



# БІАЛОГІЯ

УДК 582.282.31+57.083.132+577.151.45

## 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\*, А.Б. Шикунец\*\*

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

\*\*Учреждение образования «Полесский государственный университет»

*Получение эффективных отечественных ферментных препаратов для молочной промышленности, способных заменить дорогостоящие импортные аналоги, является актуальной задачей, стоящей перед Республикой Беларусь. Для приготовления большей части сыров используется сычужный (молокосвертывающий) фермент или его аналоги. В последнее время появились данные о применении грибов рода *Pleurotus* для получения молокосвертывающего фермента.*

*Цель статьи – подобрать условия поверхностного и глубинного культивирования промышленного штамма *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* 462 с целью получения молокосвертывающего фермента.*

**Материал и методы.** *В работе был использован промышленный штамм *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* 462 (он любезно предоставлен С.А. Коваленко, заведующей сектором пищевых и лекарственных ресурсов леса государственного научного учреждения «Институт леса НАН Беларуси»). Питательные среды готовились на кафедре фундаментальной и прикладной биологии. Винассированный жом предоставлен Слуцким сахарорафинадным комбинатом.*

**Результаты и их обсуждение.** *Предложены оптимальные среды для поверхностного и глубинного культивирования *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* 462 с целью получения молокосвертывающего фермента. Оптимизирована методика для определения активности молокосвертывающего фермента из промышленного штамма *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* 462. Показана целесообразность использования винассированного жома в качестве альтернативного источника углерода при глубинном культивировании грибов рода *Pleurotus*.*

**Заключение.** *Среда Мурациге–Скуга может быть применена на этапе поверхностного культивирования промышленного штамма *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* 462. Наиболее эффективными средами для глубинного культивирования являются среда Чапека–Докса с винассированным жомом в качестве источника углерода и картофельно-сахарозная среда.*

**Ключевые слова:** *ксилотрофный гриб *Pleurotus ostreatus*, поверхностное и глубинное культивирование, молокосвертывающий фермент.*

# SELECTION OF CONDITIONS FOR SURFACE AND DEEP CULTIVATION OF INDUSTRIAL STRAIN OF *PLEUROTUS OSTREATUS* IN ORDER TO OBTAIN A MILK-CLOTTING ENZYME

D.D. Zhernosekov\*, E.E. Pavlova\*, A.A. Litenkova\*, A.B. Shikunets\*\*

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

\*\*Education Establishment "Polesky State University"

*Obtaining effective enzyme preparations for the dairy industry that can replace expensive imported analogues is an urgent task facing the Republic of Belarus. In making most cheeses, rennet (milk-clotting) enzyme or its analogues is used. Recently, data have appeared concerning the usage of fungi *Pleurotus* for the production of a milk-clotting enzyme.*

*The purpose of the article is to select the conditions for surface and deep cultivation of the industrial strain *Pleurotus ostreatus x floridanus* 462 in order to obtain a milk-clotting enzyme.*

**Material and methods.** *The industrial strain *Pleurotus ostreatus x floridanus* 462 was used in the work. The strain was kindly provided by S.A. Kovalenko the Head of Sector of Food and Medicinal Forest Resources of the State Scientific Institution "Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus". Nutrient culture media were prepared at the Department of Fundamental and Applied Biology. The vinified pulp was provided by Slutsk Sugar Refinery.*

**Findings and their discussion.** *Optimal nutrient culture media for surface and deep cultivation of *Pleurotus ostreatus x floridanus* 462 were identified in order to obtain a milk-clotting enzyme. The method for identifying the activity of the milk-clotting enzyme from the industrial strain *Pleurotus ostreatus x floridanus* 462 has been optimized. The use of vinified pulp as an alternative source of carbon in deep cultivation of *Pleurotus* fungi was substantiated.*

**Conclusion.** *Murashige–Skoog medium can be used at the stage of surface cultivation of the industrial strain of *Pleurotus ostreatus x floridanus* 462. The most effective media for deep cultivation are Czapek–Dox medium with vinified beet pulp as a carbon source and potato-sucrose medium.*

**Key words:** *the xylophilic fungus of *Pleurotus ostreatus*, surface and deep cultivation, milk-clotting enzyme.*

Получение эффективных отечественных ферментных препаратов для молочной промышленности, способных заменить достаточно дорогие импортные аналоги, является актуальной задачей, стоящей перед Республикой Беларусь. Для приготовления большей части сыров используется сычужный (молокозвертывающий) фермент или его аналоги. Натуральный препарат молокозвертывающего фермента состоит из двух ферментов – химозина и пепсина, получают его из четвертого отдела желудков телят (сычуга), возраст которых не превышает десяти дней. Естественно, что такое производство фермента является очень затратным. Сегодня в мире спрос на сычужный фермент превышает объемы его производства. Кроме того, сейчас значительно вырос спрос на сыры, изготавливаемые без причинения вреда животным, ввиду чего возник вопрос о разработке аналогов сычужного фермента [1]. В то же время альтернативный компонент должен не уступать физико-химическим свойствам сычужного фермента и не ухудшать качество сыра. Современные предприятия молочной промышленности часто покупают и используют генномодифицированный сычужный фермент, который изготовлен как генномодифицированный продукт (часть генов желудка животных встраивается в бактерии или дрожжи). Помимо высокой стоимости таких препаратов существует и другая проблема. Автор книги «Искусство натурального сыроделия» Д. Эшер обращает внимание на то, что генномодифицированные технологии не проходят адекватное тестирование перед запуском [2]. Так, по сычужному ферменту не было сделано заключение перед тем, как Управление по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарств США присвоило ему статус «считается в целом безопасным». Законодательство ряда западных государств относительно маркировки указанных продуктов по большей части подавляется мощными и хорошо финансируемыми корпоративными интересами. Так, например, созданы штаммы микроорганизмов с внедренными генами, обеспечивающие продуцирование микробной клеткой белковых молекул прохимозина. Пионером данного направления стала фирма Pfizer, разработавшая в 1990 году препарат под торговой маркой Chu-max, получаемый от генетически модифицированной культуры бактерий *Esherichia coli*, штамм K-12 [3]. На маркировке этого препарата указано «100% чистый химозин». Однако, по мнению Д. Эшера [2], следует с осторожностью относиться вообще ко всем

микробным ферментам: они либо вырабатываются с использованием генно-инженерных технологий, либо производятся корпорациями, которые продвигают генную модификацию.

Удачной альтернативой генетически модифицированных препаратов для получения сычужного фермента можно считать препараты немодифицированных грибов. Среди молокосвертывающих ферментов неживотного происхождения, применяемых, в том числе, для приготовления вегетарианских сыров, известны ферментные препараты грибов *Mucor miehei*, *Rhizomucor miehei*, *Cryphonectria (Endothia) parasitica* и молочных дрожжей. Главным достоинством дрожжевых и грибных клеток является их способность выделять генерируемый молокосвертывающий фермент через клеточную стенку наружу, а не накапливать внутри клетки. Это существенно упрощает технологию, т.к. не требуется операция разрушения клеток, а фермент получают освобожденным от массы примесей. К тому же количество выделяемого фермента в пересчете на единицу биомассы дрожжей или микроскопических грибов в несколько раз больше, чем на единицу биомассы бактериальных клеток *E. coli*. В последнее десятилетие появились данные об использовании базидиальных грибов для получения молокосвертывающего фермента. Базидиомицеты рода *Pleurotus* известны не только как популярный продукт питания, но и источник молокосвертывающего фермента [4]. Описаны методики получения этого фермента из плодовых тел и культуральной жидкости при глубинном культивировании вешенки обыкновенной [5; 6]. По сравнению с широко применяемыми продуцентами молокосвертывающих протеиназ вышеупомянутых родов *Endothia* и *Aspergillus* базидиомицеты имеют ряд преимуществ. К главным из них можно отнести отсутствие плодоношения в культуре, что позволяет снизить риск развития аллергических заболеваний, и отсутствие загрязнения ферментных препаратов бактериальными культурами [7; 8]. В нашей работе рассмотрены условия поверхностного и глубинного культивирования промышленного штамма *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* 462, способствующие получению препарата молокосвертывающего фермента с высокой активностью.

Цель работы – провести сравнение использования различных сред (картофельно-сахарозная среда, среда Чапека с винассированным жомом в качестве источника углерода, среда Мурасиге–Скуга с использованием сахарозы в качестве источника углерода) для глубинного культивирования *Pleurotus ostreatus* с целью получения молокосвертывающего фермента, а также проверить эффективность роста промышленного штамма на среде Мурасиге–Скуга при поверхностном культивировании.

**Материал и методы.** В работе был применен промышленный штамм *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* 462. Штамм любезно предоставлен С.А. Коваленко, заведующей сектором пищевых и лекарственных ресурсов леса государственного научного учреждения «Институт леса НАН Беларуси». Питательные среды готовились на кафедре фундаментальной и прикладной биологии. Для среды Чапека–Докса в качестве источника углерода применялся винассированный жом, который является побочным продуктом производства сахара, он был предоставлен Слуцким сахарорафинадным комбинатом.

Для поверхностного культивирования использовались сусло-агаровая питательная среда и среда Мурасиге–Скуга.

Глубинное культивирование *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* 462 проводили в колбах 250 см<sup>3</sup> (150 см<sup>3</sup> среды) при перемешивании (70 об/мин) в климатической камере при 27°С на картофельно-сахарозной среде, среде Чапека–Докса с винассированным жомом в качестве дополнительного источника углерода и среде Мурасиге–Скуга с применением сахарозы в качестве источника углерода. рН сред доводился до значения 6,0. Аэрация происходила за счет диффузии воздуха через ватно-марлевые пробки. Инокуляцию проводили под ламинарным боксом для исключения риска контаминации. Мицелий вводили в стерильные колбы с питательной средой в виде нескольких фрагментов ковра площадью 1 см<sup>2</sup>.

За основу для определения молокосвертывающей активности культуральной жидкости была взята методика Пятницкого с небольшими модификациями [9].

**Результаты и их обсуждение. Поверхностное культивирование.** Для поверхностного культивирования промышленных штаммов *Pleurotus ostreatus* традиционно используется сусло-агаровая питательная среда. В нашей работе мы проверили эффективность роста промышленного штамма *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* 462 на среде Мурасиге–Скуга и картофельно-сахарозной среде. Указанная среда как правило используется при культивировании клеток и тканей многих видов растений. Отличительной особенностью данной питательной среды является высокое содержание аммонийного и нитратного азота. Результаты исследования показали, что для поверхностного культивирования

промышленного штамма *Pleurotus ostreatus* x *floridanus* 462 наиболее эффективными оказались сусло-агаровая питательная среда и среда Мурасиге–Скуга.

**Глубинное культивирование.** Среда Чапека–Докса традиционно используется для глубинного культивирования ксилотрофных грибов (вешенки, триходермы и других) [10]. Однако в своих работах исследователи применяют различные источники углерода. Мы проанализировали рост промышленного штамма на среде Чапека–Докса с использованием в качестве источника углерода винассированного жома.

Винассированный свекловичный жом – обессахаренная свекловичная стружка, которая образуется при производстве сахара из сахарной свеклы и обогащена побочным продуктом дрожжевого производства – «Винассой», обладающей питательными свойствами и содержит в себе ряд биологически активных веществ.

Появление молокосвертывающей активности наблюдалось на пятые сутки глубинного культивирования в двух исследуемых средах (Чапека–Докса и картофельно-сахарозной). Однако наиболее высокая активность молокосвертывающего фермента фиксировалась на 14-е сутки глубинного культивирования. Расчет молокосвертывающей активности проводился по формуле:

$$U = (2400/T) \times (S/E),$$

где  $U$  – единица молокосвертывающей активности;

$T$  – время, необходимое для образования молочного сгустка, с;

$S$  – объем молока, мл.;

$E$  – объем ферментного препарата, мл.

Молокосвертывающая активность культуральной жидкости вешенки обыкновенной, выращиваемой на среде Чапека–Докса с использованием в качестве источника углерода винассированного жома, на 14-е сутки культивирования показала следующее:

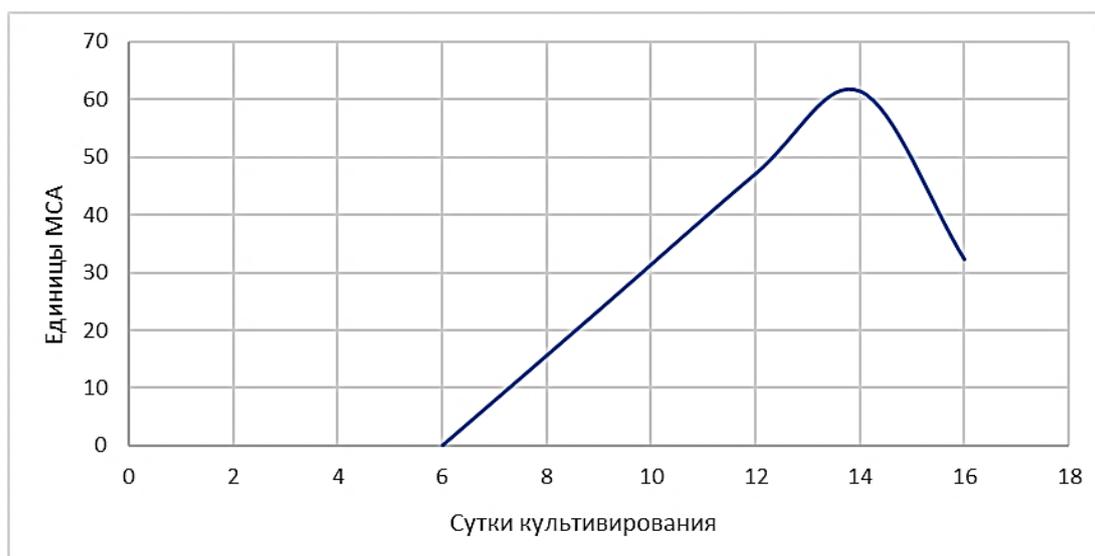
$$U_1 = (2400/720) \times (10/2) = 16,6 \text{ (ед. МСА).}$$

Молокосвертывающая активность культуральной жидкости вешенки обыкновенной, выращиваемой на картофельно-сахарозной среде, на 14-е сутки культивирования показала такое значение:

$$U_1 = (2400/195) \times (10/2) = 61,5 \text{ (ед. МСА).}$$

Полученные данные согласуются с предыдущими исследованиями, проведенными при культивировании дикого штамма *Pleurotus ostreatus* на картофельно-сахарозной среде [5].

На основе полученных результатов нами представлена зависимость молокосвертывающей активности культуральной жидкости от срока культивирования вешенки на картофельно-сахарозной среде (рис.).



По оси абсцисс – сутки глубинного культивирования, по оси ординат – единицы активности молокосвертывающего фермента

Рис. Зависимость молокосвертывающей активности культуральной жидкости от срока культивирования вешенки на картофельно-сахарозной среде

При проведении исследований использовались две различные концентрации хлорида кальция (0,0015 Моль и 0,0001 Моль). Наиболее плотный сгусток наблюдали при использовании хлорида кальция в конечной концентрации 0,0015 Моль.

В ходе эксперимента молокосвертывающая активность проверялась при различных значениях кислотности среды, так как в литературе имеются противоречивые данные по этому вопросу. В нашем случае наиболее высокая молокосвертывающая активность наблюдалась при значении pH=7,2.

При проведении экспериментов по определению молокосвертывающей активности нами было обнаружено, что показатели активности зависят от качества применяемого молока. Поэтому для определения молокосвертывающей активности мы предлагаем использование промышленного препарата сухого молока (Волковысское ОАО «Беллакт»).

Применение сухого молока рекомендовано и в документах ГОСТа при определении активности молокосвертывающих ферментов [11].

Некоторые авторы рекомендуют проведение преинкубации субстрата при определении молокосвертывающей активности [12]. При работе с промышленным штаммом *Pleurotus ostreatus x floridanus 462* мы установили, что наиболее оптимальной является преинкубация длительностью в 10 минут, так как этого времени достаточно для установления необходимой температуры в инкубационной среде.

**Заключение.** Среда Мурасиге–Скуга может быть использована на этапе поверхностного культивирования промышленного штамма *Pleurotus ostreatus x floridanus 462*.

Показана эффективность применения винассы (побочного продукта сахаро-рафинадного производства) для глубинного культивирования промышленного штамма *Pleurotus ostreatus x floridanus 462*.

Наиболее эффективной средой для глубинного культивирования является картофельно-сахарозная среда. Однако на среде Чапека–Докса с винассированным жомом в качестве источника углерода также была замечена достаточно высокая активность, что дает возможность в будущем работать в направлении подбора условий для улучшения молокосвертывающей активности на данной среде.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шляпникова, С.В. Особенности коагуляции молока: сычужный ферментный препарат и его аналоги / С.В. Шляпникова, Э.Р. Батырова // Биомика. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 33–41.
2. Эшер, Д. Искусство натурального сыроделия / Д. Эшер. – М.: Эксмо, 2023. – 320 с.
3. Мягконос, Д.С. Перспективы использования микробных заменителей химозина в сыроделии / Д.С. Мягконос [и др.] // Сыроделие и маслоделие. – 2019. – № 4. – С. 16–19.
4. Жерносеков, Д.Д. Применение ксилотрофных грибов рода *Pleurotus* и *Trichoderma* в современной биотехнологии / Д.Д. Жерносеков // Весн. Віцеб. дзярж. ун-та. – 2022. – № 3(116). – С. 17–22.
5. Sakovich, V.V. Milk-clotting enzymes of various origin: prospects for application in cheese making / V.V. Sakovich, D.D. Zhernossekov // Изв. Гомел. гос. ун-та имени Ф. Скорины. – 2020. – № 6(123). – Р. 75–80.
6. Лебедева, Г.В. Выделение и характеристика фермента сычужного действия из плодовых тел вешенки обыкновенной / Г.В. Лебедева, М.Т. Проскураков, М.А. Кожухова // Изв. высш. учеб. заведений. Пищевая технология. – 2008. – № 1. – С. 114–115.
7. 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.
8. Минакова, М.В. Исследование процесса глубинного культивирования высших грибов для получения молокосвертывающих ферментов / М.В. Минакова [и др.] // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы XV Всерос. науч.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых с междунар. участием, Бийск, 18–20 мая 2022 г. – Бийск: АлтГУ, 2022. – С. 324–327.
9. Merheb-Dini, C. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31) / C. Merheb-Dini [et al.] // Food Chemistry. – 2010. – Vol. 120, № 1. – Р. 87–93.
10. Жерносеков, Д.Д. Поиск оптимальных условий культивирования ксилотрофных грибов (вешенки обыкновенной и триходермы) и их антибактериальная активность / Д.Д. Жерносеков, П.Н. Кузьмин // Наука – образованию, производству, экономике: материалы 74-й Регион. науч.-практ. конф. преподавателей, научных сотрудников и аспирантов, Витебск, 18 февр. 2022 г. / Витеб. гос. ун-т; редкол.: Е.Я. Аршанский (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2022. – С. 60–62.
11. Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента: ГОСТ ISO 11815-2015. – Введ. 2017-01-01. – М.: Стандартинформ, 2015. – 10 с.
12. Sato, K. Purification and characterization of a milk-clotting enzyme from *Heresium erinaceum* / K. Sato [et al.] // Food Science and Technology Research. – 2019. – Vol. 2, № 5. – Р. 735–741.

**REFERENCES**

1. Shlaipnikova S.V., Batyrova E.R. *Biomika* [Biomics], 2017, 9(1), pp. 33–41.
2. Esher D. *Iskusstvo naturalnogo syrodelyiya* [The Art of Natural Cheese Making], M.: Eksmo, 2023, 320 p.
3. Miagkonosov D.S. *Syrodellie i maslodeliye* [Cheesemaking and Butter Making], 2019, 4, pp. 16–19.
4. Zhernosekov D.D. *Vesn. Vitseb. dzharzh. un-ta* [Bulletin of Vitebsk State University], 2022, 3(116), pp. 17–22.
5. Sakovich V.V., Zhernosekov D.D. *Izv. Gomel. gos. un-ta imeni F. Skoryny* [Journal of Gomel State University], 2020, 6(123), pp. 75–80.
6. Lebedeva G.V., Proskuriakov M.T., Kozhukhova M.A. *Izv. vyssh. ucheb. zavedeni. Pishchevaya tekhnologiya* [Journal of Higher Education Establishments. Food Technology], 2008, 1, pp. 114–115.
7. 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 16<sup>th</sup> International Youth Scientific and Practical Conference: Pinsk, April 15, 2022], Pinsk, 2022, 2, pp. 240–242.
8. Minakova M.V. *Tekhnologiyi i oborudovaniye khimicheskoi, biotekhnologicheskoi i pishchevoi promyshlennosti: materialy XV Vseros. nauch.-prakt. konf. studentov, aspirantov i molodykh uchenykh s mezhdunar. uchastiyem, Biysk, 18–20 maya 2022 g.* [Technologies and Equipment of Chemical, Biotechnological and Food Industry: Proceedings of the 15<sup>th</sup> All-Russia Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scholars with International Participation, Biysk, May 18–20, 2022], Biysk: AltGU, 2022, pp. 324–327.
9. Merheb-Dini, C. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31) / C. Merheb-Dini [et al.] // *Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 120, № 1. – P. 87–93.
10. Zhernosekov D.D., Kuzmin P.N. *Nauka – obrazovaniyu, proizvodstvu, ekonomike: materialy 74-i Region. nauch.-prakt. konf. prepodavatelei, nauchnykh sotrudnikov i aspirantov, Vitebsk, 18 fevr. 2022 g.* [Science – for Education, Industry, Economy: Proceedings of the 74<sup>th</sup> Regional Scientific and Practical Conference of Teachers, Researchers and Postgraduates, Vitebsk, February 18, 2022], Vitebsk, 2022, pp. 60–62.
11. *Moloko. Opredeleniye obshchei molokosvertyvayushchei aktivnosti goviazhyego sychuzhnogo fermenta: GOST ISO 11815-2015* [Milk. Identification of General Milk Clotting Activity of Beef Rennet Enzyme: State Standard (GOST) ISO 11815-2015], 2017-01-01, M.: Standartinform, 2015, 10 p.
12. Sato, K. Purification and characterization of a milk-clotting enzyme from *Heresium erinaceum* / K. Sato [et al.] // *Food Science and Technology Research*. – 2019. – Vol. 2, № 5. – P. 735–741.

Поступила в редакцию 14.07.2023

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