

УДК 541.49:546.732/3:547.496.2

О.В. ГУДЗЕНКО, к. б. н., ст. дослід., ст. наук. співроб.,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: alena.gudzenko81@gmail.com
ORCID 0000-0002-6103-6109

М.Д. ШТЕНІКОВ, к. б. н., ст. наук. співроб.,
Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65029, Україна
e-mail: shtenikovnik@gmail.com
ORCID 0000-0002-2036-0412

Л.Д. ВАРБАНЕЦЬ, д. б. н., проф., зав. відділу,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: varbanets_imv@ukr.net
ORCID 0009-0000-1172-4088

В.О. ІВАНИЦЯ д. б. н., проф., чл.-кор. НАН України, проректор,
Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65029, Україна
e-mail: v_ivanit@ukr.net
ORCID 0000-0001-5325-3800

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ КУЛЬТИВУВАННЯ НА АКТИВНІСТЬ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ЕНЗИМІВ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ З ГЛИБОКОВОДНИХ ВІДКЛАДІВ ЧОРНОГО МОРЯ

*Визначено, що температура культивування продуцентів відіграє суттєву роль для досягнення максимальної еластазної, фібриногенолітичної і колагеназної активності досліджуваних штамів *Bacillus subtilis* 1, *Priestia megaterium* 55 і *Bacillus licheniformis* 249, виділених з глибоководних відкладів Чорного моря. Показано, що динаміка синтезу ензимів у досліджуваних штамів за різних температур відрізняється.*

Ключові слова: бактерії з глибоководних відкладів Чорного моря, температура культивування, еластолітична, фібриногенолітична, колагеназна активність.

Серед ряду біологічно активних речовин одне з провідних місць у практичному застосуванні в різних галузях промисловості та медицини посідають ензими. Використання ензимів мікробного походження ви-

Ц и т у в а н н я: Гудзенко О.В., Штеніков М.Д., Варбанець Л.Д., Іваниця В.О. Вплив температури культивування на активність протеолітичних ензимів бактерій, виділених з глибоководних відкладів Чорного моря. *Гідробіол. журн.* 2024. Т. 60, № 2. С. 108—118.

гідне як з економічної, так і з екологічної точки зору. Основну частину ензимів світового ринку складають протеази [1, 5—7, 10, 13]. Вони широко використовуються при переробленні побутових відходів, у сільському господарстві, харчовій промисловості. Не менш перспективним є впровадження термостабільних протеаз у вітчизняне виробництво м'яких засобів [1, 10]. Біотехнологічний спосіб одержання ензимних препаратів залишається найдоцільнішим за економічністю та ефективністю. Тому пошук нових продуцентів ензимів серед мікроорганізмів, зокрема бактерій, які залишаються ефективними продуцентами позаклітинних протеаз для промислових виробництв, є актуальним напрямом досліджень [1, 6, 7, 10]. Відомо [1—7, 10, 13], що мікроорганізми синтезують різні протеази, особливе значення серед яких мають ті, що здатні розщеплювати важкорозчинні протеїни, такі як колаген, еластин, фібрин. Такі протеази можуть бути використані при створенні медичних препаратів для лікування трофічних виразок, гнійних ран, опіків, для розчинення фібринових згустків та ін. [3, 4].

В результаті скринінгу активних продуцентів протеолітичних ензимів серед 20 культур бактерій, ізольованих з глибоководних осадов Чорного моря, було відібрано три штами, які проявляли найбільшу еластазну, фібриногенолітичну і колагеназну активність. При роботі з продуцентами ензимів одним із завдань дослідника є одержання ензимів з підвищеною активністю. Одним з визначальних факторів, які впливають на цей процес, є температура культивування продуцента. Оскільки штами-продуценти були виділені з глибоководних осадов Чорного моря, де температура завжди складає 5 °С, важливим було дослідити можливість збільшити активність ензимів шляхом підвищення температури культивування продуцента. Тому метою роботи було визначити оптимальні температури культивування продуцентів, необхідні для досягнення максимальної активності еластазної, фібриногенолітичної і колагеназної активності досліджуваних штамів *Bacillus subtilis* 1, *Priestia megaterium* 55 і *Bacillus licheniformis* 249.

Матеріал і методика досліджень

Об'єктами дослідження були штами *Bacillus subtilis* 1, *Priestia megaterium* 55 і *Bacillus licheniformis* 249, виділені з донних відкладів на глибинах 1499 та 1537 м у Чорному морі, з відповідних горизонтів кернів донних осадов з інтервалом 5 см (таблиця). Зразки, з яких ідентифіковано штами, були відібрані під час експедиції М 84/2 Бременського університету на кораблі «Метеор» у березні 2011 р. та передані до Одеського національного університету для мікробіологічних досліджень Ю.П. Зайцевим і Б.Г. Александровим (Інститут біології моря НАН України). Відібрані штами були ідентифіковані раніше [2].

В якості базового використовували середовище такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,75; $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ — 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5; мальтоза — 1,0; желатин — 10,0; дріжджовий автолізат — 0,15, рН 7.

Таблиця

Штами бактерій

| Номери станцій, глибина, горизонти | Штами |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| ст. 242, 1499 м, 5—10 см | <i>Bacillus subtilis</i> 1 |
| ст. 233, 1537 м, 0—5 см | <i>Priestia megaterium</i> 55 |
| ст. 242, 1499 м, 15—20 см | <i>Bacillus licheniformis</i> 249 |

Культури *Bacillus subtilis* 1, *Priestia megaterium* 55 і *B. licheniformis* 249 вирощували у глибинних умовах у колбах Ерленмейера (750 мл), які містили 100 мл поживного середовища, при перемішуванні 220 об/хв, за різних температур — 12, 28 і 42 °С.

Біомасу відділяли центрифугуванням при 5000 г 45 хв, і в супернатанті культуральної рідини визначали протеолітичну активність.

Еластазну активність визначали колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ензиматичному гідролізі еластину, забарвленого конго червоним [12]. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 515 нм. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз 1 мг еластину за 1 хв. Визначення фібриногенолітичної активності проводили за методом [9], використовуючи як субстрат фібриноген. Утворення продуктів розщеплення фібриногену вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібриногенолітичної активності приймали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв.

Колагеназну активність визначали за методом [8]. Продукти розщеплення колагену визначали в реакції з нінгідрином на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 600 нм. За одиницю колагеназної активності приймали кількість мкмолей вивільненого лейцину за 1 хв.

Усі досліди проводили в 3—5 повторностях. Для проведення статистичного аналізу використовувався *t*-критерій Стьюдента. Дані представлені як середнє \pm стандартна помилка ($M \pm m$) і вважаються значущими при $p < 0,05$. Результати, представлені у вигляді графіків, опрацьовані за допомогою Microsoft Excel 2007.

Результати досліджень

Дослідження впливу температури культивування продуцента показало (рис. 1, а), що еластазна активність *Bacillus subtilis* 1 змінюється в динаміці росту. Так, на першу добу культивування при 12 °С еластазна активність в супернатанті культуральної рідини не виявлена, при температурі 28 °С культивування продуцента еластазна активність була незначною і складала 4,68 од/мл, а при 42 °С вона була максимальною — 29,83 од/мл.

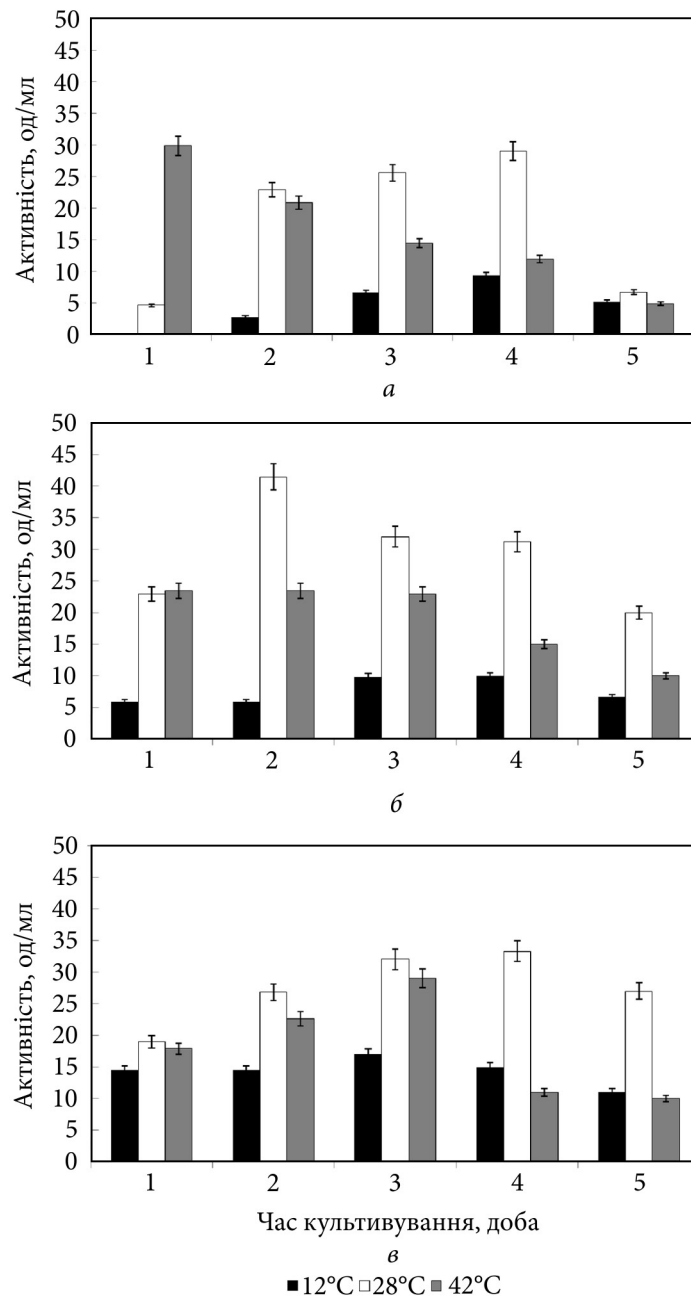


Рис. 1. Вплив температури культивування на еластазну активність *Bacillus subtilis* 1 (а), *Priestia megaterium* 55 (б) і *Bacillus licheniformis* 249 (в)

При подальшому культивуванні *B. subtilis* 1, починаючи з другої доби, спостерігали еластазну активність при всіх температурах культивування, але найвищою вона була на четверту добу при 28 °C (29,0 од/мл), тобто майже на рівні активності при 42 °C. На п'яту добу культивування елас-

ISSN 0375-8990. Гідробіологічний журнал. 2024. 60(2) 111

тазна активність була незначною, майже однаковою при всіх досліджуваних температурах вирощування. Дослідження впливу температури культивування на фібриногенолітичну активність *B. subtilis* 1 показало (рис. 2, а), що на першу добу активність не була виявлена за жодної температури вирощування продуцента. Синтез досліджуваного ензиму починається з другої доби культивування продуцента при 28 °С та 42 °С, але не при 12 °С. Максимальну фібриногенолітичну активність спостерігали на четверту добу культивування при 28 °С (16,6 од/мл).

Вивчення впливу температури культивування на колагеназну активність *B. subtilis* 1 показало (рис. 3, а), що при 12 °С вона не була виявлена в процесі культивування від першої до п'ятої доби. Максимальну колагеназну активність спостерігали з другої по четверту добу культивування продуцента при 28 °С, рівень її був однаковий і складав 0,42 од/мл. На п'яту добу культивування активність знижувалась майже в 2 рази і складала всього 0,2 од/мл.

Таким чином, показано, що лише еластазна активність *B. subtilis* 1 при 42 °С була дещо більшою (29,8 од/мл), ніж при 28 °С (29,0 од/мл), в той час як фібриногенолітична і колагеназна активність були максимальними при вирощуванні продуцента при 28 °С.

При вивченні впливу температури культивування на еластазну активність *Priestia megaterium* 55 показано (рис. 1, б), що її відмічали, починаючи вже з першої доби культивування за всіх досліджуваних температур, причому найбільш сприятливою, незалежно від доби вирощування, була температура 28 °С. Найвищу активність при даній температурі відмічали на другу добу культивування (41,4 од/мл). Дещо нижчою була активність при вирощуванні культури при 42 °С (23 од/мл), а найнижчою (5,5 од/мл) — при 12 °С.

Максимальна фібриногенолітична активність *P. megaterium* 55 відмічалась на третю добу культивування при 12 °С (15 од/мл) (рис. 2, б), що значно перевищувало активність при більш високих температурах культивування продуцента.

Так, при 28 °С фібриногенолітична активність була майже в 4 рази нижчою і складала 4 од/мл, а при температурі культивування 42 °С – була в 7,5 рази меншою і становила 2 од/мл.

На відміну від попередньо дослідженого штаму, результати впливу температури культивування на колагеназну активність *P. megaterium* 55 виявились надзвичайно цікавими (рис. 3, в). Так, на першу і п'яту добу культивування активність не була виявлена за жодної з досліджуваних температур. Максимальна колагеназна активність була виявлена на третю добу культивування при 12 °С і складала 0,25 од/мл. При збільшенні температури культивування активність пропорційно знижувалась. Аналогічні результати відмічали і на другу добу культивування. На четверту добу культивування колагеназна активність була доволі низькою і виявлена лише при 12 і 28 °С (0,05 од/мл).

Еластазну, фібриногенолітичну і колагеназну активність у *Bacillus licheniformis* 249 відмічали (рис. 1, в, 2, в, 3, в), починаючи з першої по п'яту

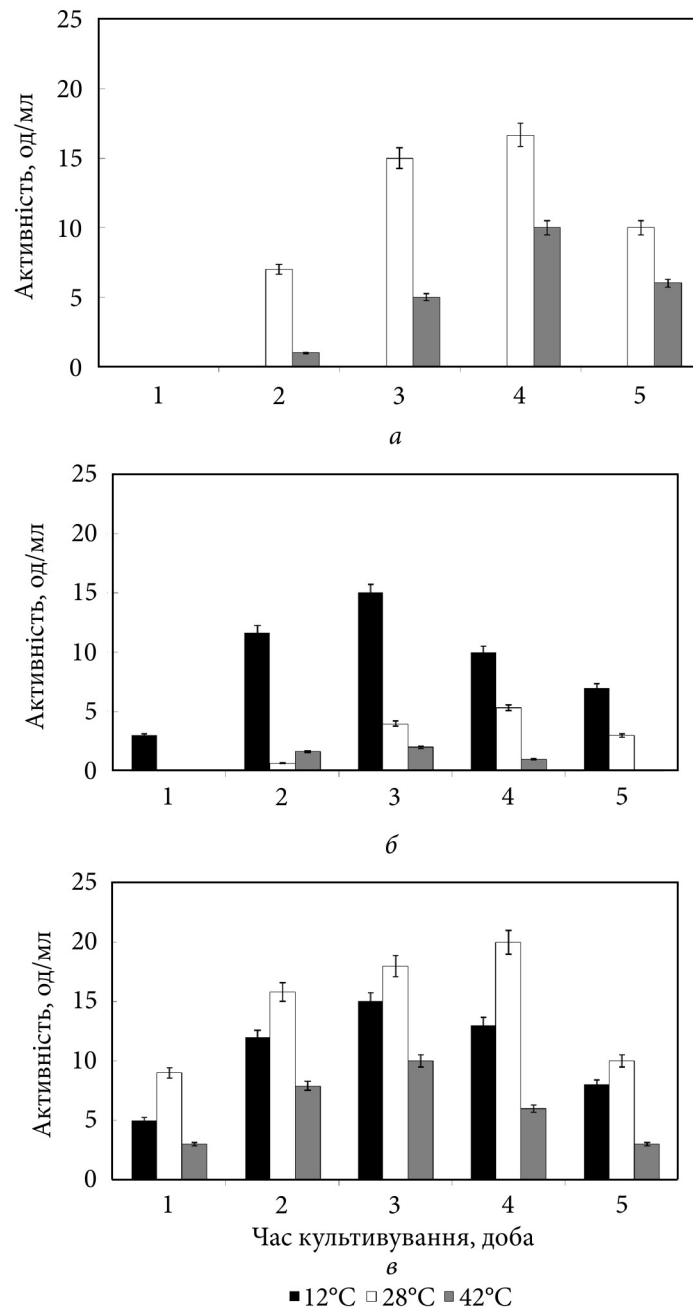


Рис. 2. Вплив температури культивування на фібриногенолітичну активність *Bacillus subtilis* 1 (а), *Priestia megaterium* 55 (б) і *Bacillus licheniformis* 249 (в)

добу культивування за всіх досліджуваних температур. Найвищою еластазна активність (33,3 од/мл) була на четверту добу культивування продуцента при 28 °С (див. рис. 1, в). Дещо нижчою була активність при вирощуванні культури як при 42, так і при 12 °С.

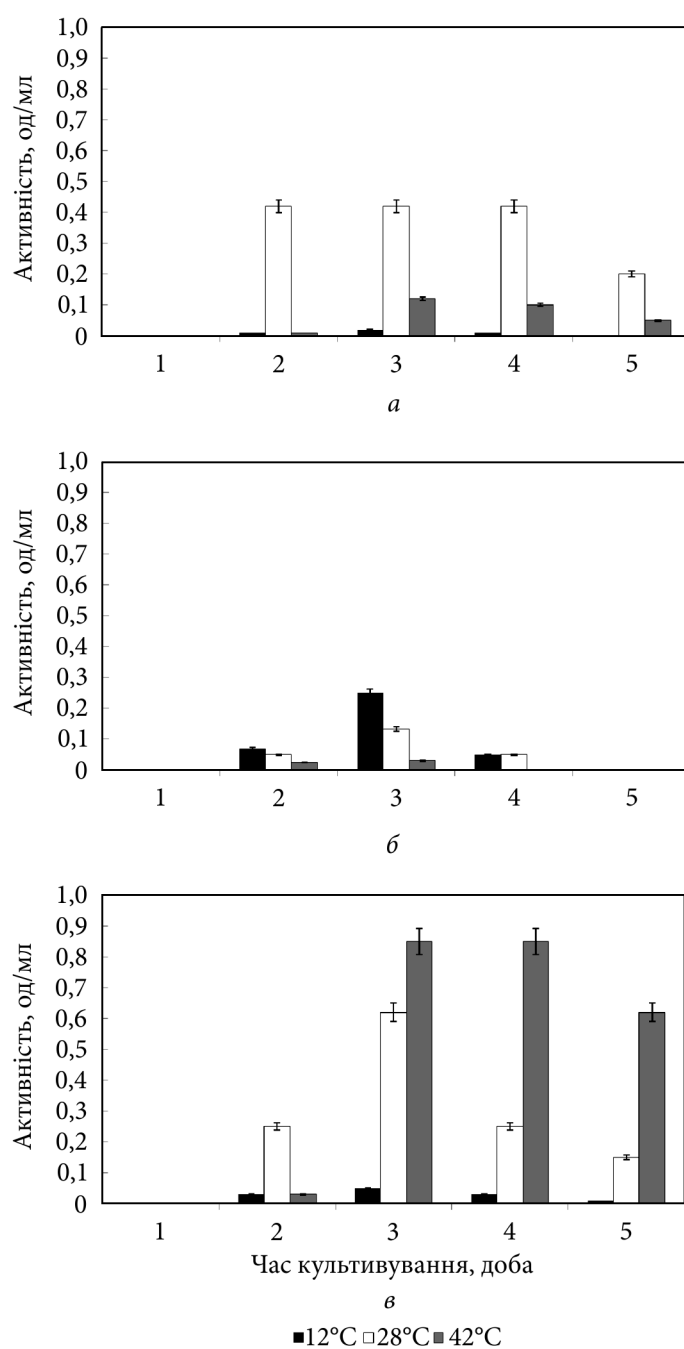


Рис. 3. Вплив температури культивування на колагеназну активність *Bacillus subtilis* 1 (а), *Priestia megaterium* 55 (б) і *Bacillus licheniformis* 249 (в)

Дослідження впливу температури культивування на фібриногенолітичну активність *B. licheniformis* 249 показало (див. рис. 2, в), що 28 °С є оптимальними незалежно від доби культивування. Максимальна фібри-

ногенолітична активність була виявлена на четверту добу культивування і становила 20 од/мл.

Цікавим виявився той факт, що при культивуванні *B. licheniformis* 249 при 12 °С фібриногенолітична активність була вищою, ніж при 42 °С, і її максимальний рівень становив 15 од/мл на третю добу вирощування продуцента.

Деяку іншу картину спостерігали при аналізі колагеназної активності *B. licheniformis* 249 (рис. 3, в). Її максимальна активність відмічалась на третю — четверту добу культивування при 42 °С і досягала 0,85 од/мл, що значно перевищувало показники колагеназної активності для *B. subtilis* 1 (0,42 од/мл) та *P. megaterium* 55 (0,25 од/мл).

При 28 °С вирощування продуцента активність була дещо нижчою і становила 0,62 од/мл на третю добу культивування та 0,25 од/мл — на четверту добу. Синтез ензима починався з другої доби культивування *B. licheniformis* 249 і лише мінімальні рівні колагеназної активності спостерігали при вирощуванні продуцента при 12 °С.

Таким чином, температура культивування мікроорганізмів відіграє суттєву роль для досягнення максимального синтезу протеолітичних ензимів. Визначення оптимальної температури вирощування дозволяє збільшити активність ензимів з еластазою, фібриногенолітичною і колагеназою дією. Показано, що динаміка синтезу ензимів у різних штамів за різних температур суттєво відрізняється.

Обговорення результатів досліджень

Протягом мільярдів років океан є джерелом життя на Землі, оскільки він містить найбільшу кількість середовищ існування, в яких проживає більшість форм життя. Але, незважаючи на безперечну спільність біологічних, у тому числі і мікробіологічних процесів, що протікають на всій планеті, біоценози Світового океану істотно відрізняються як від прісноводних, так і від наземних. Це обумовлено тим, що вони перебувають під впливом таких екстремальних умов, як глибоководні гідротермальні джерела, надзвичайна солоність, тиск, низькі температури. Конкуренція між мікроорганізмами за простір і поживні речовини в морському середовищі є потужною селективною силою, яка призвела до еволюції, яка підштовхнула морські мікроорганізми до створення різноманітних ферментних систем для адаптації до складного морського середовища [13]. Тому властивості ензимів, які продукуються морськими мікроорганізмами, можуть значно відрізнятися від наземних. Оскільки вивчені штами мікроорганізмів були виділені із глибоководних відкладів Чорного моря, де температура становить +5 °С, важливо було вивчити, як температура вирощування може вплинути на активність досліджуваних ензимів. Хоча досліджувані культури були виділені майже з однакової глибини: *B. subtilis* 1 та *B. licheniformis* 249 — 1499 м, *Priestia megaterium* 55 — 1537 м, супернатанти їхніх культуральних рідин проявляли різну ензиматичну активність як в залежності від температури, так і в динаміці росту. Так, якщо для *B. subtilis* 1 найбільша еластазна активність була майже однаковою

при 42 і 28 °С (перша та четверта доба культивування, 29,83 і 29,0 од/мл, відповідно), фібриногенолітична та колагеназна — при 28 °С (четверта та з другої по четверту добу, 16,6 та 0,42 од/мл, відповідно), то для *P. megaterium* 55 лише для еластазної активності оптимальною була температура 28 °С (друга доба, 41,4 од/мл), в той час як для фібриногенолітичної та колагеназної активності оптимальною виявилась температура 12 °С (третя та третя доба культивування, 15,0 та 0,25 од/мл, відповідно). *B. licheniformis* 249 відрізняється від вищеописаних штамів тим, що для його колагеназної активності оптимальною виявилась температура 42 °С (третя – четверта доба, 0,85 од/мл), в той час як для еластолітичної та фібриногенолітичної активності — 28 °С (четверта доба, 33,3 од/мл та четверта доба, 20 од/мл, відповідно).

Підвищення активності ензимів, одержаних з культур, що вирощені за низьких температур, можна розглядати як один з механізмів адаптації організму до умов навколишнього середовища. В той час як зниження активності при підвищенні температури культивування пов'язане зі збільшенням швидкості денатурації позаклітинного ензиму вже під час культивування. Разом з тим деякі ензими можуть проявляти активність при культивуванні штаму-продуцента як за високих, так і за низьких температур. Одержані результати свідчать, що особливості досліджених штамів залежать від властивостей ензимів, зокрема їхньої структурної організації.

Роботи, присвячені дослідженням впливу температури культивування на прояв активності протеолітичних ензимів морських мікроорганізмів, на сьогодні в літературі майже відсутні. Разом з тим деякі автори [5] показали, що у східній частині Індійського океану через зміну температури води, солоності і рівня фосфатів спостерігаються зміни в мікробному різноманітті донних осадів. Дев'ять різних культур з морських зразків Індійського океану, здатних рости в присутності 10 % NaCl, були виділені авторами [5]. Оптимальною для їхнього росту була температура 30 °С, рН середовища 7,0—8,0. Жодна з культур не здатна була рости при температурі вище 45 °С і нижче 15 °С. Безклітинний екстракт лише однієї культури, яка належить до роду *Marinobacter* MBRI 7, проявляв протеолітичну активність. Виявлено, що оптимальна температура та рН для активності становили 40 °С та 7,0 відповідно. Неочищений фермент був стабільним за температури 30—80 °С і рН 5,0—9,0. Він зберігав 60 % активності при витримуванні при 80 °С протягом 4 год та понад 70 % активності — за 70 °С через 1 год. Цікаво, що фермент зберігав 50 % активності при рН 9,0 протягом 1 год. Порівняння з іншими протеазами з різних мікробних джерел дало можливість авторам припустити, що нейтральна протеаза з галотолерантного морського ізоляту *Marinobacter* MBRI 7 є новим ферментом з високою термостабільністю.

Також лише в одного з 33 бактеріальних ізолятів, виділених з морських біотопів на о. Кінг-Джордж (Антарктида), була виявлена висока протеолітична активність [13]. Цей ізолят був ідентифікований як *Pseudoalteromonas* sp. P96-47. Оптимальною температурою його росту було 20 °С, а

синтезу протеази — 15 °С. Протеази були очищені з культурального супернатанта *Pseudoalteromonas* sp. P96-47 і показано, що вони представляють нейтральні металопротеази, оптимум дії яких становив 45 °С. Їхня стабільність була вищою при нейтральному значенні рН і більше 80% активності зберігалось при рН 6—10 після 3 год інкубації за 4 °С. Після 90 хв інкубації при 40 і 50 °С частка залишкової активності становила відповідно 78 і 44%.

Таким чином, морські мікробні протеази можуть бути перспективними для подальшого промислового застосування.

Висновки

В результаті проведених досліджень щодо впливу температури культивування на активність протеолітичних ензимів встановлено, що: 1) *P. megaterium* 55 є найкращим продуцентом еластолітичної активності (41,4 од/мл), який проявляє її на четверту добу культивування при 28 °С; 2) *B. licheniformis* 249 проявляє найвищу колагеназну активність (0,85 од/мл) при температурі 42 °С (третя та четверта доба культивування) та фібриногенолітичну активність (20 од/мл) при температурі 28 °С (четверта доба культивування). Значний теоретичний інтерес представляє встановлена здатність *P. megaterium* 55 проявляти максимальну фібриногенолітичну (15,0 од/мл) та колагеназну (0,25 од/мл) активність при температурі 12 °С на третю добу культивування.

Список використаної літератури

1. Варбанец Л.Д., Мацелюх Е.В. Пептидазы микроорганизмов и методы их исследования. Киев : Наук. думка, 2014. 323 с.
2. Іваниця В.О., Штеніков М.Д., Остапчук А.М. Факультативно-анаеробні спороутворюючі бактерії глибоководних відкладень Чорного моря. *Мікробіологія та біотехнологія*. 2017. Т. 40, № 4. С. 94—103.
3. Abdul Rahim P., Rengaswamy D. Fibrinolytic enzyme — an overview. *Curr Pharm. Biotechnol.* 2022. Vol. 23, N 11. P. 1336—1345.
4. AlShaikh-Mubarak G.A., Kotb E., Alabdallal A.H., Aldayel M.F. A survey of elastase-producing bacteria and characteristics of the most potent producer, *Priestia megaterium* gasm32. *PLoS One*. 2023. Vol. 18, N 3. : e0282963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282963>
5. Ambati M., Kumar M.S. Microbial Diversity in the Indian Ocean Sediments / Insight into the Distribution and Associated Factors. *Curr Microbiol.* 2022. Vol. 79, N 4. P. 115. doi: 10.1007/s00284-022-02801-z. PMID: 35195780
6. Danilova I., Sharipova M. The practical potential of *Bacilli* and their enzymes for industrial production. *Front Microbiol.* 2020. Vol. 11. P. 1782.
7. Gudzenko O.V., Ivanytsia V.O., Varbanets L.D. Bacteria of the Black Sea are producers of proteolytic enzymes. *Microbiol. J.* 2022. Vol. 84, N 3. P. 3—8.
8. Mandl I., Zipper H., Ferguson L.T. *Clostridium histolyticum* collagenase: its purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 1958. Vol. 74, N 3. P. 465—475.
9. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract. *Food style*. 2004. Vol. 8, N 1. P. 92—95.
10. Razzaq A., Shamsi S., Ali A. et al. Microbial Proteases Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019. Vol. 7. P. 110.
11. Solanki P., Putatunda C., Kumar A. et al. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech.* 2021. Vol. 11, N 10. P. 428.

12. Trombridg G.O., Moon H.D. Purification of human elastase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1972. Vol. 141, N 3. P. 928—931.

13. Vázquez S.C., Hernández E., Mac Cormack W.P. Extracellular proteases from the Antarctic marine *Pseudoalteromonas* sp. P96-47 strain. *Revista Argentina de microbiologia.* 2008. Vol. 40, N 1. P. 63—71.

Надійшла 23.01.2024

O.V. Gudzenko, PhD (Biol.), Senior Researcher, Senior Researcher,
Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
Academician Zabolotny Str., 154, Kyiv, 03143, Ukraine
e-mail: alena.gudzenko81@gmail.com
ORCID 0000-0002-6103-6109

M.D. Shtenikov, PhD (Biol.), Senior Researcher,
Mechnikov Odesa National University,
Dvoryanska Str., 2, Odesa, 65029, Ukraine
e-mail: shtenikovnik@gmail.com
ORCID 0000-0002-2036-0412

L.D. Varbanets, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Head of Department,
Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
Academician Zabolotny Str., 154, Kyiv, 03143, Ukraine
e-mail: varbanets_imv@ukr.net
ORCID 0009-0000-1172-4088

V.O. Ivanytsia, Dr. Sci. (Biol.), Prof., NAS Corresp. member,, Vice-Rector,
Mechnikov Odesa National University,
Dvoryanska Str., 2, Odesa, 65029, Ukraine
e-mail: v_ivanit@ukr.net
ORCID 0000-0001-5325-3800

INFLUENCE OF CULTIVATION TEMPERATURE ON THE ACTIVITY OF PROTEOLITIC ENZYMES OF BACTERIA ISOLATED FROM THE DEEP-WATER BOTTOM SEDIMENTS OF THE BLACK SEA

It was determined, that the temperature of cultivation of producers plays a significant role in achieving maximum elastase, fibrinogenolytic and collagenase activity of the studied strains of *Bacillus subtilis* 1, *Priestia megaterium* 55, *Bacillus licheniformis* 249, isolated from deep-water bottom sediments of the Black Sea. It is shown that the dynamics of enzyme synthesis in different strains at different temperatures is different.

Key words: bacteria, isolated from deep-sea bottom sediments of the Black Sea, cultivation temperature, elastolytic, fibrinogenolytic, collagenase activity.