

Научная статья
УДК 577.15:663.15
EDN: EWIDYI
DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-340-349



Исследование ферментативной активности экстрактов из биомассы высших грибов для получения молочнокислых продуктов

Д.В. Минаков^{*,**✉}, Я.В. Уразова^{***}, Н.Г. Базарнова^{*}, С.Л. Тихонов^{***}, М.В. Минакова^{**}

^{*}Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Российская Федерация

^{**}Бийский технологический институт – филиал Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова, г. Бийск, Российская Федерация

^{***}Уральский государственный экономический университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация

Аннотация. Статья посвящена исследованию ферментативной активности и химического состава экстрактов, полученных из субстратного мицелия высших грибов. Объектом исследования является биомасса мицелия грибов *Piptoporus betulinus* (субстратный мицелий), полученная методом твердофазного культивирования на растительном субстрате. Для получения экстрактов использовали дистиллированную воду (pH=7,0), ацетатный (pH=4,7), фосфатный (pH=7,4) и буфер McIlvaine (pH=4,0). В работе определяли молокосвертывающую, протеолитическую, целлюлозолитическую и липолитическую активности, а также содержание белковых веществ в водном и буферных экстрактах. В результате проведенных исследований было установлено, что в извлечениях из субстратного мицелия *P. betulinus*, полученных дистиллированной водой и буферами, значения целлюлозолитической (3,75–3,90 ед/г), липолитической (40,00–44,24 ед/г) и молокосвертывающей (65,80–66,60 ед/мл) активности отличаются незначительно. Значения протеолитической активности изменялись от 0,22 до 0,78 ед/мл. Наиболее эффективным растворителем для получения высоких значений молокосвертывающей активности является дистиллированная вода. Концентрация белковых веществ в нативном водном экстракте из субстратного мицелия *P. betulinus* составила 14,50 мг/мл. Очистка экстракта микрофильтрацией и бентонитом приводит к значительному снижению концентрации белка (до 5,90 мг/мл), целлюлозолитической (до 1,40 ед/г), липолитической (до 5,30 ед/г) и протеолитической (до 0,11 ед/мл) активности и повышению значений молокосвертывающей активности (до 285,80 ед/мл). Бентонит сорбирует целлюлозолитические, липолитические и неспецифические протеолитические ферменты, за счет чего происходит очевидное повышение значений молокосвертывающей активности. Установлен высокий показатель соотношения молокосвертывающей к протеолитической активности у водного экстракта грибов *P. betulinus* – 2598,20, что, возможно, приведет к повышению выхода, улучшению органолептических свойств и увеличению срока хранения сыров.

Ключевые слова: культивирование, *Piptoporus betulinus*, экстракты, ферментативная активность, буферы, белковые вещества

Финансирование. Авторы благодарят за финансовую поддержку Минобрнауки РФ (тема № 075-00316-20-01, FZMM-2020-0013, мнемокод 0611-2020-013).

Для цитирования: Минаков Д.В., Уразова Я.В., Базарнова Н.Г., Тихонов С.Л., Минакова М.В. Исследование ферментативной активности экстрактов из биомассы высших грибов для получения молочнокислых продуктов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 340–349. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-340-349>. EDN: EWIDYI.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Enzymatic activity of extracts from higher fungi for manufacturing fermented dairy products

Denis V. Minakov^{*,**✉}, Yana V. Urazova^{***}, Natalya G. Bazarnova^{*}, Sergei L. Tikhonov^{***},

Marianna V. Minakova^{**}

^{*}Altai State University, Barnaul, Russian Federation

^{**}Biysk Institute of Technology (branch) of the Polzunov Altai State Technical University, Biysk, Russian Federation

^{***}Ural State Economic University, Yekaterinburg, Russian Federation

© Минаков Д.В., Уразова Я.В., Базарнова Н.Г., Тихонов С.Л., Минакова М.В., 2023

Abstract. The present study investigates the enzymatic activity and chemical composition of extracts obtained from the substrate mycelium of higher fungi. The investigated object is the biomass of fungi *Piptoporus betulinus* (substrate mycelium) gathered after solid-phase cultivation on natural substrate. The extracts were obtained using distilled water (pH=7.0), acetate (pH=4.7) and phosphate (pH=7.4) buffers, and McIlvaine buffer (pH=4.0). Milk-clotting, proteolytic, cellulolytic and lipolytic activity, as well as protein content, were determined in both aqueous or buffer extracts. As a result, the values of cellulolytic (3.75–3.90 units/g), lipolytic (40.00–44.24 units/g) and milk-clotting (65.80–66.60 units/mL) activity of the substrate mycelium was determined. These values differ slightly in the extracts prepared on distilled water and buffers. Moreover, the concentration of protein substances in the native aqueous extract from the substrate mycelium of *P. betulinus* was 14.50 mg/mL. The values of proteolytic activity varied from 0.22 to 0.78 units/mL. Distilled water was found to be the most effective solvent for achieving high values of milk-clotting activity. Extract purification by microfiltration or with bentonite leads to a significant decrease in protein concentration (up to 5.90 mg/mL), cellulose- (up to 1.40 units/g), lipo- (up to 5.30 units/g), and proteolytic (up to 0.11 units/mL) activity, and an increase in milk-clotting activity values (up to 285.80 units/mL). The bentonite sorbs cellulolytic, lipolytic, and non-specific proteolytic enzymes, resulting in a noticeable increase in the value of milk-clotting activity. In the aqueous extract of *P. betulinus* fungi, a high ratio of milk-clotting to proteolytic activity was found with a value of 2598.20. This may lead to an increased yield and improvement of the organoleptic properties of cheese and its storage period.

Keywords: cultivation, *Piptoporus betulinus*, extracts, enzymatic activity, buffers, proteins

Funding. This work was supported by the project 075-00316-20-01 (FZMM-2020-0013, mnemocode 0611-2020-013) from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

For citation: Minakov D.V., Urazova Ya.V., Bazarnova N.G., Tikhonov S.L., Minakova M.V. Enzymatic activity of extracts from higher fungi for manufacturing fermented dairy products. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(3):340-349. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-340-349>. EDN: EWIDYI.

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты являются природными катализаторами, которые нашли широкое применение в различных отраслях промышленности и биотехнологии. Одной из крупнейших групп ферментов с перспективой роста около 7% в год являются протеазы. Данная группа ферментов активно применяется в пищевой, фармацевтической и химической промышленности [1, 2].

Микробные протеазы по сравнению с ферментами растительного и животного происхождения в наибольшей степени являются востребованными из-за биотехнологического процесса их производства, что дает возможность получать продукт за более короткий период времени [3]. К продуцентам микробных ферментов относят различные виды бактерий и грибов. В последнее время перспективными продуцентами протеолитических ферментов являются высшие базидиальные грибы (отдел *Basidiomycota*), токсикологическая безопасность которых подтверждена Всемирной организацией здравоохранения [4]. Известно, что к этому отделу относятся грибы, разрушающие растительные субстраты. За счет выделения мицелием большого количества различных классов ферментов (целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы, ферменты лигниназного комплекса) происходит микогенный ксиллиз – деструкция компонентов растительной клеточной стенки – целлюлозы, лигнина, гемицеллюлозы [5–7].

Биоконверсия растительного сырья высшими грибами представляет собой альтернативный подход к производству промышленно важных продуктов с высокой добавленной стоимостью [8]. Использование технологии твердофазной ферментации грибов позволяет существенно снизить энергозатраты при производстве ферментов за счет статических условий культивирования продуцентов в простых конструкциях биореакторов на лигноцеллюлозных отходах сельскохозяйственной и деревоперерабатывающей промыш-

ленности [9, 10].

В качестве перспективного направления можно отметить группу протеолитических ферментов, способных коагулировать белок молока и являющихся важным функционально необходимым компонентом, который применяется для производства большинства групп сыров. Многочисленные исследования продемонстрировали присутствие таких ферментов у съедобных и лекарственных видов грибов, в том числе *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa*, *Tricholoma saponaceum*, *Armillaria mellea*, *Russula decolorans*, *Coprinus lagopides*, *Irpex lacteus*, *Fomitopsis pinicola*. В процессе глубинного и твердофазного культивирования данные виды грибов продуцируют сериновые, щелочные, фибринолитические, металлозависимые протеазы, плерерин, эрингеолизин, небродеолизин, гемолизин, лакказные изоферменты, аминоклотазазы и сигнальные пептидазы [11–14].

Вышеперечисленные грибы, за исключением *Russula* и *Coprinus*, относятся к дереворазрушающим, что дает возможность культивировать мицелий твердофазным способом на лигноцеллюлозных субстратах. Однако на сегодняшний день в литературе в основном описаны питательные среды для получения молокосвертывающих ферментов из высших грибов с использованием технологии глубинного культивирования [11, 12]. Субстраты для твердофазного культивирования высших грибов – продуцентов ферментов молокосвертывающего действия – представлены в литературных источниках в ограниченном количестве [15].

Несмотря на широкий перечень грибов, протеолитическая активность базидиомицетов недостаточно исследована и их потенциал в сфере биотехнологического производства полностью не раскрыт. Сегодня исследователями продолжается поиск по обнаружению новых протеаз, обладающих свойствами, для их коммерческого применения [16–18]. Детальное исследование ферментативной активности и химического состава продуцентов

протеолитических ферментов среди высших базидиомицетов, культивируемых на растительных субстратах, позволит создать технологию их производства в промышленном масштабе, учитывая доступность сырьевых источников.

Целью работы является исследование ферментативной активности и химического состава экстрактов из субстратного мицелия высших грибов для получения молочнокислых продуктов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследованиях использовали культуру высшего базидиального гриба *Piptoporus betulinus* D-21, полученную тканевым способом из плодовых тел, собранных с древесины березы в лесной зоне Алтайского края. Получение чистой культуры мицелия проводили на питательной среде сусло-агар. Контроль чистоты мицелия осуществляли методом световой микроскопии (Carl Zeiss Primo Star) на наличие/отсутствии пражек и микофильных грибов. Идентификацию вида производили по получению и описанию плодовых тел в искусственной культуре. Хранение штамма осуществляли на сусло-агаре в чашках Петри при температуре 5 ± 2 °С.

Для получения посевного мицелия использовали зерно пшеницы, приготовленное по методике, описанной в работе [13]. Подготовленное зерно помещали в колбы Эрленмейера объемом 500 мл на 2/3 части, стерилизовали (при 0,1 МПа 1,5 ч) и засеивали цилиндрическими блоками мицелия диаметром 8 мм, вырезанные с помощью пробойника из зоны роста семисуточной культуры штамма в чашке Петри. Культивирование мицелия на зерне проводили в термостате ТСО-1/80 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 26 ± 1 °С до полного зарастания в течение 14 суток.

В качестве лигноцеллюлозных субстратов для твердофазного культивирования мицелия грибов использовались березовые опилки (размер частиц 4–10 мм) и пшеничные отруби в соотношении 5:1. В субстрат добавляли дистиллированную воду и перемешивали для создания относительной влажности 60%.

Стерилизацию древесного субстрата в полипропиленовых контейнерах объемом 1,2 дм³ осуществляли в автоклаве ВК-75 (АО «ТЗМОИ», Россия) при избыточном давлении 0,1 МПа в течение 1,5 ч.

В простерилизованный древесный субстрат вносили зерновой мицелий в количестве 5% от общей массы и тщательно перемешивали с помощью металлического шпателя. Субстрат, инокулированный мицелием, помещали в суховоздушный термостат (ТСО-1/80 СПУ) и инкубировали при температуре 26 ± 2 °С. Зарастание растительного субстрата происходило в течение 20 суток. Отделение мицелия с поверхности древесного субстрата осуществляли с помощью микробиологической иглы. Для этого субстратный блок разламывали на частицы размером 5–10 мм и отбирали 10 образцов (проб) для оценки качества мицелия методом световой микроскопии с изучением микроморфологических признаков.

Экстракцию ферментов из субстратного мицелия проводили по следующей методике: навеску в количестве

10 г влажностью $50 \pm 5\%$ помещали в фарфоровую ступку и растирали пестиком с 0,25 г оксида алюминия до однородного состояния. Затем к полученной массе при гидромодуле 1:10 добавляли исследуемые экстрагенты: дистиллированная вода, ацетатный (рН=4,7), фосфатный (рН=7,4) буферы и буфер McIlvaine (рН=4,0). Смесь тщательно перемешивали и оставляли в статических условиях в течение 15 мин. Далее полученную суспензию выдерживали в термостате при 30 °С в течение 30 мин для более полного экстрагирования ферментов из субстратного мицелия. После чего проводили фильтрацию через ватно-марлевые фильтры, получая нативные экстракты и под вакуумом используя мембранные фильтры «Владипор» марки МФАС-ОС-2 с размером пор 0,45 мкм, получая микрофильтраты [19].

Очистку экстрактов бентонитовой глиной (ОСТ 18-49-71) проводили по методике, описанной в работе [20], с некоторыми модификациями: к 100 мл экстракта добавляли 2,0 г бентонитовой глины, смесь перемешивали в течение 40 мин при 180 об/мин. Полученную суспензию дополнительно выдерживали в статических условиях в течение 3 ч для осаждения частиц бентонита. Отработанный бентонит отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин. Полученный раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм и использовали для исследований.

Определение молокосвертывающей активности (МСА) проводили по методике, предложенной Каваи и Мукаи, описанной в ранее опубликованной работе [21]. Сущность методики заключается в определении времени свертывания молока, содержащего раствор хлористого кальция при добавлении экстракта, содержащего фермент.

Определение общей протеолитической активности (ПА) проводили методом Ансона на субстрате, содержащем казеин, по ГОСТ 34430–20182 применительно к слабокислым протеазам (при рН=5,3).

Определение концентрации белка проводили по общей фармакопейной статье ОФС. 1.2.3.0012.15 с использованием колориметрического метода Брэдфорда. Сущность метода заключается в связывании реагента Coomassie brilliant blue R-250 (кумасси бриллиантовый синий) с аминокислотными остатками белка – аргинином, триптофаном, тирозином, гистидином и фенилаланином. При связывании происходит сдвиг максимума поглощения с длины волны, равной 470 нм (свободный краситель), до 595 нм (связанный), при этой длине волны и проводятся все измерения¹.

Целлюлозолитическую активность (ЦА) определяли по выходу редуцирующих сахаров при ферментативном гидролизе 2,0% натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы в соответствующих водном и буферных экстрактах при температуре 35 °С в течение 1 мин. Количество редуцирующих сахаров устанавливали методом Бертрана по ГОСТ 13192-73. За одну единицу ЦА принимают такое количество фермента, которое приводит к образованию 1,0 микромоля глюкозы [20].

Липолитическую активность (ЛА) определяли по выходу титруемых жирных кислот, образовавшихся в результате ферментативной реакции водного и буферных

¹Общая фармакопейная статья. 1.2.3.0012.15 Определение белка (Метод Брэдфорда. Колориметрический) // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М.: 2018.

экстрактов с пастеризованными молочными сливками (25%-й жирности) в присутствии 0,01 М раствора хлорида кальция при температуре 35 °С в течение 60 мин. За единицу ЛА принимают такое количество фермента, которое приводит к образованию свободных жирных кислот при ферментативной реакции, эквивалентное титрованию 1,0 мл 0,05 М раствором гидроксида натрия [20].

Исследования проводились в 3-кратной повторности. Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с использованием программы MS Excel 2010.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время большинство технологий для производства ферментов основано на глубинной ферментации. Однако, несмотря на это, продолжает расти интерес к твердофазным культурам, поскольку количество ферментов, секретируемых мицелиальными грибами в растительные субстраты, часто превышает содержание ферментов, полученных в глубинной культуре [22]. Например, мицелий грибов *Aspergillus oryzae*, культивируемый на пшеничных отрубях, продуцирует в 500 раз больше фермента химозина, чем в глубинной культуре [23].

В наших исследованиях использовали технологию твердофазного культивирования мицелия *P. betulinus* на березовых опилках и пшеничных отрубях (рисунок).



Растительные субстраты, колонизированные мицелием грибов

Plant substrates colonized by fungi mycelium

После полной колонизации субстрата было проведено извлечение экстрактивных веществ, содержащих протеолитические ферменты молокосвертывающего действия. Известно, что в процессе биодеструкции растительных субстратов грибы выделяют комплекс ферментов [24]. Поэтому был проведен скрининг ферментативной активности полученных экстрактов. Определяли целлюлозолитическую, липолитическую, протеолитическую и молокосвертывающую активности.

Целлюлазные примеси, содержащиеся в ферментных препаратах, оказывают разрушающее действие на хлопчатобумажные прессы, используемые в сыроделии для формирования сыров. Липолитические ферменты также оказывают отрицательное действие на процесс изготовления сыров. С действием липаз на жиры молока увеличивается содержание свободных жирных кислот в молочной сыворотке и сгустке, уменьшается

выход сыра, развивается более пресный вкус сыра и изменяются физические характеристики сыров [20]. ПА молокосвертывающих ферментов выражается в двух формах. Первая – это специфическая МСА, равная степени протеолиза в отношении расщепления связи Phe105-Met106 в молекуле каппа-казеина. Вторая форма – общая ПА, равная степени неспецифического протеолиза в отношении расщепления любых пептидных связей в казеинах молока, что может приводить к существенному гидролизу белков до пептидов и аминокислот, снижая качество сыров на стадии созревания, разжижая молочный сгусток [25].

В табл. 1 представлены результаты определения ферментативной активности водных и буферных экстрактов из субстратного мицелия.

В качестве контрольных образцов использовали водные и буферные экстракты из растительного субстрата без мицелия. В результате было установлено, что данные экстракты не проявляли МСА.

Установлено, что независимо от используемого растворителя значения ЦА и МСА нативных экстрактов из субстратного мицелия остаются практически неизменными. При этом выявлено существенное влияние растворителей на ПА и незначительное на ЛА. На все виды ферментативной активности наибольшее влияние оказала обработка экстрактов бентонитом.

ЦА нативных экстрактов, полученных с использованием воды и буферных растворителей, составила от 3,75 (ацетатный буфер) до 3,90 ед/г (дистиллированная вода). Применение процесса микрофилтрации привело к незначительному снижению ЦА. Последующая обработка бентонитом позволила снизить ЦА по сравнению с нативным экстрактом в 3 раза.

ЛА экстрактов составила от 40,00 (вода) до 44,24 ед/г (фосфатный буфер). Значительное снижение активности экстрактов также было обнаружено при их обработке бентонитом, наименьшая ЛА (5,30 ед/г) установлена при использовании в качестве экстрагента дистиллированной воды.

ПА полученных экстрактов без очистки составила от 0,22 (буфер McIlvaine) до 0,78 ед/мл (фосфатный буфер). При получении ацетатного и водного экстрактов ПА после микрофилтрации (0,12 ед/мл) и очистки бентонитом (0,11 ед/мл) снижается в 4,6 и 5,6 раз соответственно. При экстрагировании мицелиального субстрата фосфатным буфером после микрофилтрации наблюдается снижение ПА в 2,3 раза, а после очистки бентонитом – в 3,5 раза. ПА экстрактов, полученных с использованием буфера McIlvaine, снижается в 1,6 раза после пропускания экстракта через фильтр с размером пор 0,45 мкм и при обработке бентонитом в 1,8 раза.

Несмотря на снижение ЦА, ЛА и ПА в результате микрофилтрации и обработки бентонитом, установлено существенное повышение уровня МСА экстрактов. Наибольшее значение МСА было обнаружено при очистке бентонитом и составило 285,8 ед/мл, что выше значений МСА экстракта после микрофилтрации и неочищенного экстракта в 2,4 и 4,3 раза соответственно.

Поскольку уровень МСА при экстрагировании ферментов не зависит от растворителя, для промышленного получения фермента целесообразно использовать дистиллированную воду. По значению МСА мицелий грибов

Таблица 1. Ферментативная активность экстрактов *P. betulinus*

Table 1. Enzymatic activity of extracts *P. betulinus*

Образец	Экстрагент			
	Вода	Фосфатный буфер	Ацетатный буфер	Буфер McIlvaine
Целлюлозолитическая активность, ед/г				
НЭ*	3,90±0,40	3,80±0,50	3,75±0,60	3,85±0,50
М**	3,20±0,20	3,15±0,40	3,24±0,40	3,32±0,30
Б***	1,40±0,20	1,20±0,20	1,30±0,30	1,25±0,10
Липолитическая активность, ед/г				
НЭ	40,00±4,00	44,24±2,00	42,40±1,00	42,50±2,00
М	39,20±3,00	42,10±4,00	41,00±2,00	41,60±2,00
Б	5,30±1,00	10,20±2,00	7,58±2,00	6,28±1,00
Молокосвертывающая активность, ед/мл				
НЭ	66,60±2,00	66,30±1,00	65,80±2,00	66,50±2,00
М	117,60±3,00	117,40±2,00	116,70±3,00	117,10±2,00
Б	285,80±4,00	285,50±4,00	284,90±4,00	285,70±4,00
Протеолитическая активность, ед/мл				
НЭ	0,67±0,02	0,78±0,02	0,56±0,02	0,22±0,02
М	0,12±0,01	0,34±0,02	0,12±0,02	0,14±0,01
Б	0,11±0,01	0,22±0,01	0,11±0,01	0,12±0,02
Соотношение молокоосвертывающей активности к протеолитической активности				
НЭ	99,40	85,00	117,50	302,30
М	980,00	345,30	972,50	836,40
Б	2598,20	1297,70	2590,00	2380,80

Примечание. * – нативный экстракт; ** – микрофльтрация; *** – обработка бентонитом.

Таблица 2. Показатели молокоосвертывающей и протеолитической активности водного экстракта *P. betulinus* в сравнении с ферментами других видов высших грибов

Table 2. Indicators of MCA and PA of *P. betulinus* water extract in comparison with enzymes of other higher fungi species

Образец	Молокосвертывающая активность, ед/мл	Протеолитическая активность, ед. ПА/мл	Молокосвертывающая активность/ протеолитическая активность
Водный экстракт <i>P. betulinus</i> после микрофльтрации и обработки бентонитом	285,80±0,10	0,110±0,010	2598,20
<i>Hericium erinaceum</i> NBRC 100328*	241,00	0,150	1607,00
<i>Hericium erinaceum</i> MAFF430234*	364,00	0,164	2219,00
<i>Pleurotus ostreatus</i> YFH 060301*	29,00	0,170	171,00
<i>Lentinula edodes</i> NBRC 6654*	16,00	0,074	216,00
<i>Laetiporus sulphureus</i> NBRC 6496*	17,00	0,022	773,00
<i>Grifola frondosa</i> NBRC 7040*	17,00	0,056	304
<i>Piptoporus soloniensis</i> 279.55*	2,55±0,12	0,050±0,003	51,00±2,21

Примечание. * – литературные данные [27].

P. betulinus представляет значительный практический интерес для разработки технологии производства ферментных препаратов.

Снижение целлюлозолитической, липолитической и протеолитической активности экстрактов при очистке бентонитом напрямую связано с механизмом его действия, который способствует осветлению экстракта вследствие процессов флокуляции и адсорбции мутящих частиц и пигментных примесей, стабилизации за счет адсорбции белка, окислительных ферментов, неспецифических протеолитических ферментов, липидов, полисахаридов, нуклеиновых кислот и других соединений, которые способны вступать в реакцию между собой [20].

Известно, что критерием оценки неспецифической ПА фермента является не абсолютная величина ПА, а ее доля от МСА. Важным условием, определяющим пригодность фермента для свертывания молока в сырodelии, является соотношение его МСА к общей ПА. Соотношение МСА/ПА выражает долю «полезной» активности фермента [12, 25, 26]. Повышение соотношения МСА/ПА у фермента обеспечивает стабильно высокую скорость свертывания молока, повышает выход сыра (на 0,5–1,5%), улучшает органолептические свойства и увеличивает срок хранения.

Для проведения сравнительной оценки соотношения МСА/ПА с ферментами других видов грибов был выбран водный экстракт *P. betulinus* после микрофльтрации и обработки бентонитом, т.к. обладает более высоким соотношением МСА/ПА в отличие от буферных экстрактов. Статистические данные по соотношению МСА/ПА приведены в табл. 2.

При проведении сравнительной оценки очищенного бентонитом водного экстракта из грибов *P. betulinus* с экстрактами ферментов других видов высших грибов было установлено, что значения МСА и ПА близки к значениям базидиального гриба ежевика гребенчатого – *Hericium erinaceum* NBRC 100328, *H. erinaceum* MAFF430234. При этом МСА экстракта *P. betulinus* значительно превышает активность грибов *Pleurotus ostreatus* YFH 060301, *Lentinula edodes* NBRC 6654, *Laetiporus sulphureus* NBRC 6496, *Grifola frondosa* NBRC 7040 и *Piptoporus soloniensis* 279.55. Эти данные позволяют рекомендовать водный экстракт для разработки технологии получения ферментного препарата за счет проведения дополнительных технологических операций – концентрирования и сушки.

Количественное определение белка в экстрактах субстратного мицелия является важным этапом при очистке фермента. Существует множество методов измерения концентрации белка, однако наиболее

часто цитируемым в научной литературе является колориметрический метод Бредфорда. К преимуществам данного метода можно отнести минимальную погрешность определения не более 10%, быстроту и удобство исполнения.

Анализ экстрактов показал, что концентрация белковых веществ варьирует от 5,80 до 14,50 мг/мл в зависимости от используемого растворителя и способа очистки (табл. 3).

Высокое содержание белковых веществ в неочищенных экстрактах субстратного мицелия 11,90–14,50 мг/мл может быть связано с дополнительным извлечением белка из растительного субстрата, используемого в качестве питательной среды для мицелия. Установлено, что при пропускании экстрактов через фильтр с размером пор 0,45 мкм наблюдается незначительное снижение концентрации белковых веществ. Однако при обработке экстрактов бентонитом происходит существенное снижение концентрации белка в 2,0–2,4 раза в экстрактах, полученных с использованием ацетатного, фосфатного буферов, буфера McIlvaine и дистиллированной воды соответственно. Это связано прежде всего с механизмом действия бентонита на белковые составляющие. Бентонит, как уже упоминалось выше, вследствие процессов адсорбции и флокуляции способен сорбировать на себя белковые вещества, тем самым уменьшать их количество в смеси.

Таким образом, было установлено, что экстракты, полученные растирианием субстрата (мицелия) с оксидом алюминия с растворителями с последующей микрофльтрацией и обработкой бентонитом, обладают высокой МСА (до 285,8 мг/ед) и низкими ПА (до 0,11 мг/ед), ЦА (до 1,40 ед/г) и ЛА (до 10,20 ед/г). Наиболее эффективным растворителем следует считать дистиллированную воду. Дополнительная очистка экстрактов микрофльтрацией и бентонитом позволила существенно повысить уровень МСА и снизить концентрацию белка, вероятно, за счет удаления из жидкого экстракта нежелательных белковых веществ, окислительных ферментов и неспецифических протеолитических ферментов. Полученные результаты могут найти применение при производстве молочнокислых продуктов – сыров, йогурта, сметаны.

ВЫВОДЫ

Установлено, что в экстрактах из субстратного мицелия *P. betulinus*, полученных дистиллированной водой и буферными растворителями, значения ЦА (3,75–3,90 ед/г),

Таблица 3. Содержание белковых веществ в экстрактах субстратного мицелия *P. betulinus*

Table 3. Protein substances content in extracts of substrate mycelium *P. betulinus*

Образец	Растворитель			
	Вода	Фосфатный буфер	Ацетатный буфер	Буфер McIlvaine
Содержание белка, мг/мл				
НЭ*	14,50±0,50	11,95±0,50	11,90±0,40	13,90±0,50
М**	13,20±0,20	11,60±0,50	9,10±0,20	10,80±0,40
Б***	5,90±0,10	5,85±0,10	5,80±0,10	5,95±0,10

Примечание. * – нативный экстракт; ** – микрофльтрация; *** – обработка бентонитом.

ЛА (40,00–44,24 ед/г) и МСА (65,80–66,60 ед/мл) отличаются незначительно. Значения ПА изменялись от 0,22 до 0,78 ед/мл. Водные экстракты характеризуются высокой МСА и низкими ЦА, ЛА, ПА.

Концентрация белковых веществ в нативном водном экстракте из субстратного мицелия *P. betulinus* составила 14,50 мг/мл. Очистка экстракта микрофильтрацией и бентонитом приводит к значительному снижению

концентрации белка (до 5,90 мг/мл), ЦА (до 1,40 ед/г), ЛА (до 5,30 ед/г) и ПА (до 0,11 ед/мл) и повышению МСА (до 285,80 ед/мл).

Установлен высокий показатель отношения МСА к ПА у водного экстракта грибов *P. betulinus* – 2598,20, что, возможно, приведет к повышению выхода, улучшению органолептических свойств и увеличению срока хранения при получении сыров.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Fasim A., More V.S., More S.S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses // *Current Opinion in Biotechnology*. 2021. Vol. 69. P. 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>.
2. Kishimoto M., Nakamura K., Kanemaru K., Tasaki T., Nakamura T., Sato K., et al. 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. Vol. 24, no. 1. P. 139–143. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.139>.
3. Christensen L.F., García-Béjar B., Bang-Berthelsen C.H., Hansen E.B. Extracellular microbial proteases with specificity for plant proteins in food fermentation // *International Journal of Food Microbiology*. 2022. Vol. 381. P. 109889. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109889>
4. Sommano S.R., Suksathan R., Sombat T., Seehanam P., Sirilun S., Ruksiriwanich W., et al. Novel perspective of medicinal mushroom cultivations: a review case for «Magic» mushrooms // *Agronomy*. 2022. Vol. 12, no. 12. P. 3185. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123185>.
5. Usman A., Mohammed S., Mamo J. Production, optimization, and characterization of an acid protease from a filamentous fungus by solid-state fermentation // *International Journal of Microbiology*. 2021. Vol. 190. P. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2021/6685963>.
6. Prabhu G., Bhat D., Bhat R.M., Selvaraj S. A critical look at bioproducts co cultured under solid state fermentation and their challenges and industrial applications // *Waste and Biomass Valorization*. 2022. Vol. 13, no. 4. P. 3095–3111. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01721-0>.
7. Petraglia T., Latronico T., Liuzzi G.M., Fanigliulo A., Crescenzi A., Rossano R. Edible mushrooms as source of fibrin(ogen)olytic enzymes: comparison between four cultivated species // *Molecules*. 2022. Vol. 27, no. 23. P. 8145. <https://doi.org/10.3390/molecules27238145>.
8. Berger R.G., Ersoy F. Improved foods using enzymes from basidiomycetes // *Processes*. 2022. Vol. 10, no. 4. P. 726. <https://doi.org/10.3390/pr10040726>
9. Pallavi P., Avanti K., Pallavi K. Production of milk clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* under solid-state fermentation using mixture of wheat bran and rice bran // *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2012. Vol. 2, no. 10. P. 1–12.
10. Hamrouni R., Molinet J., Mitropoulou G., Kourkoutas Y., Dupuy N., Masmoudi A., et al. From flasks to single used bioreactor: scale-up of solid-state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum* // *Journal of Environmental Management*. 2019. Vol. 252, no. 2. P. 109496. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109496>.
11. Lebedev L.R., Kosogova T.A., Teplyakova T.V., Kriger A.V., Elchaninov V.V., Belov A.N., et al. Study of technological properties of milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.) // *Foods and Raw Materials*. 2016. Vol. 4, no. 2. P. 58–65. <https://doi.org/10.21179/2308-4057-2016-2-58-65>.
12. Shamtsyan M., Dmitriyeva T., Kolesnikov B., Denisova N. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom // *LWT – Food Science and Technology*. 2014. Vol. 58, no. 2. P. 343–347. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.009>.
13. Melanouri E., Dedousi M., Diamantopoulou P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase // *Carbon Resources Conversion*. 2021. Vol. 5, no. 1. P. 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004>.
14. Cho N.S., Wilkolazka A.J., Staszczak M., Cho H.Y., Ohga S. The role of laccase from white rot fungi to stress conditions // *Journal of the Faculty of Agriculture*. 2009. Vol. 54, no. 1. P. 81–83. <https://doi.org/10.5109/14041>.
15. Thomas L., Larroche H., Pandeya A. Current developments in solid-state fermentation // *Biochemical Engineering Journal*. 2013. Vol. 81. P. 146–161. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>.
16. Salomao R.M., Larissa S.C.S., Leilane B.S., Edson J.C., Mircella M.A., Marne C.V., et al. Teixeira *Pleurotus albidus*: a new source of milk-clotting proteases // *African Journal of Microbiology Research*. 2017. Vol. 11, no. 17. P. 660–667. <https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8520>.
17. 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. Vol. 49, no. 9. P. 858–867. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1630647>.
18. 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. Vol. 1. P. 60–65.
19. 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. Vol. 24, no. 4. P. 669–676. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.669>.
20. А.С. N 962303, СССР, C12N 9/58. Способ очистки молокосвертывающего ферментного препарата из

Mucor, *Pusillus*, *Mucor michei* / К.А. Калунянц, Т.А. Смирнова, В.М. Денисов, Р. Джалмухамедова, А.П. Шарапов, Н.П. Шурупова. Заявл. 25.12.1980; опубл. 30.09.1982.

21. Минаков Д.В., Уразова Я.В., Минакова А.А. Скрининг и исследование продуцентов молокосвертывающих ферментов среди культур высших базидиальных грибов // Ползуновский вестник. 2022. N 3. С. 173–180. <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2022.03.024>. EDN: LFMEJT.

22. Mamo J., Getachew P., Kuria M.S., Assefa F. Application of milk-clotting protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for danbo cheese production // Journal of Food Quality. 2020. Vol. 4. P. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/8869010>.

23. Kumura H., Saito C., Taniguchi Y., Machiya T., Takahashi Y., Kobayashi K., et al. Adjunctive application of solid-state culture products from *Aspergillus oryzae* for semi-hard cheese // Advances in Dairy Research. 2017. Vol. 5, no. 3. P. 188. <https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000188>.

24. Musoni M., Destain J., Thonart P., Bahama J., Delvigne F. Bioreactor design and implementation strategies

for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems // Biotechnology, Agronomy and Society and Environment. 2015. Vol. 19, no. 4. P. 430–442.

25. Мяконосов Д.С., Абрамов Д.В., Делицкая И.Н., Овчинникова Е.Г. Протеолитическая активность молокосвертывающих ферментов разного происхождения // Пищевые системы. 2022. Т. 5. N 1. С. 47–54. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54>. EDN: FKA0JB.

26. Kishimoto M., Nakamura K., Kanemaru K., Tasaki T., Nakamura T., Sato K., et al. 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. Vol. 24, no. 1. P. 139–143. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.139>.

27. Nakamura K., Kobayashi N., Tanimoto M. Screening of edible mushrooms producing milk-clotting enzyme // Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 2014. Vol. 61, no. 9. P. 444–447. <https://doi.org/10.3136/nshkk.61.444>.

REFERENCES

1. Fasim A., More V.S., More S.S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*. 2021;69:68-76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>.

2. Kishimoto M., Nakamura K., Kanemaru K., Tasaki T., Nakamura T., Sato K., et al. 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;24(1):139-143. <https://doi.org/10.3136/fstr.24.139>.

3. Christensen L.F., García-Béjar B., Bang-Berthelsen C.H., Hansen E.B. Extracellular microbial proteases with specificity for plant proteins in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2022;381:109889. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109889>

4. Sommano S.R., Suksathan R., Sombat T., Seehanam P., Sirilun S., Ruksiriwanich W., et al. Novel perspective of medicinal mushroom cultivations: a review case for «Magic» mushrooms. *Agronomy*. 2022;12(12):3185. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123185>.

5. Usman A., Mohammed S., Mamo J. Production, optimization, and characterization of an acid protease from a filamentous fungus by solid-state fermentation. *International Journal of Microbiology*. 2021;190:1-12. <https://doi.org/10.1155/2021/6685963>.

6. Prabhu G., Bhat D., Bhat R.M., Selvaraj S. A critical look at bioproducts co cultured under solid state fermentation and their challenges and industrial applications. *Waste and Biomass Valorization*. 2022;13(4):3095-3111. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01721-0>.

7. Petraglia T., Latronico T., Liuzzi G.M., Fanigliulo A., Crescenzi A., Rossano R. Edible mushrooms as source of fibrin(ogen)olytic enzymes: comparison between four cultivated species. *Molecules*. 2022;27(23):8145.

<https://doi.org/10.3390/molecules27238145>.

8. Berger R.G., Ersoy F. Improved foods using enzymes from basidiomycetes. *Processes*. 2022;10(4):726. <https://doi.org/10.3390/pr10040726>

9. Pallavi P., Avanti K., Pallavi K. Production of milk clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* under solid-state fermentation using mixture of wheat bran and rice bran. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2012;2(10):1-12.

10. Hamrouni R., Molinet J., Mitropoulou G., Kourkoutas Y., Dupuy N., Masmoudi A., et al. From flasks to single used bioreactor: scale-up of solid-state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. *Journal of Environmental Management*. 2019;252(2):109496. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109496>.

11. Lebedev L.R., Kosogova T.A., Teplyakova T.V., Kriger A.V., Elchaninov V.V., Belov A.N., et al. Study of technological properties of milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.). *Foods and Raw Materials*. 2016;4(2):58-65. <https://doi.org/10.21179/2308-4057-2016-2-58-65>.

12. Shamtsyan M., Dmitriyeva T., Kolesnikov B., Denisova N. Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. *LWT – Food Science and Technology*. 2014;58(2):343-347. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.009>.

13. Melanouri E., Dedousi M., Diamantopoulou P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. *Carbon Resources Conversion*. 2021;5(1):61-70. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004>.

14. Cho N.S., Wilkolazka A.J., Staszczak M., Cho H.Y., Ohga S. The role of laccase from white rot fungi to stress conditions. *Journal of the Faculty of Agriculture*.

2009;54(1):81-83.

<https://doi.org/10.5109/14041>.

15. Thomas L., Larroche H., Pandeya A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2013;81:146-161.

<https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2013.10.013>.

16. Salomao R.M., Larissa S.C.S., Leilane B.S., Edson J.C., Mircella M.A., Marne C.V., et al. Teixeira *Pleurotus albidus*: a new source of milk-clotting proteases. *African Journal of Microbiology Research*. 2017;11(17):660-667.

<https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8520>.

17. 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;49(9):858-867.

<https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1630647>.

18. 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;1:60-65.

19. 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;24(4):669-676.

<https://doi.org/10.3136/fstr.24.669>.

20. Kalunyants K.A., Smirnova T.A., Denisov V.M., Dzhalumukhamedova R., Sharapov A.P., Shurupova N.P. Method for purifying milk-curdling enzyme preparation from *Mucor*, *Pusillus*, *Mucor michei*. Certificate of authorship, no. 962303; 1982. (In Russian).

21. Minakov D.V., Urazova Ya.V., Minakova A.A. Screening and research of producers of milk-coagulating enzymes among cultures of higher basidiomycetes. *Polzunovskii vestnik*. 2022;(3):173-180.

<https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2022.03.024>.

EDN: LFMEJT.

22. Mamo J., Getachew P., Kuria M.S., Assefa F. Application of milk-clotting protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for danbo cheese production. *Journal of Food Quality*. 2020;4:1-12.

<https://doi.org/10.1155/2020/8869010>.

23. Kumura H., Saito C., Taniguchi Y., Machiya T., Takahashi Y., Kobayashi K., et al. Adjunctive application of solid-state culture products from *Aspergillus oryzae* for semi-hard cheese. *Advances in Dairy Research*. 2017;5(3):188.

<https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000188>.

24. Musoni M., Destain J., Thonart P., Bahama J., Delvigne F. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*. 2015;19(4):430-442.

25. Myagkonosov D.S., Abramov D.V., Delitskaya I.N., Ovchinnikova E.G. Proteolytic activity of milk-clotting enzymes of different origin. *Pishchevye sistemy = Food Systems*. 2022;5(1):47-54. (In Russian).

<https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54>.

EDN: FKA0JB.

26. Kishimoto M., Nakamura K., Kanemaru K., Tasaki T., Nakamura T., Sato K., et al. 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;24(1):139-143.

<https://doi.org/10.3136/fstr.24.139>.

27. Nakamura K., Kobayashi N., Tanimoto M. Screening of edible mushrooms producing milk-clotting enzyme. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 2014;61(9):444-447.

<https://doi.org/10.3136/nskkk.61.444>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Минаков Денис Викторович,

к.б.н., доцент,

Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61,

Российская Федерация;

доцент,

Бийский технологический институт –
филиал Алтайского государственного технического

университета им. И.И. Ползунова,

659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27,

Российская Федерация,

✉ minakovd-1990@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4286-7783>

Уразова Яна Валерьевна,

аспирант,

Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61,

Российская Федерация;

преподаватель,

Бийский технологический институт –

филиал Алтайского государственного технического

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Denis V. Minakov,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,

Altai State University,

61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,

Russian Federation;

Associate Professor,

Biysk Institute of Technology (branch)

of the Polzunov Altai State Technical University,

27, Trofimov St., Biysk, 659323,

Russian Federation,

✉ minakovd-1990@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4286-7783>

Yana V. Urazova,

Postgraduate Student,

Altai State University,

61, Lenin Ave., Barnaul, 656049,

Russian Federation;

Lecturer,

Biysk Institute of Technology (branch)

of the Polzunov Altai State Technical University,

университета им. И.И. Ползунова,
659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27,
Российская Федерация,
urazova.iav@bti.secna.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6847-8487>

Базарнова Наталья Григорьевна,
д.х.н., профессор,
Алтайский государственный университет,
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61,
Российская Федерация,
bazarnova@chem.asu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4539-2744>

Тихонов Сергей Леонидович,
д.т.н., профессор,
Уральский государственный экономический
университет,
620000, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта/Народной
воли, 62/45, Российская Федерация,
tikhonov75@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

Минакова Марианна Викторовна,
магистрант, инженер,
Бийский технологический институт –
филиал Алтайского государственного технического
университета им. И.И. Ползунова,
659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27, Российская
Федерация,
marianna.minakova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8618-7085>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили окончательный
вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 30.03.2023.
Одобрена после рецензирования 15.06.2023.
Принята к публикации 31.08.2023.

27, Trofimov St., Biysk, 659323,
Russian Federation,
urazova.iav@bti.secna.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6847-8487>

Natalya G. Bazarnova,
Doctor of Chemistry, Professor,
Altai State University,
656049, Barnaul, Lenin Ave., 61,
Russian Federation,
bazarnova@chem.asu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4539-2744>

Sergei L. Tikhonov,
Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Ural State University of Economics,
62/45, 8 Marta/Narodnoi Voli St., Yekaterinburg,
620000, Russian Federation,
tikhonov75@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5841-1791>

Marianna V. Minakova,
Master Student, Engineer,
Biysk Institute of Technology (branch)
of the Polzunov Altai State Technical University,
27, Trofimov St., Biysk, 659323,
Russian Federation,
marianna.minakova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6692-4482>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding
the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved by
all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 30.03.2023.
Approved after reviewing 15.06.2023.
Accepted for publication 31.08.2023.