



БІАЛОГІЯ

УДК 663.1:582.28:637

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЭТЧ-МЕТОДА
ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕГО
ФЕРМЕНТА ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ
ПРОМЫШЛЕННОГО ШТАММА
PLEUROTUS OSTREATUS X FLORIDANUS

Д.Д. Жерносеков*, Е.Е. Павлова*, О.Н. Спышнов**, П.А. Суворова*,
А.В. Вашневская*, Е.С. Минакова*

*Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»

**ООО «Ингрибел»

Поскольку сыр является популярным молочным продуктом во всем мире, спрос на молочный коагулянт быстро растет по мере увеличения производства сыра. С целью удовлетворения растущего спроса на молочные коагулянты для сыроделия активно разрабатываются препараты молокосвертывающего фермента грибного происхождения. В настоящей работе предложен метод для концентрирования молокосвертывающего фермента из культуральной жидкости промышленного штамма *Pleurotus ostreatus x floridanus*. Культуральную жидкость, полученную после 14-дневного глубинного культивирования на картофельно-сахарозной среде, концентрировали с помощью бэтч-метода на ДЭАЕ-сефарозе. Полученный концентрат после добавления активатора обеспечивал формирование молочного сгустка, который по консистенции не уступал сгусткам, которые образовались с использованием импортных препаратов молокосвертывающих ферментов. Планируется дальнейшее исследование для достижения молокосвертывающей активности препарата на уровне импортных аналогов.

Цель исследования – провести концентрирование препарата молокосвертывающего фермента из культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus*, используя бэтч-метод с применением ДЭАЕ-сефарозы.

Материал и методы. Штамм *Pleurotus ostreatus x floridanus*, гибрид (*P. ostreatus x P. florida*) 462 предоставлен Государственным научным учреждением «Институт леса НАН Беларуси». Для концентрирования молокосвертывающего препарата применялся бэтч-метод. Для сравнения молокосвертывающей активности были взяты промышленные препараты «Здоровеево kalase» (производитель Нидерланды) и «Полезная партия» (производитель Россия).

Результаты и их обсуждение. При использовании бэтч-метода были получены три фракции, содержащие белки: одна из них не показала наличия молокосвертывающей активности, вторая имела следовые значения, а в третьей сконцентрировалась основная масса целевого белка.

Заключение. При сравнении молокосвертывающей активности фракции, содержащей целевой белок с активатором, был получен молочный сгусток, не уступающий по качеству молочным сгусткам, образовавшимся при использовании промышленных препаратов «Здоровеево kalase» и «Полезная партия».

Ключевые слова: молокосвертывающая активность, вешенка обыкновенная, *Pleurotus ostreatus*, бэтч-метод, молочная промышленность.

APPLICATION OF BATCH METHOD FOR CONCENTRATION OF MILK-CLOTTING ENZYME FROM CULTURE LIQUID OF INDUSTRIAL STRAIN *PLEUROTUS OSTREATUS X FLORIDANUS*

D.D. Zhernossekov*, E.E. Pavlova*, A.N. Spyshnov**, P.A. Suvorova*,
A.V. Vashnevskaya*, E.S. Minakova*

*Education Establishment "Vitebsk State P.M. Masherov University"

**Ingribel Ltd.

Since cheese is a popular dairy product all over the world, the demand for milk coagulant is rapidly increasing as cheese production increases. In order to meet the growing demand for milk coagulants for cheese making, milk-clotting enzyme preparations of fungal origin are being actively developed. In this paper, a method for concentrating milk-clotting enzyme from the culture fluid of the industrial strain *Pleurotus ostreatus x floridanus* is proposed. The culture fluid was obtained after 14 days of cultivation on potato-sucrose medium and was concentrated using the batch method on DEAE-sepharose. The resulting concentrate after adding the activator ensured the formation of a milk clot, the consistency of which was not inferior to the clots obtained using imported milk-clotting enzyme preparations. Further research is planned to achieve the milk-clotting activity of the preparation at the level of imported analogues.

The aim of the study is to concentrate the milk-clotting enzyme preparation from the culture fluid of *Pleurotus ostreatus* using the batch method with DEAE-sepharose.

Material and methods. The strain *Pleurotus ostreatus x floridanus*, hybrid (*P. ostreatus x P. florida*) 462 was provided by the State Scientific Institution "Forest Institute of the National Academy of Sciences of the Republic of Belarus". The batch method was used to concentrate the milk-clotting preparation. Industrial preparations "Zdoroveevo kalase" (Netherlands) and "Poleznaya partiya" (Russia) were used to compare milk-clotting activity.

Findings and their discussion. Using the batch method, three fractions containing proteins were obtained: one of them did not show milk-clotting activity, one showed trace values, and one, in which the bulk of the target protein was concentrated.

Conclusion. When comparing the milk-clotting activity of the obtained fraction containing the target protein plus activator, the milk clot was obtained which quality was not inferior milk clots obtained using the industrial preparations "Zdoroveevo kalase" and "Poleznaya partiya".

Key words: milk-clotting activity, Oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, batch method, dairy industry.

Молочная промышленность Республики Беларусь – это приоритетная отрасль отечественной экономики. Она по праву считается визитной карточкой страны и источником валюты. Начиная с 1961 года масштабы мирового производства сыров увеличились примерно в 3,5 раза, что привело к дефициту сычужного фермента. Спрос на коагулирующие ферменты стал превышать предложение почти 50 лет назад и сегодня только 20–30% мирового объема сыра может быть получено с использованием сычужного фермента. Поэтому в настоящее время остается актуальным поиск альтернативных источников молокосвертывающих ферментов. Инновации в данной отрасли формируются в результате взаимодействия биохимии, биотехнологии и микробиологии, а также посредством внедрения научно-исследовательских работ для получения лучших результатов. Одним из современных разрабатываемых направлений является поиск аналогов сычужного фермента, используемого в сыроделии. Природный сычужный фермент представлен химозином и пепсином. Первый известен своей высокой специфичностью к высвобождению казеиномакропептида из каппа-казеина, что вызывает дестабилизацию мицелл казеина и обеспечивает свертывание молока, тогда как второй гораздо менее специфичен и гидролизует связи с остатками Phe, Tyr, Leu или Val [1]. На мировом рынке пользуются популярностью препараты молокосвертывающего фермента из грибных источников [2]. Грибы относятся к биологическому разнообразию, которое обычно считается безопасным (GRAS), а их внеклеточные ферменты легко восстанавливаются в биопроцессе [3; 4]. Препараты фермента, полученные методом рекомбинантной технологии, имеют ограниченное применение в связи с обеспокоенностью потребителей в отношении генетически модифицированных продуктов. Так, например, Германия, Нидерланды и Франция запрещают использование рекомбинантного телячьего сычужного фермента [5].

Не менее важной проблемой, которая стоит перед любым предприятием перед выпуском готового продукта на рынок, является оптимизация технологического процесса (возможность сократить

расходы и время производства). Постоянно происходит поиск путей для усовершенствования и удешевления уже готовых методик, поиск альтернативных источников более дешевого, но не уступающего по качеству сырья, что позволило бы решить указанные вопросы. В связи с этим ранее нами был проведен подбор условий для поверхностного и глубинного культивирования промышленного штамма *Pleurotus ostreatus x floridanus* с целью получения молокосвертывающего фермента [6]. В настоящей работе мы предложили метод концентрирования препарата с использованием ионообменника и провели сравнение молокосвертывающей активности нашего препарата с известными импортными аналогами.

Материал и методы. Исходный штамм *Pleurotus ostreatus x floridanus*, гибрид (*P. ostreatus x P. florida*) 462 был предоставлен Государственным научным учреждением «Институт леса Национальной академии наук Беларуси» из коллекции грибов ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» (С.А. Коваленко). Поверхностное культивирование промышленного штамма *Pleurotus ostreatus x floridanus* проведено, как описано нами ранее в [6], а глубинное культивирование – с использованием картофельно-сахарозной среды, что также подробно представлено в [6]. Для сравнения молокосвертывающей активности полученного нами препарата с известными фирменными аналогами брали следующие препараты, рекомендуемые для производства сыров: «Здоровеево kalase» (производитель Нидерланды) и «Полезная партия» (производитель Россия). Для проведения бэтч-метода использовали ДЕАЕ-сефарозу (Bio-Rad, США). После окончания глубинного культивирования культуральная жидкость отфильтровывалась и смешивалась с ДЕАЕ-сефарозой, уравновешенной 0,2 М ацетатным буфером, pH 4,96. Далее уравновешенный гель смешивали с фильтратом культуральной жидкости в соотношении с учетом емкости сорбента. После получасовой инкубации при температуре 4°C проводили центрифугирование, 10000 об/мин в течение 10 минут (центрифуга TG16G, Китай). Полученный в результате центрифугирования супернатант рассматривался в дальнейшем как целевая несвязавшаяся фракция. Связавшиеся с ионообменником белки экстрагировали поэтапно: на первом этапе с помощью 0,2 М ацетатного буфера с pH 4,96, содержащим 0,5 моля хлористого натрия и на втором этапе – тем же буфером, но содержащим 1 моль хлористого натрия в конечной концентрации. Определение молокосвертывающей активности полученных и фирменных препаратов проводили, как указано в [7].

Активность свертывания молока выражается в единицах Сокслета. Одна единица Сокслета (SU) активности свертывания молока определялась как количество фермента, необходимое для свертывания 1 мл субстрата в течение 40 мин при 35°C. Единицы Сокслета рассчитывали с использованием следующего уравнения:

$$SU/мл = M \times 2400 / E \times t,$$

где M – объем субстрата (мл); E – количество ферментного экстракта (мл); t – время свертывания (сек) [8].

В препарат, полученный на основе культуральной жидкости промышленного штамма *Pleurotus ostreatus x floridanus*, добавляли активатор и консервант (фирма «Ингрибел», Беларусь). Концентрацию белка в фирменных препаратах молокосвертывающего фермента и полученном нами конечном препарате брали приблизительно равной $0,033 \pm 0,005$ мг/мл. Определение концентрации белка в пробах проводили по методу Брэдфорда [9].

Результаты и их обсуждение. В ходе проведения работы мы пришли к выводу, что для получения молокосвертывающего фермента с наибольшей активностью является целесообразным использование промышленных грибных штаммов, по сравнению с дикими штаммами или плодовыми телами. Так, из работы [2] следует, что молокосвертывающая активность фермента в солевом экстракте, выделенном из плодовых тел *Pleurotus ostreatus*, составляет всего 12,5 ед/мл, в то время как активность неочищенного фермента, полученного в результате глубинного культивирования промышленного штамма *Pleurotus ostreatus x floridanus*, составила 16,6 ед/мл. Кроме того, несомненным преимуществом является применение именно глубинного культивирования, так как в этом случае можно избежать накопления в конечном продукте солей тяжелых металлов, а также заражения другими бактериальными культурами. К тому же подобный способ накопления исходного продукта признан более экологичным [10].

Для очистки фермента из культуральной жидкости традиционно используется метод высаливания с помощью сульфата аммония или хлорида натрия [8]. После высаливания почти всегда необходимо проводить диализ. Эти этапы часто сопряжены с частичной потерей ферментативной активности и создают сложности при получении препарата в промышленных условиях. Для получения концентрированного препарата обычно применяют процесс лиофилизации, который позволяет сохранить активность

фермента, но зачастую это приводит к большим затратам времени и энергии, что является крайне нежелательным при промышленном производстве, так как не обеспечивает выход продукта в необходимых для предприятия объемах. Поэтому в своей работе мы предприняли попытку концентрирования целевого препарата молокосвертывающего фермента с помощью бэтч-метода с использованием ДЕАЕ-сефарозы. Это позволяет значительно сократить время для концентрирования целевого фермента, что обусловлено связыванием большинства белков (более 50% от всех, наносимых на колонку) с анионообменником. Дополнительным преимуществом данного метода можно считать автоактивацию фермента или ферментов, обладающих молокосвертывающей активностью. Данное явление было обнаружено ранее для ферментного препарата *Pleurotus ostreatus*, содержащего молокосвертывающую активность [11]. Ранее этот метод применялся нами для очистки молокосвертывающего фермента из культуральной жидкости дикого штамма *Pleurotus ostreatus* [12]. В нашем исследовании при проведении бэтч-метода с использованием ДЕАЕ-сефарозы было получено три фракции. Фракция белков, несвязавшихся с анионообменником, и две фракции связавшихся белков, которые перешли в раствор после получасовой инкубации геля с раствором 0,2 М ацетатного буфера, pH 4,96, содержащего 0,5 М и 1 М NaCl соответственно. В супернатанте с 0,5 М хлористым натрием определялись следовые количества молокосвертывающей активности, в то время как в супернатанте с 1 М хлористым натрием молокосвертывающая активность полностью отсутствовала. Это помогло нам предположить, что практически весь фермент сконцентрировался в несвязавшейся фракции. Проверка молокосвертывающей активности в несвязавшейся фракции полностью подтвердила это предположение.

Данные по результатам молокосвертывающей активности, приведенные в работе [12], также позволяют сделать вывод о преимуществе применения промышленного штамма по сравнению с диким, так как активность ферментного препарата промышленного штамма *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* при очистке бэтч-методом достигла 19 ед/мл, в то время как активность ферментного препарата дикого штамма *Pleurotus ostreatus* после аналогичной очистки составила всего 5 ед/мл.

Полученный после концентрирования на ДЕАЕ-сефарозе препарат активировали, добавляли консервант и сравнивали с фирменными препаратами, рекомендуемыми для использования в отечественной молочной промышленности.

Время полного формирования молочных сгустков при применении сравниваемых препаратов следующее: *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* – 3 минуты 10 секунд (63 ед/мл); «Здоровеево kalase» – 1 минута 10 секунд (171 ед/мл); «Полезная партия» – 15 секунд (800 ед/мл).

На рис. представлены полученные молочные сгустки.

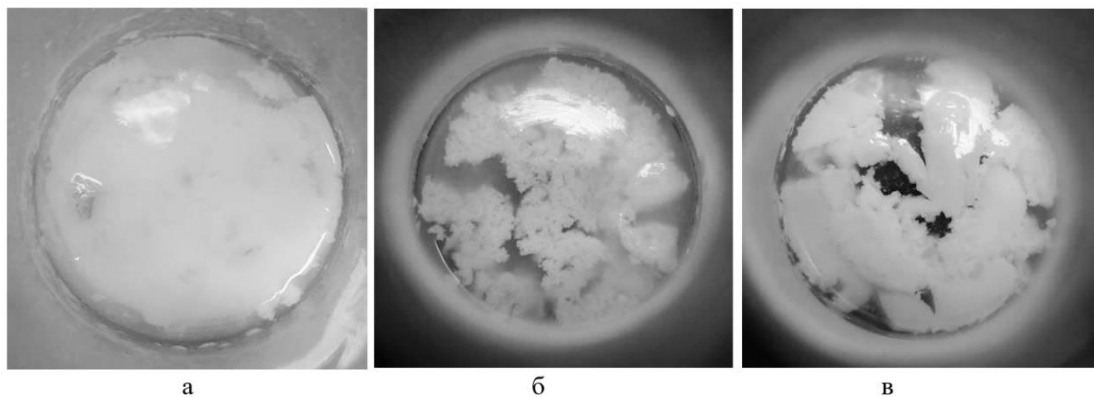


Рис. Сравнение молочных сгустков, полученных при использовании различных препаратов молокосвертывающего фермента (а – *Pleurotus ostreatus* x *floridanus*, б – «Здоровеево kalase», в – «Полезная партия»)

Заключение. Приведенные данные позволяют заключить, что применение промышленного штамма *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* является более целесообразным для молочного производства, так как при этом наблюдается более высокая исходная молокосвертывающая активность (19 ед/мл), по сравнению с ферментными препаратами, выделенными из культуральной жидкости дикого штамма (5 ед/мл) или из экстракта плодовых тел (12,5 ед/мл).

Также можно сделать вывод о рациональности использования бэтч-метода для концентрирования фермента с целью уменьшения энергетических затрат и получения большего выхода целевого продукта.

По сравнению с фирменными препаратами сгусток, образовавшийся при применении молокосвертывающего фермента *Pleurotus ostreatus* x *floridanus*, является более плотным, однако молокосвертывающая активность выше у фирменных препаратов (63 ед/мл по сравнению со значениями, полученными для фирменных препаратов: 171 ед/мл и 800 ед/мл). Таким образом, можно сделать вывод, что полученный нами препарат из культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* является хорошим кандидатом в качестве заменителя сычужного фермента телят после соответствующей доработки. В дальнейших исследованиях будут подобраны питательные среды и технологические условия, обеспечивающие наибольший выход целевого фермента в культуральную жидкость. Необходимо также подобрать и отработать методики, позволяющие получить высокую степень очистки молокосвертывающего фермента без значительной потери его активности. Кроме того, планируется изучение технологической пригодности ферментного препарата из культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* для производства сыра и его влияния на химические, текстурные и органолептические свойства полученного сыра по сравнению с коммерческими коагулянтами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kinetics of peptide fraction release during in vitro digestion of casein / R.A. Agudelo [et al.] // J. Sci. Food Agric. – 2004. – № 84. – P. 325–333.
2. Лебедева, Г.В. Выделение и характеристика фермента сычужного действия из плодовых тел вешенки обыкновенной / Г.В. Лебедева, М.Т. Проскуряков, М.А. Кожухова // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2008. – № 1. – С. 114–115.
3. *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases / S.R. Martim [et al.] // Afr. J. Microbiol. Res. – 2017. – № 11. – P. 660–667.
4. Yegin, S. A Thermolabile Aspartic Proteinase from *Mucor mucedo* DSM 809: Gene Identification, Cloning, and Functional Expression in *Pichia pastoris* / S. Yegin, M. Fernandez-Lahore // A Mol. Biotechnol. – 2013. – № 54. – P. 661–672.
5. Cheese-making with vegetable coagulants the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses // L.B. Roseiro [et al.] // Int. J. Dairy Technol. – 2003. – № 56. – P. 76–85.
6. Подбор условий для поверхностного и глубинного культивирования промышленного штамма *Pleurotus ostreatus* с целью получения молокосвертывающего фермента / Д.Д. Жерносеков, Е.Е. Павлова, А.А. Литенкова [и др.] // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта. – 2023. – № 4. – С. 11–16.
7. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента: ГОСТ ISO 11815-2015. – Переизд. 11.2019; введ. 01.01.2017. – Москва: Стандартинформ, 2019. – 10 с.
8. Purification and characterization of milk-clotting enzyme from edible mushroom *Pleurotus florida* / A. Bakr [et al.] // Letters in Applied NanoBioScience. – 2022. – Vol. 11, № 2. – P. 3362–3373.
9. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, № 1-2. – P. 248–254.
10. Кульгавеня, А.Д. О культивировании вешенки обыкновенной / А.Д. Кульгавеня // Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси: материалы XVI Междунар. молодежн. науч.-практ. конф., Пинск, 15 апр. 2022 г.: в 2 ч. / Полес. гос. ун-т; редкол.: В.И. Дунай [и др.]. – Пинск, 2022. – Ч. 2. – С. 240–242.
11. Сакович, В.В. Методические рекомендации для получения препарата, обладающего молокосвертывающей активностью из жидкости *Pleurotus ostreatus* / В.В. Сакович, А.М. Груша, Д.Д. Жерносеков // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – № 9. – С. 63–67.
12. Хроматографическая очистка ферментного препарата из культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus* / В.В. Сакович [и др.] // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя біялагічных навук. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 467–471.

REFERENCES

1. Kinetics of peptide fraction release during in vitro digestion of casein / R.A. Agudelo [et al.] // J. Sci. Food Agric. – 2004. – № 84. – P. 325–333.
2. Lebedeva G.V., Proskuriakov M.I., Kozhukhova M.A. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeni. Pishchevaya tekhnologiya* [Journal of Higher Education Establishments. Food Technology], 2008, 1, pp. 114–115.
3. *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases / S.R. Martim [et al.] // Afr. J. Microbiol. Res. – 2017. – № 11. – P. 660–667.
4. Yegin, S. A Thermolabile Aspartic Proteinase from *Mucor mucedo* DSM 809: Gene Identification, Cloning, and Functional Expression in *Pichia pastoris* / S. Yegin, M. Fernandez-Lahore // A Mol. Biotechnol. – 2013. – № 54. – P. 661–672.
5. Cheese-making with vegetable coagulants the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses // L.B. Roseiro [et al.] // Int. J. Dairy Technol. – 2003. – № 56. – P. 76–85.
6. Zernosekov D.D., Pavlova E.E., Litenskova A.A. *Vesnik Vitsebskaga dzharzhavnaga universiteta* [Bulletin of Vitebsk State University], 2023, 4, pp. 11–16.
7. *Opredeleniye obshchei molokosvertyvayushchei aktivnosti govayzhego sychuzhnogo fermenta: GOST ISO 11815-2015* [Identification of General Milk-Clotting Activity of Beef Rennet Enzyme: State Standard ISO 11815-2015], Moscow: Standartinform, 2019, 10 p.
8. Purification and characterization of milk-clotting enzyme from edible mushroom *Pleurotus florida* / A. Bakr [et al.] // Letters in Applied NanoBioScience. – 2022. – Vol. 11, № 2. – P. 3362–3373.
9. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, № 1-2. – P. 248–254.
10. Kulgavenia A.D. *Nauchny potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi: materialy XVI Mezhdunar. molodezhn. nauch.-prakt. konf., Pinsk, 15 apr. 2022 g.: v 2 ch.* [Research Potential of the Young – for the Future of Belarus: Proceedings of the 16th International Youth Scientific and Practical Conference, Pinsk, April 15, 2022: in 2 Parts], Pinsk, 2022, 2, pp. 240–242.
11. Sakovich V.V., Grusha A.M., Zernosekov D.D. *Veterinarny zhurnal Belarusi* [Veterinary Journal of Belarus], 2018, 9, pp. 63–67.
12. Sakovich V.V. *Vesti Natsyonalnai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk* [Journal of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Sciences], 2019, 64(4), pp. 467–471.

Поступила в редакцию 11.03.2025

Адрес для корреспонденции: e-mail: chemikdd@mail.ru – Жерносеков Д.Д.