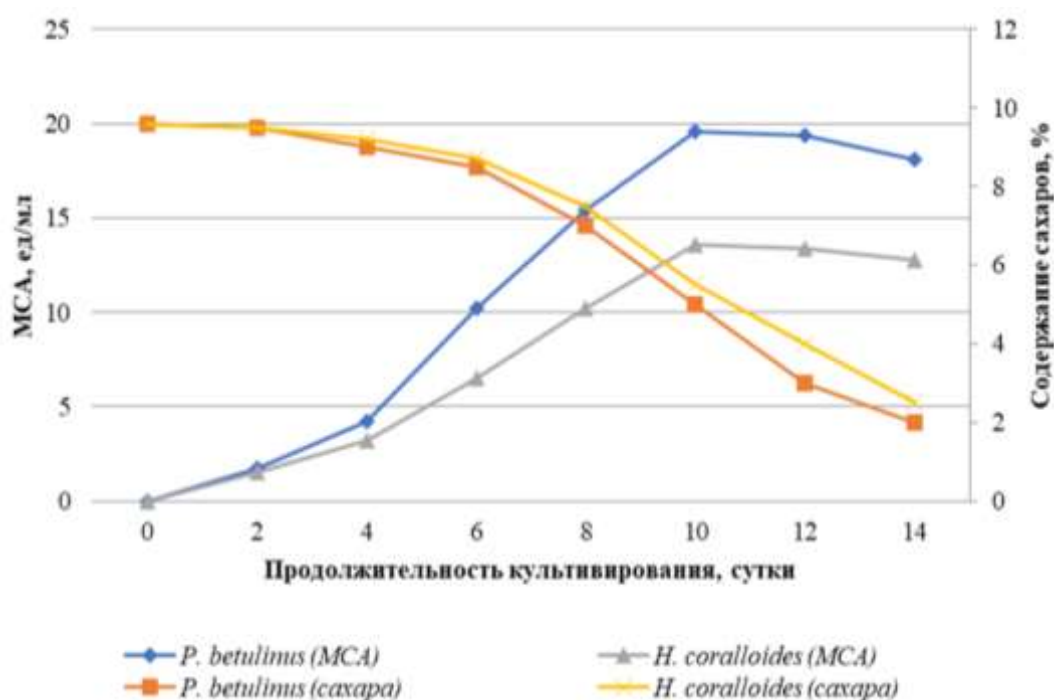


Рисунок 1 – Динамика МСА мицелия грибов и потребление сахаров в процессе глубинного культивирования

Figure 1 – Dynamics of the MSA of the mycelium of fungi and the consumption of sugars in the process of deep cultivation

Таблица 3 – Характеристика ферментативной активности микро- и ультрафильтратов культуральной жидкости грибов

Table 3 – Characterization of the enzymatic activity of micro- and ultrafiltrates of the culture liquid of fungi

Образец исследования	Культура грибов	МСА, ед/мл	ПА, ед/мл	МСА/ПА
Исходный культуральный фильтрат	<i>P. betulinus</i>	19,4±0,1	0,049	396
	<i>H. coralloides</i>	13,4±0,1	0,045	298
Микрофильтрат КЖ	<i>P. betulinus</i>	24,6±0,1	0,052	473
	<i>H. coralloides</i>	15,2±0,1	0,042	361
Ультрафильтрат КЖ	<i>P. betulinus</i>	38,1±0,1	0,067	568
	<i>H. coralloides</i>	22,5±0,1	0,065	346

умом через фильтры с размером пор 0,45 мкм (микрофльтрация) и 0,1 мкм (ультрафльтрация) позволяет повысить уровень МСА в 1,27 и 1,96 раза, соответственно. В то время как для мицелия *H. coralloides* происходит повышение МСА в 1,13 и 1,67 раз, соответственно. То есть, методы микро- и ультрафльтрации позволяют очистить культуральную жидкость от балластных белков [10].

Для более полной оценки ферментативной активности полученных препаратов необходимо, помимо МСА, проанализировать уровень протеиназной активности (ПА), отвеча-

ющей за структурные свойства сыра в процессе созревания.

ПА у микро- и ультрафильтратов *P. betulinus* составила 0,052 и 0,067 ед/г, у *H. coralloides* – 0,042 и 0,065 ед/г. Данные показатели соответствуют ПА, предъявляемой к коммерческим ферментным препаратам, полученным из грибов.

Не менее важным показателем для сыроделия является соотношение МСА к ПА. Для высококачественных сыров (полутвердых, твердых долгого периода созревания) это соотношение должно быть в пределах 1000. Для получения сыров более низкого качества и

## СКРИНИНГ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ СРЕДИ КУЛЬТУР ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

кисломолочных продуктов это соотношение может быть около 300. У стандартного сычужного фермента, полученного из сычужков телят отношение МСА к ПА составляет 910 [4].

Расчеты показали, что отношение МСА к ПА у микро- и ультрафильтрата *P. betulinus* составляет 473 и 568, соответственно. У грибов *H. coralloides* это отношение составило 361 и 346. Таким образом, на основании проведенных расчетов, полученные образцы можно рекомендовать к применению в процессе производства мягких сыров и кисломолочных продуктов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что наибольший выход биомассы мицелия в глубинных условиях (14,2 г/л) характерен для *G. frondosa*, наименьший – у *P. betulinus* (6,7 г/л). По продолжительности культивирования высокой скоростью роста обладал мицелий всех исследуемых видов грибов. При сравнении МСА обнаружено, что наибольшая активность наблюдается у культуры грибов *P. betulinus* 19,4 ед/мл в сравнении с *H. coralloides* (13,4 ед/мл), *H. erinaceus* (5,7 ед/мл), *S. comatus* (3,4 ед/мл) и *G. frondosa* (3,2 ед/мл). Установлено также, что фильтрование культуральной жидкости грибов *P. betulinus* и *H. coralloides* под вакуумом через фильтры с размером пор 0,45 мкм (микрофильтрация) и 0,1 мкм (ультрафильтрация) позволяет повысить уровень МСА у грибов *P. betulinus* в 1,27 и 1,96 раза, у *H. coralloides* в 1,13 и 1,67 раз, соответственно.

Согласно экспериментальным данным, уровень ПА у полученных образцов культуральной жидкости составляет от 0,042 до 0,067 ед/г. Отношение МСА к ПА у культурального фильтрата *P. betulinus* составляет 473...568, в то время как у *H. coralloides* – 346...361. Данные показатели характеризуют культуральную жидкость как перспективный объект для разработки технологии выделения и очистки молокосвертывающих ферментов, применимых для получения различных типов сыров и кисломолочных продуктов.

При обработке культуральной жидкости микро- и ультрафильтрацией выявлено увеличение МСА *P. betulinus* в 1,27 и 1,96 раза, у грибов *H. coralloides* – в 1,13 и 1,67 раз соответственно.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Алтайского края в рамках научного проекта № 19-48-220008.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cirium V.C., Vidya C., Rani A., Singh S.A. Production of highly active fungal milk-clotting enzyme by solid-state fermentation // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2019. V. 49 (9). P. 858-867. Doi: 10.1080/10826068.2019.1630647.
2. Lebedev L.R., Kosogova T.A., Teplyakova, T.V., Kriger A.V., Elchaninov V.V., Belov A.N., Koval' A.D. Study of technological properties of milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.) // Foods and Raw Materials. 2016. V. 4. №2. P. 58-65. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-58-65.
3. Lebedeva G.V., Proskuryakov M.T. Purification and characterization of milk-clotting enzymes from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm) // Applied biochemistry and microbiology. 2009. V. 45. P. 623-625.
4. Shamtsyan M., Dmitrieva T., Kolesnikov B., Denisova N. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom // Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie. 2014. V. 58 (2). P. 343-347. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.10.009.
5. Zagnitko Yu.P. Some physical and chemical properties of enzymic preparations derived from strain V-02 of *Irpex lacteus* FR. Immunology // Allergology, Infectiology (Section: Fungal biotechnologies in medicine and industry). 2010. №1. P. 249-250.
6. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова думка, 1982. 552 с.
7. Вишняков В.А., Хабаров Ю.Г., Камакина Н.Д. Сравнение методов определения редуцирующих веществ: метод Бертрана, збулиостатический и фотометрический методы // Химия растительного сырья. 2008. №4. С. 47-50.
8. Kawai M. Studies on Milk Clotting Enzymes Produced by Basidiomycetes // Agricultural and Biological Chemistry. 1971. V. 35 (10). P. 1517-1525. DOI: 10.1080/00021369.1971.10860118.
9. ГОСТ 20264.2-88. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности. Москва: Стандартинформ, 1989. 15 с.
10. Kishimoto M., Nakamura K., Kanemaru K., Tasaki T., Nakamura T., Sato K., Tanimoto M. Crude enzymes from a *Hericium edible mushroom* isolated in Japan: variability in milk-clotting activity and the ability to coagulate ultra-high-temperature pasteurized milk // Food science and technology Research. 2018. V. 24 (1). P. 139-143. Doi: 10.3136/fstr.24.139.
11. Sato K., Goto K., Suzuki A., Miura T. Characterization of a Milk-clotting Enzyme from *Hericium erinaceum* and Its Proteolytic Action on Bovine Caseins // Food Science and Technology Research. 2018. V. 24 (4). P. 669-676. Doi: 10.3136/fstr.24.669.
12. El-Baky H.A., Linke D., Nimtz M., Berger R.G. PsoP1, a milk-clotting aspartic peptidase from the basidiomycete fungus *Piptoporus soloniensis* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. V. 59 (18). P. 10311-10316. Doi: 10.1021/jf2021495.
13. Yin C., Zheng L., Chen L., Tan Q., Shang X., Ma A. Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (Po-Asp) from *Pleurotostreatus* // Applied biochemistry and biotechnology. 2014. V. 172. P. 2119-2131. DOI: 10.1007/s12010-013-0674-4.

14. Salomao R.M., Larissa S.C.S., Leilane B. de S., Edson J. do C., Mircella M.A., Marne C. de V., Maria F.S.T. Teixeira *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases // *African Journal of Microbiology Research*. 2017. V. 11 (17). P. 660-667. DOI: 10.5897/AJMR2017.8520.

### Информация об авторах

Д. В. Минаков – кандидат биологических наук, доцент кафедры органической химии Алтайского государственного университета.

Я. В. Уразова – преподаватель кафедры биотехнологии Бийского технологического института (филиала) ФГБОУ ВО «АлтГТУ им. И.И. Ползунова», аспирант 2 курса кафедры техносферной безопасности и аналитической химии Алтайского государственного университета.

А. А. Минакова – кандидат химических наук, доцент кафедры органической химии Алтайского государственного университета.

### REFERENCES

1. Cirium, V.C., Vidya, C., Rani, A. & Singh, S.A. (2019). Production of highly active fungal milk-clotting enzyme by solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 49 (9). P. 858-867. Doi: 10.1080/10826068.2019.1630647.
2. Lebedev, L.R. et al (2016). Study of technological properties of milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.). *Foods and Raw Materials*. 4(2). 58-65. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-58-65. (In Russ.).
3. Lebedeva, G.V. & Proskuryakov, M.T. (2009). Purification and characterization of milk-clotting enzymes from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm). *Applied biochemistry and microbiology*. (45). 623-625. (In Russ.).
4. Shamtsyan, M., Dmitrieva, T., Kolesnikov, B. & Denisova, N. (2014). Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 58 (2). 343-347. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.10.009.
5. Zagnitko, Yu.P. (2010). Some physical and chemical properties of enzymic preparations derived from strain V-02 of *Irpex lacteus* FR. *Immunology. Allergology, Infectiology (Section: Fungal biotechnologies in medicine and industry)*. (1). 249-250.
6. Bilai, V.I. (1982). Methods of experimental mycology. Kiev: Naukova dumka. (In Russ.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
The authors declare that there is no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 14.06.2022; одобрена после рецензирования 25.07.2022; принята к публикации 15.08.2022.

The article was received by the editorial board on 14 June 2022 approved after editing on 25 July 2022; accepted for publication on 15 Aug 2022.

7. Vishnyakov, V.A., Khabarov, Yu.G. & Kamakina, N.D. (2008). Comparison of methods for determining reducing substances: Bertrand's method, ebullioscopic and photometric methods. *Chemistry of plant raw materials*. (4). 47-50 (In Russ.).

8. Kawai, M. (1971). Studies on Milk Clotting Enzymes Produced by Basidiomycetes // *Agricultural and Biological Chemistry*. 35 (10). 1517-1525. DOI: 10.1080/00021369.1971.10860118.

9. Enzyme preparations. Methods for determining proteolytic activity (1989). HOST 20264.2-88. M.: Standartinform. (In Russ.).

10. Kishimoto, M. et al. (2018). Crude enzymes from a *Hericium edible* mushroom isolated in Japan: variability in milk-clotting activity and the ability to coagulate ultra-high-temperature pasteurized milk. *Food science and technology Research*. 24 (1). 139-143. Doi: 10.3136/fstr.24.139.

11. Sato, K., Goto, K., Suzuki, A. & Miura, T. (2018). Characterization of a Milk-clotting Enzyme from *Hericium erinaceum* and Its Proteolytic Action on Bovine Caseins. *Food Science and Technology Research*. 201824 (4). 669-676. Doi: 10.3136/fstr.24.669.

12. El-Baky, H. A., Linke, D., Nimtz, M. & Berger, R. G. (2011). PsoP1, a Milk-Clotting Aspartic Peptidase from the Basidiomycete Fungus *Piptoporus soloniensis*. *Journal of Agricultural and Food*. 59 (18). 10311-10316. Doi: 10.1021/jf2021495.

13. Yin, C. et al. (2013). Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (Po-Asp) from *Pleurotus ostreatus*. *Applied biochemistry biotechnology*. 172. 2119-2131. DOI: 10.1007/s12010-013-0674-4.

14. Salomao, R. M. et al. (2017). *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases. *African Journal of Microbiology Research*. 11 (17). 660-667. Doi: 10.5897/ajmr2017.8520.

### Information about the authors

D. V. Minakov - Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of Organic Chemistry, Altai State University.

Ya.V. Urazova – 2nd year postgraduate student of the Department of Technosphere Safety and Analytical Chemistry of the Altai State University, lecturer of the Department of Biotechnology of the Biysk Technological Institute (branch FSBEI HE "Altai State Technical University named after I.I. Polzunov").

A.A. Minakova – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Department of Organic Chemistry, Altai State University.