

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 637.334

EDN: CGBHDA

DOI: 10.21285/achb.957



Молокосвертывающая активность экстрактов волосовидных корней *Withania coagulans*

Е.В. Михайлова*,[✉] И.М. Палкина**, А.А. Слинкин***

**Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение

Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Российская Федерация

**Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, Российская Федерация

***Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Российская Федерация

Аннотация. В статье приведены данные об исследовании влияния экстрактов плодов и волосовидных корней *Withania coagulans Dunal* на свертывание молока как сырья для производства сыра. Сырный сгусток может быть получен в результате воздействия на белковую фракцию молока молокосвертывающих ферментов. Наиболее широко в мире применяются ферменты животного происхождения. Тем не менее не для всех групп населения подходят сыры, получаемые с их использованием. В связи с этим актуальным является изучение возможности применения в сыроделии растительных протеаз, а также их производство в культурах растительных тканей. Волосовидные корни, получаемые при помощи почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes*, могут культивироваться в биоректорах и как правило содержат не только корнеспецифичные метаболиты, но и соединения, характерные для других тканей растения. В ходе проведенного исследования с использованием различных буферов проводили экстракцию белка из плодов и волосовидных корней *Withania coagulans* и оценивали молокосвертывающую активность экстрактов на свежем и сухом цельном молоке. В качестве контрольного образца использовали молокосвертывающий фермент животного происхождения. Активность экстракта плодов *Withania coagulans* составила 5 ЕД/мг белка. С использованием экстрактов волосовидных корней образование сгустка занимало не менее 6 часов, что говорит о присутствии в них молокосвертывающего фермента в низкой концентрации. Поскольку волосовидные корни *Withania coagulans* рассматривались в данном аспекте впервые, необходима дальнейшая оптимизация параметров их культивирования, экстракции фермента и его применения.

Ключевые слова: *Withania coagulans*, коагуляция, молоко, сыр, экстракт, протеаза

Для цитирования: Михайлова Е.В., Палкина И.М., Слинкин А.А. Молокосвертывающая активность экстрактов волосовидных корней *Withania coagulans* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. № 1. DOI: 10.21285/achb.957. EDN: CGBHDA.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Milk-clotting activity of *Withania coagulans* hairy root extracts

Elena V. Mikhaylova*,[✉] Irina M. Palkina**, Artem A. Slinkin***

*Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Centre RAS, Ufa, Russian Federation

**Ufa State Petroleum University, Ufa, Russian Federation

***Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russian Federation

Abstract. This article presents data on the effect of fruit and hairy root extracts of *Withania coagulans Dunal* on the process of milk coagulation with a view to its potential application in cheese making. Cheese curd can be obtained by the action of milk-clotting enzymes on the protein fraction of milk. To that end, animal-derived enzymes are widely

used. However, the as-produced cheeses may not suit some population groups. In this regard, studying the possibility of using plant proteases in cheese making, as well as their production in plant tissue cultures, appears to be a relevant research task. Hairy roots bioreactor-cultivated using the *Agrobacterium rhizogenes* soil bacterium contain, as a rule, not only root-specific metabolites but also compounds characteristic of other plant tissues. In this work, protein was extracted from *Withania coagulans* fruits and hairy roots using various buffers followed by assessing the milk-clotting activity of the extracts using fresh and powdered full cream milk. An animal milk-clotting enzyme was used as a control. The activity of *Withania coagulans* fruit extract was found to be 5 U/mg of protein. Coagulation carried out with hairy root extracts lasted for at least 6 hours, indicating the presence of a low concentration of milk-clotting enzyme. Since hairy roots of *Withania coagulans* have been studied in this respect for the first time, further optimization of their cultivation parameters, enzyme extraction, and its application is required.

Keywords: *Withania coagulans*, milk-clotting activity, milk, cheese, extract, protease

For citation: Mikhaylova E.V., Palkina I.M., Slinkin A.A. Milk-clotting activity of *Withania coagulans* hairy root extracts. Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2025;15(1). (In Russian). DOI: 10.21285/achb.957. EDN: CGBHDA.

ВВЕДЕНИЕ

Сыр считается одним из древнейших пищевых продуктов и занимает важнейшее место в рационе человека. По данным FAS-USDA, в 2023 г. россияне занимали шестое место в мире по потреблению сыра (9,9 кг на человека)¹. Важнейшим этапом производства сыра является сырчужное свертывание, которое представляет собой последствие дестабилизации коллоидных частиц (казеиновых мицелл) молока и их агрегации. Роль молокосвертывающего фермента состоит в отщеплении гидрофильных макропептидных волосков к-казеина путем гидролиза связи Phe₁₀₅-Met₁₀₆ [1]. Наиболее эффективной для сыророделия считается аспарагиновая протеаза химозин – сырчужный фермент животного происхождения из желудков телят. В производстве сыра используют протеолитические ферменты из различных источников, такие как животный пепсин, микробиальные протеазы из *Rhizomucor miehei*, *Cryphonectria parasitica* и других микроорганизмов, рекомбинантные ферменты, полученные с использованием генной инженерии, а также грибные и растительные молокосвертывающие ферменты [2, 3]. Популярность последних растет в связи с тем, что они позволяют получать произведенные традиционным способом продукты, которые могут быть сертифицированы и подходить для употребления верующими, вегетарианцами и другими группами населения, отказывающимися от продукции животного происхождения.

Растительные молокосвертывающие ферменты в основном относятся к классу аспартатных, сериновых или цистeinовых протеаз. Большинство растительных аспартатных протеаз имеют два остатка аспарагиновой кислоты и представляют собой гетеродимерные белки с большой субъединицей 28–35 кДа и малой субъединицей 11–16 кДа, реже встречаются мономерные белки с молекулярной массой 36–65 кДа [4].

Среди известных растительных аспартатных протеаз – кардозины, накапливающиеся в основном в пестиках цветков растений рода Артишок и издревле используемые при производстве нескольких сортов испанских и португальских сыров. В семенах риса был обнаружен оризасин, в цветках татарника колючего – онопордосин, бодяка обыкновенного – цирсин, чертополоха курчавого – цинаразы [1, 2, 5, 6]. Цистeinовые и сери-

новые протеазы чаще обнаруживаются в млечном соке растений и плодах (актинидин – в плодах актинидии, кукумизин – в плодах дыни, леттуцин – в листьях латука, фицин – в стеблях фикуса).

Несмотря на интенсивные исследования, растительные ферменты до сих пор не нашли широкого применения. Одной из причин этого может быть сложность и экономическая неэффективность сбора сырья, такого как пестики цветков или млечный сок. Его биохимический состав может значительно различаться в зависимости от происхождения, качества, генетических и эпигенетических особенностей. Излишне высокая активность и стабильность ферментов, а также их неспецифичность к связям Phe₁₀₅-Met₁₀₆ могут сказываться на вкусовых характеристиках и качестве сыра [7, 8]. Например, кардозины расщепляют преимущественно связи α - и β -казеина, такие как Phe₂₄-Phe₂₅, Arg₁₀₀-Leu₁₀₁, Phe₁₅₃-Tyr₁₅₄, Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅, Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆.

В связи с вышесказанным поиск источников растительных молокосвертывающих ферментов остается актуальной задачей современной науки. Одним из альтернативных способов их получения является выращивание культур растительных тканей в биореакторах [2]. Культуры волосовидных корней (англ: hairy roots), которые получают с использованием почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes*, имеют преимущество благодаря своей способности к неограниченному росту и наработке ценных метаболитов, которые у интактных растений могут встречаться только в отдельных тканях, а в корнях и вовсе отсутствовать. Например, хотя в природе у *Cynara cardunculus* кардозины содержатся в основном в цветках, они были идентифицированы в волосовидных корнях, полученных из данного растения. Экстракти этих корней показали высокую протеолитическую активность по отношению к молочным белкам [9]. В отличие от сыра, изъятого из природы, культуры волосовидных корней отличаются стабильностью состава метаболитов и могут культивироваться круглогодично.

Одним из растений, используемых в производстве сыров и при этом хорошо поддающихся трансформации *A. rhizogenes*, является *Withania coagulans*. Это кустарник семейства Пасленовых, произрастающий в засушливых районах Пакистана, Афганистана и Индии, а также на юге

¹ Per capita consumption of cheese worldwide in 2023, by country (in kilograms) // Statista.com. Режим доступа: <https://www.statista.com/statistics/527195/consumption-of-cheese-per-capita-worldwide-country/> (дата обращения: 31.01.2025).

Ирана и широко применяемый в традиционных медицине и кулинарии. Его называют также Ришьяганд, индийским сычугом и сычужным растением [10]. У экстрактов листьев и корней растения благодаря содержанию витанолидов (A, D, L, P, I, F и K, витаферины A), витакоагулинов (A, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, S, Q, U и R), коагуланзина B, коагуланолида обнаруживаются противоопухолевая, противовоспалительная и антибактериальная активности, обуславливающие широкое применение растения при лечении сахарного диабета, нервного истощения, бессонницы, при заболеваниях печени, желчного пузыря и астме [11, 12]. Плоды растения содержат аспартатную протеазу, которая, по разным данным, имеет размер от 31 до 66 кДа [10, 13–15]. Экстракт плодов *W. coagulans* показывает содержание белка 2,47 мг/мл и протеолитическую удельную активность 1,06 ЕД/мг [9]. В зависимости от степени и метода очистки, а также условий эксперимента активность белка составляет от 26 ЕД/мг до 12 тыс. ЕД/мг [10, 13].

В то же время широкое применение плодов *W. coagulans* в сыротделении ограничено узким ареалом произрастания и сложностью сбора. Альтернативным способом получения сырья этого растения является культивирование волосовидных корней. Однако на данный момент неизвестно, имеют ли экстракты волосовидных корней *W. coagulans* молокосвертывающую активность. Ранее мы получили такую культуру и определили оптимальные условия ее выращивания [16]. Целью данной работы является определение возможности использования экстрактов волосовидных корней *W. coagulans* для коагуляции молока и наилучшего метода экстракции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Волосовидные корни *W. coagulans* были ранее получены в лаборатории биоинженерии растений и микробиологии Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН [16]. Перед экстракцией культуры в течение месяца выращивали в чашках Петри на среде Мурасиге – Скуга, после чего собирали и отмывали от остатков питательной среды дистilledированной водой. Использовали как свежие корни, так и корни, высушенные при комнатной температуре в течение суток. Растения *W. coagulans* культивировали

в почве с фотoperиодом 16/8. Зрелые плоды собирали и высушивали при комнатной температуре (рис. 1).

Для экстракции использовали три различных буфера, традиционно применяемых для экстракции протеаз из растительного сырья, составы которых приведены в таблице. 3 г растительного сырья измельчали в холодном буфере в соотношении 1:6 с использованием гомогенизатора FastPrep-24 (MP Biomedicals, США), выдерживали в холодильнике в течение 12 ч, после чего центрифугировали 30 мин при 4 °C. Супернатант фильтровали и использовали в экспериментах по коагуляции свежего и сухого цельного молока в различных концентрациях. В экстрактах определяли содержание белка по методу Брэдфорда. Больше всего белка содержалось в экстрактах, полученных с использованием Трис-HCl (0,933 мг/мл в экстрактах сухих волосовидных корней, 0,24 мг/мл в экстрактах свежих корней, 0,6 мг/мл в экстрактах плодов). В экстрактах, полученных с использованием других буферов, было в среднем в 3 раза меньше белка, также они имели более светлый цвет.

Состав буферов для экстракции молокосвертывающих ферментов

Content of buffers for extraction of milk-clotting enzymes

Состав буфера	Источник
0,85% NaCl	[10, 17]
0,1M K ₂ HPO ₄	[18, 19]
50 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 0,85% NaCl	[9, 13]

Эксперименты по определению молокосвертывающей активности проводили по стандартной методике (согласно ISO 11815²). Субстрат (свежее цельное молоко либо 10%-й раствор обезжиренного сухого молока в дистilledированной воде) нагревали в климатостате до 32 °C, добавляли 200 мг/л CaCl₂, при необходимости доводили pH лимонной кислотой до значения 5,8 и разливали по стерильным экспериментальным сосудам объемом 50 мл. Добавляли экстракты в количестве от 20 до 3000 мкл на 40 мл субстрата. В качестве отрицательного контроля использовали экстрагенты в соответствующих объемах, в качестве положительного контроля – 30 мкл/л коммерческого сычужного фермента (химозин CHY-MAX



Рис. 1. Волосовидные корни (а) и плоды (б) *Withania coagulans*

Fig. 1. Hairy roots (a) and fruits (b) of *Withania coagulans*

² ГОСТ ISO 11815-2015. Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента (ISO 11815:2007, IDT). М.: Стандартинформ, 2015. 15 с.

производства Chr. Hansen (Дания) с активностью 998 ЕД/мл). Инкубировали пробирки в климатостате при 37 °C, при этом периодически перемешивая вручную. Регистрировали образование сгустка и рассчитывали молокосвертывающую активность по формуле

$$MA = A / (T_1 \times T_2),$$

где A – аттестованная молокосвертывающая активность коммерческого фермента; T_1 – время свертывания с коммерческим ферментом; T_2 – время свертывания с экстрактом.

При добавлении химозина коагуляция начиналась в течение 4 мин, однородный сгусток образовывался в течение 30 мин. Экстракт плодов в максимальной концентрации продемонстрировал аналогичные показатели, исходя из чего была рассчитана его активность (5 ЕД/мг белка). Активность экстрактов волосовидных корней становилась заметна не менее чем через 6 ч, а отделение сыворотки наблюдали по прошествии 20 ч. С учетом низкой скорости коагуляции проблематично определить точное время ее начала, однако очевидно, что волосовидные корни содержат в десятки раз меньше молокосвертывающего фермента, несмотря на более высокое содержание общего белка. Коагуляция была наиболее эффективна при добавлении Трис-HCl-экстрактов, а образующийся сгусток по характеристикам был наиболее приближен к положительному контролю (рис. 2). Добавление в субстрат буфера не оказывало влияния на свертывание молока. Добавление буфера и экстрактов

не оказывало влияния на показатель pH субстрата. Необходимо отметить, что образцы с добавлением экстракта как плодов, так и волосовидных корней в достаточной для коагуляции концентрации имели горький вкус, при этом наиболее выраженным он был у образцов, полученных с использованием Трис-HCl-экстракта.

Поскольку, согласно различным литературным данным, оптимум активности молокосвертывающих ферментов *W. coagulans* разнится от pH 4,25 и 37 °C [10], pH 5 и 65 °C [14], pH 4 и 70 °C [17], проводили также эксперименты в микрообъемах для оценки влияния pH и температуры на активность экстрактов. Для этого доводили pH субстрата до 4,25 и добавляли от 1 до 100 мкл экстракта на 1 мл субстрата с нормальным и сниженным pH. Образцы выдерживали при 37 и 65 °C. Все эксперименты проводили в трех повторностях.

При pH 6 образование сгустка наблюдали с использованием всех видов экстрактов вне зависимости от используемого буфера как на цельном, так и на сухом молоке. При pH 4 вместо коагуляции происходило образование хлопьев и расслоение субстрата во всех образцах (рис. 3, 7, 8), в том числе в положительном и отрицательном контроле, за исключением образцов свежего молока с наивысшей концентрацией экстрактов плодов *W. coagulans*, где наблюдалось формирование сгустка при 65 °C.

Хотя при повышенной температуре и нормальном pH удалось добиться коагуляции образцов цельного

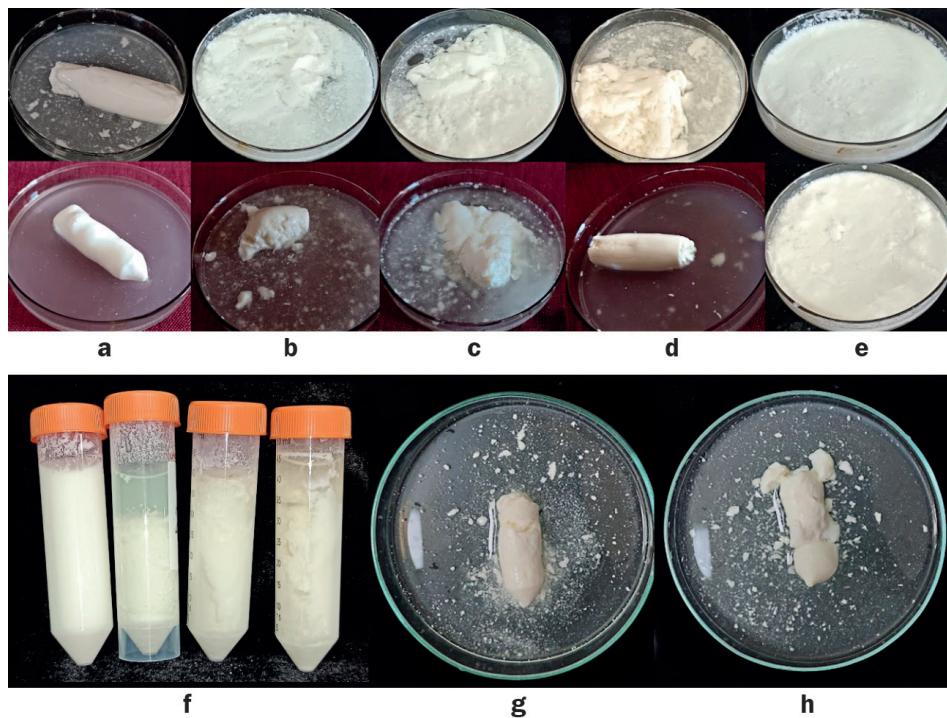


Рис. 2. Коагуляция цельного молока через 6 (сверху) и 20 (снизу) часов эксперимента при использовании: а – химозина; б – 500 мкл NaCl-экстракта сухих корней; в – 500 мкл KH₂PO₄-экстракта сухих корней; г – 500 мкл Трис-HCl-экстракта сухих корней; д – 500 мкл буфера Трис-HCl. Коагуляция сухого молока через 6 часов эксперимента: ф – слева направо: отрицательный контроль, химозин, 500 мкл экстракта плодов, 1000 мкл экстракта плодов; г – 500 мкл экстракта плодов; д – 1000 мкл экстракта плодов

Fig. 2. Coagulation of full-cream milk after 6 (top) and 20 (bottom) hours of the experiment using: a – chymosin; b – 500 μ l NaCl extract of dry roots; c – 500 μ l KH₂PO₄ extract of dry roots; d – 500 μ l Tris-HCl extract of dry roots; e – 500 μ l Tris-HCl buffer. Coagulation of dry milk after 6 hours of the experiment: f – from left to right: negative control, chymosin, 500 μ l fruit extract, 1000 μ l fruit extract; g – 500 μ l fruit extract; h – 1000 μ l fruit extract

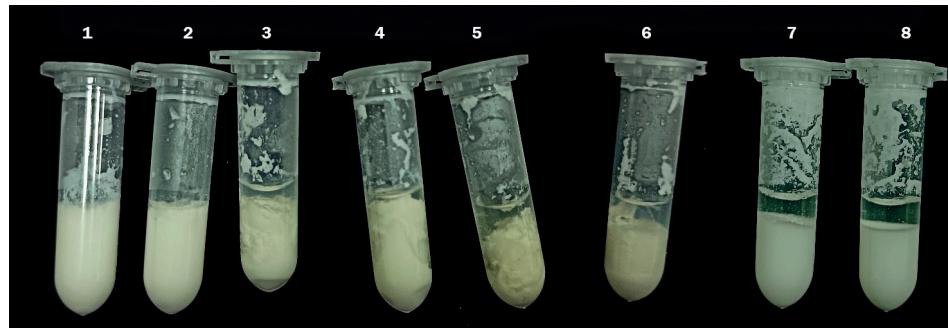


Рис. 3. Результат коагуляции сухого молока в течение 6 часов при температуре 37 °С и pH 6: 1 – отрицательный контроль; 2 – 10 мкл экстракта плодов; 3 – 25 мкл экстракта плодов; 4 – 50 мкл экстракта плодов; 5 – 100 мкл экстракта плодов; 6 – химозин. Результат коагуляции сухого молока в течение 6 часов при температуре 37 °С и pH 4: 7 – отрицательный контроль; 8 – химозин

Fig. 3. Powdered milk coagulation for 6 hours at 37 °C and pH 6: 1 – negative control; 2 – 10 µl of fruit extract; 3 – 25 µl of fruit extract; 4 – 50 µl of fruit extract; 5 – 100 µl of fruit extract; 6 – chymosin. The result of coagulation of powdered milk for 6 hours at 37 °C and pH 4: 7 – negative control; 8 – chymosin

молока с более низкой концентрацией экстракта, скорость образования сгустка существенно не отличалась. При повышенной температуре коагуляция в сухом молоке замедлялась и составляла более 30 мин, в том числе и для химозина (рис. 4, б). Низкий pH негативно влиял на коагуляцию цельного молока, а в сухом молоке сгусток в течение 20 ч не образовывался вовсе. Визуально можно было отметить лишь образование хлопьев, обусловленное обычной кислотной коагуляцией при низком значении pH. Таким образом, в наших исследованиях не подтверждается положительное влияние сниженного pH и повышенной температуры на активность молокосвертывающих ферментов *W. coagulans*. Это видно из графика, представленного на рис. 4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные нами эксперименты показали, что не только плоды, но и волосовидные корни *W. coagulans* могут быть использованы в качестве источников молокосвертывающих ферментов. Все три использованных буфера для экстракции оказались эффективны, при этом несколько более плотный сгусток и прозрачная сыворотка наблюдались при использовании Трис-HCl, что соотносится с результатами исследования методов экстракции сычужного фермента из *Streblus asper*, где

буфер на основе Трис-HCl превосходил по эффективности ацетатный и фосфатный буфера [20]. Экстракти, приготовленные с использованием этого буфера, имели наиболее высокое содержание белка.

Молокосвертывающая активность экстракта плодов *W. coagulans* в нашем исследовании (5 ЕД/мг белка) согласуется с литературными данными [10]. По активности растительный экстракт существенно уступает коммерческому, что может быть обусловлено не только меньшим содержанием фермента, но и иным механизмом его действия. Химозин превосходит все альтернативы, поскольку избирательно гидролизует Phe₁₀₅-Met₁₀₆ связи κ-казеина, тогда как растительные протеазы могут расщеплять преимущественно другие связи, а также α- и β-казеин. В связи с этим требуются большие объем фермента и время, чтобы вызвать свертывание молока с использованием растительных протеаз. Так, было показано что характер гидролиза κ-казеина и α_s-казеина экстрактами *W. coagulans* иной, нежели у реннина, но одинаковый для β-казеина [14]. Для сравнения, такие известные ферменты, как бромелайн и папаин, осуществляют гидролиз молока только на 17–22% за 5 ч [3]. Хотя путем добавления больших концентраций экстракта плодов *W. coagulans* (100 мкл на 1 мл) и можно достичь эффекта, не уступающего

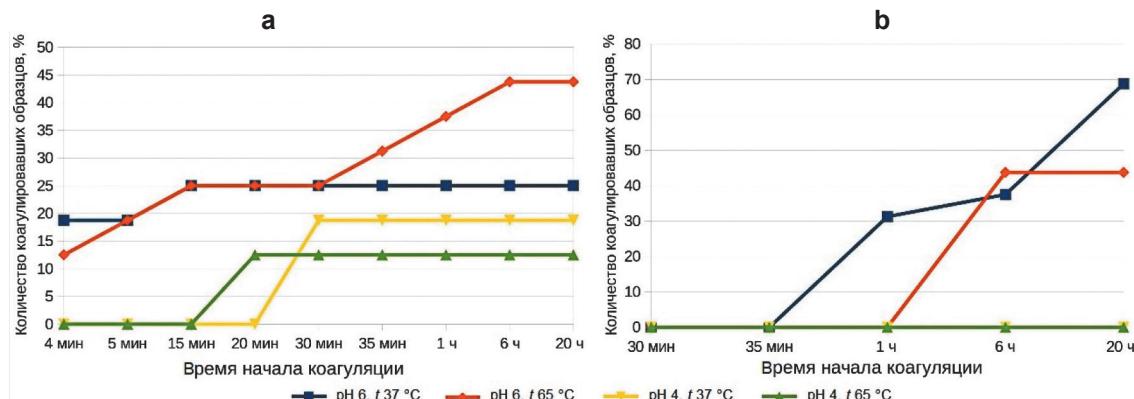


Рис. 4. Время начала коагуляции образцов цельного (а) и сухого (б) молока в зависимости от значения активной кислотности и температуры

Fig. 4. Coagulation onset time of whole (a) and powdered milk (b) depending on the value of active acidity and temperature

химозину, образующиеся сгустки имеют горький вкус и мало подходят для массового изготовления сыра. Более темный цвет экстрактов, полученных с использованием буфера Трис-HCl, может свидетельствовать о наличии в них большего количества других соединений, таких как полифенолы, обуславливающие более выраженный неприятный вкус. Большее содержание в них белка по сравнению с экстрактами плодов говорит о присутствии посторонних белков. Проблема может быть решена путем очистки протеаз методом диализа и гель-хроматографии, хотя это и приведет к удорожанию производства, а также добавлению в буферы для экстракции таких соединений, как поливинилпирролидон, для удаления полифенольных соединений [9].

Следует отметить неоднозначность литературных данных об аспартатной протеазе из плодов *W. coagulans*, в частности ее размере и оптимуме активности [10, 14, 17]. Разнообразие экспериментальных данных может свидетельствовать о наличии в этом растении нескольких молокосвертывающих ферментов, некоторые из которых могут отсутствовать в волосовидных корнях и плодах в зависимости от условий культивирования. В нашем исследовании не подтверждается положительное влияние низкого уровня pH и высоких температур на активность экстрактов *W. coagulans*. Следует также отметить, что низкие показатели pH в принципе не подходят для производства сыра, поскольку вызывают расслоение молока.

В целом аспартатные протеазы *W. coagulans* вряд ли могут заменить химозин, однако ничем не уступают другим растительным ферментам. В связи с более медленным, чем у ферментов животного происхождения, механизмом действия растительные протеазы часто рекомендуют использовать не самостоятельно, а в

качестве добавок при проведении медленной кислотной коагуляции с использованием молочнокислых микроорганизмов. Выгодное отличие *W. coagulans* заключается в том, что помимо молокосвертывающих ферментов в этом растении содержатся также другие метаболиты – в основном стероидные лактоны, относящиеся к группе витанолидов и широко применяемые в традиционной медицине. Одним из их свойств, востребованных в пищевой промышленности, является активность против *Escherichia coli* и ряда других микроорганизмов [12]. Молокосвертывающие ферменты могут стать дополнительными побочными продуктами производства витанолидов из волосовидных корней, а витанолиды могут повысить пищевую ценность и срок хранения сыров, производимых с помощью таких ферментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного эксперимента нами была впервые показана возможность применения ферментов, экстрагированных из волосовидных корней *W. coagulans*, в приготовлении сыра. Несмотря на меньшую молокосвертывающую активность экстрактов корней по сравнению с экстрактом плодов, они обладают рядом преимуществ, таких как возможность круглогодичного культивирования в биореакторах и постоянство химического состава. Корни *W. coagulans* также богаты биологически активными веществами, в том числе антибактериальными. Характерный для ферментов растительного происхождения длительный механизм действия и горький вкус предполагает дальнейшее изучение методов выделения и очистки протеаз *W. coagulans*, а также их применения в совокупности с молочнокислыми микроорганизмами.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Михайлова Ю.А. Мягкий сыр с использованием растительного ферmenta из цветков чертополоха курчавого (*Carduus Crispus*) // Молочнохозяйственный вестник. 2023. N 1. C. 163–181. DOI: 10.52231/2225-4269_2023_1_163. EDN: MBZGFS.
2. Шляпникова С.В., Батырова Э.Р. Особенности коагуляции молока: сырчужный ферментный препарат и его аналоги // Biomics. 2017. T. 9. N 1. C. 33–41. EDN: ZAXQYV.
3. Troncoso F.D., Sánchez D.A., Ferreira M.L. Production of plant proteases and new biotechnological applications: an updated review // ChemistryOpen. 2022. Vol. 11, no. 3. P. e202200017. DOI: 10.1002/open.202200017.
4. Nicosia F.D., Puglisi I., Pino A., Caggia C., Randazzo C.L. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking // Foods. 2022. Vol. 11, no. 6. P. 871. DOI: 10.3390/foods11060871.
5. Mozzon M., Foligni R., Mannozzi C., Zamporlini F., Raffaelli N., Aquilanti L. Clotting properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) aqueous extract in milk of different species // Foods. 2020. Vol. 9, no. 6. P. 692. DOI: 10.3390/foods9060692.
6. Foligni R., Mannozzi C., Gasparrini M., Raffaelli N., Zamporlini F., Tejada L., et al. Potentialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking // Food Research International. 2022. Vol. 158. P. 111592. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111592.
7. Ben Amira A., Besbes S., Attia H., Blecker C. Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: a review // International Journal of Dairy Technology. 2019. Vol. 62, no. 3. P. 352–361. DOI: 10.1080/10942912.2017.1289959.
8. Струрова Ю.Г., Гришкова А.В., Коньшин В.В., Проsekov А.Ю. Влияние физико-химических факторов на специфическую активность протеаз, применяемых в биотехнологии сыров // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 352–361. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.935. EDN: GEWFBW.
9. Folgado A., Pires A.S., Figueiredo A.C., Pimentel C., Abrantes R. Toward alternative sources of milk coagulants for cheese manufacturing: establishment of hairy roots culture and protease characterization from *Cynara cardunculus* L. // Plant Cell Reports. 2020. Vol. 39. P. 89–100. DOI: 10.1007/s00299-019-02475-1.
10. Naz S., Masud T., Nawaz M.A. Characterization of milk coagulating properties from the extract of *Withania coagulans* // International Journal of Dairy Technology. 2009. Vol. 62, no. 3. P. 315–320. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2009.00492.x.
11. Khan R.S., Masud T. Comparison of buffalo cottage cheese made from aqueous extract of *Withania coagulans* with commercial calf rennet // International Journal of Dairy Technology. 2013. Vol. 66, no. 3. P. 396–401. DOI: 10.1111/1471-0307.12048.
12. Khan M.I., Maqsood M., Saeed R.A., Alam A., Sahar A., Kieliszek M., et al. Phytochemistry, food application, and therapeutic potential of the medicinal plant (*Withania coagulans*): a review // Molecules. 2021. Vol. 26.

no. 22. P. 6881. DOI: 10.3390/molecules26226881.

13. Salehi M., Aghamaali M.R., Sajedi R.H., Asghari S.M., Jorjani E. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit // International Journal of Biological Macromolecules. 2017. Vol. 98. P. 847–854. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.034.

14. Kazemipour N., Salehi Inchebro M., Valizadeh J., Sepehrimanesh M. Clotting characteristics of milk by *Withania coagulans*: proteomic and biochemical study // International Journal of Food Properties. 2017. Vol. 20, no. 6. P. 1290–1301. DOI: 10.1080/10942912.2016.1207664.

15. Ahmadi S., Salehi M., Ausi S. Kinetic and thermodynamic study of aspartic protease extracted from *Withania coagulans* // International Dairy Journal. 2021. Vol. 116. P. 104960. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104960.

16. Михайлова Е.В., Панфилова М.А., Федяев В.В., Кулев Б.Р. Влияние содержания макро- и микроэлементов в питательной среде на продуктивность культур волосовидных корней *Withania coagulans* // Биотехнология. 2024. Т. 40. № 1. С. 15–23. DOI: 10.56304/S0234275824010083. EDN: LDMFXF.

17. Beigomi M., Mohammadifar M.A., Hashemi M.,

Rohani M.G., Senthil K., Valizadeh M. Biochemical and rheological characterization of a protease from fruits of *Withania coagulans* with a milk-clotting activity // Food Science and Biotechnology. 2014. Vol. 23. P. 1805–1813. DOI: 10.1007/s10068-014-0247-5.

18. Rocha G.F., Cotabarren J., Obregón W.D., Fernández G., Rosso A.M., Parisi M.G. Milk-clotting and hydrolytic activities of an aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits on individual caseins // International Journal of Biological Macromolecules. 2021. Vol. 192. P. 931–938. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.004.

19. Senthilkumar S., Ramasamy D., Subramanian S. Isolation and partial characterisation of milk-clotting aspartic protease from *Streblus asper* // Food Science and Technology International. 2006. Vol. 12, no. 2. P. 103–109. DOI: 10.1177/1082013206063839.

20. Pagthinathan M., Ghazali H.M., Yazid A.M., Foo H.L. Extraction, purification and characterisation of a milk-clotting protease from ‘kesinai’ (*Streblus asper* Lour.) leaves // International Food Research Journal. 2019. Vol. 26, no. 3. P. 913–922.

REFERENCES

- 1.** Mihajlova Ju.A. Soft chese using a vegetable enzyme from curly thistle flowers (*Carduus crispus*). *Dairy Farming Journal*. 2023;1:163-181. (In Russian). DOI: 10.52231/2225-4269_2023_1_163. EDN: MBZGFS.
- 2.** Shlyapnikova S.V., Batyrova E.R. Features of coagulation of milk. Rennet enzyme preparation and its analogues. *Biomics*. 2017;9(1):33-41. (In Russian). EDN: ZAXQYV.
- 3.** Troncoso F.D., Sánchez D.A., Ferreira M.L. Production of plant proteases and new biotechnological applications: an updated review. *ChemistryOpen*. 2022;11(3):e202200017. DOI: 10.1002/open.202200017.
- 4.** Nicosia F.D., Puglisi I., Pino A., Caggia C., Randazzo C.L. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. *Foods*. 2022;11(6):871. DOI: 10.3390/foods11060871.
- 5.** Mozzon M., Foligni R., Mannozi C., Zamporlini F., Raffaelli N., Aquilanti L. Clotting properties of *Onopordum tauricum* (Willd.) aqueous extract in milk of different species. *Foods*. 2020;9(6):692. DOI: 10.3390/foods9060692.
- 6.** Foligni R., Mannozi C., Gasparini M., Raffaelli N., Zamporlini F., Tejada L., et al. Potentialities of aqueous extract from cultivated *Onopordum tauricum* (Willd.) as milk clotting agent for cheesemaking. *Food Research International*. 2022;158:111592. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111592.
- 7.** Ben Amira A., Besbes S., Attia H., Blecker C. Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: a review. *International Journal of Food Properties*. 2017;20(sup1):S76-S93. DOI: 10.1080/10942912.2017.1289959.
- 8.** Sturova Yu.G., Grishkova A.V., Konshin V.V., Prosekov A.Yu. Influence of physicochemical factors on the specific activity of proteases used in cheesemaking biotechnology. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):352-361. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.935. EDN: GEWFBW.
- 9.** Folgado A., Pires A.S., Figueiredo A.C., Pimentel C., Abrantes R. Toward alternative sources of milk coagulants for cheese manufacturing: establishment of hairy roots culture and protease characterization from *Cynara cardunculus* L. *Plant Cell Reports*. 2020;39:89-100.
- 10.** Naz S., Masud T., Nawaz M.A. Characterization of milk coagulating properties from the extract of *Withania coagulans*. *International Journal of Dairy Technology*. 2009;62(3):315-320. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2009.00492.x.
- 11.** Khan R.S., Masud T. Comparison of buffalo cottage cheese made from aqueous extract of *Withania coagulans* with commercial calf rennet. *International Journal of Dairy Technology*. 2013;66(3):396-401. DOI: 10.1111/1471-0307.12048.
- 12.** Khan M.I., Maqsood M., Saeed R.A., Alam A., Sahar A., Kieliszek M., et al. Phytochemistry, food application, and therapeutic potential of the medicinal plant (*Withania coagulans*): a review. *Molecules*. 2021;26(22):6881. DOI: 10.3390/molecules26226881.
- 13.** Salehi M., Aghamaali M.R., Sajedi R.H., Asghari S.M., Jorjani E. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;98:847-854. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.034.
- 14.** Kazemipour N., Salehi Inchebro M., Valizadeh J., Sepehrimanesh M. Clotting characteristics of milk by *Withania coagulans*: proteomic and biochemical study. *International Journal of Food Properties*. 2017;20(6):1290-1301. DOI: 10.1080/10942912.2016.1207664.
- 15.** Ahmadi S., Salehi M., Ausi S. Kinetic and thermodynamic study of aspartic protease extracted from *Withania coagulans*. *International Dairy Journal*. 2021;116:104960. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104960.
- 16.** Михайлова Е.В., Панфилова М.А., Федяев В.В., Кулев Б.Р. The impact of the content of macro- and microelements in the culture medium on the productivity of *Withania coagulans* hairy root cultures. *Biotehnologiya*. 2024;40(1):15-23. (In Russian). DOI: 10.56304/S0234275824010083. EDN: LDMFXF.
- 17.** Beigomi M., Mohammadifar M.A., Hashemi M., Rohani M.G., Senthil K., Valizadeh M. Biochemical and rheological characterization of a protease from fruits of *Withania coagulans* with a milk-clotting activity. *Food Science*

and Biotechnology. 2014;23:1805-1813. DOI: 10.1007/s10068-014-0247-5.

18. Rocha G.F., Cobabarren J., Obregón W.D., Fernández G., Rosso A.M., Parisi M.G. Milk-clotting and hydrolytic activities of an aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits on individual caseins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;192:931-938. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.004.

19. Senthilkumar S., Ramasamy D., Subramanian S.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Михайлова Елена Владимировна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Институт биохимии и генетики – обособленное
структурное подразделение Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450054, г. Уфа, Проспект Октября, 71,
Российская Федерация,
✉ mikhele@list.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7374-8405>

Палкина Ирина Максимовна,
магистрант,
Уфимский государственный нефтяной
технический университет,
450064, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1,
Российская Федерация,
palkinaim@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0001-7433-7533>

Слинкин Артем Андреевич,
к.б.н., доцент,
Башкирский государственный
аграрный университет,
450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34,
Российская Федерация,
s-artemk@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0007-1717-3177>

Вклад авторов

Е.В. Михайлова – разработка концепции, курирование данных, административное руководство исследовательским проектом, написание черновика рукописи.
И.М. Палкина – проведение исследования.
А.А. Слинкин – разработка методологии, проведение исследования, формальный анализ, редактирование рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 01.11.2024.
Одобрена после рецензирования 03.12.2024.
Принята к публикации 28.02.2025.

Isolation and partial characterisation of milk-clotting aspartic protease from *Streblus asper*. *Food Science and Technology International*. 2006;12(2):103-109. DOI: 10.1177/1082013206063839.

20. Pagthiathan M., Ghazali H.M., Yazid A.M., Foo H.L. Extraction, purification and characterisation of a milk-clotting protease from 'kesinai' (*Streblus asper* Lour.) leaves. *International Food Research Journal*. 2019;26(3):913-922.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena V. Mikhaylova,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
Institute of Biochemistry and Genetics
of Ufa Federal Research Center RAS,
71, Oktyabrya Ave., Ufa, 450054,
Russian Federation,
✉ mikhele@list.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7374-8405>

Irina M. Palkina,
Master's Student,
Ufa State Petroleum Technological University,
1, Kosmonavtov St., Ufa, 450064,
Russian Federation,
palkinaim@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0001-7433-7533>

Artem A. Slinkin,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Bashkir State Agrarian University,
34, 50-letiya Oktyabrya St., Ufa, 450001,
Russian Federation,
s-artemk@yandex.ru
<https://orcid.org/0009-0007-1717-3177>

Contribution of the authors

Elena V. Mikhaylova – conceptualization, data curation, project administration, writing – original draft.
Irina M. Palkina – investigation.
Artem A. Slinkin – methodology, investigation, formal analysis, writing – editing.

Conflict of interest

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 01.11.2024.
Approved after reviewing 03.12.2024.
Accepted for publication 28.02.2025.