

СКРИНИНГ СРЕДИ ШТАММОВ *VACILLUS* ЧЕРНОГО МОРЯ ПРОДУЦЕНТОВ С ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ, ЭЛАСТАЗНОЙ И КОЛЛАГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТЯМИ

Л.Д. Варбанец¹, Н.А. Дзюблюк¹, В.А. Иваница²

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

²Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина
e-mail: varbanets_imv@ukr.net

Целью работы было провести скрининг среди штаммов рода *Vacillus*, выделенных из глубоководного грунта Черного моря, продуцентов с фибринолитической, эластазной и коллагеназной активностями. **Методы.** При изучении протеолитической активности в качестве субстратов использовали казеин, фибрин, коллаген и конго-рот эластин. Содержание белка определяли методом Лоури. **Результаты.** В результате скрининга среди 10 штаммов *Vacillus*, выделенных из глубоководного грунта Черного моря, установлено, что супернатант культуральной жидкости *Vacillus* sp. 08 выявил высокую фибринолитическую активность, в то время как штаммы 98, 1 и 249 синтезировали пептидазы с эластазной и казеинолитической активностями. Коллагеназная активность не была выявлена ни у одного из исследуемых штаммов. **Выводы.** Результаты исследований позволили отобрать среди представителей рода *Vacillus*, изолированных из глубоководного грунта Черного моря, 4 штамма, которые являются перспективными для дальнейших исследований по выделению из них пептидаз с казеинолитической, эластазной и фибринолитической активностями.

Ключевые слова: штаммы рода *Vacillus* из глубоководного грунта Черного моря, эластолитическая, коллагеназная и фибринолитическая активности.

Ферменты являются хорошо известными биокатализаторами, которые выполняют множество химических реакций в метаболизме почти всех организмов, а именно: растений, животных, грибов, бактерий и вирусов. Гидролитические ферменты, к которым относятся протеазы и гликозидазы, в сравнении с другими классами ферментов способны осуществлять ферментативные реакции без кофакторов и коферментов, поэтому привлекают внимание исследователей. Многие из протеаз являются важными из-за их широкого применения в кожевенной, детергентной, пищевой, фармацевтической, текстильной и других видах промышленности. Особенно интересны как с теоретической, так и с практической стороны протеазы, способные гидролизовать такие трудно растворимые белки, как фибрин, эластин, коллаген. Ферменты с фибринолитической активностью, препятствующие свертыванию крови, а также способные специфично гидролизовать тромбы, вызывают огромный интерес ученых и фармацевтов. Известные в настоящее время фибринолитические средства, доступные для клинического применения, являются в основном активаторами плаз-

миногена, такими как активатор плазминогена тканевого типа, активатор плазминогена урокиназы и бактериальный активатор плазминогена, стрептокиназа. Несмотря на их широкое использование, эти агенты проявляют низкую специфичность к фибрину, являются очень дорогими и вызывают нежелательные эффекты.

Лишь у незначительного количества микроорганизмов обнаружены такие протеолитические ферменты, как коллагеназы и эластазы. Коллагеназы уникальны по своей способности при различных условиях окружающей среды избирательно гидролизовать тройную спираль молекулы нативного нерастворимого белка коллагена, который относится к фибриллярным белкам группы склеропротеинов и является компонентом матрикса соединительной ткани (кожи, сухожилий, костей, хрящей и др.). Способность коллагеназ расщеплять указанные субстраты обуславливает возможность их практического применения в медицине – для лечения некоторых заболеваний печени, грыжи инвертебрального диска позвоночника, ожогов, обморожений, для ускорения отторжения струпов и отмерших тканей, трофических язв, для ускорения очищения гнойно-некротических налетов. Использование коллагеназ в косметологии дает возможность создания косметических средств лечебно-профилактического назначения, которые не имеют побочного действия. Так, коллагеназы эффективны в составе очищающих кремов и масок, поскольку ускоряют процесс гидролиза старого коллагена в коже, не затрагивая, таким образом, новый. Кроме того, в кожевенной промышленности коллагеназу применяют в составе препаратов для мягчения сырья и на стадии утилизации отходов производства.

Что касается эластаз, то интерес исследователей к этой группе ферментов обусловлен, прежде всего, их активным участием в развитии различных заболеваний воспалительного генезиса и высокой клинико-диагностической информативностью их определения при многих патологических процессах. Кроме того, эластолитические ферменты используют в промышленности для гидролиза сырья, содержащего эластиновые волокна: это мясоперерабатывающая, рыбная промышленности. Отдельно или в комплексе с другими пептидазами эластолитические ферменты применяют в медицине для обработки ран при ожогах, лечения воспалительных процессов, отеков, гематом.

Поскольку производимых в настоящее время в Украине пептидаз с различной специфичностью недостаточно, необходим дальнейший поиск ферментов, способных в различных условиях окружающей среды эффективно гидролизовать такие сложные белки, как фибрин, эластин и коллаген.

Поэтому целью данной работы было провести скрининг микроорганизмов, выделенных из Черного моря, для изучения их способности продуцировать пептидазы, расщепляющие фибрин, эластин и коллаген.

Материалы и методы. Объектами исследований были штаммы рода *Bacillus* из коллекции культур микроорганизмов кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии Одесского национального университета им. И.И. Мечникова, выделенные из глубоководного грунта Черного моря.

Для синтеза внеклеточных протеаз штаммы культивировали на жидкой питательной среде [1] следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; мальтоза – 1,0; желатин – 10,0; дрожжевой автолизат – 0,15; pH – 6,5–6,7. Культуру выращивали в течение 24 ч в колбах Эрленмейера на качалках при 250 об/мин и 28 °С. Инокулом выращивали на соответствующей среде в течение 24 ч, затем засевали в колбы в количестве 10^5 – 10^6 КОЕ/мл.

По окончании культивирования биомассу отделяли центрифугированием при 5000 g, 30 мин. Ферментативные активности определяли в супернатанте культуральной жидкости.

Содержание белка определяли методом Лоури [2], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Общую протеолитическую (казеинолитическую) активность определяли методом Ансона в модификации Петровой [3], который основывается на количественном определении тирозина, образующегося при гидролизе казеина под действием исследуемого энзима. В опытную пробирку вносили 0,5 мл супернатанта культуральной жидкости и 0,5 мл 1 % раствора казеина. Контрольная пробирка содержала 0,5 мл супернатанта культуральной жидкости и 1 мл 4 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Инкубирование проводили на водяной бане при 37 °С 30 мин, после чего в опытную пробирку вносили 1 мл 4 % раствора ТХУ, а в контрольную – 0,5 мл 1 % казеина. Смесь в пробирках выдерживали 20 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 10000g в течение 5 мин. К 0,5 мл супернатанта добавляли 2,5 мл 0,5 М раствора Na_2CO_3 и 0,5 мл реактива Фолина, разведенного (1:3), выдерживали 20 мин при комнатной температуре. Продукты расщепления определяли на спектрофотометре СФ-26 с длиной волны 670 нм. За единицу активности принимали способность энзима за 1 мин при температуре 37 °С превращать казеин в неосаждаемое ТХУ состояние в количестве, которое соответствует 1 мкмоль тирозина.

Фибринолитическую активность измеряли методом Masada [4], в качестве субстрата использовали фибрин, полученный из плазмы крови человека и предоставленный нам сотрудниками станции переливания крови. Опытная пробирка содержала 1 мг фибрина, 1,8 мл 0,01 М Трис-НСl буфера (pH 7,5) и 0,2 мл исследуемого препарата. Реакционную смесь инкубировали на водяной бане при 37 °С в течение 30–45 мин. Реакцию останавливали добавлением 2 мл 10 % раствора ТХУ. В контрольную пробирку ТХУ добавляли сразу. Образцы выдерживали при комнатной температуре 20 мин, затем центрифугировали при 10000g в течение 5 мин. Образование продуктов расщепления определяли на спектрофотометре СФ-26 при 275 нм. За единицу фибринолитической активности принимали такое количество энзима, которое повышает оптическую плотность реакционной смеси на 0,01 за 1 мин в условиях опыта.

При определении коллагеназной активности [5] инкубационную смесь, которая содержала 10 мг коллагена, 2,5 мл 0,01 М Трис-НСl буфера (pH 9,0–10,0) и 1 мл исследуемого препарата, выдерживали на водяной бане 3 часа при 37 °С. Затем реакционную смесь центрифугировали при 10000g, 5 мин и 0,1 мл супернатанта переносили в пробирки, которые содержали 0,5 мл 4 % раствора нингидрина в ацетоне и равный объем 0,2 М цитратного

буфера. Инкубирование проводили 20 мин на кипящей водяной бане, затем в охлажденную смесь добавляли 5 мл 50 % раствора н-пропанола и выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Продукты расщепления идентифицировали на спектрофотометре СФ-26 с длиной волны 600 нм. По стандартной кривой, построенной для свободного L-лейцина, определяли эквивалентное количество мкмоль, освобожденных в процессе гидролиза аминокислот. Одна единица активности эквивалентна 1 мкмоль L-лейцина, освобожденного из коллагена за 3 часа гидролиза при 37 °С.

Определение эластазной активности осуществляли путем колориметрического измерения интенсивности окрашивания раствора, который содержит конго-рот эластин в качестве субстрата. [6]. Инкубационная смесь содержала 2,5 мл 0,01 М Трис-НСl буфера (рН 7,5), 5 мг эластина, окрашенного 0,002 % раствором конго-рот, и 1 мл раствора энзима. Смесь выдерживали в течение 3 часов при 37 °С. Реакцию останавливали, выдерживая пробирки с реакционной смесью на ледяной бане в течение 30 мин. Негидролизированный эластин отделяли центрифугированием при 10000g, 5 мин. Интенсивность окрашивания измеряли на спектрофотометре СФ-26 с длиной волны 515 нм. За единицу активности принимали такое количество энзима, которое катализирует гидролиз 1 мг эластина за 1 мин.

Все эксперименты проводили не менее, чем в 3–5 повторностях. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием критерия Стьюдента (t) [9]. В работе высчитывали средние значения величин и стандартные ошибки ($M \pm m$). Обработку результатов, которые поданы графически, осуществляли с использованием программы Microsoft Excel 2010. Значения при $P < 0,05$ рассматривали как достоверные [10].

Результаты. Скрининг штаммов рода *Bacillus* на наличие пептидазных активностей проводили при выращивании в пробирках в условиях качалки при 28°C, 250 об/мин в течение двух суток. Показано (рис. 1), что в супернатантах культуральных жидкостей только ряда исследуемых штаммов была выявлена казеинолитическая активность на первые сутки выращивания, в то время как на вторые сутки довольно высокую казеинолитическую активность проявили все исследуемые штаммы. Максимальная казеинолитическая активность 0.212, 0.223 и 0.228 ед/мг белка соответственно была установлена для *Bacillus* sp. 98, O8 и 249. Интерес представляет штамм 213, в супернатанте культуральной жидкости которого была обнаружена высокая казеинолитическая активность уже на первые сутки выращивания и составляла 251 ед/мг белка.

Эластазная активность, как и казеинолитическая, проявлялась у всех штаммов на вторые сутки культивирования и по величине очень различалась у исследованных штаммов. Наибольшая активность идентифицирована у *Bacillus* sp. O8, 249, 98 и 1 (составляла 15.0, 9.8, 8.5 и 6.1 ед/мг белка соответственно).

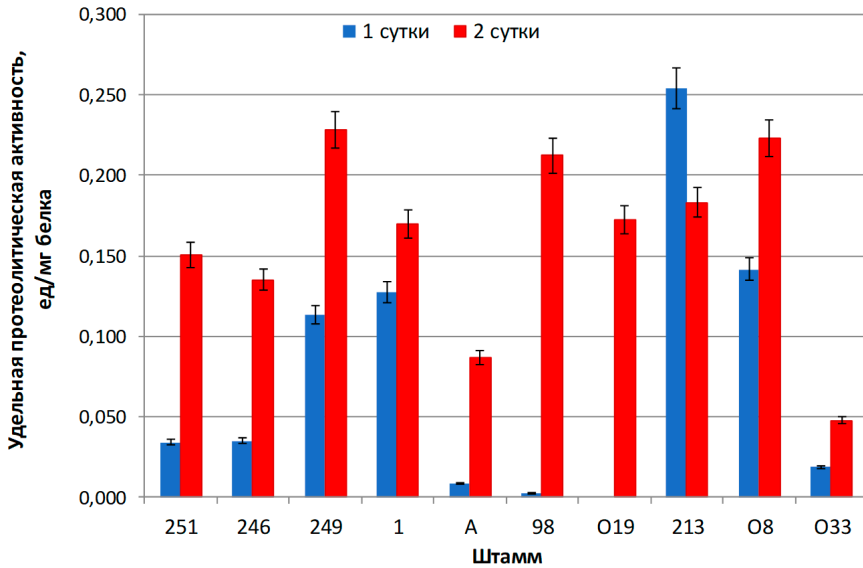


Рис. 1. Удельная протеолитическая (казеинолитическая) активность в супернатантах культуральных жидкостей *Bacillus*, выращиваемых в пробирках в течение двух суток

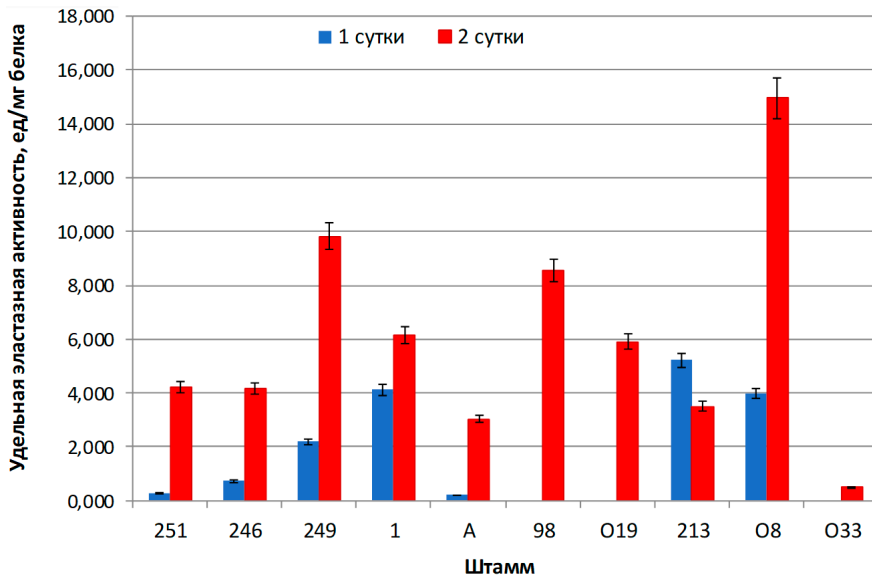


Рис. 2. Удельная эластазная активность в супернатантах культуральных жидкостей *Bacillus*, выращиваемых в пробирках в течение двух суток

Что касается фибринолитической активности, то у некоторых штаммов она не была обнаружена ни на первые, ни на вторые сутки культивирования (рис. 3). Наиболее активный гидролиз фибрина характерен для *Bacillus* sp. O8 на вторые сутки культивирования (1.37 ед/мг белка). Кроме того, на вторые сутки культивирования фибринолитическую активность проявляли также супернатанты культуральных жидкостей штаммов 249 и 1, а также 246 и 98. Однако их активность была гораздо ниже и составляла 0.47 и 0.45, а также 0.24 и 0.24 ед/мг белка.

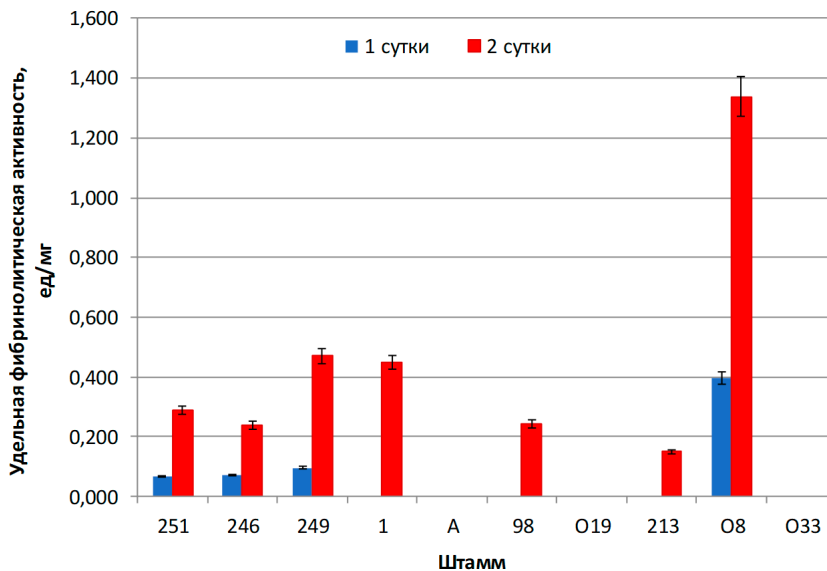


Рис. 3. Фибринолитическая активность в супернатантах культуральных жидкостей *Bacillus*, выращиваемых в пробирках в течение двух суток

В супернатантах культуральных жидкостей ни у одного из исследуемых штаммов коллагеназная активность не была обнаружена.

Поскольку супернатанты культуральных жидкостей *Bacillus* sp. 246, 249, 1, 98 и O8 проявили наибольшую ферментативную активность, они были выбраны для дальнейших исследований динамики накопления протеаз этими штаммами, при этом были изменены условия их аэрации. Так, выращивание культур проводили в 200 мл питательной среды в колбах Эрленмейера при 28°C в условиях качалки (250 об/мин). Активность в супернатантах культуральных жидкостей исследуемых штаммов определяли через 5, 24, 29 и 48 часов культивирования. Установлено (рис. 4), что максимальная казеинолитическая активность в супернатантах культуральных жидкостей *Bacillus* sp. 98, 1 и 249 (0.165, 0.165 и 0.05 ед/мг белка соответственно) была выявлена на 48 час выращивания. Синтез фермента штаммами 246, 249 и 98 через 5 часов выращивания не происходил, а был выявлен только через 24 часа культивирования.

Показано (рис. 5), что при выращивании отобранных штаммов в колбах эластазная активность была обнаружена в супернатантах культуральных жидкостей только *Bacillus* sp. 98, 1 и 249 (6.3, 5.3 и 0.83 ед/мг белка соответственно), причем синтез фермента регистрировали через 48 часов выращивания, а в супернатанте культуральной жидкости штамма 98 она проявлялась раньше (1.4 ед/мг белка) – через 29 часов.

Что касается фибринолитической активности, то наиболее активным оказался штамм O8 (рис. 6), синтез энзима у которого выявлялся уже через 24 часа выращивания (0.21 ед/мг белка), достигая максимального уровня через 48 часов (0.59 ед/мг белка). Фибринолитическая активность штаммов 1, 249, и 98 характеризовалась более низкими показателями, достигая максимума через 48 часов культивирования (0.31, 0.25 и 0.20 ед/мг белка). Синтез пептидазы с фибринолитической активностью у штаммов 1 и 98 обнаруживали только через 29 часов культивирования.

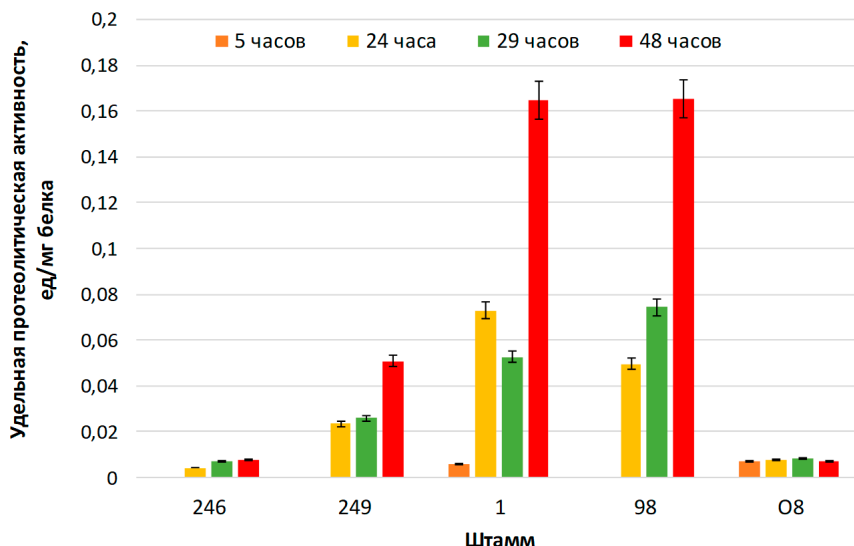


Рис. 4. Удельная протеолитическая (казеиолитическая) активность в супернатантах культуральных жидкостей *Bacillus* в динамике их выращивания в колбах

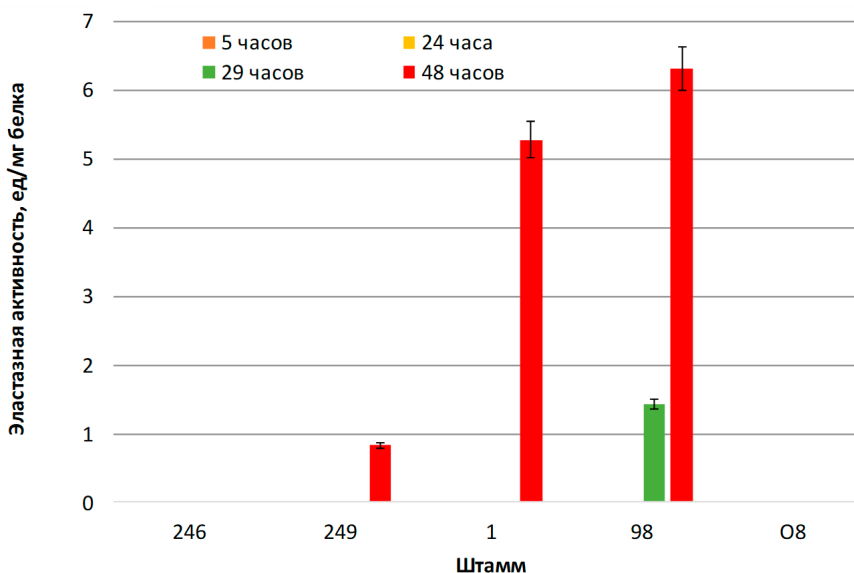


Рис. 5. Удельная эластазная активность в супернатантах культуральных жидкостей *Bacillus* в динамике их выращивания в колбах

Таким образом, в результате проведенной работы показано, что Черное море богато морскими видами бактерий, которые могут быть эффективными продуцентами ряда практически важных ферментов, таких как пептидазы, характеризующиеся специфичностью по отношению к таким белковым субстратам, как казеин, фибрин и эластин. На активность пептидаз существенно влияет степень аэрации. Так, *Bacillus* sp. O8 при выращивании в пробирках оказался наиболее активным по всем видам пептидазной активности: общей (казеиолитической), эластазной и

фибринолитической. При выращивании в колбах супернатант культуральной жидкости штамма О8 выявил максимальной только одну фибринолитическую активность, в то время как штаммы 98, 1 и 249 синтезировали пептидазы с максимальной эластазой и казеинолитической активностями. Результаты исследований позволили отобрать 4 штамма, которые являются перспективными для дальнейших исследований.

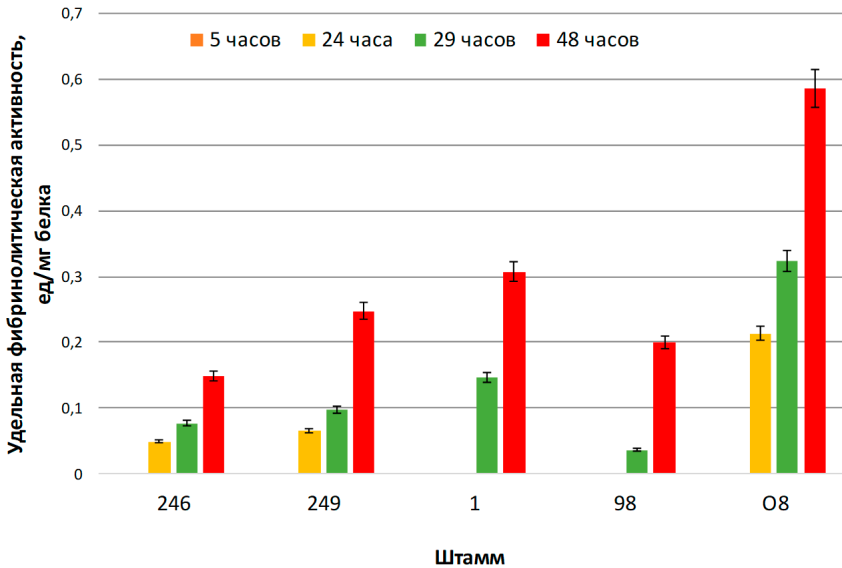


Рис. 6. Удельная фибринолитическая активность в супернатантах культуральных жидкостей *Bacillus* в динамике их выращивания в колбах

Обсуждение результатов. Морские микроорганизмы, миллионы лет адаптируясь к выживанию в достаточно суровой среде, характеризующейся экстремальными физическими и химическими параметрами (давление, температура, соленость и т.д.), занимают различные экологические ниши. Ареалы их обитания разнообразны и охватывают прибрежные и открытые акватории океанов, глубоководные и гидротермальные впадины, грунты; многие виды являются ассоциантами беспозвоночных, рыб, водорослей или морских трав. Основной интерес к исследованию морских бактерий обусловлен их способностью продуцировать различные биологически активные соединения, в частности уникальные ферменты, включая пептидазы с различной специфичностью. Особое строение функционально значимых участков белковых молекул таких ферментов легло в основу механизма адаптации морских микроорганизмов к условиям обитания, что привело в процессе эволюции к уменьшению количества межмолекулярных и внутримолекулярных связей. Такая стратегия позволила повысить активность каталитической реакции за счет увеличения числа оборотов активных центров ферментов. Такие ферменты характеризуются более высокой активностью, низким температурным оптимумом, отсутствием примесей, устойчивостью к химическим модификациям и длительному хранению. На сегодня достаточно плодотворно исследуются

микроорганизмы, выделенные из Тихого и Индийского океанов, однако микроорганизмы Черного моря недостаточно хорошо изучены, в частности их способность синтезировать протеолитические ферменты различной специфичности.

Ранее [7] из 64 штаммов бактерий как типовых, так и выделенных из воды и позвоночных Черного моря, нами был отобран ряд штаммов с фибринолитической, коллагеназной и кератиназной активностями. Однако ни у одного из исследуемых штаммов не была обнаружена эластазная активность.

Поэтому очень важными являются полученные нами в данной работе результаты, свидетельствующие о способности трех штаммов *Bacillus* sp. (98, 1 и 249) синтезировать внеклеточные пептидазы с эластазной активностью и одного штамма (O8) проявлять высокую фибринолитическую активность.

Протеазы с фибринолитической активностью являются потенциально важными для целей медицины. Они препятствуют свертыванию крови, а также способны разжижать ее сгустки. Образование сгустков крови в системе кровообращения может приводить к тяжелым последствиям, таким как острый инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, заболевания периферических сосудов, аритмии, инсульт и другие [8]. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) в настоящее время являются основной причиной смерти во всем мире. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2016 году от ССЗ умерло 17,9 миллиона человек, что составляет 31% от всех случаев смерти в мире, при этом 85% этих смертей произошло в результате ишемической болезни сердца и инсульта. Более 80% смертей от ССЗ происходит в странах с низким и средним уровнем дохода и почти одинаково встречается у мужчин и женщин. В настоящее время используется тромболитическая терапия, которая представляет собой вид фармакологической терапии, направленной на восстановление кровотока за счет лизиса тромбов сосудов. Принцип действия основан на активировании тромболитической активности крови превращением плазминогена в его активную форму – плазмин. В отличие от терапии гепаринами, которые только замедляют формирование тромбомассы, тромболитическая терапия способствует ее разрушению и восстановлению кровотока по закупоренным сосудам. В связи с этим необычайно актуальными являются пептидазы с фибринолитической активностью, поскольку используемые в настоящее время ферменты характеризуются рядом недостатков.

Не менее важными являются ферменты с эластазной и коллагеназной активностями. Однако, к сожалению, ни у одного из исследуемых штаммов не выявлено коллагеназной активности.

Таким образом, проведенный нами скрининг среди микроорганизмов, выделенных из глубоководного грунта Черного моря, показал перспективность дальнейших исследований четырех штаммов бацилл, активных продуцентов пептидаз с фибринолитической (штамм O8) и эластазной (штаммы 98, 1 и 249) активностями.

СКРИНІНГ СЕРЕД ШТАМІВ *BACILLUS* ЧОРНОГО МОРЯ ПРОДУЦЕНТІВ З ФІБРИНОЛІТИЧНОЮ, ЕЛАСТАЗНОЮ ТА КОЛАГЕНАЗНОЮ АКТИВНОСТЯМИ

Л.Д. Варбанець¹, Н.А. Дзюблюк¹, В.А. Іваниця²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

²Одеський національний університет ім. І.І. Мечнікова,
вул.Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна

Резюме

Метою роботи було провести скринінг серед штамів роду *Bacillus*, виділених із глибоководного ґрунту Чорного моря, продуцентів з фібринолітичною, еластазою і колагеназою активностями. **Методи.** При дослідженні протеолітичної активності як субстрати використовували казеїн, фібрин, колаген і конго-рот еластин. Вміст білка визначали методом Лоурі. **Результати.** Внаслідок скринінгу серед 10 штамів роду *Bacillus*, виділених із води Чорного моря, встановлено, що супернатант культуральної рідини *Bacillus* sp. O8 виявив високу фібринолітичну активність, в той час як штами 98, 1 і 249 синтезували пептидази з еластазою та казеїнолітичною активностями. Колагеназна активність не була виявлена в жодному із досліджуваних штамів. **Висновки.** Результати досліджень дозволили відібрати серед представників роду *Bacillus*, ізольованих із глибоководного ґрунту Чорного моря, 4 штами, які є перспективними для подальших досліджень щодо виділення із них пептидаз з казеїнолітичною, еластазою та фібринолітичною активностями.

Ключові слова: штами роду *Bacillus* Чорного моря, еластолітична, колагеназна, фібринолітична активності.

SCREENING AMONG *BACILLUS* STRAINS OF THE BLACK SEA OF PRODUCERS WITH FIBRINOLYTIC, ELASTASE AND COLLAGENASE ACTIVITIES

L.D. Varbanets¹, N.A. Dziubliuk¹, V.A. Ivanitsia²

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

²Mechnikov Odessa National University,
2 Dvoryanskaya str., Odessa, 65082, Ukraine

Summary

The aim of the work was to screen among strains of *Bacillus* isolated from the deep-sea ground of the Black Sea, producers with fibrinolytic, elastase and collagenase activities. **Methods.** To study proteolytic activity casein, fibrin, collagen and congo rot elastin were used as substrates. The protein content was determined by the method of Lowry. **Results.** As a result of screening among 10 strains of *Bacillus* isolated from the deep-sea ground of the Black Sea, it was found that the supernatant of the culture liquid of the *Bacillus* sp. O8 revealed high fibrinolytic activity, while strains 98, 1, and 249 synthesized peptidases with elastase and caseinolytic activities. Collagenase activity was not detected in any of the studied strains. **Conclusion.** The results of the research allowed to select among the representatives of *Bacillus* isolated from the deep-sea ground of the Black Sea 4 strains

that are promising for further research on the isolation of peptidases with caseinolytic, elastase and fibrinolytic activities from them.

Keywords: strains of *Bacillus* from the deep-sea ground of Black Sea, elastase, collagenase and fibrinolytic activities.

1. Koltukova NV, Vaskivniuk VT. [Selection of methods for isolating the proteolytic complex from *Bacillus mesentericus* 316m for deep cultivation]. Mikrobiol Zh.. 1980; 42(2):245–248. Russian.
2. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193(1):265–275.
3. Petrova IS, Vintsyunaite MN. [Determination of the proteolytic activity of the enzyme preparations of microbial origin]. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 1966; 2(1):322–327. Russian.
4. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract. Food style, 2004; 8(1):92 – 95.
5. Mandl I. Collagenase. Science. 1970; 169(3951):1234–1238.
6. Trombridg GO, Moon HD. Purification of human elastase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1972; 141(3):928–931.
7. Varbanets LD, Avdeeva LV, Borzova NV, Matseliuch EV, Gudzenko AV, Kiprianova EA, Yaroshenko LV. [Bacteria of Black sea – producers of hydrolytic enzymes]. Mikrobiol Zh. 2011, 73(5):9–15. Russian.
8. Venkatanagaraju E, Divakar G, SwethaC. Overview on fibrinolytic proteases purification strategies. Int. J. Pharm. Res. Sci., 2014, 02(3), 232–246.
9. Lakin GF. [Biometrics]. M.: High School, 1990; 352. Russian.
10. Lapatch S.N., Tchubenko A.V., Babitch P.H. [Statistical methods in biomedical research using “Excel”]. K.: Morion, 2001; 408. Russian.

Отримано 1.11.2018