

УДК 577.151.52 : 582.284.3 : 57.083.132

**А.Д. КУЛЬГАВЕНЯ**

аспірант<sup>1</sup>

**В.Н. НИКАНДРОВ**, доктор биол. наук, профессор

профессор кафедры биотехнологии<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Полесский государственный университет,

г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 7 октября 2021 г.

## **ДИНАМИКА ЖЕЛАТИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЫ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PLEUROTUS OSTREATUS*) НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА<sup>1</sup>**

*Изучена динамика роста, уровень внутриклеточного и внеклеточного белка, желатинолитическая активность внутриклеточных и внеклеточных протеиназ при культивировании мицелия *Pleurotus ostreatus* в течение 14 дней на среде «отвар картофеля+сахароза» и среде Чапека-Докса с водорастворимым крахмалом.*

*Установлено, что при росте на среде Чапека-Докса через 12 и 14 дней концентрация белка в мицелии превышала таковую при использовании картофельно-сахарозной среды на 86 и 69% соответственно.*

*Концентрация белка в культуральной жидкости на обеих питательных средах за весь период культивирования существенно не изменялась.*

*При росте гриба на обеих питательных средах желатинолитическая активность мицелия проявлялась при pH 5,8, 7,6, 9,2 и 10,6. Однако максимум активности при этих величинах pH в случае картофельно-сахарозной питательной среды проявился в разное время. На среде Чапека-Докса он при всех pH соответствовал 12 дням после начала роста культуры.*

*Удельная активность протеиназ на 1 мг белка мицелия при росте на картофельно-сахарозной среде превосходила таковую на среде Чапека-Докса в 2,28 – 2,61 раза, за исключением протеина, активных при pH 10,2.*

*Однако удельная активность внеклеточных протеиназ на 1 мг белка при росте гриба на среде Чапека-Докса более чем в семь раз ( $P < 0,05$ ) превышала активность культуральной жидкости гриба при культивировании на картофельно-сахарозной среде.*

**Ключевые слова:** мицелиальная культура, питательные среды, концентрация белка, внутриклеточные и экстрацеллюлярные желатинолитические протеиназы

**KULGAVENYA A.D.**

Graduate Student<sup>1</sup>

**NIKANDROV V.N.**, Doctor of Biol. Sc. Habil., Professor of Biochemistry

Professor of the Department of Biotechnology<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

## **DYNAMICS OF GELATINOLYTIC ACTIVITY OF *PLEUROTUS OSTREATUS* DEEP CULTURE ON A NUTRIENT MEDIA OF DIFFERENT COMPOSITION**

---

<sup>1</sup> Материал получен при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь в рамках гранта на выполнение научно- исследовательских работ.

*Growth dynamics, level of intracellular and extracellular protein, gelatinolytic activity of intracellular and extracellular proteinases during cultivation of *Pleurotus ostreatus* mycelium for 14 days on potato "decoction + sucrose" medium and Chapek-Dox medium with water-soluble starch were studied.*

*It was found that when mycelium growing on Chapek-Doks medium after 12 and 14 days, the protein concentration in mycelium exceeded that when using a potato-sucrose medium by 86 and 69%, respectively*

*The protein concentration in the culture fluid on both nutrient media did not change significantly over the entire culture period.*

*When the fungus grew on both nutrient media, the gelatinolytic activity of the mycelium appeared at pH 5.8, 7.6, 9.2 and 10.6. However, the maximum activity at these pH values in the case of a potato-sucrose nutrient medium appeared at different times. On the Chapek-Doks medium, maximal proteolytic activity at all pH corresponded to 12 days after the beginning of culture growth.*

*The specific activity of proteinases per 1 mg of mycelium protein when the fungus growing on a potato-sucrose medium exceeded that on Chapek-Doks medium by 2.28-2.61 times, with the exception of the activity at pH 10.2.*

*However, the specific activity of extracellular proteinases per 1 mg of protein with growth of the fungus on Chapek-Dox medium was more than seven times ( $P < 0.05$ ) higher than the activity of the culture fluid of the fungus when it was cultured on potato-sucrose medium.*

**Keywords:** *mycelial culture, nutrient media, protein concentration, intracellular and extracellular gelatinolytic proteinases*

В предыдущих статьях мы, ссылаясь на экспертный анализ, уже упоминали проблемы обеспечения полноценным белком рационов питания населения и животных в мировом масштабе [1, 2]. Так, только в России, по данным экспертов проекта «Протеин России», недостаток кормовых белков составляет 770 тыс. тонн, а общий дефицит белков в России – 2 млн. тонн/год. Ликвидировать дефицит белка только за счет расширения посевных площадей или увеличения поголовья скота невозможно. Необходимо расширять диапазоны поиска альтернативных источников белка [3].

К числу альтернативных источников белка относятся грибы, содержащие 30–50% белков с аминокислотным составом сопоставимым с рекомендациями ФАО (FAO). Грибы достаточно богаты витаминами, в первую очередь группы В, и целым рядом других биологически активных субстанций [4]. Одним из представителей их является, в частности, вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*).

В этом плане все большее внимание привлекает глубинное жидкофазное культивирование вешенки. Однако пока по данному вопросу в литературе имеется лишь весьма ограниченная информация.

Между тем, интенсификация технологии глубинного культивирования мицелия гриба

диктует необходимость детального уяснения механизмов регуляции метаболизма как основы жизнедеятельности, к числу которых относится система протеолиза.

В мировой литературе публикации о протеолитическом потенциале *P. ostreatus* немногочисленны, тем более, что набор протеиназ существенно зависит от состава питательной среды и условий культивирования.

Ранее было установлено, что мицелий и культуральная жидкость *P. ostreatus* при культивировании в течение 14 дней на питательной среде «отвар картофеля+сахароза» при pH 7,4 расщепляют с различной интенсивностью гемоглобин, желатин, казеин и фибриноген [5].

Желатинолитическая активность мицелия проявлялась в широком диапазоне pH и была наиболее высока в диапазоне pH 5,8–8,0 с дополнительными максимумами при pH 9,0 и 10,5. Что касается протеиназ культуральной жидкости, то pH-зависимость желатинолитической активности была близка таковой гомогенатов мицелия гриба [1].

Эта активность умеренно (на 38–61%) угнеталась диизопропилфосфатом и реагентами, связывающими металлы. Активность «щелочных» желатиназ полностью подавлялась диизопропилфторфосфатом, *p*-хлормеркурибензоатом и *o*-фенантролином. Судя по ингибиторному анализу, желатино-

литическая активность культуральной жидкости обусловлена, в основном, сериновыми протеиназами [1].

Вместе с тем оказалось, что желатинолитическая активность протеиназ мицелия вешенки с рН-оптимумом при 9,2 и протеиназ культуральной жидкости с рН-оптимумом при 7,6 была слабо чувствительна ко всем использованным нами в исследовании группоспецифическим ингибиторам [1]. Это позволяет предположить наличие среди протеиназ данного гриба пептидогидролаз иного типа. Их природа нуждается в дальнейших исследованиях.

Более того, в источниках литературы практически отсутствуют материалы о состоянии системы протеолиза вешенки в процессе развития мицелиальной культуры этого гриба.

Цель настоящей статьи – раскрыть изменения интрацеллюлярной и экстрацеллюлярной системы протеолиза мицелиальной культуры *P. ostreatus* по желатинолитической активности в динамике развития культуры.

**Материалы и методы.** При проведении исследований использовали бактоагар (Melford, USA), желатин (Fluka, Germany). Остальные реактивы были квалификации «хч» производства стран СНГ.

Исследования выполнены на «диком» штамме *Pleurotus ostreatus*, выделенном кандидатом биол. наук доцентом Е.О. Юрченко в 2014 г. из плодовых тел гриба, растущего на культурном тополе (*Populus sp.*) в г. Минске.

Глубинное культивирование вешенки проводили в стеклянных колбах емкостью 500 мл при температуре 27 °С на качалке модели WiseShakeSHO-2D и режиме перемешивания 70 об/мин., как было описано нами ранее [1]. Для культивирования использовали два варианта питательных сред: отвар картофеля с добавлением сахарозы (30 г/л) [6], и среду Чапека-Докса [7]. При этом в последнюю вместо сахарозы добавляли водорастворимый крахмал (30 г/л), а также раствор микроэлементов по Хогланду (1 мл/л). Среды инокулировали участком мицелия 1 см<sup>2</sup> на картофельно-сахарозном агаре.

На 4, 6, 8, 10, 12 и 14-е сутки отбирали аликвоты культуральной жидкости (по 1 мл),

и биомассы гриба. Мицелий отмывали, максимально просушивали на фильтровальной бумаге, навески по 500 мг помещали в пробирки типа эппендорфа. Культуральную жидкость использовали без дополнительного разведения. Мицелий вешенки гомогенизировали в течение 2 мин в бидистиллированной воде при 4 °С, центрифугировали 10 мин при 4 С и 8000 об/мин. Осветленный гомогенат использовали для дальнейших исследований.

Протеолитическую активность определяли по расщеплению желатина в тонком слое агарового геля [8]. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали 0,15 М раствор NaCl (рН 7,4). В зависимости от величины рН, при которой определяли протеолитическую активность, к исследуемым образцам добавляли 0,2 М ацетатный буфер рН 5,8 или 0,05 М трис-НСl буфер рН 7,6 или 0,1 М боратный буфер рН 9,2 и 10,6. Эти значения рН выбраны, исходя из ранее полученных результатов о рН-зависимости желатинолитической активности гриба [1].

Количество белка определяли колориметрическим методом по Бредфорду [9].

Все исследования проведены не менее чем трехкратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программ *Statistica 6.0* по *t*-критерию Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Накопление биомассы мицелия вешенки в динамике роста культуры на избранных питательных средах заметно различалось. На картофельно-сахарозной среде оно существенно превышало таковое на среде Чапека-Докса, начиная уже с четвертых суток – в 2,26 раза. Однако через 10 дней эта разница составила лишь 2,1, а через 14 дней – 5,92% соответственно. Следует отметить, что на картофельно-сахарозной среде прирост биомассы в период с 10 по 14 сутки составлял 2,17%. В тот же период увеличение биомассы на среде Чапека-Докса не превышало 1,1% (таблица 1, рисунок 1а).

Концентрация белка в мицелии гриба на картофельно-сахарозной среде в период 4–10 суток практически не различалась, а к 12 суткам уровень его снижался на 51% (таблица 2, рисунок 1б,  $P < 0,05$ ).

Таблица 1. – Динамика накопления биомассы (г) мицелия вешенки обыкновенной в динамике роста культуры на питательных средах ( $n=3$ )

Время культивирования, сутки	Масса мицелия при росте	
	на картофельно-сахарозной среде	среде Чапека-Докса с водорастворимым крахмалом
4	0,52 ± 0,02	0,23 ± 0,01
6	1,31 ± 0,01	0,33 ± 0,01
8	1,30 ± 0,03	0,41 ± 0,01
10	2,05 ± 0,09	0,68 ± 0,01
12	2,36 ± 0,13	0,70 ± 0,01
14	4,44 ± 0,09	0,75 ± 0,01

Что касается среды Чапека-Докса, то в период 4–10 сутки культивирования гриба на ней концентрация белка в мицелии возрастала в 2,49 раза ( $P < 0,05$ ), и лишь к окончанию культивирования наблюдалось небольшое уменьшение концентрации его не более 9%. При этом уровень белка на среде Чапека-Докса через 10 дней практически не отличался (различия – 7%) от такового на картофельно-сахарозной среде, а через 14 дней содержание белка в мицелии на среде Чапека-Докса превышало таковое на 49% ( $P < 0,05$ ) в мицелии на картофельно-сахарозной среде.

При росте на среде Чапека-Докса через 12 и 14 суток мицелий был более обогащен белком. Его концентрация превышала таковую в мицелии при культивировании вешенки на картофельно-сахарозной среде на 86 и 69% соответственно ( $P < 0,05$ ).

Как видно из представленных данных, концентрация белка в культуральной жидкости на обеих питательных средах за весь период культивирования существенных изменений не претерпела (таблица 2). Соотношение содержания белка в мицелии к таковому в культуральной жидкости при росте на картофельно-сахарозной среде через 10 дней составляло 8,14, а через 14 суток – 16,44. Вместе с тем, в эти же сроки на среде Чапека-Докса это отношение равнялось 33,33 и 29,33 соответственно, что свидетельствует о преимущественном накоплении белка именно в мицелии при росте на данной питательной среде.

На использованных в экспериментах обеих питательных средах при росте гриба желатинолитическая активность мицелия проявлялась при pH 5,8, 7,6, 9,2 и 10,6. Однако максимум активности при этих величинах pH в случае картофельно-сахарозной питательной среды проявился в разное время. Тогда как на среде Чапека-Докса он во всех случаях соответствовал 12 дням после начала роста культуры (таблица 3, рисунок 2).

Активность протеиназ при pH 5,8 и 7,6 на картофельно-сахарозной среде была максимальной через 4 суток. В дальнейшем она существенно не изменялась или снижалась. Однако снижение не превышало 12%, за исключением активности протеиназ при pH 7,6 через 14 дней, где снижение активности составило 19% (таблица 3, рисунок 2,  $P < 0,05$ ).

Аналогичная картина наблюдалась с протеиназами при pH 9,2, активность которых на протяжении всего культивирования изменялась не более чем на 16%. Активность желатинолитических протеиназ мицелия, выросшего на картофельно-сахарозной среде, при pH 10,6 так же принципиально не изменялась на протяжении 12 дней (колебания не превышали 10%). И лишь через 14 дней она снижалась на 22% ( $P < 0,05$ ).

В отличие от этого, при культивировании мицелия на среде Чапека-Докса желатинолитическая активность при pH 5,8 через 8 дней снижалась на 23%. Однако через 12 дней она достигала максимальной величины.

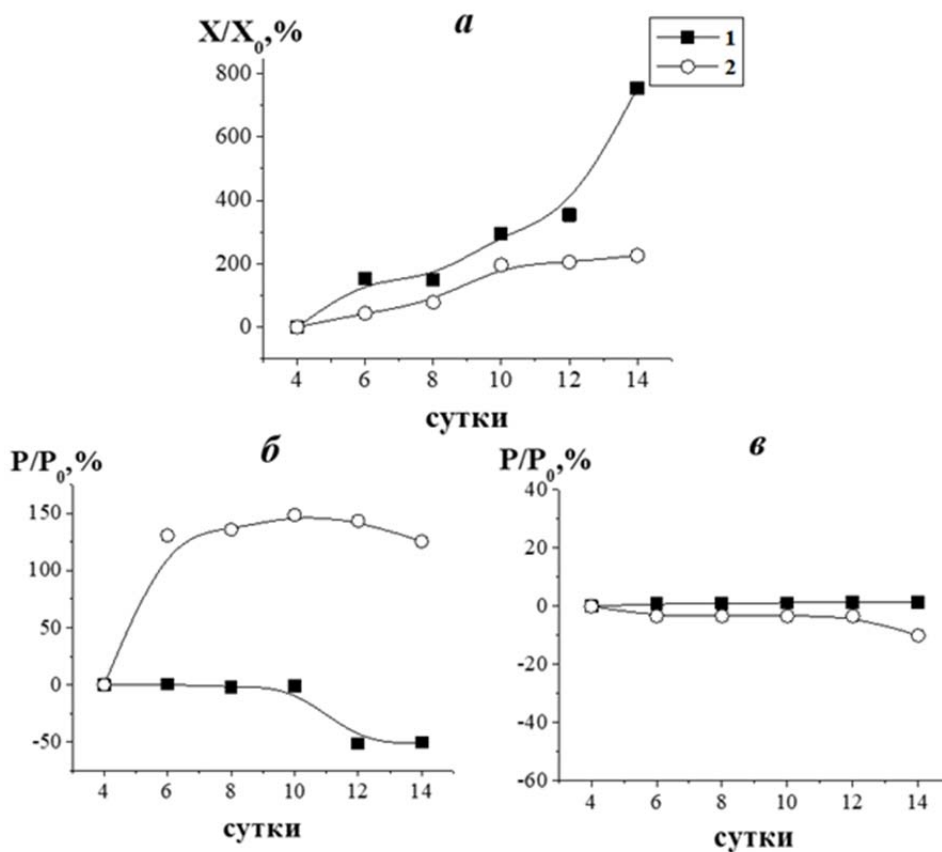


Рисунок 1. – Динамика (% к 4-м суткам роста, принятым за 100%) биомассы (а) и концентрации белка в мицелии (б) и культуральной жидкости (в) вешенки обыкновенной при росте на картофельно-сахарозной среде (1) и среде Чапека-Докса с водорастворимым крахмалом (2)

Таблица 2. – Концентрация белка в мицелии (мг/г) и культуральной жидкости (мг/мл) при росте культуры вешенки на питательных средах ( $n=9$ )

Время культивирования, сутки	Концентрация белка	
	в мицелии	в культуральной жидкости
Картофельно-сахарозная питательная среда		
4	$1,05 \pm 0,004$	$0,30 \pm 0,01$
6	$1,06 \pm 0,002$	$0,29 \pm 0,01$
8	$1,03 \pm 0,003$	$0,29 \pm 0,02$
10	$1,04 \pm 0,006$	$0,29 \pm 0,01$
12	$0,51 \pm 0,001$	$0,29 \pm 0,01$
14	$0,52 \pm 0,005$	$0,27 \pm 0,02$
Питательная среда Чапека-Докса с растворимым крахмалом		
4	$0,39 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$
6	$0,90 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,02$
8	$0,92 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,03$
10	$0,97 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,03$
12	$0,95 \pm 0,32$	$0,03 \pm 0,03$
14	$0,88 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,01$

Ее увеличение составило 32% в сравнении с активностью на 4 сутки ( $P < 0,05$ ). Желатинолитическая активность мицелия при pH 7,6 возрастала через 8, 10 и с максимумом через 12 дней на 30, 64 и 92% соответственно ( $P < 0,05$ ).

Что касается желатинолитической активности при pH 9,2, то она достигала максимума также через 12 дней культивирования. Ее увеличение в сравнении с 4 днями составило

31,5% (однако  $P > 0,05$ ). Вместе с тем, через 6 дней отмечено умеренное (21%,  $P < 0,05$ ) снижение этой активности.

Желатинолитическая активность мицелия при pH 10,6 при росте на среде Чапека-Докса достигала максимума опять-таки через 12 суток: увеличение в сравнении с исходной активностью составило 32% ( $P < 0,05$ ). В остальные сроки культивирования ее изменения не превышали 12%.

Таблица 3. – Изменения желатинолитической активности ( $\text{мм}^2$  площади лизиса желатина) протеиназами гомогената мицелия вешенки обыкновенной в динамике роста культуры ( $n=9$ )

Время культивирования, сутки	Желатинолитическая активность при pH			
	5,8	7,6	9,2	10,6
Картофельно-сахарозная среда				
4	335,0 ± 23,1	355,0 ± 12,4	317,7 ± 27,4	318,5 ± 61,6
6	296,8 ± 25,4	287,4 ± 32,0	296,2 ± 32,6	343,7 ± 30,4
8	318,4 ± 21,2	297,3 ± 20,9	288,9 ± 42,2	317,8 ± 15,7
10	339,5 ± 23,1	324,4 ± 26,5	265,7 ± 24,5	308,5 ± 16,1
12	333,7 ± 13,9	324,0 ± 19,2	304,4 ± 29,5	347,8 ± 33,0
14	294,9 ± 26,7	283,2 ± 17,7	265,7 ± 36,3	248,0 ± 22,0
Питательная среда Чапека-Докса с растворимым крахмалом				
4	183,4 ± 25,9	148,0 ± 44,7	172,2 ± 22,3	176,9 ± 23,6
6	151,6 ± 20,9	127,3 ± 11,7	136,3 ± 22,6	157,4 ± 22,1
8	139,8 ± 34,3	193,2 ± 26,0	167,9 ± 33,9	156,0 ± 10,0
10	212,6 ± 24,6	243,8 ± 52,9	228,8 ± 17,3	188,6 ± 24,7
12	241,8 ± 53,0	283,5 ± 48,9	233,0 ± 26,1	232,8 ± 28,5
14	189,9 ± 28,4	179,3 ± 31,6	189,7 ± 38,1	164,3 ± 19,6

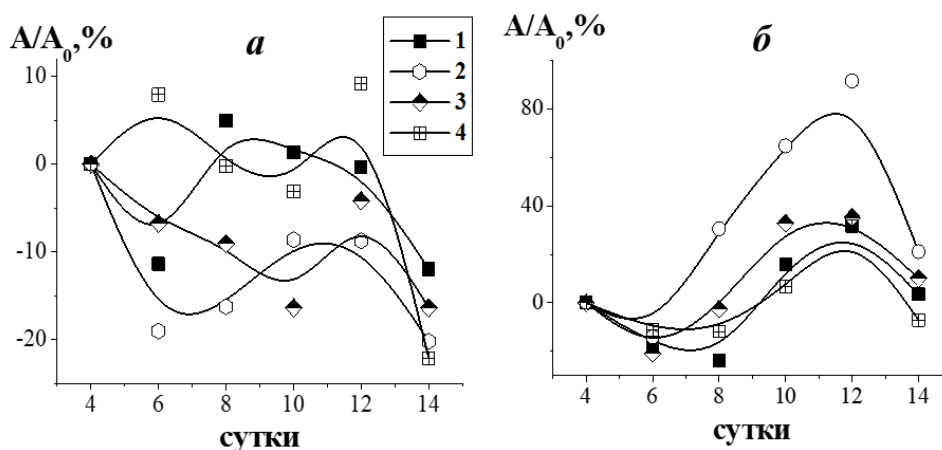


Рисунок 2. – Изменения желатинолитической активности мицелия вешенки обыкновенной (% к 4-м суткам роста, принятым за 100%) при росте культуры на картофельно-сахарозной среде (а) и среде Чапека-Докса с водорастворимым крахмалом (б) при pH реакционной среды: 5,8 (1); 7,6 (2); 9,2 (3) и 10,6 (4)

Судя по полученным результатам, максимальная активность желатинолитических протеиназ мицелия при pH 5,8, 9,2 и 10,6 при росте на картофельно-сахарозной среде в сравнении с таковой мицелия, полученного на Чапека-Докса, была выше, соответственно, на 40, 36 и 48% ( $P < 0,05$ ).

Удельная активность, рассчитанная для этапов культивирования, в которых наблюдали максимальную активность, на картофельно-сахарозной среде составляла 664,2, 682,7, 611,5 и 147,5 мм<sup>2</sup>/мг белка. На среде Чапека-Докса в эти же интервалы удельная активность мицелия составляла 254,8, 298,9, 245,3 и 245,3 мм<sup>2</sup>/мг белка соответственно.

Следовательно, удельная протеолитическая активность мицелия при росте на картофельно-сахарозной среде превосходила таковую на среде Чапека-Докса в 2,28 – 2,61 раза ( $P < 0,05$ ). Исключение составила желатинолитическая активность при pH 10,2: при росте мицелия на среде Чапека-Докса его желатинолитическая активность превышала таковую при росте на картофельно-сахарозной среде в 1,66 раза ( $P < 0,05$ ).

Динамика желатинолитической активности культуральной жидкости при pH 5,8 и 7,6 при культивировании мицелия на обеих питательных средах также различалась, хотя не столь сильно, как активность мицелия (таблица 4, рисунок 3).

При росте на картофельно-сахарозной среде активность протеиназ при pH 5,8 достигала максимума через 12 дней – ее прирост, в сравнении в 4-м днем, составил 19,1% ( $P < 0,05$ ). В последующий период она снижалась практически до уровня 4-го дня. Изменения желатинолитической активности при pH 7,6 культуральной жидкости на этой питательной среде носили колебательный характер. Через 8 дней она возрастала в сравнении с 4-м днем на 23,6% ( $P < 0,05$ ). Через 10 дней ее уровень на отличался от такового через 4 дня от начала культивирования, а через 12 дней эта активность была выше последней на 20,5% ( $P < 0,05$ ).

При культивировании мицелия на среде Чапека-Докса колебания желатинолитической активности культуральной жидкости были менее выраженными и, в целом, при обоих значениях pH достаточно близкими. Колебания активности протеиназ в динамике роста культуры не превысили 14%.

Удельная же активность протеиназ культуральной жидкости при pH 5,8 и 7,6 и росте гриба на картофельно-сахарозной среде составляла 534,5 и 554,1 мм<sup>2</sup>/мг белка соответственно, тогда как на среде Чапека-Докса эти величины были равны 4035,3 и 3965,5 мм<sup>2</sup>/мг белка, что более чем в семь раз ( $P < 0,05$ ) превышало активность культуральной жидкости гриба при культивировании на картофельно-сахарозной среде.

Таблица 4. – Изменения желатинолитической активности (мм<sup>2</sup> площади лизиса желатина) протеиназами культуральной жидкости вешенки обыкновенной в динамике роста культуры ( $n=9$ )

Время культивирования, сутки	Желатинолитическая активность при pH	
	5,8	7,6
Картофельно-сахарозная среда		
4	130,6 ± 8,7	130,0 ± 17,0
6	118,5 ± 14,3	118,7 ± 12,9
8	136,5 ± 22,8	160,7 ± 12,5
10	129,1 ± 13,7	135,5 ± 17,6
12	155,5 ± 24,2	156,6 ± 25,1
14	125,9 ± 12,7	112,4 ± 11,2
Питательная среда Чапека-Докса с растворимым крахмалом		
4	107,7 ± 8,32	105,5 ± 27,2
6	117,5 ± 16,42	115,7 ± 11,2
8	107,4 ± 15,9	105,0 ± 21,8
10	110,1 ± 14,5	108,3 ± 13,2
12	102,8 ± 16,1	91,9 ± 4,5
14	115,2 ± 21,0	101,2 ± 19,5

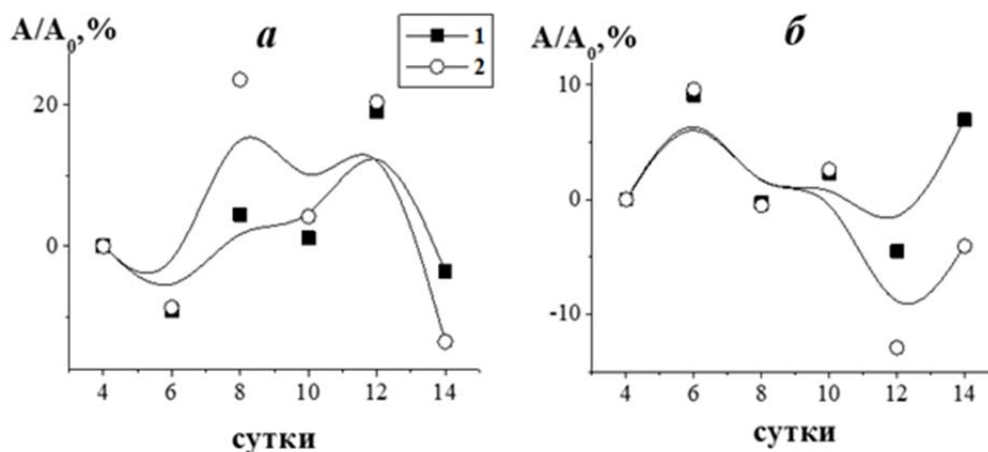


Рисунок 3. – Изменения желатинолитической активности культуральной жидкости вешенки обыкновенной (% к 4-м суткам роста, принятым за 100%) при росте культуры на картофельно-сахарозной среде (а) и среде Чапека-Докса с водорастворимым крахмалом (б) при pH реакционной среды: 5,8 (1); 7,6 (2)

Следует отметить, что в картофельно-сахарозной среде нами было обнаружено небольшое количество белков –  $0,1049 \pm 0,0001$  мг/мл. Это дает основания полагать, что указанная среда содержит также пептиды и аминокислоты. Однако подробно ее состав не изучен. Содержание остаточных белков (вероятно, термостабильных) в картофельно-сахарозной среде, таким образом, было невелико. Однако это достаточно для стимуляции продукции экстрацеллюлярных протеиназ.

**Заключение.** Итак, показана четкая зависимость активности желатинолитической активности протеиназ мицелия и культуральной жидкости вешенки в динамике роста на двух различных питательных средах. Несмотря на кажущуюся тривиальность такого вывода, ранее в литературе этот вопрос практически не рассматривали. Используемые в эксперименте питательные среды различались принципиально. Картофельно-сахарозная среда – сложная питательная среда неопределенного состава, содержащая легко метаболизируемый дисахарид. Более того, судя по подученным данным, что в ее составе присутствуют термостабильные белки, а также пептиды и аминокислоты. Хорошо известно, что аминокислоты питательной среды, не говоря уже о белках, способны интенсифицировать продуцирование экстрацеллюлярных протеиназ микроорганизмами [10].

Среда Чапека-Докса в оригинале синтетическая. Однако дисахарид в ней мы заменили водорастворимым крахмалом, что делает ее полусинтетической. В ее составе исключено наличие белков, пептидов или аминокислот.

Тем примечательнее, что на такой полусинтетической среде белок концентрируется преимущественно в мицелии, а удельная активность внеклеточных протеиназ существенно превосходит таковую при использовании для роста мицелия картофельно-сахарозной среды. Это важный момент для выделения и очистки протеиназ из культуральной жидкости.

#### Список литературы

1. Кульгавеня, А. Д. Протеолитическая активность мицелиальной культуры гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании / А. Д. Кульгавеня, В. Н. Никандров // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2020. – № 1. – С. 12-23.
2. Кульгавеня, А. Д. О протеиназах вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*). / А. Д. Кульгавеня, И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // Сборник материалов V международной научно-практической конференции *online-offline* «Биотехнология: достижения и перспективы развития», Пинск, 2021. – С. 29–32.



3. Рождественская, Л. Н. Анализ вызовов и современных тенденций развития технологий на рынке белков / Л. Н. Рождественская, Е. С. Бычкова, А. Л. Бычков // Пищевая промышленность. – 2018. – № 5. – С. 42–47.
4. Стахеев, И. В. Биотехнология малотоннажного производства микробного протеина / И. В. Стахеев, Э. И. Коломиец, Н. А. Здор // Минск: «Навука і тэхніка». – 1991. – 264 с.
5. Жук, О. Н. Влияние хлорида марганца (II) на протеолитическую активность гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании / О. Н. Жук, И. А. Ильчук, А. Д. Кульгавеня, В.Н. Никандров // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2017. – № 1. – С. 62–68.
6. Чугай, А. С. Апробация питательных сред на основе корнеплодов для глубинного культивирования вешенки обыкновенной / А. С. Чугай, Е. С. Гришан, Н. С. Коломацкая // Материалы X международной молодежной науч.-практ. конференции «Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси». – Пинск. – 2016. – Ч. I. – С. 520–522.
7. Практикум по микробиологии: учеб. пособие / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
8. Никандров, В. Н. Методы исследования протеолиза. Глава 5 / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // Современные проблемы биохимии. Методы исследований. – Минск: Выш. шк. – 2013. – С. 132–157.
9. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
10. Лория, Ж. К. Влияние аминокислот на синтез внеклеточной протеазы у *Serratia marcescens* / Ж. К. Лория, Б. Брокнер, Н. С. Егоров // Микробиология. – 1977. – Т. 46, № 1. – С. 41–45.
1. Kul'gavenya, A.D., Nikandrov V.N. Proteolitichestskaya aktivnost' micelial'noj kultury griba veshenka obyknovennaya (*Pleurotus ostreatus*) pri glubinnom kul'tivirovanii [Proteolytic activity of fungus pleurotus ostreatus mycelial culture in deep-liquid cultivation]. *Vesnik Paleskaga dzyarzhaynaga universiteta. Seryya pryrodaznaŭchyh navuk nauk* [Bulletin of Polesky State University. Series in Natural Sciences], 2020, no 1, pp. 12-23. (In Russian)
2. Kul'gavenya A.D., Il'yuchik I.A., Nikandrov V.N. O proteinazah veshenki obyknovenoj (*Pleurotus ostreatus*). *Sbornik materialov V mezhdunarodnoj nauchno–prakticheskoy konferencii online-offline «Biotekhnologiya: dos-tizheniya i perspektivy razvitiya»*. Pinsk, 2021, S. 29–32.
2. Rozhdestvenskaya L.N., Bychkova Ye.S., Bychkov A.L. Analiz vyzovov i sovremnykh tendentsiy razvitiya tekhnologiy na rynke belkov [Analysis of challenges and current trends in development technology in the protein market]. *Pishchevaya promyshlennost'* [Food Industry], 2018, no. 5, pp. 42–47. (In Russian)
4. Stakheyev I.V. Kolomiyets E.I., Zdor N.A. *Biotekhnologiya malotonnazhnogo proizvodstva mikrobnogo proteina* [Biotechnology of small tonnage production of microbial protein]. Minsk: «Navuka i tekhnika» [Science and Technology], 1991, 264 p. (In Russian)
5. Zhuk O.N., Il'yuchik I.A., Kul'gavenya A.D., Nikandrov V.N. Vliyaniye khlorida margantsa (II) na proteoliticheskuyu aktivnost' griba veshenka obyknovennaya (*Pleurotus ostreatus*) pri glubinnom kul'tivirovanii [Effect of Manganese (II) Chloride on the Proteolytic Activity of *Pleurotus Ostreatus* Mushroom at Periodic Culture]. *Vestnik Polesskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya prirodovedcheskih nauk* [Bulletin of Polesky State University. Series in Natural Sciences], 2017, no. 2, pp. 62–68. (In Russian)
6. Chugay A.S., Grishan Ye.S., Kolomatskaya N.S. Aprobatsiya pitatel'nykh sred na osnove korneplodov dlya glubinnogo kul'tivirovaniya veshenki obyknovenoj. [Testing of nutrient media based on root crops for deep cultivation of oyster mushroom]. *Materialy X mezhdunarodnoy molodezhnoy nauch.-prakt. konferentsii «Nauchnyy potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi»*, Pinsk, 2016. CH. I, pp. 520–522. (In Russian)

#### References

7. Netrusov A. I., Egorova M.A., Zaharchuk L.M. *Praktikum po mikrobiologii: Ucheb. posobie dlya stud. vyssh. ucheb. zavedenij* [Workshop on microbiology: Textbook. university student manual]. M.: Izdatel'skij centr «Akademiya»[Academy], 2005, 608 p. (In Russian)
8. Nikandrov V.N., Pyizhova N.S. Metodyi issledovaniya proteoliza. Glava 5. [Methods for the study of proteolysis. Chapter 5]. *Sovremennyye problemy biohimii. Metodyi issledovaniy* [Modern problems of biochemistry. Research methods]. Minsk: Visheyschaya shkola, 2013, pp. 132-157. (In Russian)
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: *Anal. Biochem*, 1976, Vol. 72, pp. 248–254.
10. Loriya Zh.K., Brokner B., Egorov N.S. *Vliyanie aminokislot na sintez vnekletchnoj proteazy u Serratia marcescens* [Effect of amino acids on the synthesis of extracellular protease in *Serratia marcescens*]: *Mikrobiologiya* [Microbiology]. 1977. Vol. 46, no 1, pp. 41–45. (In Russian).

*Received 7 October 2021*