

УДК 577.152.34/577.112.083

О. В. Севастьянов<sup>1</sup>, Ю. А. Шестеренко<sup>1</sup>, О. А. Рижак<sup>1</sup>, І. І. Романовська<sup>1</sup>,  
Л. Д. Варбанець<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,  
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080,

<sup>2</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03680  
e-mail:romairina@gmail.com

### КІНЕТИКА ГІДРОЛІЗУ КАЗЕЇНУ ЗА ДОПОМОГОЮ ВІЛЬНОЇ І ІММОБІЛІЗОВАНОЇ ПЕПТИДАЗИ *BACILLUS THURINGIENSIS VAR. ISRAELENسيس* IMB B-7465

Досліджено кінетику гідролізу казеїну вільною і вивільненою з плівок ПВС/хітозан пептидазою з *Bacillus thuringiensis var. israelensis* IMB B-7465. Показано, що тільки модифікований метод Ансона може бути застосований для визначення казеїнолітичної активності вивільненої з матриці пептидази.

Визначено, що включення ензиму в плівку ПВС/хітозан істотно не впливає на  $V_{\text{макс}}$  гідролізу, тоді як  $K_m$  збільшується в 1,3 рази. Виявлено інгібування вільної і вивільненої з плівок пептидази субстратом. Показано, що  $K_{is}$  останньої у 2,3 рази перевищує таку вільного ензиму, що дозволяє гідролізувати більші концентрації субстрату.

**Ключові слова:** кінетика, пептидаза, іммобілізація, матриця ПВС/хітозан

Сьогодні широко проводяться дослідження щодо застосування протеолітичних ензимів в терапії гнійно-запальних захворювань, ран, опіків, трофічних виразок та ін. для швидкого і безболісного видалення некротизованих ділянок та прискорення процесу загоєння ран.

Недоліки, пов'язані з високою вартістю вільних протеаз, процесами автолізу і впливом рН ранового вмісту, що інактивує ензими, навчилися мінімізувати за допомогою їх іммобілізації в полімерні носії.

В процесі іммобілізації протеаз може змінюватись їх конформація, спорідненість ензимів до субстрату, а також ряд інших властивостей [2, 4, 8, 11, 15]. Тому їх всебічне дослідження, у тому числі, швидкостей реакцій, спорідненості до субстрату та встановлення механізму дії за допомогою кінетичних досліджень вільних і іммобілізованих пептидаз, є актуальною задачею.

При вивченні кінетики гідролізу казеїну протеазами були отримані різні дані щодо впливу іммобілізації на кінетичні параметри. Так, Sattar et al., при дослідженні включення серинової протеази з *Aspergillus niger* у агар-агар, показали збільшення  $K_m$  в 1,3 рази і відповідне зменшення  $V_{\text{макс}}$  [11]. Diyanat S. et al. і Thakrar F.J. et al. також визначили збільшення  $K_m$  і зниження  $V_{\text{макс}}$  [2, 15], зазвичай спостерігається саме такий вплив іммобілізації на кінетичні параметри [2, 4, 11, 15]. Однак у роботі Nwagu et al. при вивченні кінетичних особливостей бромелаїну з *Ananas comosus* L., іммобілізованого на спорах пробіотичних *Bacillus*, виявили значне зменшення константи Міхаеліса (в 2,4 рази) при зниженні максимальної швидкості реакції [8]. А Li et al. показали, поряд із збільшенням  $K_m$ ,

двократне зростання  $V_{\text{макс}}$  при дослідженні іммобілізації нейтральної протеази у модифіковані гранули хітозану [6].

Тому метою даної роботи було визначення кінетичних особливостей гідролізу казеїну вільною і вивільненою з плівок ПВС/хітозан пептидазою *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB В-7465.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Пептидазу *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB В-7465 виділяли з супернатанту, отриманого центрифугуванням культуральної рідини при 5000 г впродовж 30 хв, осадженням сульфатом амонію 60 % насичення. Осад збирали центрифугуванням при 5000g, 30 хв, розчиняли в 0,01 Трис-НСІ буфері (рН 7,5) та наносили на колонку (2,5·40 см) з аніонообмінником TSK DEAE 650 (М) (“Тоуосода”, Японія). Елюцію проводили тим же буфером в градієнті хлориду натрію від 0 до 1 М, зі швидкістю 0,5 см<sup>3</sup>/хв. Білкові фракції, які проявляли казеїнолітичну активність, відбирали, об’єднували та наносили на колонку (2,5·40 см) з нейтральним TSK-гелем – Тоуорепарл НW-55 (F-grade) (“Тоуосода”, Японія). Елюцію проводили тим же буфером зі швидкістю 0,85 см<sup>3</sup>/хв [13].

Вміст загального протеїну визначали методом Лоурі в модифікації Хартрі [3], казеїнолітичну активність вільного ензиму визначали за методом Кунітца – спектрофотометрично при 280 нм [6], за методом Ансона в модифікації Петрової з реактивом Фоліна-Чокальтеу [9] і за аміногрупами, що вивільнялись в ході протеолізу, за допомогою о-фталевого діальдегіду (о-ФДА) [1]. Останній метод модифікували приготуванням в 4 рази більш концентрованого реактиву у 1 М Н<sub>3</sub>ВO<sub>3</sub>/NaOH буферному розчині (рН 9,2). Проведена модифікація дозволила значно збільшити діапазон чутливості методу.

Включення ензиму здійснювали в полімерну матрицю, яка була попередньо приготована змішуванням хітозану, розчиненого в 1,5 % оцтовій кислоті і 20 % водного розчину полівінілового спирту в об’ємному відношенні 1:1. Після приготування перевіряли рН суміші полімерів. Потім додавали розчин ензиму, а для поліпшення пластичних властивостей плівки додавали кілька крапель гліцерину. Отриману суміш перемішували протягом 30 хв, виливали на підкладку і висушували при кімнатній температурі протягом 5 діб.

Вивільнення пептидази з плівок *in vitro* визначали при 37 ° С за допомогою водяної бані-струшувача. Фіксовану масу плівки, що містить ензим, суспендували у 3 см<sup>3</sup> дистильованої води, поміщали в водяну баню при постійній температурі 37 °С. Плівка поступово розчинялась і вивільнялась пептидаза. Як контроль використовували плівку без ферменту. [9].

Кінетику гідролізу казеїну в присутності вільної і вивільненої з плівок пептидази досліджували у 0,0167 моль/дм<sup>3</sup> Na-фосфатному буферному розчині з рН 7,5 при 37 °С, визначаючи початкові швидкості гідролізу субстрату. Кількість ензиму становила 12,5 мкг білка. Визначення  $K_m$  і  $V_{\text{макс}}$  проводили в межах висхідної гілки (5 точок) залежності початкової швидкості реакції від концентрації субстрату, а потім лінеаризували отримані дані методом Лайнуївера-Берка [5]. Вимірювання проводили в умовах, де ступінь трансформації субстрату при найменшій з використаних концентрацій не перевищував 5 %. Концентрації казеїну становили

0,31-10 г/дм<sup>3</sup>. Константу інгібування субстратом  $K_i$  визначали, використовуючи графік залежності  $1/V$  від  $[S]$  [5]. Статистичну обробку результатів проводили у програмі Statistica, використовуючи t-критерій Стьюдента, результати вважали достовірними при ( $P < 0,05$ ). Для отримання стандартних похибок кінетичних констант спочатку визначали значення і стандартні похибки коефіцієнтів лінійної регресії висхідної гілки кінетичної кривої, потім розраховували значення  $K_m$  і  $V_{\max}$  і їх стандартні похибки, визначаючи похибки непрямих вимірювань [13].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пептидазу *B. thuringiensis var. israelensis* ІМВ В-7465 виділяли шляхом багатоступеневої очистки за класичними методами протеїнової хімії: фракціонуванням супернатанту культуральної рідини сульфатом амонію (60 % насичення), іонообмінною хроматографією та ексклюзійною хроматографією. Із *B. thuringiensis var. israelensis* ІМВ В-7465 отримано очищений ензимний препарат нової пептидази (М.м. 34 kDa) з загальною протеолітичною активністю 0,21 од/см<sup>3</sup> [12].

Виділена пептидаза була іммобілізована у полімерну матрицю полівініловий спирт/хітозан (10:1). В результаті включення ензиму отримані полімерні плівки з кількісним включенням білка і високим збереженням загальної протеолітичної активності (80 %) [10].

Раніше нами була досліджена кінетика гідролізу казеїну вільною пептидазою *B. thuringiensis var. israelensis* ІМВ В-7465. Порівняльний аналіз трьох методів визначення казеїнолітичної активності ензиму (Кунітца, модифікованого методу Ансона, за допомогою о-ФДА) показав, що використання о-фталевого діальдегіду дозволяє визначити  $NH_2$ -групи продуктів гідролізу білкового субстрату за кількістю розриваємих пептидних зв'язків, тобто найбільш повно виявити глибину протеолізу вільним ензимом [12].

Однак вплив іммобілізації на кінетичні параметри гідролізу казеїну в присутності пептидази досліджували, визначаючи казеїнолітичну активність у тирозинових еквівалентах методом Ансона в модифікації Петрової.

Використання інших методів визначення активності пептидази було недоцільним, оскільки хітозан містить значну кількість аміногруп і, ймовірно, взаємодіє з о-ФДА, що викривляє результати вимірювання; застосування методу Кунітца не є можливим внаслідок взаємодії розчинних фрагментів субстрату, що не осаджуються ТХО, з компонентами матриці. Вплив включення виділеної пептидази у матрицю ПВС/хітозан на кінетичні параметри визначали після розчинення плівок, адже матриця створює значні дифузійні обмеження і перешкоджає проникненню казеїну до іммобілізованої пептидази.

В ході вивчення кінетики гідролізу казеїну вільною і вивільненою з плівок пептидазою було показано, що при відносно невисоких значеннях концентрації субстрату швидкість реакції зростає пропорційно, по мірі подальшого підвищення концентрації субстрату значення швидкості наближається до граничного, а потім починає знижуватися, тобто в певному діапазоні концентрацій казеїну відбувається інгібування ензиму субстратом (рис. 1).

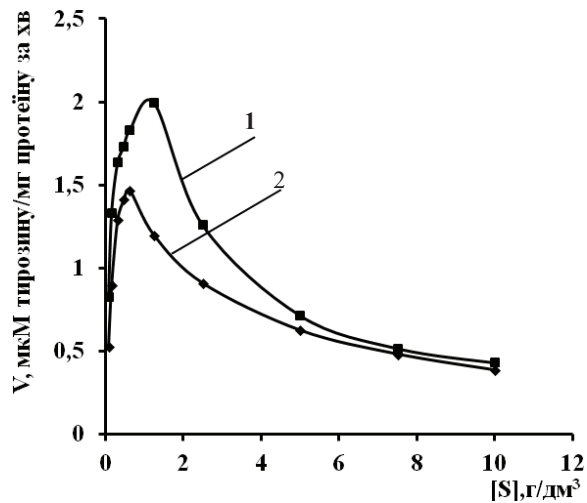


Рис. 1. Кінетика гідролізу казеїну, що каталізується вільною і вивільненою з плівок пептидазою (1 – вільна пептидаза, 2 – вивільнена пептидаза).

Fig. 1. Kinetics of casein hydrolysis catalyzed by free and released from PVA/chitosan films peptidase (1 – free peptidase, 2 – released peptidase)

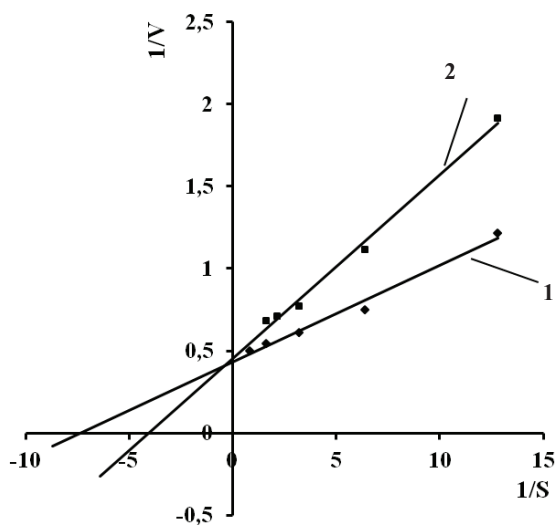


Рис. 2. Визначення кінетичних параметрів гідролізу казеїну, що каталізується вільною і вивільненою з полімерної плівки пептидазою, в координатах Лайнуївера-Берка (1 – вільна пептидаза, 2 – вивільнена пептидаза)

Fig. 2. Determination of kinetic parameters of casein hydrolysis catalysed by free and released from PVA/chitosan film peptidase by the Lineweaver-Burk plot (1 – free peptidase, 2 – released peptidase)

Таблиця

Кінетичні параметри гідролізу казеїну, що каталізується вільною і вивільненою з плівки пептидазою

Table

Kinetic parameters of casein hydrolysis catalysed by free and released from film peptidase

Ензим	$K_m$ , г/дм <sup>3</sup>	$V_{\text{макс}}$ , мкмоль тирозину/мг протеїну за хв.
Вільна пептидаза	0,191±0,032	1,96±0,11
Вивільнена пептидаза	0,257±0,032	2,27±0,17

Показано, що включення ензиму в матрицю істотно не впливає на  $V_{\text{макс}}$  гідролізу казеїну (рис. 2, табл.), що свідчить про м'який метод іммобілізації пептидази, який не порушує каталітичний центр ензиму.

Однак  $K_m$  збільшується в 1,3 рази, що, ймовірно, обумовлено зменшенням спорідненості ферменту до субстрату в результаті конформаційних змін глобули білка, або наявності в'язкісних обмежень в результаті взаємодії з компонентами матриці.

За допомогою графіка залежності  $1/V$  від  $S$  (рис. 3) були проаналізовані гілки кінетичних кривих, де спостерігалось інгібування субстратом. Значення константи інгібування вільної пептидази казеїном ( $K_{is}$ ) становить 1,30 г/дм<sup>3</sup>.

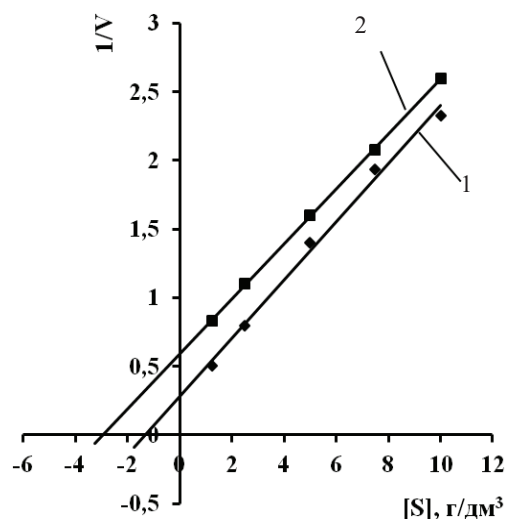


Рис. 3. Визначення інгібування субстратом вільної і вивільненої з полімерної плівки пептидази (1 – вільна пептидаза, 2 – вивільнена пептидаза)

Fig. 3. Determination of substrate inhibition of free and released from polymeric film peptidase (1 – free peptidase, 2 –released peptidase)

Дослідження інгібування ензиму субстратом після вивільнення з плівок показало збільшення  $K_{is}$  в 2,3 рази ( $2,95 \text{ г/дм}^3$ ) порівняно з вільною, що є значною перевагою включеного в матрицю ензиму. Адже наявність субстратного інгібування значно змінює істинну активність ензиму, ускладнює її дослідження і зменшує діапазон робочих концентрацій субстрату.

Таким чином, досліджено кінетику гідролізу казеїну вільною і вивільненою з плівок ПВС/хітозан пептидазою з *Bacillus thuringiensis var. israelensis* IMB B-7465. Показано, що з трьох досліджених методів визначення казеїнолітичної активності ензиму тільки для модифікованого методу Ансона не спостерігається перешкод з боку компонентів матриці.

Виявлено, що включення ензиму в полімерний носій істотно не впливає на  $V_{\text{макс}}$  гідролізу;  $K_M$  збільшується в 1,3 рази, що ймовірно, пов'язано із зменшенням спорідненості ферменту до субстрату в результаті конформаційних змін глобули білка, або наявністю в'язкісних обмежень, обумовлених полімерами матриці. Показано, що  $K_{is}$  у випадку іммобілізованого препарату у 2,3 рази перевищує таку вільного, що дозволяє гідролізувати більші концентрації субстрату.

Штам *Bacillus thuringiensis var. israelensis* IMB B-7465, виділений з акваторії о. Зміїний (Чорне море) і люб'язно наданий нам співробітниками кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins // J. Dairy Sci. – 1983. – Vol. 66. – P. 1219-1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
2. Diyanat S., Homaei A., Mosaddegh E. Immobilization of *Penaeus vannamei* protease on ZnO nanoparticles for long-term use // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – Vol. 118. – P. 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.075>
3. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Analyst. Biochem. – 1972. – Vol. 48. – P. 422-427. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2)
4. Kumari A., Kaur B., Srivastava R., Sangwana R.S. Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties // Biochem Biophys Rep. – 2015. – Vol. 2. – P. 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.05.009>
5. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. 348 с.
6. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties // J. Gen. Physiol. – 1947. – Vol. 30. – P. 291-310.
7. Li J., Cai J., Zhong L., Du Y. Immobilization of a protease on modified chitosan beads for the depolymerization of chitosan // Carbohydrate polymers. – 2012. – Vol. 87. – P. 2697-2705. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.062>
8. Nwagu T.N., Ugwuodo C.J. Stabilizing bromelain for therapeutic applications by adsorption immobilization on spores of probiotic *Bacillus* // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 127. – P. 406-414. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.061>
9. Петрова И.С., Вишонайте М.Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробиологического происхождения // Прикл. биохим. микробиол. – 1966 – Т. 2. – С. 322-327.
10. Рижак О.А., Декіна С.С., Шестеренко Є.А., Дзюблюк Н.А. Фізико-хімічні властивості іммобілізованої протеази з *Bacillus thuringiensis*. XX наукова молодіжна конференція «Проблеми і досягнення сучасної хімії», 27-28 вересня 2018, Одеса, 20018, С. 59.
11. Sattar H., Aman A., Qader S.A.U. Agar-agar immobilization: An alternative approach for the entrapment of protease to improve the catalytic efficiency, thermal stability and recycling efficiency // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – Vol. 111. – P. 917-922. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.105>
12. Sevastyanov O.V., Shesterenko Yu.A., Ryzhak A.A., Romanovska I.I., Dziubliuk N.A., Varbanets L.D. Kinetics of casein hydrolysis by peptidase from *Bacillus thuringiensis var. israelensis* IMB B-7465 // Ukr. Biochem. J. – 2019 (in press).

13. Stohny E.M., Chernyshenko V.O., Nidialkova N. A., Rebriev A.V., Varbanets L.D., Hadzhynova V.E., Chernyshenko T.M., Kolesnikova I.M., Lugovsko E.V. Mapping of residues of fibrinogen cleaved by protease II of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88 (spec.issue). – P. 79-86. <https://doi.org/10.15407/ubj88.si01.079>
14. Тейлор Дж. Введение в теорию ошибок. М.: Мир, 1985. – 272 с.
15. Thakrar F.J., Singh S.P. Catalytic, thermodynamic and structural properties of an immobilized and highly thermostable alkaline protease from a haloalkaliphilic actinobacteria, *Nocardopsis alba* TATA-5 // Bioresour Technol. – 2019. – Vol. 278. – P. 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.058>

Стаття надійшла до редакції 08.05.2019

**О. В. Севастьянов<sup>1</sup>, Ю. А. Шестеренко<sup>1</sup>, А. А. Рыжак<sup>1</sup>, И. И. Романовская<sup>1</sup>,  
Л. Д. Варбанец<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,  
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080,

<sup>2</sup> Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03680  
e-mail:romairina@gmail.com

### **КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА КАЗЕИНА С ПОМОЩЬЮ СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕПТИДАЗЫ *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENIS* IMB B-7465**

Исследована кинетика гидролиза казеина свободной и высвобожденной из пленок ПВС/хитозан пептидазы из *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465. Показано, что только модифицированный метод Ансона применим для определения казеинолитической активности высвобожденной из матрицы пептидазы. Определено, что включение энзима в пленку ПВС/хитозан существенно не влияет на  $V_{\max}$  гидролиза, тогда как  $K_m$  увеличивается в 1,3 раза. Выявлено ингибирование свободной и высвобожденной из пленок пептидазы субстратом. Показано, что  $K_{is}$  последней в 2,3 раза превышает такую свободного энзима, что позволяет гидролизовать большие концентрации субстрата.

**Ключевые слова:** кинетика, пептидаза, иммобилизация, матрица ПВС/хитозан

**O. V. Sevastyanov<sup>1</sup>, Yu. A. Shesterenko<sup>1</sup>, A. A. Ryzhak<sup>1</sup>, I. I. Romanovska<sup>1</sup>,  
L. D. Varbanets<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>A.V. Bogatsky Physico-chemical Institute, NAS of Ukraine  
Odessa, Ukraine, Lyustdorfskaya doroga, 86,

<sup>2</sup> D.K. Zabolotny Institute of Microbiology an Virology of the NASU  
Kiev, Ukraine, Academician Zabolotny, 154  
E-mail: romairina@gmail.com

### **KINETICS OF CASEIN HYDROLYSIS BY FREE AND IMMOBILIZED PEPTIDASE FROM *BACILLUS* *THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENIS* IMB B-7465**

In the process of proteases immobilization, their conformation, affinity of enzymes to the substrate, as well as other properties, may change. Therefore, their comprehensive study, including the reaction rates, affinity to the substrate and the determination of the mechanism of action using kinetic studies of free and immobilized peptidases, is an important task.

This work aimed to determine the kinetic parameters of casein hydrolysis catalyzed by free and released from PVA/chitosan films peptidase from *B. thuringiensis var. israelensis* IMB B-7465.

The kinetics of casein hydrolysis of free and released from PVA/chitosan films peptidase from *Bacillus thuringiensis var. israelensis* IMB B-7465 was studied. It is shown, that only the modified Anson method is applicable for determining the caseinolytic activity of peptidase, released from the matrix.

It was revealed, that at relatively low substrate concentrations, the reaction rate of casein hydrolysis catalysed by free and released from PVA/chitosan films peptidase increased proportionally. When substrate concentration increased, the rate value approached its limit, and then began to decrease. That is, in the certain casein concentration range, the enzyme is inhibited by the substrate.

The kinetic constants were measured within the ascending part of the curve relating the initial reaction rate and the substrate concentration.

It was determined that the entrapment of the enzyme in the PVA/chitosan film does not significantly affect  $V_{max}$  of hydrolysis, while  $K_m$  is increased 1.3-fold. It is associated with decreasing of the affinity of the enzyme to the substrate as a result of conformational changes in the protein globule, or due to the viscosity limitations, caused by polymers of the matrix.

Substrate inhibition of free and released from films peptidase was studied. It was shown that the last  $K_{is}$  is 2.3-fold higher, than that of the free enzyme, which allows to hydrolyze higher concentrations of the substrate.

**Keywords:** kinetics, peptidase, immobilization, PVA/chitosan matrix

## REFERENCES

1. Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L. *Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins*. J. Dairy Sci., 1983, vol. 66, pp. 1219-1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
2. Diyanat S., Homaei A., Mosaddegh E. *Immobilization of Penaeus vannamei protease on ZnO nanoparticles for long-term use*. Int. J. Biol. Macromol., 2018, vol. 118, pp. 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.075>
3. Hartree E.F. *Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response*. Analyt. Biochem., 1972, vol. 48, pp. 422-427. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2)
4. Kumari A., Kaur B., Srivastava R., Sangwana R.S. *Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties*. Biochem. Biophys. Rep., 2015, vol. 2, pp. 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.05.009>
5. Keleti T. *Osnovy fermentativnoy kinetiki*. Moscow, Mir, 1990. 348 p. (in Russian)
6. Kunitz M. *Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties*. J. Gen. Physiol., 1947, vol. 30, pp. 291-310.
7. Li J., Cai J., Zhong L., Du Y. *Immobilization of a protease on modified chitosan beads for the depolymerization of chitosan*. Carbohydrate polym., 2012, vol. 87, pp. 2697-2705. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.062>
8. Nwagu T.N., Ugwuodo C.J. *Stabilizing bromelain for therapeutic applications by adsorption immobilization on spores of probiotic Bacillus*. Int. J. Biol. Macromol., 2019, vol. 127, pp. 406-414. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.061>
9. Petrova I.S., Vintsyunayte M.N. *Opredele niye proteoliticheskoy aktivnosti fermentnykh preparatov mikrobiologicheskogo proiskhozhdeniya*. Prikl. biokhim. mikrobiol. 1966, vol. 2, pp. 322-327. (in Russian)
10. Ryzhak O.A., Dekina S.S., Shesterenko Ye.A., Dzyublyuk N.A. *Fizyko-khimichni vlastyosti immobilizovano-ho proteyinu z Bacillus thuringiensis*. XX naukova molodizhna konferentsiya «Problemy i dosyahnennya suchasnoyi khimiyi», 27-28 September 2018, Odesa, 20018, P. 59. (in Ukrainian)
11. Sattar H., Aman A., Qader S.A.U. *Agar-agar immobilization: An alternative approach for the entrapment of noi proteazy to improve the catalytic efficiency, thermal stability and recycling efficiency*. Int. J. Biol. Macromol., 2018, vol. 111, pp. 917-922. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.105>
12. Sevastyanov O.V., Shesterenko Yu.A., Ryzhak A.A., Romanovska I.I., Dziubliuk N.A., Varbanets L.D. *Kinetics of casein hydrolysis by peptidase from Bacillus thuringiensis var. israelensis IMB B-7465*. Ukr. Biochem. J., 2019 (in press).



13. Stohniy E.M., Chernyshenko V.O., Nidialkova N. A., Rebriev A.V., Varbanets L.D., Hadzhynova V.E., Chernyshenko T.M., Kolesnikova I.M., Lugovsko E.V. *Mapping of residues of fibrinogen cleaved by protease II of Bacillus thuringiensis var. israelensis IMV B-7465*. Ukr. Biochem. J., 2016, vol. 88(spec.issue), pp. 79-86. <https://doi.org/10.15407/ubj88.si01.079>
14. Teylor G. *Vvedeniye v teoriyu oshibok*. Moscow, Mir, 1985, 272 p. (in Russian)
15. Thakrar F.J., Singh S.P. *Catalytic, thermodynamic and structural properties of an immobilized and highly thermostable alkaline protease from a haloalkaliphilic actinobacteria, Nocardioopsis alba TATA-5*. Bioresour Technol., 2019, vol. 278, pp. 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.058>