

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

*На правах рукописи*

**Сорокин Андрей Викторович**

**МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ,  
СТРУКТУРА И АКТИВНОСТЬ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ В  
КОМПЛЕКСАХ С ПРОИЗВОДНЫМИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ**

1.5.2. Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, доцент  
Холявка Марина Геннадьевна

Воронеж – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Бромелин, папаин и фицин: строение, свойства и применение .....	12
1.1.1 Бромелин, его свойства и применение .....	16
1.1.2 Папаин, его свойства и применение .....	22
1.1.3 Фицин, его свойства и применение .....	27
1.2 Комплексообразование ферментов .....	31
1.2.1 Комплексообразование ферментов. Сущность методов комплексообразования и преимущества использования .....	31
1.2.2 Способы получения комплексов ферментов .....	36
1.2.3 Стратегии выбора компонентов для получения белок-полисахаридных комплексов .....	39
II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	43
2.1 Объекты исследования .....	43
2.2 Синтез и характеристика сополимеров карбоксиметилцеллюлозы .....	43
2.2.1 Гель-проникающая хроматография .....	45
2.2.2 ИК-спектроскопия .....	45
2.2.3 <sup>1</sup> H ЯМР-спектроскопия .....	46
2.2.4 Просвечивающая электронная микроскопия .....	46
2.2.5 Лазерный доплеровский микроэлектрофорез .....	46
2.2.6 Динамическое светорассеяние .....	47
2.3 Изучение комплексных препаратов цистеиновых протеаз .....	47
2.3.1 Получение комплексов цистеиновых протеаз .....	47
2.3.2 Измерение количества белка в препаратах .....	47
2.3.3 Измерение протеазной активности ферментных препаратов .....	48
2.3.4 Определение стабильности комплексных препаратов протеаз .....	49
2.3.5 Исследование изменений вторичной структуры белка в комплексах с полисахаридами .....	49
2.4 Молекулярный докинг .....	50
2.5 Статистическая обработка результатов исследования .....	51
III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	52
3.1 Гибкий молекулярный докинг цистеиновых протеаз, натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимеров с <i>N</i> -винилимидазолом или <i>N,N</i> -диметиламиноэтилметакрилатом .....	52
3.1.1 Детализация результатов гибкого молекулярного докинга бромелина и модифицированных полисахаридов .....	54

3.1.2 Детализация результатов гибкого молекулярного докинга папаина и модифицированных полисахаридов.....	58
3.1.3 Детализация результатов гибкого молекулярного докинга фицина и модифицированных полисахаридов.....	64
3.2 Синтез и свойства сополимеров карбоксиметилцеллюлозы .....	76
3.2.1 Синтез сополимеров .....	77
3.2.2 Свойства водных дисперсий сополимеров.....	84
3.3 Исследование особенностей взаимодействия бромелина, папаина и фицина с полисахаридами методом ИК-спектроскопии.....	88
3.4 Исследование протеолитической активности комплексов бромелина, фицина и папаина с полимерными матрицами.....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	110
ВЫВОДЫ .....	112
ПЕРЕЧЕНЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	114

## СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

КМЦ – натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы

ВИ – *N*-винилимидазол

ДМАЭМА – *N,N*-диметиламиноэтилметакрилат

КМЦ-ВИ – сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с *N*-винилимидазолом

КМЦ-ДМАЭМА – сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом

трис-НС1 – трис(гидроксиметил)аминометан

ПСК – персульфат калия

МБС – метабисульфит натрия

ЭП – эффективность прививки

ЧП – частота прививки

$M_w$  – средневесовая молекулярная масса

$R_h$  – гидродинамический радиус

$\zeta$  – электрокинетический потенциал

$n_D^{20}$  – показатель преломления жидкости при 20°C

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

## ВВЕДЕНИЕ

**Постановка проблемы и ее актуальность.** Современные тенденции биофизики направлены на углубление фундаментальных знаний о строении и функциональной активности биосистем в тесном сочетании с их практическим применением. Взаимодействие биомакромолекул различной природы, в частности белков и полисахаридов, между собой формирует уникальную среду, структурные и физико-химические свойства которой определяют специфическую функциональную нагрузку белок-полисахаридных комплексов по сравнению с индивидуальными функциями каждого типа биополимеров [1-3]. Фундаментальные исследования межмолекулярных взаимодействий биологических макромолекул являются неотъемлемой частью современной молекулярной биофизики. В последнее время все большее внимание ученых привлекают комплексы ферментов с различными типами биополимеров, в которых модулируется их структура и функциональная активность [4].

Цистеиновые протеазы – бромелин, папаин и фицин – характеризуются высокой протеолитической активностью, широкой субстратной специфичностью и оптимумами действия и находят свое применение в биотехнологии и биомедицине. Наличие разнообразных данных по структурно-функциональным свойствам делает этот тип ферментов удобным объектом для решения задач об установлении корреляции структура-свойство (активность) [5-7].

Однако, несмотря на столь обширные сферы применения, эти ферменты не лишены ряда существенных недостатков, осложняющих их практическое использование. Активный центр фицина, бромелина и папаина содержит тиольную группу, которая легко подвергается окислению, поэтому рассматриваемые ферменты в высокой степени подвержены деструктивному влиянию окружающей среды, что негативно сказывается на функциональных свойствах ферментов, снижая время их полужизни [8].

В свою очередь, стабилизация структуры и модуляция каталитической активности ферментов за счет межмолекулярных взаимодействий с микроокружением, включая водородные связи, гидрофобные и электростатические силы, является одной из центральных задач современной биофизики [9, 10]. В настоящее время предлагаются различные подходы к решению проблемы стабилизации структуры рассматриваемых ферментов: от геномного редактирования продуцентов до химической модификации белковых макромолекул, однако, одним из самых доступных подходов к стабилизации структуры ферментов является в настоящее время их фиксация на каком-либо полимере, например, полисахариде [10, 11]. Этот процесс хорошо изучен для многих типов ферментов, выяснена функциональная роль подобной стабилизации в живых системах, прием широко внедрен в различные биотехнологические схемы, однако, в виду особенностей строения белковых молекул и разнообразия структуры и свойств стабилизирующих матриц, сложно однозначно определить молекулярные механизмы воздействия иммобилизирующей системы на структуру и каталитическую активность фермента в каждом конкретном случае. Чаще всего подбор матриц осуществляется эмпирическим путем, что значительно усложняет исследования и процесс накопления теоретических представлений о взаимодействии белков с макромолекулярным окружением. Решить эту проблему в определенном смысле можно взглянув на нее с различных сторон, используя комплекс взаимодополняющих расчетных и экспериментальных биофизических подходов [12].

По многообразию регулируемых свойств высокие перспективы имеют гибридные каталитические системы на основе ферментов и полисахаридов. Благодаря своим уникальным структурным особенностям, включающим перестраиваемые физико-химические и функциональные характеристики, белок-полисахаридные комплексы являются перспективными системами для применения в биотехнологии, медицине, фармакологии и пищевой промышленности [3, 4, 7]. Работы по получению качественной и

количественной информации о структуре и других физико-химических характеристиках белков, полисахаридов и супрамолекулярных комплексов на их основе востребованы в фундаментальной и прикладной науке. Таким образом, исследования, посвященные изучению особенностей взаимодействия цистеиновых протеаз с полимерными иммобилизующими матрицами, а также оценка влияния этих взаимодействий на структуру, каталитическую активность и стабильность белок-полисахаридных комплексов является актуальной задачей современной физико-химической биологии и молекулярной биофизики.

**Цель настоящей работы** – изучение структурно-функциональных свойств цистеиновых протеаз бромелина, папаина и фицина в комплексах с производными целлюлозы.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Исследование особенностей взаимодействия бромелина, папаина и фицина с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимерами с *N*-винилимидазолом и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом методами молекулярного докинга и ИК-спектроскопии, а также анализ топологии образующихся комплексов.

2. Изучение вторичной структуры цистеиновых протеаз в составе комплексов с карбоксиметилцеллюлозой и ее производными.

3. Оценка и анализ структурно-функциональных особенностей белок-полисахаридных комплексов, характеристика их каталитической активности и времени полужизни.

#### **Научная новизна работы.**

Новизна работы состоит в комплексном исследовании особенностей взаимодействия цистеиновых протеаз: бромелина, папаина и фицина с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимерами с *N*-винилимидазолом и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом и оценке структурно-функциональных свойств цистеиновых протеаз в составе белок-полисахаридных комплексов.

Впервые предложен способ получения комплексов бромелина и папаина с карбоксиметилцеллюлозой и ее сополимерами, осуществлена количественная оценка конформационных изменений бромелина, папаина и фицина в комплексах с новыми, ранее неописанными иммобилизационными системами – сополимерами натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с *N*-винилимидазолом и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом. Для детального изучения особенностей взаимодействия исследуемых цистеиновых протеаз с матрицами, названных выше полисахаридов, был применен комплексный подход, заключающийся в сочетании взаимодополняющих биофизических методов – молекулярного докинга и ИК-спектроскопии.

В работе показано, что взаимодействие исследуемых ферментов с производными карбоксиметилцеллюлозы вызывает более существенные изменения во вторичной структуре белков по сравнению с немодифицированным полисахаридом, что приводит к значительному повышению стабильности для всех исследуемых ферментов, увеличивая время их полужизни до 12 раз. Выявлена возможность повышения активности цистеиновых протеаз в ходе их комплексообразования с полисахаридами. Установлено, что модуляция активности названных протеаз осуществляется за счет изменений во вторичной структуре белка: взаимодействие бромелина и фицина со всеми рассматриваемыми полисахаридами приводят к разрушению части  $\alpha$ -спиральных участков, для папаина при взаимодействии с карбоксиметилцеллюлозой происходит увеличение доли  $\beta$ -структур, а в случае комплексообразования с производными карбоксиметилцеллюлозы происходит резкое снижение содержания  $\beta$ -структур.

Достоверность научных результатов подтверждается использованием ряда современных биофизических методов исследования и воспроизводимостью экспериментальных данных.

#### **Научно-практическая значимость.**

Разработаны гибридные ферментные препараты цистеиновых протеаз – бромелина, папаина и фицина, отличающиеся повышенной стабильностью и



протеолитической активностью по сравнению с нативными ферментами. Эти биокатализаторы на основе нетоксичных компонентов имеют широкие перспективы для применения в фармакологии и биомедицине. Сочетание способности полисахаридов образовывать пленки и антибактериальной активности изучаемых ферментов может быть использовано при создании multifunctional перевязочных материалов, соответствующих пункту НЗ Стратегии научно-технического развития Российской Федерации. На основании проведенных исследований получено три патента РФ на изобретения (2750378, 2750377, 2744457).

Экспериментальные данные и методические подходы, изложенные в работе, могут быть использованы в учреждениях биофизической и физико-химической направленности, занимающихся современными проблемами энзимологии, исследованием взаимосвязи структуры и функций биомакромолекул, а также изучением влияния микроокружения на активность ферментов. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, вошли в лекционные курсы дисциплин «Биофизика» и «Физика ферментов», читаемых на старших курсах медико-биологического факультета Воронежского государственного университета. Кроме того, полученные материалы можно применять для направленного воздействия (модуляции) активности ферментов, что имеет большое значение для технологий биокатализа.

**Связь работы с научными программами и собственный вклад автора.** Исследовательская работа выполнялась в рамках проекта, поддержанного грантом РФФИ, «проект № 21-74-20053». Данные ИК-спектроскопии получены и интерпретированы совместно со с.н.с. лаборатории биофизической химии наносистем КИББ ФИЦ КазНЦ РАН к.б.н. Файзуллиным Джигангиром Асхатовичем, микрофотографии ПЭМ получены заведующим лабораторией микроскопии КИББ ФИЦ КазНЦ РАН д.б.н. Сальниковым Вадимом Владимировичем, исследования по определению стабильности иммобилизованных ферментов были выполнены совместно с

м.н.с. кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ Гончаровой Светланой Сергеевной. Результаты молекулярного докинга получены заведующим лабораторией структуры и динамики биомолекулярных систем, к.ф.-м.н. Кондратьевым Максимом Сергеевичем. Научные положения и выводы диссертации основаны на результатах собственных исследований автора.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В ходе самопроизвольно протекающего многоточечного взаимодействия цистеиновых протеаз с карбоксиметилцеллюлозой и ее производными молекулы полисахаридов локализуются вблизи каталитического кармана ферментов.

2. Взаимодействие ферментов с полисахаридной матрицей приводит к изменениям в их вторичной структуре: при комплексообразовании фицина и бромелина со всеми изученными полисахаридами наблюдается снижение количества  $\alpha$ -спиральных участков, в системе папаин-карбоксиметилцеллюлоза происходит увеличение доли  $\beta$ -слоев во вторичной структуре фермента, а при его взаимодействии с сополимерами – их содержание сокращается в несколько раз.

3. Комплексообразование цистеиновых протеаз с карбоксиметилцеллюлозой и ее сополимерами приводит к повышению каталитической активности ферментов до 2.5 раз и увеличению времени полужизни комплексных препаратов до 12 раз по сравнению с нативными ферментами.

**Апробация работы.** Результаты диссертационного исследования прошли апробацию на следующих Всероссийских и Международных конференциях: III школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» с международным участием (г. Казань, 2021); X Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (г. Алушта, 2022); XVII Международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии.

БФФХ–2022» (г. Севастополь, 2022); Школа-конференция для молодых ученых «Самоорганизация в «мягких» средах: достижения и современное состояние» памяти И.Я. Ерухимовича (г. Москва, 2022); VII Съезд биофизиков России (г. Краснодар, 2023).

**Публикации.** По теме диссертационной работы имеется 14 публикаций, из них 3 патента на изобретение, в перечень ВАК или МБД WoS и Scopus входят 6.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа включает 135 страниц машинописного текста; состоит из «Введения», 3 глав, «Заключения», «Выводов». Перечень цитируемой литературы содержит 201 источник. Иллюстративный материал включает 30 рисунков и 13 таблиц.

**Благодарности.** Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в получении и интерпретации экспериментальных данных с.н.с. лаборатории биофизической химии наносистем КИББ ФИЦ КазНЦ РАН к.б.н. **Файзуллину Джигангиру Асхатовичу**, заведующему лаборатории микроскопии КИББ ФИЦ КазНЦ РАН д.б.н. **Сальникову Вадиму Владимировичу** и м.н.с. кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ **Гончаровой Светлане Сергеевне**.

Автор благодарен заведующему кафедрой биофизики и биотехнологии ВГУ д.б.н., проф. **Артюхову Валерию Григорьевичу** за помощь в поиске формулировок, наиболее полно отражающих глубину работы и ее связь с фундаментальными аспектами молекулярной биофизики.

Искренние слова благодарности научному руководителю, д.б.н., профессору кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ **Холявка Марине Геннадьевне** за то, что открыла мир биофизического знания и показала, насколько он интересен и многогранен.

Особую благодарность автор выражает с.н.с. кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ, к.х.н. **Лавлинской Марии Сергеевне** за колоссальную помощь на всех этапах исследования и дружескую поддержку во время преодоления всех сложностей, возникавших при выполнении работы.

# I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Бромелин, папаин и фицин: строение, свойства и применение

Бромелин, папаин и фицин являются представителями гидролитических ферментов, точнее – протеолитических энзимов (КФ 3.4) растительного происхождения. Протеазы — это ферменты, ускоряющие расщепляющие связей С-N, образующихся между аминокислотами, и высвобождающие последние из макромолекул белков и пептидов. Широкое распространение протеаз среди растений, животных и микроорганизмов свидетельствует о том, что они необходимы для живых организмов и играют важную физиологическую роль в весьма разнообразных биологических процессах [13]. Так, например, протеолиз, в котором протеазы принимают непосредственное участие, является одним из завершающих этапов посттрансляционного процессинга для многих белков [14].

С точки зрения промышленного использования протеазы, являются наиболее важными представителями катализирующих белков, поскольку на их долю приходится порядка 60 % выпускаемых коммерческих ферментных препаратов в мире. Эта ситуация обусловлена широтой областей применения протеолитических энзимов, включающих пищевые биотехнологии, фармацевтическую и косметическую промышленности, производство моющих средств и, конечно же, биомедицину [15].

Количество используемых в деятельности человека протеаз растительного происхождения довольно ограничено, и бромелин, папаин и фицин занимают среди них особое место [16, 17]. Это обусловлено их практически ценными свойствами, среди которых не только протеолитическая активность в отношении многих субстратов, но и устойчивость в довольно широком диапазоне температур и значений рН среды [5]. Причинами этого, в свою очередь, являются особенности пространственного строения их молекул и структуры активного центра.

## Структура макромолекулы и строение активного центра бромелина, папаина и фицина. Механизм их каталитического действия

Бромелин, папаин и фицин относятся к цистеиновым протеазам, т.е. в их активном центре содержится остаток цистеина. Кроме того, они высококогомологичны друг другу, т.е. различия в аминокислотной последовательности для всех трех ферментов минимальны. Рассмотрим конформационные особенности макромолекулы и активного центра цистеиновых протеаз на примере самого изученного представителя из указанных белков – папаина.

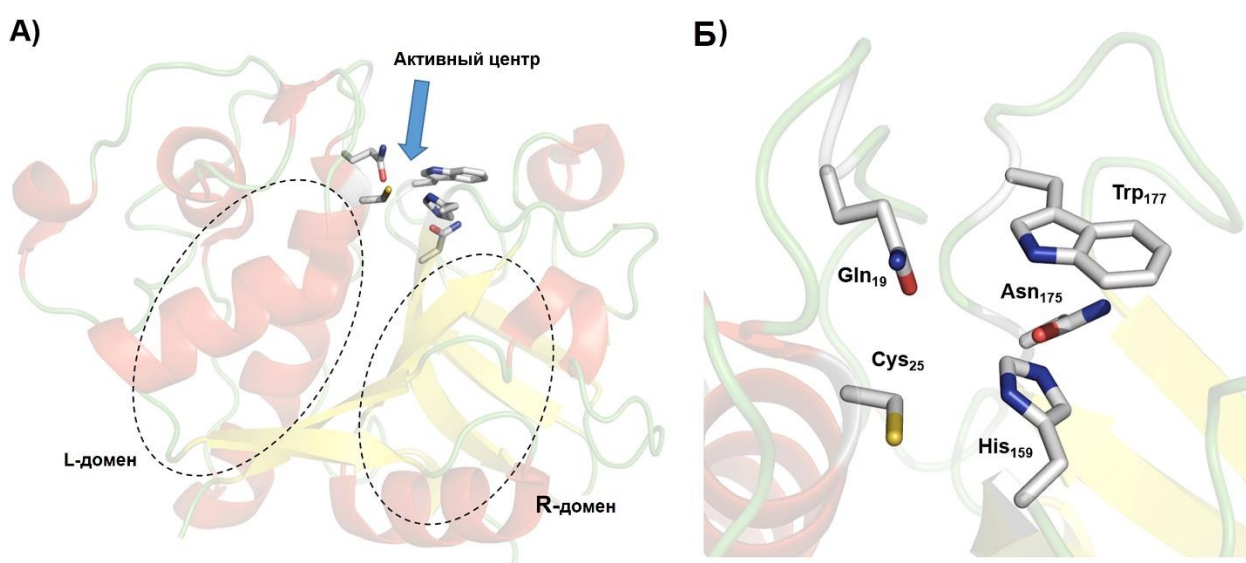


Рис. 1. Трехмерная модель макромолекулы папаина (PDB ID: 1PPN) (А) и каталитически значимые остатки аминокислот (Б) [18].

Цистеиновые протеазы характеризуются консервативной структурой, состоящей из двух четко выраженных доменов *L*- и *R*-, представляющих собой совокупность преимущественно  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев, соответственно (рис. 1) [18]. Папаин – это глобулярный белок, каждая макромолекула которого содержит три дисульфидных мостика. Его активный центр располагается на границе доменов в виде V-образной щели (каталитического кармана) и включает в себя ряд аминокислотных остатков, число которых варьируют по представлениям различных исследователей. Наиболее часто ученые выделяют цистеин (Cys), гистидин (His), аспарагин (Asn) и глутамин (Gln), которые консервативны во всех папаиноподобных протеазах (рис. 1). В модели

макромолекулы папаина (PDB ID: 1PPN) Cys25 и His159 образуют ионную пару и субстрат-связывающий карман. Согласно современным представлениям, остаток Asp175 участвует в процессе формирования стерически выгодной ориентации имидазольного цикла, содержащегося в His159, путем образования водородной связи между ними. Однако было показано, что этот процесс не является строго необходимым для эффективного катализа [19].

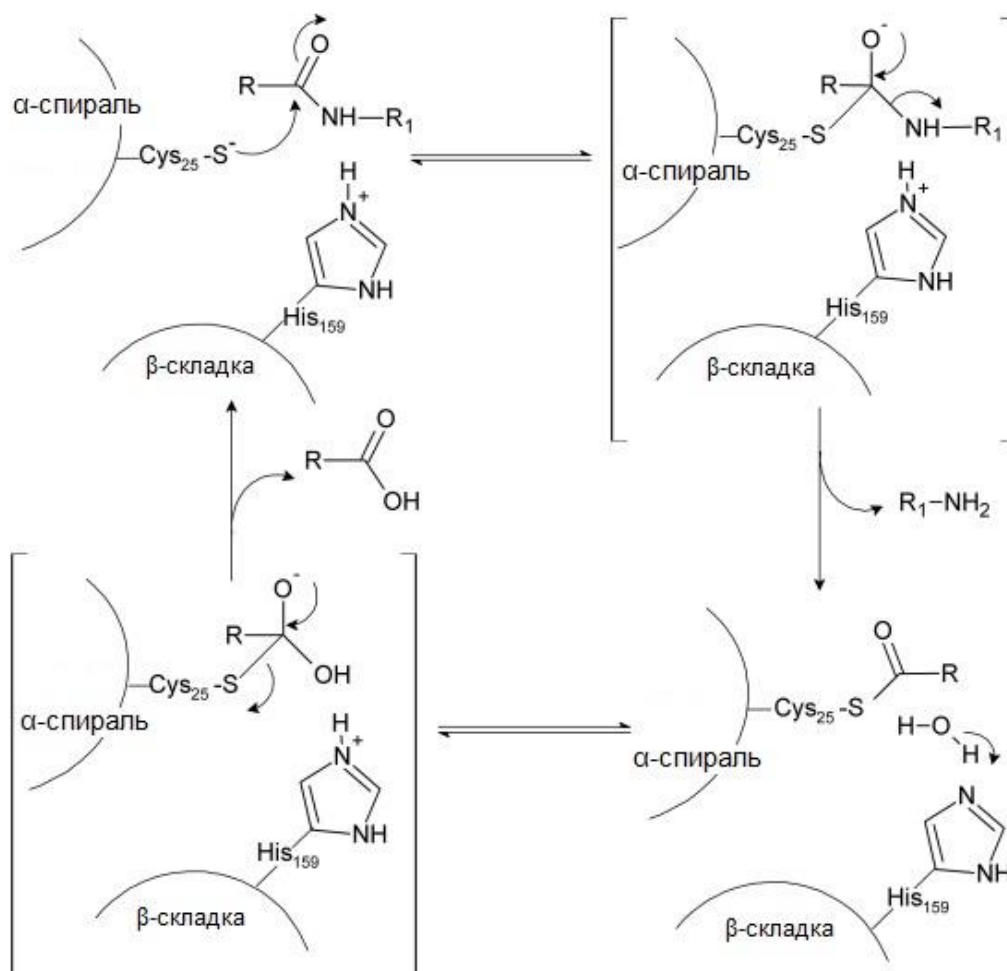


Рис. 2. Механизм каталитического действия папаина [18].

Механизм взаимодействия цистеиновой протеазы с субстратом можно представить следующим образом: тиольная группа Cys25 атакует карбонильный атом углерода пептидной связи субстрата, в результате чего образуется интермедиат тетраэдрической геометрии. Этот промежуточный продукт из-за своей низкой стабильности спонтанно разрушается с высвобождением карбонильной группы, что приводит к образованию

комплекса фермент-субстрат, гидролизующийся на свободный фермент и *N*-концевой фрагмент субстрата (рис. 2) [18]. Как уже отмечалось выше, некоторые исследователи относят к каталитически значимым аминокислотным остатком Gln19, который, согласно их представлениям, принимает участие в формировании оксианионного окна, смещающего на себя избыточную электронную плотность и, таким образом, стабилизирующего тетраэдрический интермедиат. Кроме того, следует отметить, что Trp17 участвует в усилении нуклеофильных свойств образуемой ионной пары Cys25–His159 (рис. 2).

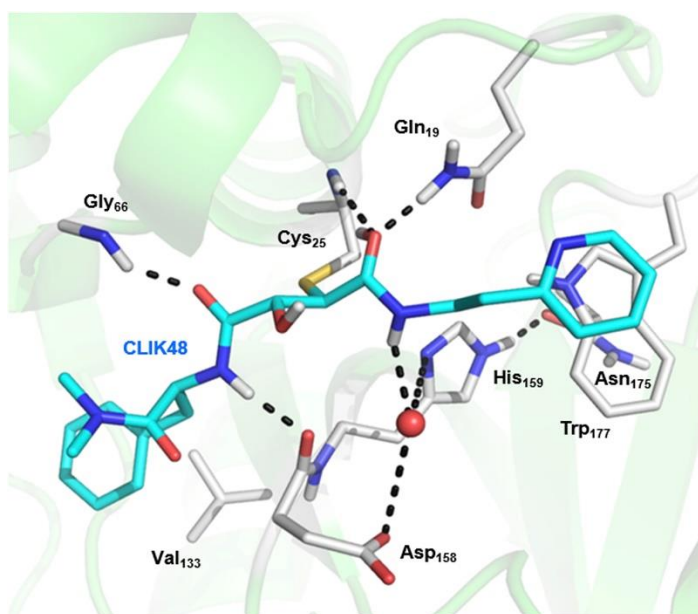


Рис. 3. Модель структуры CLIK148 (пиридилэтиламино-*N*-(транс-карбамоилоксиран-2-карбонил)-*L*-фенилаланин-диметиламид, атомы С – голубые), связанной с активным центром папаина. Образованные водородные связи между лигандом и белком показаны черными пунктирными линиями. Молекула воды представлена в виде красной сферы.

Для более подробного исследования механизма связывания субстрата цистеиновой протеазой, было осуществлено *in silico* исследование взаимодействия папаина с CLIK148 (пиридилэтиламино-*N*-(транс-карбамоилоксиран-2-карбонил)-*L*-фенилаланин-диметиламид), являющегося типичным ингибитором *L*-специфического катепсина (рис. 3) [20]. Установлено, что водородная связь, образуемая между Asn175 и His159,

стабилизирует субстрат-связывающий карман и ориентирует имидазольное кольцо, присутствующее в остатке His159. Тиольная группа Cys25 ковалентно связывается с С2-атомом CLIK148. Кроме того, ингибитор фиксируется в активном центре водородными связями: они формируются между атомами азота Cys25 и Gln19 и атомом кислорода O1 CLIK148; атом азота Gly66 связан Н-связью с атомом O3 CLIK148; также водородная связь образуется между атомом кислорода Asp158 и N5 атомом CLIK148. В процессе комплексообразования ферментов могут принимать участие и побочные соединения, например, молекулы воды. Как видно на рис. 3, молекула воды находится в активном центре папаина, вблизи остатка His159, поэтому наблюдается образование трех дополнительных Н-связей с участием воды: у N7-атома CLIK148, карбонильного кислорода Asp158 и N1-атома His159. Наконец, выявлено наличие нескольких гидрофобных взаимодействий между CLIK148 с остатками Trp177 и Val133.

Таким образом, показано, что цистеиновые протеазы: бромелин, папаин и фицин – ферменты, катализирующие реакции расщепления пептидных связей и содержащие в активном центре цистеин, характеризуются консервативной структурой с двумя четко выраженными доменами и активным центром, находящимся на их границе. Описан механизм их каталитического действия. Взаимодействие с субстратом, направленное на его удержание в активном центре, реализуется, в основном, за счет образования водородных связей, однако, могут наблюдаться и другие типы взаимодействий.

### **1.1.2 Бромелин, его свойства и применение**

Все эндопептидазы растения ананас (*Ananas comosus*) обычно называют бромелинами, поэтому название «бромелин» первоначально применялось к любой протеазе, выделенной из представителей семейства Bromeliaceae [21]. Следуя этой логике, названия «бромелин из стебля» и «бромелин из плода»



используются для обозначения основного источника энзима – сока стебля или плода растений. Первоначально Международный союз биохимии и молекулярной биологии присвоил этим ферментам отдельные систематические номера: КФ 3.4.4.24 и КФ 3.4.4.25; позднее – объединил под единым номером КФ 3.4.22.4 и снова разделил в 1992 г. Согласно современной номенклатуре, бромелин, выделяемый стебля (англ. *stem bromelain*) имеет номер КФ 3.4.22.32, а бромелин из плода (англ. *fruit bromelain*) – КФ 3.4.22.33 [22].



Рис. 4. Пространственная модель молекулы бромелина, выделяемого из стебля *Ananas comosus* (PDB ID: 1W0Q [23])

Стеблевой бромелин представляет собой одноцепочечный белок с молекулярной массой 24.5 кДа [24] и содержит в составе своей макромолекулы олигомерный углеводный фрагмент. Олигосахаридная составляющая стеблевого бромелина способствует повышению стабильности фермента [25-28], что характерно для многих гликопротеинов, а также его устойчивости к действию денатурирующих агентов, таких как гидрохлорид гуанидина [26] и мочевины [27]. Бромелин, выделяемый из стебля, также

устойчив к денатурации додецилсульфатом натрия несмотря на то, что для многих протеаз последний является частичным ингибитором. Было показано, что активный центр фермента сохраняет стабильность даже в присутствии высоких концентраций этой соли [28].

Аминокислотная последовательность бромелина, выделенного из стебля, полностью расшифрована [29]. Установлено, что он относится к папаиноподобным энзимам. В его макромолекуле содержится семь остатков цистеина (табл. 1) [22, 30]. Фермент характеризуется наличием изоэлектрической точки при  $pH=9.55$ ; его вторичная структура достаточно устойчива в диапазоне  $pH 7-10$ , но необратимо разрушается при значениях  $pH$  выше 10 [31].

Таблица 1

Аминокислотный состав бромелина, выделенного из стебля *Ananas comosus* [32]

Аминокислота	Количество остатков
Asp	18
His	1
Met	3
Leu	6
Phe	6
Arg	6
Cys	7
Thr	9
Val	14
Tyr	14
Lys	15
Glu	16
Ser	17
Ile	17
Gly	22
Ala	25

Бромелин, выделенный из плода ананаса, также представляет собой одноцепочечный белок с молекулярной массой примерно 25 кДа [33]. Изоэлектрическая точка белка находится значительно ниже, чем у фермента,

выделенного и стебля, и ее значение составляет 4.6 [34]. Энзим содержит углеводную часть, однако, ее состав до конца не изучен [35, 36]. Аминокислотная последовательность фермента, выделенного из плода, также содержит семь остатков цистеина [37].

На бромелин, выделяемый из стебля, приходится практически 90% протеолитически активного материала, присутствующего в экстракте стебля ананаса [38]. Известно, что именно стеблевой фермент содержится в растущих на плоде листьях [39]. Стоит отметить интересную особенность этого фермента: при высокой протеолитической активности бромелина в отношении белковых субстратов природного происхождения [33], было обнаружено, что в отношении синтетических субстратов он эффективен только при гидролизе связей Arg-Arg [40]. Это «роднит» бромелин с комозаином, другой эндопептидазой, содержащейся в ананасе [30, 41]. рН-оптимум бромелина в процессах гидролиза как синтетических, так и белковых субстратов достаточно широк, но в практических целях его чаще всего используют в процессах, осуществляемых вблизи нейтрального значения рН среды [30]. Для достижения максимальной активности фермента рекомендуется использовать восстанавливающие агенты, такие как дитиотреитол или цистеин.

В отличие от других эндопептидаз ананаса, стеблевой бромелин проявляет необычную кинетику ингибирования *транс*-эпоксисукциноил-*L*-лейциламидо-(4-гуанидино) бутаном (E-64) [42] и нетипичную устойчивость к ингибированию куриным цистатином, что характерно и для фермента, выделяемого из плода [24].

На бромелин, присутствующий в плоде, приходится 30–40 % всего белка, содержащегося в плоде ананаса, а также около 90 % протеолитически активного вещества [43]. Как и энзим, выделяемый из стебля, он требует присутствия восстановителя для достижения максимальной активности. Бромелин, выделяемый из плода, имеет более высокую протеолитическую активность по сравнению с ферментом, содержащимся в стебле [24],

характеризуется широким рН-оптимумом гидролиза как синтетических, так и белковых субстратов.

В настоящий момент точно неизвестно почему в растениях семейства Bromeliaceae образуются различные эндопептидазы, однако, можно предположить, что эти ферменты могут обеспечить растению защиту от паразитов, патогенов и травоядных животных. В *Ananas comosus* также присутствуют и ингибиторы бромелина, бromeины, способные регулировать активность цистеиновых эндопептидаз растения в естественных условиях [42–43].

Благодаря своей высокой активности, широким субстратной специфичности и рН-оптимуму, бромелин, преимущественно выделяемый из стеблей растений, находит широкое применение в различных областях деятельности человека. Основные сферы промышленного применения фермента представлены в таблице 2.

Таблица 2

Основные сферы применения бромелина

Сфера применения	Цели применения	Источники информации
Хлебопечение	- улучшение технологических свойств теста - производство гипоаллергенной муки	[44–46]
Тендеризация высокобелковых продуктов	- гидролиз белков мяса, рыбы, птицы и морепродуктов для снижения жесткости продукта - получение гидролизата рыбных белков (коллагена)	[47–53]
Пищевой консервант	- замедление процессов гниения фруктов и овощей	[54, 55]
Пивоварение и виноделие	- повышение стабильности белков пива - снижение вероятности и скорости образования осадков в напитках, полученных путем брожения	[56]
Производство кормов для животных	- для количественной оценки уровня гидролиза белка в кормах	[57]

Текстильная промышленность	<ul style="list-style-type: none"> <li>- при производстве белковых волокон: сокращение времени размягчения коконов шелкопрядов</li> <li>- очистка шерстяных и шелковых волокон</li> <li>- повышение интенсивности окраски белковых волокон</li> </ul>	[58, 59]
Косметическая индустрия и производство средств личной гигиены	<ul style="list-style-type: none"> <li>- добавка к зубным пастам для улучшения их очищающих свойств</li> <li>- компонент средств для лечения акне, борьбы с морщинами и сухостью кожи</li> <li>- входит в состав энзимных пилингов</li> <li>- уменьшает проявление гематом и снимает отеки</li> </ul>	[60–62]

Отдельно следует выделить применение бромелина в биомедицинских целях, обусловленное наличием у него множественных терапевтических эффектов [63–64]. Среди них: ингибирование процесса агрегации тромбоцитов и противоотечное действие [65], антитромботическая и фибринолитическая активности [66], противовоспалительное и противоопухолевое действие [67], модуляция выделения цитокинов и формирования иммунитета, свойства очистки кожи [68], усиление абсорбции других препаратов, муколитическое действие, роль в улучшении пищеварения, ускорение процессов заживления ран и др. [69–70].

Таким образом, показано, что цистеиновая протеаза бромелин, выделяемая из растений семейства Bromeliaceae, обладает широкой субстратной специфичностью, высокой активностью в диапазоне значений pH 7-10, а также рядом практически значимых свойств, что обуславливает его применение в различных сферах деятельности человека. Эти факторы делают бромелин перспективным для, например, исследований по расширению pH-оптимума фермента путем создания новых форм энзима и расширения сфер его использования.

### 1.1.3 Папаин, его свойства и применение

Папаин (КФ 3.4.22.2) — это прочтение слова «рапаїне», названия, данного Wurtz A. и Bouchut E. протеолитически активной части латекса тропического растения папайя (*Carica papaya*) [71]. Этот неочищенный высушенный латекс содержит не менее четырех цистеиновых протеаз и других ферментов [72], поэтому первоначально выделенные препараты папаина были загрязнены другими протеазами. Усовершенствования процедур очистки, предложенные Kimmel J.R. и Smith E.L. [73], позволили выделить чистый папаин. Ранние работы, посвященные папаину, обобщенные в ряде обзоров [73–74], отражают значительные достижения не только в области биологии цистеиновых протеаз, но и энзимологии в целом. Папаин является наиболее широко изученным представителем цистеиновых протеаз, а также первым ферментом этой группы, для которого определили пространственную структуру [75]. Поэтому среди протеаз, содержащих в активном центре цистеин, выделяют группу папаиноподобных ферментов.

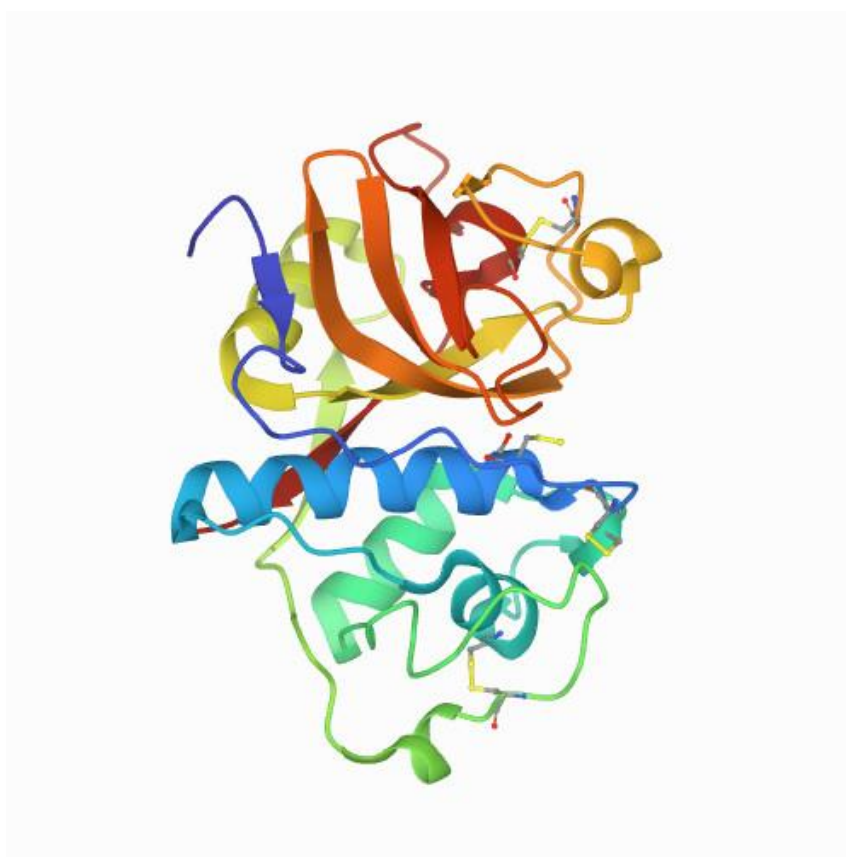


Рис. 5. Трехмерная модель молекулы папаина (PBD ID: 1PPN [76])

Папаин представляет собой одноцепочечный полипептид, не содержащий простетических или олигосахаридных групп и состоящий из 212 аминокислот; молекулярная масса составляет 23.4 кДа, в макромолекуле присутствуют три дисульфидных связи (рис. 5-6). Полипептидная цепь папаина образует глобулу с двумя взаимодействующими доменами, ограничивающими щель на поверхности фермента, где находится его активный центр. Белок является относительно основным, величина изоэлектрической точки составляет 8.75 [73–74].

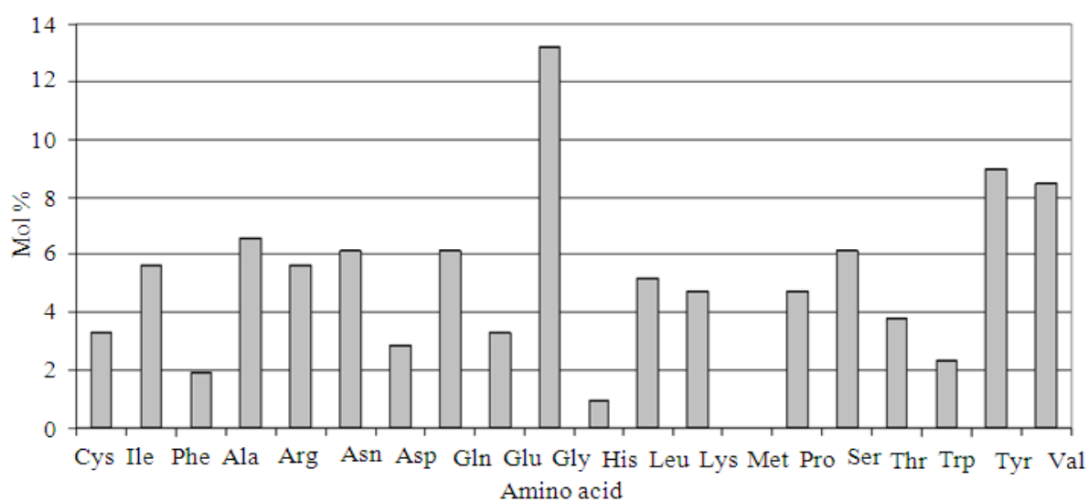


Рис. 6. Мольный аминокислотный состав макромолекулы папаина [74].

Папаин характеризуется широкой субстратной специфичностью и кроме эндопептидазной активности для него характерно проявление амидазной и эстеразной активности [77]. Преимущественно расщепляет пептидные связи, образованные основными аминокислотами, такими как аргинин, лизин, а также гидролизует связи, расположенные в пептидной цепи после фенилаланина [78]. Папаин достаточно устойчив к присутствию высоких концентраций денатурирующих агентов, таких как 8М раствор мочевины или органических растворителей, например, концентрированных растворов этилового спирта. Оптимальное значение рН среды для папаина находится в диапазоне 3.0-9.0, который варьируется в зависимости от субстрата [79, 80].

Папаин проявляет высокую стабильность в гидрофобных средах, может катализировать процессы, протекающие в органических растворителях.

Субстратная специфичность при этом практически не изменяется [81]. Обусловлена эта закономерность особенностью конформации макромолекулы нативного папаина, имеющего плотное ядро, в котором сконцентрированы остатки гидрофобных аминокислот. Ядро покрыто гидрофильной оболочкой, состоящей преимущественно из полярных остатков [82]. Оно способствует поддержанию третичной структуры белка, а полярная оболочка взаимодействует с окружающей макромолекулу средой [83].

Также как и бромелин, папаин имеет широкое практическое применение (табл. 3): активно используется в пищевой промышленности, что обусловлено его высокой протеолитической способностью. Кроме того, существуют и много других областей применения этого фермента, таких как (био)медицина, стоматология, текстильная промышленность и др.

Таблица 3.

Основные сферы применения папаина

Сфера применения	Цели применения	Источники информации
Тендеризация мяса	Гидролиз соединительных тканей и миофибриллярных белков	[84–85]
Производство белковых гидролизатов	Гидролиз белков до пептидов для их дальнейшего использования в фармации, косметологии, БАДах и т.д.	[86–87]
Производство сыра	Варьирование свойств сыров, производство мягких, полутвердых и творожных сыров	[88–89]
Хлебопечение	Повышение растворимости белков и уменьшение содержания аллергенов в муке	[90]
Производство кормов для животных	Оценка степени деградации белков в кормах для жвачных животных. Производство биоактивных пептидов	[91–92]
Пивоварение и виноделие	Разрушение некоторых нерастворимых белковых ассоциатов, образующихся во время и после ферментации пива, стабилизация вина	[93]
Производство биоэтанола	Папаин действует как дефлокулирующий агент, предотвращая флокуляцию дрожжей во время ферментации	[94]



Очистка воды	Связывание тяжелых металлов, таких как ртуть, благодаря наличию четырех сульфгидрильных групп в макромолекуле папаина	[95]
Производство средств для отбеливания зубов	Удаление пятен, налета и остатков пищи с поверхности зубов	[96]

Папаин применяется в медицине, например, в качестве препарата для начального этапа лечения пациентов с непроходимостью пищевода. Для этой цели используют его смесь с другими протеолитическими ферментами [97]. Композиции на основе папаина предложены для лечения акне легкой и средней тяжести [98, 99]. Гели, содержащие папаин в концентрации не более 4 %, широко распространены для обработки язв [100].

В настоящее время фермент вызывает значительный интерес для применения в стоматологии, где протеолитические и антибактериальные свойства папаина могут быть эффективной и безопасной альтернативой для удаления кариеса и/или зубного налета перед проведением лечебных и восстановительных процедур.

Папаин входит в состав химико-механического средства для удаления кариеса, впервые выпущенного на рынок в 2003 году под торговой маркой «Parasarie». Препарат представляет собой смесь папаина, хлорамина, толуидинового синего и ряда других минеральных компонентов [101]. Позднее появились аналоги этого препарата, такие как «Apararies», «papEdent» [102, 103] и «CarieCare» [104].

Кроме того, папаин используют как компонент зубных паст, способный эффективно удалять пятна на зубной эмали. Он может входить в состав пасты как самостоятельно, так и в сочетании с другими протеазами, например, бромелином [105].

Такое широкое использование папаина в стоматологии и производстве средств ухода за полостью рта обусловлено селективным и безопасным механизмом действия фермента. Белок воздействует только на пораженные

ткани, в которых отсутствует  $\alpha 1$ -антитрипсин плазматическая антипротеаза, ингибирующая протеолиз в здоровых тканях [106]. Принцип удаления зубного налета или кариеса включает расщепление полипептидных цепей и/или гидролиз поперечных связей коллагена. Таким образом, структуры налета или пораженных кариесом тканей становятся более рыхлыми, что значительно облегчает их удаление [107].

Папаин успешно используется для лечения травм, в том числе спортивных, и аллергии. Также было показано, что включение папаина в рацион спортсменов сокращает сроки их восстановления с 8.4 до 3.9 дней [108]. Фермент успешно используется для купирования симптомов аллергии, обусловленной повышенной кишечной проницаемостью, гипохлоргидрией и непереносимостью глютена. Фермент обладает обезболивающим и противовоспалительным действием, если симптомы обусловлены острым аллергическим синуситом, эффективен против головной или зубной боли. При этом у такой терапии отмечается отсутствие побочных эффектов [109].

Еще одним интересным примером использования папаина является создание инновационных антибактериальных упаковок для продуктов питания. В работе [110] иммобилизованный на полиуретановых пленках папаин использовали для продления срока годности сыра. Экспериментальные результаты показали, что такая упаковка может быть использована в качестве эффективного средства контроля и уменьшения роста и образования биопленок *Staphylococcus aureus*. Также показано антибактериальное действие иммобилизованных форм папаина против *Acinetobacter spp.* и *Staphylococcus aureus* [111].

Стоит отметить и другие нестандартные области применения папаина, например, очистку воды путем удаления ионов тяжелых металлов или предотвращение флокуляции дрожжей в производстве биоэтанола (таблица 3).

Таким образом, папаин – наиболее изученный представитель семейства цистеиновых протеаз, архетип папаиноподобных протеаз. На его примере подробно изучен механизм их каталитического действия. Благодаря своей

высокой протеолитической активности фермент широко используется в различных сферах деятельности человека и, кроме того, не прекращается поиск новых, в том числе и нестандартных для гидролаз, областей его использования.

#### 1.1.4 Фицин, его свойства и применение

Тот факт, что млечный сок (латекс) срезов стебля, листьев и незрелых плодов представителей рода *Ficus* обладают протеолитической активностью, известен уже много лет. Название «фицин» (англ. *ficin*) было предложено Robbins В.Н. для очищенного белого порошка с антигельминтной активностью, выделяемого из любого представителя рода *Ficus* [112]. Позднее Walti А. выделил кристаллический препарат из неназванного вида, и также назвал его фицином [113]. Существует более 1300 видов *Ficus*, латексы многих из них обладают протеолитической активностью [114], иногда это явление обусловлено наличием более чем одной протеазы [115]. В 1992 году Международный союз биохимии и молекулярной биологии рекомендовал название «фикаин» (англ. *ficain*) для «основного протеолитического компонента латекса инжира *Ficus glabrata*». Таким образом, термин «фицин» следует рассматривать как общий и универсальный.

Фицин (КФ 3.4.22.3) представляет собой одноцепочечный белок, состоящий из 220 аминокислотных остатков, молекулярная масса составляет 24.5 кДа. Аминокислотный состав фицина и папаина схожи, но в макромолекуле фицина присутствует дополнительный остаток Cys [117]. Исследование аминокислотной последовательности вокруг активного центра фицина, включающего Cys и His, показало большое сходство с соответствующими аминокислотными фрагментами в папаине [118]. Учитывая эту информацию, а также тот факт, что фицин подвергается практически полному ингибированию куриным цистатином, было доказано, что фермент относится к папаиноподобным цистеиновым протеазам. Имеет

несколько изоформ: фицин А, В, С и D2 [119], отличающихся пространственным строением.

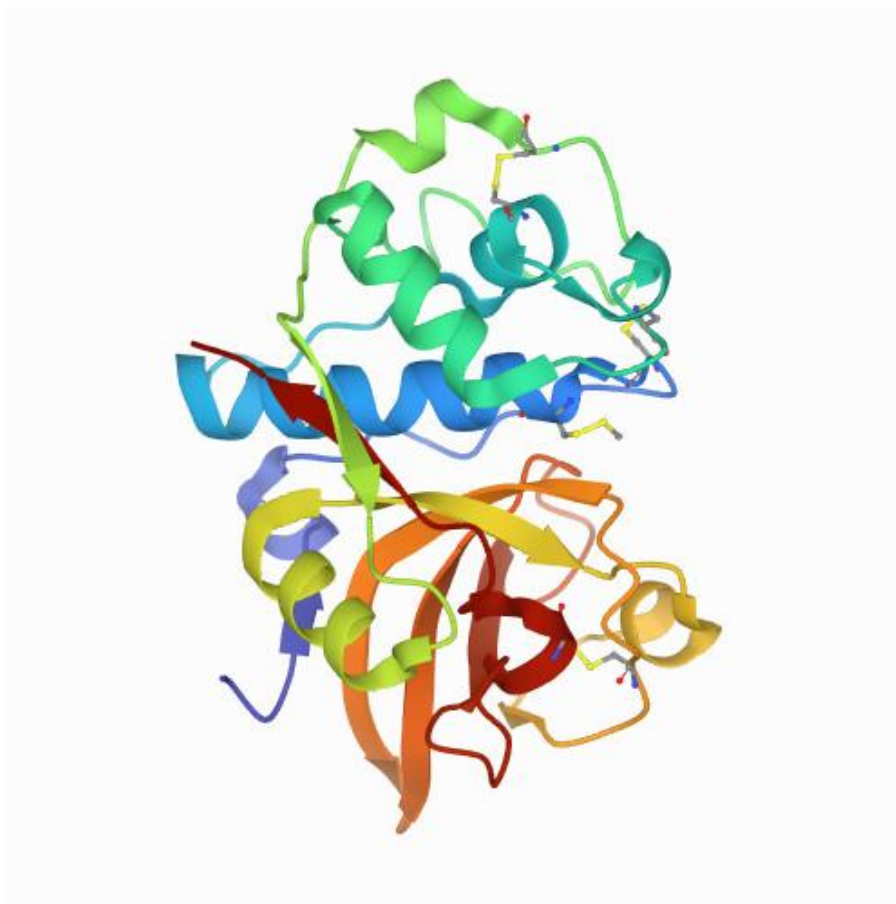


Рис. 7. Модель макромолекулы фицина D2 (PBD ID: 4YYW) [116]

Фицин является самым малоизученным представителем из всех рассматриваемых нами энзимов. Имеющиеся на настоящий момент данные свидетельствуют о том, что он в целом похож на папаин с точки зрения специфичности. Однако в ходе сравнения продуктов расщепления этими ферментами окисленной В-цепи инсулина, было установлено, что специфичность фицина к гидролизу пептидных связей, образованных гидрофобными аминокислотами выше, чем у папаина [117, 120]. рН-оптимум фицина расположен около 7.0; фермент имеет широкий профиль рН-активности, обусловленный, в первую очередь, боковыми заместителями остатков аминокислот группы со значениями  $pK_a$  4.46 и 8.37 [121]. Также как бромелин и папаин, фицин требует присутствия восстановителей для достижения максимальной активности. Было показано, что добавление 4 мМ

цистеина в буферы, содержащие фермент, существенно повышает его активность [122].

Фицин также нашел свое практическое применение: как и другие протеазы он используется в тендеризации высокобелковых продуктов питания и пищевой промышленности. Возможно его применение как в смеси с другими протеазами, и так и отдельно [123]. Есть сведения об использовании фицина как агента для коагуляции молока. Например, в работе [124] ультрафильтрованное коровье обезжиренное молоко створаживали сычужным ферментом, после чего в него вносили фицин и папаин. Наиболее яркое влияние присутствия энзимов на творог наблюдалось для однократно фильтрованного молока.

Однако анализ литературных данных показывает, что для фицина описаны и более нестандартные сферы применения. Например, было предложено использование фермента для выделения активных фрагментов антител. Эффективность процесса может быть значительно повышена, если применять только активные фрагменты, связывающие антигены. Эластаза, пепсин и фицин были применены для выделения фрагментов F(ab)<sub>2</sub> из мышинового иммуноглобулина IgG1, после чего целевые продукты фиксировали на реактивной подложке (рис. 8). В результате исследования было установлено, что в присутствии эластазы не происходит отщепления целевых компонентов, а в случае использования пепсина наблюдается гидролиз иммуноглобулинов на мелкие фрагменты, не имеющие иммунной активности. В результате применения фицина были получены превосходные результаты: выделенные активные фрагменты обнаруживали во всех случаях быстрый и воспроизводимый ответ для всех тестируемых антител. Также авторы исследования отмечают, что полученный из фицина активный фрагмент F(ab)<sub>2</sub> проявлял высококонсервативную иммунореактивность [125]. Аналогичным образом иммобилизованный фицин использовали для расщепления глипикан-3-антитела – рецептора клеточной поверхности – для получения фрагментов αGPC3-F(ab')<sub>2</sub> впоследствии конъюгированных с <sup>89</sup>Zr [126].

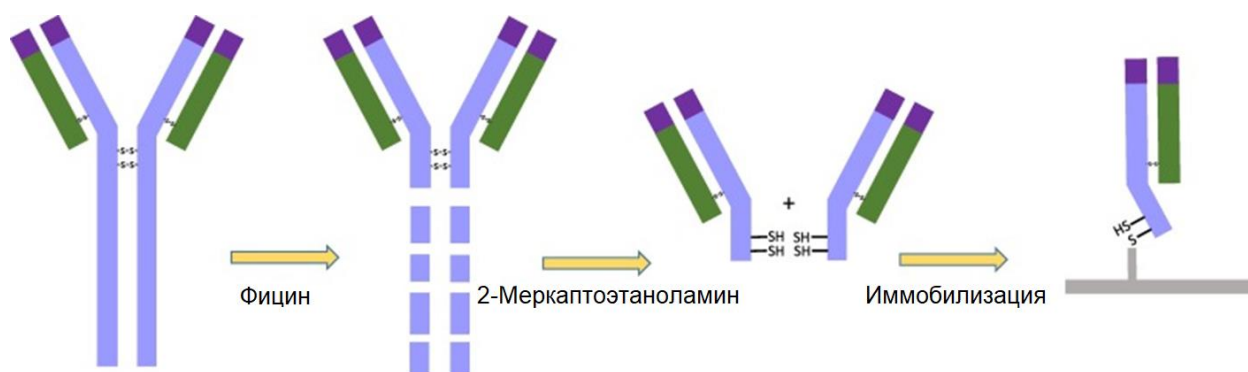


Рис. 8. Схема использования фицина для выделения активных фрагментов антител [125].

Есть сведения об использовании фицина для получения пептидов с биологической активностью путем протеолиза белков. Например, с применением фицина был получен гидролизат желатина, выделенного из *Uroteuthis duvauceli* [127]. Свойства гидролизата оценивали как ингибитор роста раковых клеток молочной железы. Опухолевые клетки MCF-7 и MDA-MB-231 использовали в качестве испытуемых, а клетки HUVEC были выбраны как контрольный образец. Было отмечено значительное ингибирование роста MCF-7 и MDA-MB-231 при этом цитотоксичности по отношению к здоровым HUVEC не наблюдалось. Эксперименты *in vivo*, проведенные на мышах, показали, что введение гидролизата желатина индуцировало биосинтез p53, предотвращало потерю веса животных, снижало уровень Ki67 и уменьшало размеры опухоли.

Фицин находит свое применение как катализатор в реакциях органического синтеза. Как и другие протеазы, энзим применяется в качестве биокатализатора в реакциях получения синтетических пептидов. Процесс характеризуется высокими выходами, достигающими 100 % [128]. Предложено использование этого фермента для катализа альдольной конденсации гетероциклических кетонов с ароматическими альдегидами [129].

Благодаря своим ценным свойствам фицин используется в биомедицинских целях, например, как антипаразитарное средство [130] и гемостатик [131].

Таким образом, показано, что фицин относится к папаиноподобных цистеиновым протеазам и во многом схож с папаином по свойствам, однако, его субстратная специфичность несколько смещена в сторону гидролиза амидных связей, образованных гидрофобными аминокислотами. Фермент используется как в традиционных для протеаз сферах применения ферментов, так и необычных, например, выделение активных фрагментов антител. Это делает фицин интересным и перспективным объектом для исследования.

## **1.2 Комплексообразование ферментов**

### **1.2.1 Комплексообразование ферментов. Сущность методов комплексообразования и преимущества использования**

Из приведенной в разделе 1.1 информации становится очевидно, что как протеолитические ферменты в целом, так и бромелин, папаин и фицин в частности, широко используются в различных областях деятельности человека. Однако эти белки, как и многие объекты биологического происхождения, имеют ряд ограничений в своем практическом применении. Среди них отдельно стоит отметить:

- относительно узкие диапазоны значений рН среды и температуры, в которых ферменты сохраняют достаточный уровень каталитической активности. Для рассматриваемых энзимов оптимальные температурные значения, как правило, не превышают 50 – 65 °С;

- применение ферментов чаще всего предполагает использование водных сред. Нативные бромелин, папаин и фицин представляют собой глобулярные белки, что обеспечивает их растворимость в воде. Гомогенные катализаторы не подлежат регенерации и повторному использованию, кроме того, появляется проблема очистки финального продукта от применяемых белков;

- растворы ферментов характеризуются низкой стабильностью, т.е. при длительном хранении или использовании частично или полностью теряют каталитическую активность. Кроме того, протеазы подвержены автолизу,

также негативно сказывающемуся на практически значимых свойствах энзимов [12, 132, 133].

В настоящее время для решения этих проблем предложено достаточно много способов, включающих как химическую модификацию энзимов [134], так и получение рекомбинантных и мутантных ферментов [135, 136], а также их сочетания [10, 137]. Однако пока эти методы не получили столь широкого распространения в виду низкой эффективности или их высокой стоимости. Наиболее распространенным путем повышения стабильности и расширения оптимумов работы энзимов является иммобилизация – ограничение числа степеней свободы молекулы путем образования ею новых связей. С момента появления пионерских работ по получению связанных с полимерами ферментов, теоретические представления, методы и технологии иммобилизации получили стремительное развитие, становясь одним из ключевых аспектов многих областей современной биологии.

Как уже отмечалось выше, нативные ферменты, как правило, нестабильны и чувствительны к изменениям внешних условий, таких как значение рН среды, температура и концентрация субстрата, а также характеризуются ограничениями на их регенерацию и повторное использование [3, 138]. Путем создания иммобилизованных форм ферментов можно получить многократно используемые биокатализаторы с повышенной активностью и стабильностью, а также устойчивостью к действию органических растворителей [139]. Однако эффективность иммобилизованных ферментов сильно зависит от используемых носителей и методов их получения, которые должны характеризоваться дешевизной и доступностью [12].

При выборе ферментов для иммобилизации необходимо учитывать также различные физико-химические характеристики конкретного энзима, стабильность фиксации на носителе, что является необходимым условием для поддержания активности комплекса.



Среди различных типов носителей для иммобилизации ферментов, включающих в себя органические и неорганические, синтетические и природные материалы, наноматериалы и др., отдельно выделяют природные полисахариды, такие как хитозан, хитин, альгинаты и целлюлоза [140, 141]. Эти биополимеры обладают уникальными характеристиками, такими как биосовместимость, биоразлагаемость и нетоксичность [142, 143].

Для разработки метода иммобилизации ферментов на носителях на основе полисахаридов необходимо учитывать множество факторов, таких как особенности катализируемой реакции, способ иммобилизации, необходимость применения восстановителей, коферментов и кофакторов. Наличие на поверхности полисахаридов различных функциональных групп, например, гидроксильных, карбоксильных, аминогрупп и т.д., позволяет не только химически модифицировать их свойства в зависимости от области применения, но и непосредственно взаимодействовать с энзимами, получая ферментные препараты без использования каких-либо дополнительных компонентов. Физическая форма существования носителя (для полисахаридов наиболее распространенные – порошок, волокно, пленка, гель и т.д.) и морфология его поверхности, размер пор и частиц также оказывают значительное влияние на эффективность процесса иммобилизации.

Еще одним перспективным носителем для создания иммобилизованных ферментных препаратов является целлюлоза и ее производные. Целлюлоза – природный линейный полисахарид, представляющий собой остатки *D*-глюкозы, соединенные между собой 1,4- $\beta$ -гликозидными связями. Это самый распространенный биополимер, что делает его доступным, возобновляемым и, как следствие, привлекательным для использования в создании ферментных препаратов. Макромолекулы содержат стерически доступные и реакционноспособные гидроксильные группы, полимер имеет волокнистую структуру, на основе целлюлозы можно получать физически и химически сшитые гели. Таким образом, целлюлоза подходит для применения ее в практически любом методе иммобилизации [144]. С использованием

различных форм целлюлозы был получен и исследован ряд иммобилизованных ферментов, среди которых: липаза [145, 146], лакказа и уреазы [147], трипсин [148], лизоцим [149], щелочная фосфатаза [150], галактооксидаза [151].

Для увеличения емкости целлюлозы по отношению к ферментам целесообразно осуществлять ее модификацию, например, путем карбоксиметилирования. В результате такого превращения в структуру полисахарида вводят способные к ионизации карбоксильные группы и образуется карбоксиметилцеллюлоза. Солевая форма этого модифицированного полисахарида хорошо растворима в воде и может образовывать густые растворы и/или эластичные пленки, а также легко подвергается формовке для создания носителей с требуемой геометрией [144]. Путем ковалентного присоединения полифенолоксидазы к гранулам карбоксиметилцеллюлозы разработаны гетерогенные препараты с более высокой стабильностью по сравнению с нативным ферментом [152]. Также адсорбционной иммобилизацией получены препараты авидина [153] и амилазы [154], применяемые в качестве биокатализаторов и сохраняющие до 74 % активности после 6 циклов использования. Также есть сведения об эффективном использовании в иммобилизации дополнительно функционализированной карбоксиметилцеллюлозы. Привитой сополимером предварительно сшитой эпихлоргидрином карбоксиметилцеллюлозы с поливиниламином, полученным гидролизом привитого полиакриламида, применен для ковалентной иммобилизации уреазы. В качестве активатора матрицы использован глутаровый альдегид. Содержание белка в гетерогенном препарате достигало 212 мг на грамм носителя, а активность составляла 68 % по сравнению с нативным белком, что является довольно высокими показателями для ковалентно иммобилизованного фермента. Кроме того, препарат характеризуется повышенной стабильностью и расширенным температурным оптимумом [155].

Как уже отмечалось выше, зачастую собственной функциональности носителя недостаточно для получения иммобилизованной формы, содержащей достаточное количество биокатализатора, или обеспечивающей высокую стабильность итоговой композиции. Для это целесообразно проводить модификацию носителя, и самым распространенным и доступным подходом здесь является химическая модификация. Перспективным представляется использование модификации полисахаридов привитыми боковыми цепями, содержащими функциональные группы, способные к широкому спектру взаимодействий. Кроме того, введение боковых полимерных заместителей может способствовать приданию полисахариду новых физико-химических свойств, начиная от улучшения его растворимости в водных средах, до получения эффекта стимулочувствительности, т.е. способности реагировать на изменения характеристик внешней среды (рН, температуры, ионной силы, внешних полей и т.д.). Кроме того, архитектура привитого сополимера, т.е. структуры с основной ярко выраженной полимерной цепью, содержащей боковые ответвления из синтетических высокомолекулярных фрагментов с заданными свойствами, обеспечивает стерическую доступность функциональных групп для взаимодействия с ферментами или активаторами, а также сохраняет все практически значимые характеристики основной полисахаридной цепи, такие как нетоксичность и биоразлагаемость [156, 157]. Так, например, привитой сополимеры натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с боковыми цепями из поли-*N*-винилимидазола или поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата водорастворимы в широком диапазоне составов, а также проявляют склонность к самоассоциации в водных средах. Оба сополимера обладают рН-чувствительностью: способны изменять размеры частиц в водных растворах в зависимости от реакции среды. В тоже время, сополимер, содержащий поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилат, проявляет термочувствительные свойства.

Кроме того, анализ литературы показывает, что архитектура привитых сополимеров уже успешно себя зарекомендовала в качестве матриц для

иммобилизации ферментов различных типов. Так, например, ковалентная иммобилизация глюкоксидазы [158], щелочной и кислотной фосфатаз, трипсина, инвертазы и  $\beta$ -галактозидазы [159] на привитом сополимере полиэтилена и акриловой кислоты приводит к повышению удельной каталитической активности и термостабильности ферментов. Модифицированный боковыми цепями виниловых полимеров хитозан также перспективен как компонент для создания комплексных ферментных препаратов. Стимулочувствительный привитой сополимер поли- $\beta$ -гликозида с поли-*N*-изопропилакриламидом используется для иммобилизации глюкозооксидазы, каталазы и липазы. Было показано, что таким образом удастся стабилизировать четвертичные структуры мультимерных ферментов и повысить их термическую стабильность [160]. Адсорбционная иммобилизация кутиназы на привитых сополимерах полиакриламида и хитозана также повышает термостабильность энзима, а также способствует его многократному применению. Эти особенности разработанного ферментного препарата указывают на возможность его потенциального применения в органическом синтезе в качестве катализатора [161]. Комплексный препарат глюкозооксидазы и привитого сополимера хитозана с поливиниловым спиртом предлагается применять как основу биосенсора для количественного определения глюкозы [162].

Таким образом, использование биосовместимых и биodeградируемых стимулочувствительных сополимеров, содержащих стерически доступные для взаимодействия с энзимами функциональные группы, в качестве матриц-носителей представляется крайне перспективным, особенно для создания ферментных препаратов биомедицинского назначения.

### **1.2.2 Способы получения комплексов ферментов**

Способы получения комплексов ферментов (частный случай иммобилизации) можно разделить на физические методы, к которым

относятся процессы адсорбции, включения и инкапсуляции и химические методы, такие как ковалентное связывание и сополимеризация (рис. 9) [12].

*Адсорбционный метод иммобилизации* – самый доступный, дешевый и простой в исполнении, не требующий дополнительных реагентов и не разрушающий активный центр фермента [163]. Взаимодействие компонентов происходит в результате обратимой реакции, при которой биомакромолекулы физически адсорбируются или связываются с материалом носителя. Считается физическим методом, поскольку белок удерживают силы Ван-дер-Ваальса, водородные связи, электростатические, ионные и гидрофобные взаимодействия. К недостаткам метода можно отнести тот факт, что после длительного использования наблюдается вымывание фермента с поверхности носителя.

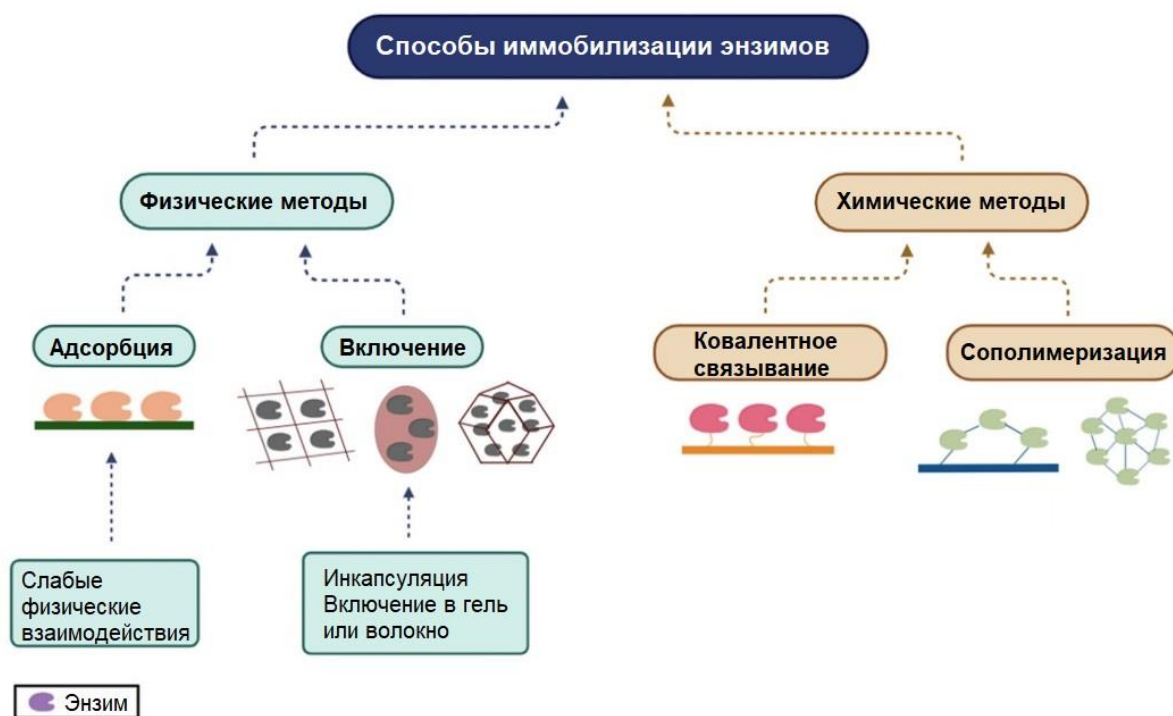


Рис. 9. Способы иммобилизации ферментов

Образование слабых физических взаимодействий роднит адсорбционную иммобилизацию с *комплексообразованием* – процессом образования нековалентного конъюгата энзим–(водо)растворимый носитель. При использовании этого метода получают растворимые формы ферментных

препаратов, однако, в результате такого процесса повышается стабильность энзима и расширяются его температурный и pH-оптимумы [163].

*Включение фермента в матрицу носителя*, чаще всего геля или волокна, представляет собой метод иммобилизации, основанный на физическом ограничении фермента внутри полимерной сетки. Такая форма препарата предотвращает прямой контакт белка со средой, так как катализируемая реакция протекает внутри пространственной структуры носителя. К недостаткам метода можно отнести трудности с выбором размера пор, обеспечивающего удержание фермента внутри носителя, доступ субстрата к биокатализатору и отведение продуктов реакции [12, 163].

Одним из наиболее часто используемых химических методов иммобилизации ферментов является *ковалентное связывание*. В результате такого процесса между матрицей и белком образуется прочная ковалентная связь, что приводит к образованию стабильного и прочного ферментного препарата. Ковалентное связывание проводится в два этапа: первый – активация носителя, т.е. его взаимодействие с би- или мультифункциональным соединением и присоединение последнего с сохранением одной функциональной группы свободной; второй этап – взаимодействие активированного носителя посредством привитой функциональной группы с ферментом, в результате чего происходит формирование стабильного комплекса. К недостаткам метода можно отнести те факты, что, если в образование ковалентной связи будут вовлечены аминокислотные остатки активного центра фермента, то у полученного препарата может полностью отсутствовать каталитическая активность, а также использование в качестве активаторов токсичных соединений (глутаровый альдегид, дивинилсульфон, эпихлоргидрин, диимиды, многоатомные спирты и т.д.) [12, 163].

*Иммобилизация путем сополимеризации* характеризуется как метод, при котором агрегация ферментов вызвана путем их ковалентного сшивания, таким образом получают стабильный биокатализатор, пригодный для

многократного применения. Для создания сшивки используются либо мультифункциональные сшивающие агенты, либо реакционноспособные органические соли или неионогенные полимеры. В случае применения последних метод отличается высокой длительностью исполнения. Образующиеся ковалентные поперечные связи являются жесткими и эффективно предотвращают денатурацию белка, сохраняют или усиливают каталитическую активность и повышают стабильность фермента. В этом методе иммобилизации энзим не прикрепляется к какой-либо подложке. Недостатки этого метода такие же, как и у ковалентного связывания [12, 163].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что не существует универсального метода и носителя для иммобилизации биомакромолекул; все известные на настоящий момент подходы имеют как преимущества, так и недостатки. Становится очевидным, что наилучшим носителем для фермента будет тот, который сохранит или увеличит его каталитическую активность и/или стабильность после иммобилизации.

### **1.2.3 Стратегии выбора компонентов для получения белок-полисахаридных комплексов**

Иммобилизованные формы бромелина, папаина и фицина находят широкое применение как для исследовательских целей, так и в хозяйственной деятельности. Результаты работ по иммобилизации этих представителей цистеиновых протеаз обобщены в обзорах [18, 119, 139]. Для иммобилизации столь практически значимых ферментов используется множество методических подходов и широкий спектр носителей.

Отдельно стоит отметить, что, несмотря на существенные успехи в рассматриваемой области, выбор носителя для иммобилизации до сих пор остается эмпирическим процессом, что значительно замедляет как накопление новых представлений о поведении и свойствах иммобилизованных энзимов, так и внедрение разработок в производственные циклы.

Рациональным и эффективным подходом, способным оптимизировать процесс выбора матрицы, является проведение предварительных экспериментов *in silico*, позволяющих выявить аминокислотные фрагменты молекул белка, взаимодействующих с носителем или его активатором. Работы [164-165] посвящены иммобилизации инулиназ, в них предлагается использовать сочетание методов гибкого каскадного молекулярного докинга и ИК-спектроскопии для выявления механизма взаимодействия фермента с синтетическими матрицами – ионообменными смолами и волокнами. Сочетание расчетного и инструментального способов исследования показали достаточную корреляцию результатов и предсказывающую способность, в дальнейшем подтвержденную экспериментами по определению каталитической активности полученных ферментных препаратов.

В дальнейшем этот же подход по исследованию механизма взаимодействия фермент-носитель был использован для изучения цистеиновых протеаз – бромелина, папаина и фицина – с хитозаном. В отличие от синтетических носителей, хитозан является биополимером, то есть экологичным биоресурсом с низкой токсичностью и высокой биосовместимостью. Кроме того, в его составе присутствуют различные типы стерически доступных функциональных групп, что делает хитозан перспективной матрицей для адсорбционной иммобилизации. Опубликован ряд работ, посвященных адсорбционной иммобилизации цистеиновых протеаз на хитозане [133, 166–172]. Анализ литературы показывает, что преобладающими типами взаимодействия между хитозаном и цистеиновыми протеазами являются водородные связи и гидрофобные взаимодействия, что коррелирует с данными о строении глобул рассматриваемых энзимов. В результате адсорбции белков на хитозане происходит модификация их вторичной структуры с частичным разрушением  $\alpha$ -спиралей. Изменение пространственной организации сказывается на каталитической способности ферментов, поэтому получаемые в работах гетерогенные катализаторы характеризовались меньшей протеолитической активностью по сравнению с



нативными энзимами. Однако эти препараты обладали более высокой стабильностью и сохраняли значительный процент каталитической активности даже после трехнедельной инкубации при 37 °С в 50 мМ трис-НСl буфере с рН 7.5. Кроме того, иммобилизованные ферменты не теряли свои практически значимые свойства: так, например, препараты на основе папаина, фицина и хитозана продемонстрировали отличные показатели по расщеплению биопленок и ранозаживлению [169–170].

В дальнейшем с помощью виртуального скрининга было установлено, что введение в макромолекулы новых типов функциональных групп: ацильных, аммонийных, а также смещающих гидрофильно-гидрофобный баланс хитозана, позволяет получать более стабильные комплексы цистеиновая протеаза-носитель [172].

Таким образом, сочетание компьютерных и физико-химических методов исследования позволяет выявить особенности взаимодействия фермента с носителем, на основании чего можно сделать достаточно точное предсказание каталитической активности потенциального ферментного препарата, оптимизировав таким образом выбор носителя для иммобилизации.

\*\*\*

Анализ информации из различных источников, резюмированный в настоящем литературном обзоре, показал, что протеолитические ферменты в общем и бромелин, папаин и фицин, в частности, являются широко используемыми в различных сферах деятельности человека. Однако эти биокатализаторы являются нестабильными, что затрудняет работу с ними и накладывает ряд ограничений на технологические процессы, предполагающие их использование. Решить эту проблему помогут получение и применение иммобилизованных белков, «прикрепленных» к какому-либо материалу, обеспечивающему «защиту» фермента от негативного воздействия факторов окружающей среды. К материалам, взаимодействующим с ферментами,

предъявляются общие требования: доступность, низкая токсичность и способность взаимодействовать с белком. Рассматривая потенциальные материалы и соединения с этой точки зрения, перспективными представляются полисахариды, содержащие различные функциональные группы и легко подвергающиеся химической модификации для усиления взаимодействий с белком. Выбор последних является нетривиальной задачей, требующей глубоких теоретических представлений о функционировании протеаз в условиях различного микроокружения и принципах их взаимодействий. Единого алгоритма выбора подобных материалов для какого-либо фермента не существует, и перспективным представляется сочетание методов *in silico* и оптической спектроскопии для предсказания стабильности и активности будущего ферментного комплекса.

## II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Объекты исследования

Объектами исследования служили коммерческие препараты протеаз фицина (F4165), папаина (P4762) и бромелина (B4882), выделенные из *Ficus carica*, *Carica papaya* и *Ananas comosus* соответственно. В качестве субстрата применялся азоказеин. Все реактивы производства «Sigma Aldrich» (Германия), использовались без дополнительной очистки.

Для получения белок-полисахаридных комплексов были выбраны сополимеры натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы с *N*-винилимидазолом (КМЦ-ВИ) и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом (КМЦ-ДМАЭМА, а также исходная КМЦ. Для синтеза сополимеров применялись следующие реактивы: натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы с  $M_w \sim 90$  кДа и степенью замещения 0.7 («Sigma Aldrich», Германия), которая не подвергалась дополнительной очистке, мономеры *N*-винилимидазол и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилат («Sigma Aldrich», Германия) очищали дистилляцией в вакууме ( $T_{кип} = 78-79$  °C/11 мм.рт.ст.;  $n_D^{20}$  1.5338) и ( $T_{кип} = 62-65$  °C/11 мм.рт.ст.;  $n_D^{20}$  1.4395) соответственно. В качестве инициатора полимеризации использовалась смесь персульфата калия с метабисульфитом натрия («Вектон», Россия).

### 2.2 Синтез и характеристика сополимеров карбоксиметилцеллюлозы

Прививочную сополимеризацию проводили в гомогенной среде при постоянном перемешивании. Навеску полисахарида массой 0.5 г растворяли в дистиллированной воде, после чего вносили предварительно рассчитанное количество растворенного в 5 мл дистиллированной воды персульфата калия. Полученную смесь дегазировали трехкратным повторением циклов замораживание-вакуумирование-оттаивание и вносили под током аргона навеску сухого метабисульфита натрия. Реакционную массу

термостатировали в течение 20–30 минут. Отдельно проводили вакуумную дегазацию мономера, после чего его вносили в реактор под током аргона. Итоговый объем реакционной смеси составил 50 мл. Реакцию вели в течение 30 часов при различных температурах в диапазоне 30–50 °С. По завершении времени процесса продукт осаждали в ацетон («Вектон», Россия), центрифугировали и сушили в вакуумном шкафу до постоянной массы. Образовавшиеся пленки очищали от примесей и гомополимера на экстракторе Сокслета этиловым спиртом («Вектон», Россия) в качестве растворителя.

Конверсия мономера,  $K$ , была определена как разность масс продукта реакции до очистки  $m_1$ , г, и исходного полисахарида  $m_{ПС}$ , г, отнесенная к массе исходного мономера  $m_{мон}$ , г:

$$K = \frac{m_1 - m_{ПС}}{m_{мон}} \times 100. \quad (1)$$

Массу гомополимера,  $M_2$ , в образцах определяли согласно следующему уравнению:

$$M_2 = m_1 - m_2, \quad (2)$$

где  $m_1$  – масса продукта синтеза до очистки от гомополимера, г,  $m_2$  – масса чистого сополимера, г.

Эффективность прививки, ЭП, определяли как разность масс очищенного продукта реакции,  $m_2$ , г, и исходного полисахарида,  $m_{ПС}$ , г отнесенную к массе загруженного мономера,  $m_{мон}$ , г:

$$\text{ЭП} = \frac{m_2 - m_{ПС}}{m_{мон}} \times 100. \quad (3)$$

Кинетика прививочной полимеризации изучалась гравиметрическим методом. В процессе синтеза, осуществляемого под током аргона, отбирались пробы, которые осаждались в ацетон, осадок сушился в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы и взвешивался с точностью до 0.0002 г.

Частоту прививки (ЧП), выраженную как число привитых полимерных цепей (ППЦ) на одно гликозидное кольцо (ГК) основной цепи, рассчитывали по формуле:

$$\text{ЧП} = \frac{\text{ППЦ, \% масс.}}{M_w \text{ ППЦ}} \times \frac{M \text{ ГК}}{\text{ПС, \% масс.}}, \quad (4)$$

где ППЦ, % масс. – содержание привитых цепей в сополимере,  $M_w$  ППЦ – средневесовая молекулярная масса привитых цепей,  $M$  ГК – молярная масса гликозидного кольца КМЦ с учетом степени замещения, и ПС, % масс. – содержание полисахарида в сополимере [188].

### 2.2.1 Гель-проникающая хроматография

Молекулярную массу боковых цепей определяли методом гель-проникающей хроматографии на приборе Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, США), оснащенном изократическим насосом, рефрактометрическим детектором и колонкой PLmixC. Для этого проводили гидролиз полисахаридной цепи выдерживанием полимера в эквимольной смеси соляной кислоты с нитритом натрия в течение суток при комнатной температуре, после чего осаждали в ацетон и сушили в вакуумном шкафу до постоянной массы. Готовили раствор выделенного полимера в *N*-метилпирролидоне с концентрацией 1 г/мл. В качестве элюента использовали 0.03 М LiCl в *N*-метилпирролидоне, температура хроматографирования – 50 °С, скорость потока составляла 0.5 мл/мин, объем вводимой пробы – 20 мкл. Калибровка проводилась по узкодисперсным образцам полистирола.

### 2.2.2 ИК-спектроскопия

Структуру полученных полимеров подтверждали методами ИК- и  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии. ИК-спектры образцов, представляющих собой сухие тонкодисперсные порошки, либо растворы в боратном/ $\text{D}_2\text{O}$  буфере с pH 9 регистрировали на ИК-спектрометре IRAffinity1 (Shimadzu Scientific Instruments, Япония), оснащенном приставкой НПВО с призмой из селенида цинка, спектральное разрешение –  $4 \text{ см}^{-1}$ . Растворы или твердые образцы

помещали на поверхность призмы НПВО и термостатировали при 25 °С. Регистрировали 128 спектров в диапазоне от 4000 до 700 см<sup>-1</sup> с последующим усреднением.

### **2.2.3 <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопия**

<sup>1</sup>H ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker AVANCE 400 МГц (Bruker, США). Растворителем служила дейтерированная вода, в качестве внутреннего стандарта – тетраметилсилан.

### **2.2.4 Просвечивающая электронная микроскопия**

Форма и размер синтезированных сополимеров были оценены методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). ПЭМ-снимки получали при помощи просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7700 (Hitachi Ltd., Япония). Образцы для исследования растворяли в дистиллированной воде (0.02 % масс.), затем 10 мкл раствора помещали на медную сетку диаметром 3 мм, покрытую формваром и углеродом, и оставляли на 24 часа для высушивания. Исследование проводилось в просвечивающем режиме. Микрофотографии ПЭМ получены заведующим лабораторией микроскопии КИББ ФИЦ КазНЦ РАН д.б.н. Сальниковым Вадимом Владимировичем.

### **2.2.5 Лазерный доплеровский микроэлектрофорез**

Электрокинетический потенциал ( $\zeta$ -потенциал) частиц полимеров в водных растворах определяли с помощью лазерного капиллярного доплеровского микроэлектрофореза на приборе Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания) в кюветах, оснащенных золотым электродом.

## **2.2.6 Динамическое светорассеяние**

Данные по динамическому светорассеянию (ДСР) получали на модульном спектрометре динамического и статического рассеяния света Photocor Complex (Фотокор, Россия) в кварцевых кюветах, оборудованном He-Ne лазером мощностью 25 мВт и длиной волны  $\lambda = 632.8$  нм.

## **2.3 Изучение комплексных препаратов цистеиновых протеаз**

### **2.3.1 Получение комплексов цистеиновых протеаз**

Комплексы бромелина, папаина и фицина с полимерными матрицами получали по следующей методике: к 20 мл раствора фермента с концентрацией 2 мг/мл в боратном буфере с рН 9.0 добавлялась навеска полисахарида массой 1 г, смесь выдерживалась 2 часа. После этого гелеобразный осадок очищался от несвязанного белка путем диализа против боратного буфера с рН=9 через мембрану из регенерированной целлюлозы с отсечением масс до 25 кДа. Процесс контролировался спектрофотометрически с использованием прибора СФ-2000 (ОКБ СПЕКТР, Россия) при длине волны  $\lambda = 280$  нм.

### **2.3.2 Измерение количества белка в препаратах**

Содержание фермента в комплексе определялось при помощи метода Лоури с некоторыми модификациями [173]. Первым этапом являлось разрушение связей между ферментом и полимером, для этого на препарат воздействовали 0.7 М раствором К, Na-тарtrate при 50 °С в течение 10 минут [174]. На втором этапе применялась смесь растворов, состоящая из 2%-го натрия углекислого натрия в 0.1 М гидроксиде натрия и 0.5 % раствора сульфата меди в 1% растворе натрия лимоннокислого, в соотношении 50:1. Дополнительно применялся коммерческий реактив Фолина-Чокальтеу (Sigma-Aldrich, Германия). К 0.4 мл анализируемого раствора препарата с концентрацией 50 мг/мл добавляли 2.0 мл раствора солей, перемешивали и оставляли на 10 минут. После этого вносили 0.2 мл реактива Фолина-

Чокальтеу, тщательно перемешивали и спустя 20 минут измеряли величину оптической плотности при  $\lambda=750$  нм при помощи спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ СПЕКТР, Россия).

### 2.3.3 Измерение протеазной активности ферментных препаратов

Определение каталитической активности препаратов ферментов осуществлялось при использовании азоказеина в качестве субстрата. Эксперимент проводился в 0.05 М трис-НСl буфере с рН 7.5 с добавлением 0.01 М *L*-цистеина, при 37 °С для фицина и при 60 °С для папаина и бромелина. В 200 мкл буфера растворяли 50 мг препарата, после чего вносили 400 мкл 1 % раствора азоказеина (0.05 М трис-НСl буфере, рН 7.5) и выдерживали в течение 30 минут. Далее добавляли 800 мкл 5 % раствора трихлоруксусной кислоты, выдерживали 5 минут при 4 °С и центрифугировали 3 минуты при 11 700 *g* для удаления негидролизованного субстрата. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3 % раствора гидроксида натрия, после чего измеряли оптическую плотность пробы при  $\lambda= 410$  нм при помощи спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ «СПЕКТР», Россия).

За единицу каталитической активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин. Удельную протеолитическую активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta DV}{120\epsilon l C},$$

где *A* – протеолитическая активность, мкМ/мин на 1 мг белка,  $\Delta D$  – изменение оптической плотности при 410 нм, *C* – концентрация белка в пробе, мг/мл, измеренная по методу Лоури, 120 – время инкубации в минутах, *V* – общий объем образца, мл,  $\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции 0.5 % раствора азоказеина ( $12 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ), *l* – длина оптического пути, 1 см.



### **2.3.4 Определение стабильности комплексных препаратов протеаз**

Навеску препарата массой 50 мг растворяли в 200 мкл 0.05 М трис-HCl буфере с pH 7.5, инкубировали при 37 °С в течение 1, 3, 5, 7, 14, 21 суток с последующей оценкой протеазной активности. Исследования по определению стабильности комплексных препаратов ферментов были выполнены совместно с м.н.с. кафедры биофизики и биотехнологии ФГБОУ ВО «ВГУ» Гончаровой Светланой Сергеевной.

### **2.3.5 Исследование изменений вторичной структуры белка в комплексах с полисахаридами**

Соотношения различных типов вторичных структур протеаз при взаимодействии с полисахаридами оценивали методом ИК-спектроскопии по изменению формы и положения полосы поглощения амид I. При подготовке проб к анализу объекты исследования растворяли в боратном буфере с pH 9.0, приготовленном на дейтерированной воде. Нерастворимые комплексы промывали тем же буфером. Регистрировали спектры изучаемых объектов и буфера. Для выделения полосы амид I белков, спектры буфера и полисахаридов вычитали из спектров белковых комплексов. Вторичную структуру ферментов в комплексах и в растворе оценивали путем разложения суммарного поглощения полосы амид I на компоненты, обусловленные вкладом канонических структур –  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -слоев и прочих структур с помощью программы Fityk 0.9.8 [175]. В качестве начального приближения использовали число и положение компонент, оцениваемые по полосе амид I второй производной спектра. Данные по ИК-спектроскопии получены и интерпретированы совместно с с.н.с. лаборатории биофизической химии наносистем КИББ ФИЦ КазНЦ РАН к.б.н. Джигангиром Асхатовичем Файзуллиним.

## 2.4 Молекулярный докинг

Подготовка структур фицина (PDB ID: 4YYW), папаина (PDB ID: 9PAP) и бромелина (PDB ID: 1W0Q), полученных из Protein Data Bank, для *in silico* исследования была выполнена в соответствии со следующей схемой: из исходного PDB-файла в программе Autodock Vina удалялись данные об атомах и координатах атомов растворителя, буфера и прочих примесей. Центр молекулы и параметры расчетной ячейки устанавливались вручную, обеспечивая положение молекулы протеазы точно внутри области вычислительного пространства [176]. Модели структуры КМЦ и сополимеров КМЦ-ДМАЭМА и КМЦ-ВИ создавались с помощью ПО HyperChem, после чего последовательно оптимизировались сначала в силовом поле AMBER, а затем квантово-химически в РМЗ (Параметрический Метод 3). Полисахарид в докинге имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расположение зарядов на полисахаридах и их протонирование/депротонирование выполнялось автоматически в пакете MGLTools 1.5.6.

Для расчетов *in silico* применяли последовательный (каскадный, множественный) докинг. Для КМЦ, КМЦ-ВИ и КМЦ-ДМАЭМА были смоделированы пять сайтов связывания по следующей методике: сначала расчет выполнялся для комплекса «фермент-полисахарид», затем модель дополнялась следующим фрагментом молекулы полисахарида с последующим циклом моделирования, число используемых фрагментов молекул полисахаридов составило пять. Другими словами, мы использовали так называемый каскадный докинг, который можно описать следующим образом: на первом этапе рассчитывалось оптимальное положение полисахарида, а затем его структура, фиксированная в оптимальном положении, становилась частью мишени для второго фрагмента макромолекулы полисахарида. Таким образом, при втором цикле моделирования блокировалось его место связывания с самым высоким

сродством к полисахариду. Затем рассчитывалось положение второго фрагмента молекулы полисахарида, молекула которого в последующих расчетах также становилась частью мишени. Последовательный поиск и заполнение оптимальных мест связывания на поверхности мишени повторялся до тех пор, пока положения всех пяти фрагментов полисахаридов не были определены. Такой каскадный докинг целесообразен для моделирования белок-полисахаридных взаимодействий в случае избыточного количества молекул последнего.

## **2.5 Статистическая обработка результатов исследования**

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью стандартных математических методов (расчет среднеквадратичного отклонения, t-критерий Стьюдента) с использованием программного обеспечения Origin Pro. Критерий вероятности  $P \leq 0.05$  принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

### III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Гибкий молекулярный докинг цистеиновых протеаз, натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимеров с *N*-винилимидазолом или *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом

Молекулярный докинг — это широко используемая процедура компьютерного моделирования для предсказания взаимной ориентации и положения нескольких молекул, а также конформации образующегося комплекса белок–полисахарид. Точное предсказание участков и особенностей связывания между полисахаридом и белком имеет фундаментальное значение в современном дизайне новых биологически активных веществ, основанном на структуре последних. Наиболее важным применением докинга является виртуальный скрининг, при котором из существующей базы данных выбираются наиболее перспективные молекулы для дальнейшего инструментального исследования. Эта особенность предъявляет требования к используемому вычислительному методу: он должен быть быстрым и надежным [177].

После выхода работы Kuntz I.D. [178] в начале 1980-х был достигнут значительный прогресс в разработке алгоритмов докинга для повышения скорости и точности вычислений. Эффективное управление гибкостью белкового рецептора в настоящее время считается одной из основных проблем в области докинга, так как расположение сайта связывания и ориентация лиганда могут сильно зависеть от подвижности молекулы белка.

Выявление типов связей и взаимодействий между двумя молекулами представляет собой сложную задачу. В межмолекулярную ассоциацию вовлечены обычно многие силы, в том числе гидрофобные, ван-дер-Ваальсовы или стэкинг-взаимодействия между ароматическими аминокислотами, водородные связи и электростатические силы. Кроме того, моделирование межмолекулярных взаимодействий в комплексах белка затруднено из-за большого количества степеней свободы в системе. Молекулярный докинг пытается имитировать естественный ход процессов связывания лиганда и его

рецептора по пути минимизации общей энергии системы. Наиболее распространенный подход – гибкий молекулярный докинг – заключается в моделировании гибкости лиганда, учитывая при этом только его конформационное пространство, при условии наличия жесткого белкового рецептора [179].

С целью определения возможности образования белок-полисахаридных комплексов цистеиновых протеаз, натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимеров с *N*-винилимидазолом или *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом, нами были проведены поисковые расчеты аффинности и оптимальных мест связывания указанных полисахаридов на три белковые мишени: бромелин (PDB ID: 1W0Q), папаин (PDB ID: 9PAP) и фицин (PDB ID: 4YYW).

Молекулярные структуры каждого фермента были взяты из Protein Data Bank, после чего «очищены» от ионов, молекул воды, компонентов буфера и иных лигандов. Проанализированные данные позволили эффективно провести виртуальный скрининг кандидатов и, впоследствии, экспериментально проверить предложенные полимеры на предмет связывания с молекулами протеаз, а также оценить влияние таких взаимодействий на активность ферментов.

Анализ результатов расчета аффинности (табл. 4) – энергии первых пяти взаимодействий белок–полисахарид, показал, что для всех исследуемых полисахаридов значения этой характеристики имеют отрицательные значения, что говорит о термодинамически разрешенном и самопроизвольном процессе взаимодействия компонентов. Кроме того, для всех рассматриваемых ферментов наибольшая убыль энергии системы наблюдается в случае натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, а наименьшая – для ее сополимера с *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом. Этот факт демонстрирует потенциальную возможность использования предлагаемых сополимеров для образования комплексов с ферментами.

Таблица 4.

Энергии первых пяти точек связывания полисахаридов с бромелином, фицином и папаином

Полисахарид	Номер взаимодействия и его аффинность, ккал/моль				
	1	2	3	4	5
<b>Бромелин</b>					
Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы	-8.8	-6.3	-7.3	-6.3	-6.7
Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и <i>N,N</i> -диметиламиноэтилметакрилата	-5.2	-4.4	-4.1	-4.4	-3.8
Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и <i>N</i> -винилимидазола	-7.0	-5.5	-4.9	-5.4	-5.4
<b>Папаин</b>					
Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы	-7.1	-6.0	-5.3	-5.8	-6.3
Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и <i>N,N</i> -диметиламиноэтилметакрилата	-4.0	-3.6	-4.6	-3.8	-3.2
Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и <i>N</i> -винилимидазола	-6.2	-4.8	-5.5	-4.5	-4.9
<b>Фицин</b>					
Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы	-6.7	-6.5	-6.3	-6.3	-6.3
Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и <i>N,N</i> -диметиламиноэтилметакрилата	-5.0	-3.7	-3.6	-3.7	-3.9
Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и <i>N</i> -винилимидазола	-5.7	-4.8	-5.8	-4.7	-4.5

Для правильной интерпретации полученных данных важно понимать, что представленные величины полной энергии комплексов белка с полисахаридами номер 2-3-4-5 (каскадный докинг) сравнивать между собой не следует, поскольку мишени во всех данных случаях были разные: комплекс наращивался путем включения в него оптимальных конформеров из предыдущей итерации расчета. Хотя, безусловно, обращает на себя внимание заметный разрыв в величинах аффинности первого взаимодействия в оптимальном положении на глобуле и последующими конформерами.

### 3.1.1 Детализация результатов гибкого молекулярного докинга бромелина и модифицированных полисахаридов

Анализ положения первого фрагмента молекулы полисахарида относительно поверхности глобулы бромелина показывает, что все полисахариды располагаются в области V-образного кармана, образуемого на

стыке доменов и содержащего в себе активный центр фермента (рис. 10, табл. 5). Однако, в виду своей разветвленности и большого объема, модифицированные полисахариды полностью не помещаются в кармане и выходят за его границы, что может обуславливать взаимодействие не только с остатками аминокислот, входящих в активный центр, но также и с фрагментами на поверхности глобулы. Последующие фрагменты макромолекул также стремятся расположиться вблизи каталитического кармана, формируя довольно плотную «шапку» вокруг активного центра бромелина. На основании этого можно сделать предположение, что взаимодействие потенциальных матриц с глобулами фермента может отразиться на каталитической активности энзима.

Среди всех представленных в таблице взаимодействий особенно стоит обратить внимание на образование водородных связей, оказывающих, как показано в более ранних исследованиях, наибольшее влияние на изменения в конформации и каталитической активности фермента [133].

Большая часть Н-связей, образуемых бромелином, сформирована посредством аминокислотных остатков, расположенных в неупорядоченных областях глобулы. Также наблюдается незначительное количество водородных связей, образованных аминокислотными остатками, расположенными в  $\alpha$ -спиралях. Образование водородных связей в областях  $\beta$ -складчатостей практически не наблюдается, за исключением комплексов с сополимерами: формирование Н-связи происходит с участием His158 – остатка, входящего в состав активного центра протеазы. Поэтому можно предположить, что взаимодействие с полисахаридами не вызовет серьезных конформационных изменений в глобулах бромелина. Каталитически значимый аминокислотный остаток Gln20 также связан Н-связями с полисахаридами. Примечательно, что при увеличении количества фрагментов макромолекул модифицированной целлюлозы последние предпочитают образовывать водородные связи между собой посредством углеводного остова, а гидрофильные цепи *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата и *N*-

винилимидазола практически не участвуют в образовании водородных связей, вступая преимущественно в гидрофобные взаимодействия.

Таблица 5.

Остатки аминокислот бромелина, взаимодействующие с полисахаридами \*

Номер связывания	Аффинность, ккал/моль	Аминокислотные остатки, образующие	
		Н-связи и их длина, Å	прочие типы взаимодействий
<b>Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы</b>			
1	-8.8	Thr15, 3.07 и 3.01; Asn19, 3.23; <b>Gln20</b> , 2.98 и 2.86; Asn21, 3.09 и 2.76; Glu51 ( $\alpha$ L2), 2.70; Lys179, 2.80; Trp180, 3.14	Val14, Thr15, Val17, Lys18, Asn19, <b>Gln20</b> , Asn21, Pro22, Cys23, Gly24, <b>Cys26</b> ( $\alpha$ L1), Phe29 ( $\alpha$ L1), Ala33 ( $\alpha$ L1), Glu36 ( $\alpha$ L1), Glu51 ( $\alpha$ L2), Val60, Ala136, Phe140, Gln141, Asn157, <b>His158</b> ( $\beta$ R), Ile163 ( $\beta$ R), Ala178, Lys179, Trp180, Gly184, Tyr185
2	-6.3	Arg9, 3.01, 3.21 и 2.71; Val14, 2.95; Ser16, 2.91; Gln167, 2.88; Glu182, 2.83; Ala183, 3.05, 3.16; Arg187, 2.79, 3.25 и 3.02	Arg9, Val14, Thr15, Ser16, Val17, Leu46, Gln167, Ile171, Tyr172, Pro173, Trp176, Glu182, Ala183, Tyr185, Arg187
3	-7.3	Cys63, 3.22; Trp67, 3.12; Arg112, 2.89; Arg115, 3.00; Asn116, 2.96	Gly24, <b>Cys26</b> ( $\alpha$ L1), Trp27 ( $\alpha$ L1), Lys64, Gly65, Gly66, Trp67, Glu68 ( $\alpha$ L2), Phe69 ( $\alpha$ L2), Arg112, Arg115, Asn116, Ala133 ( $\beta$ R), Leu156, Asn157, Ile203, Asp204
4	-6.3	Gln141, 2.83; Gly181, 2.81	Pro22, Gln141, Lys144, Tyr172, Lys174, Lys179, Trp180, Gly181
5	-6.7	Val17, 2.72 и 2.97; Asn19, 2.87; Asn21, 2.97; Tyr89, 3.02	Ser16, Val17, Lys18, Asn19, Asn21, Pro48, Glu51 ( $\alpha$ L2), Gly84, Ala85, Pro88, Tyr89, Ala178
<b>Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и N,N-диметиламиноэтилметакрилата</b>			
1	-5.2	Ser16, 3.06; Asn21, 3.31; Tyr89, 2.99; Gln141, 2.86; <b>His158</b> ( $\beta$ R), 2.98	Thr15, Ser16, Val17, Lys18, Asn19, Gln20, Asn21, Phe29 ( $\alpha$ L1), Ala33 ( $\alpha$ L1), Leu46, Pro48, Pro88, Tyr89, Ala136, Phe140, Gln141, Tyr142, Lys144, Asn157, <b>His158</b> ( $\beta$ R), Val160 ( $\beta$ R), Ala178, Lys179, Trp180, Gly184, Tyr185, Ile186
2	-4.4	Arg9, 3.11; Gln167, 2.82; Asp168, 3.13; Ser169, 2.85 и 2.93; Gly177, 3.24; Glu182, 3.00	Ser5, Ile6, Asp7, Arg9, Asp10, Gly12, Val14, Thr15, Ser16, Leu46, Gln167, Asp168, Ser169, Ile170, Ile171, Tyr172, Trp176, Gly177, Glu182, Ala183, Arg187
3	-4.1	Lys64, 3.23; Arg112, 3.09; Asn116, 3.10; Asn157, 2.88	Gln20, Pro22, Cys23, Gly24, <b>Cys26</b> ( $\alpha$ L1), Tyr61, Cys63, Lys64, Trp67, Phe69 ( $\alpha$ L2), Arg112, Arg115, Asn116, Asn137, Ser155, Leu156, Asn157, <b>His158</b> ( $\beta$ R), Ile203, Asp204, Leu206
4	-4.4	Glu118 ( $\alpha$ R1), 2.80; Tyr123 ( $\alpha$ R1), 2.88; Arg190, 2.81 и 3.03; Ser195, 2.96	Pro114, Arg115, Asn116, Asn117, Glu118 ( $\alpha$ R1), Ser119 ( $\alpha$ R1), Ser120 ( $\alpha$ R1), Met122 ( $\alpha$ R1), Tyr123 ( $\alpha$ R1), Gln167, Asp168, Ala189, Arg190, Asp191, Val192, Ser193, Ser195, Ser194, Ser196
5	-3.8	Arg70 ( $\alpha$ L3), 3.02, 3.03 и 3.03; Glu73 ( $\alpha$ L3), 3.05; Tyr110, 3.26; Arg112, 2.94	Ala58, Lys59, Gly60, Tyr61, Arg70 ( $\alpha$ L3), Glu73 ( $\alpha$ L3), Phe74 ( $\alpha$ L3), Ile76 ( $\alpha$ L3), Ser77 ( $\alpha$ L3), Gly109 ( $\beta$ R), Tyr110 ( $\beta$ R), Ala111 ( $\beta$ R), Arg112, Thr209
<b>Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и N-винилимидазола</b>			
1	-7.0	<b>Gln20</b> , 3.07; Ala136, 2.64; <b>His158</b> ( $\beta$ R), 3.05; Trp180, 3.32	Val17, Lys18, Asn19, <b>Gln20</b> , Asn21, Pro22, Gly24, <b>Cys26</b> ( $\alpha$ L1), Phe29 ( $\alpha$ L1), Ala33 ( $\alpha$ L1), Glu51 ( $\alpha$ L2), Cys63, Lys64, Gly65, Gly66, Trp67, Ala136, Asn137, Phe140, Gln141, Tyr142, Leu156, Asn157, <b>His158</b>



			( $\beta$ R), Ala159 ( $\beta$ R), Val160 ( $\beta$ R), Ala178, Lys179, Trp180, Gly184, Tyr185
2	-5.5	Arg9, 2.67; 2.79; 3.19 и 3.15; Ile171, 3.08; Arg187, 3.10 и 3.10	Gln4, Ser5, Ile6( $\beta$ R), Asp7( $\beta$ R), Arg9, Asp10, Val14, Thr15, Ser16, Val17, Tyr165( $\beta$ R), Gln167, Ser169, Ile170, Ile171, Tyr172, Gly177, Trp176, Ala178, Glu182, Ala183, Tyr185, Ile186, Arg187
3	-4.9	Ser16, 3.12; Asn21, 3.23; Gly84, 3.00; Ala178, 3.10	Gly12, Thr15, Ser16, Lys18, Asn19, Asn21, Leu46, Glu47, Pro48, Ala85, Pro88, Tyr89, Gly177, Ala178, Lys179
4	-5.4	Cys57 ( $\alpha$ L2), 3.10; Glu73 ( $\alpha$ L3), 2.77 и 2.79; Ser77 ( $\alpha$ L3), 2.78; Asn78, 3.08; Tyr110, 3.06, 3.20 и 3.21	Gln53 ( $\alpha$ L2), Cys57 ( $\alpha$ L2), Ala58, Lys59, Glu73, Phe74, Ser77, Asn78, Lys79, Cys96, Lys97, Thr98, Gly100, Val101, Pro102, Ile107, Gly109 ( $\beta$ R), Tyr110 ( $\beta$ R), Ile176
5	-5.4	Arg70 ( $\alpha$ L3), 3.01 и 2.80; Glu73 ( $\alpha$ L3), 2.91; Arg112, 3.31 и 2.94	Gly60, Tyr61, Trp67, Phe69 ( $\alpha$ L3), Arg70 ( $\alpha$ L3), Glu73 ( $\alpha$ L3), Arg112, Arg115, Leu156, Ile203, Asp204

\* – жирным шрифтом выделены каталитически значимые аминокислотные остатки, в скобках – их принадлежность к элементам вторичной структуры глобулы бромелина

Гидрофобные взаимодействия в комплексах осуществляются, в основном, за счет ароматических остатков Gln20, Trp180 и Tyr185. Остатки аминокислот активного центра бромелина – Cys26 и His158 – вовлекаются в ионные взаимодействия и образуют солевой мостик. Интересно отметить, что и в слабые физические взаимодействия вступают преимущественно остатки аминокислот, расположенные в неупорядоченных областях глобулы или образующие  $\alpha$ -спирали.

Таким образом, показано, что при образовании комплексов бромелина с рассматриваемыми производными целлюлозы их взаимодействие протекает в непосредственной близости от активного центра фермента, и в этом процессе участвуют каталитически значимые аминокислоты, что может сказаться на протеолитической активности энзима. Кроме того, во взаимодействия вовлекаются аминокислоты, расположенные в упорядоченных элементах вторичной структуры глобулы, т.е.  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -складчатости, что может сказаться на конформации глобул бромелина. Поэтому исследование взаимодействия бромелина с выбранными полисахаридами требует дополнительного изучения с целью выявления особенностей влияния матриц на вторичную структуру фермента и его протеолитическую активность.

### 3.1.2 Детализация результатов гибкого молекулярного докинга папаина и модифицированных полисахаридов

Анализ результатов *in silico* исследования показал, что топологически производные целлюлозы образуют плотное покрытие над каталитическим карманом, содержащим активный центр энзима (рис. 12). Подобная картина наблюдалась и для бромелина. На основании этого факта можно выдвинуть гипотезу о влиянии взаимодействий белок–полисахарид на каталитическую активность папаина.

Глобулы папаина образуют водородные связи в основном посредством неупорядоченных областей, и, в отличие от бромелина – с участием аминокислотных остатков, образующих  $\beta$ -структуры (табл. 6, рис. 13). Кроме того, каталитически значимые остатки Gln19 и His159 вовлечены в формирование H-связей. Также как и в случае с бромелином, водородные связи реализуются, в основном, с участием углеводного остова полимеров, которые склонны к связыванию друг с другом. Аминокислотные остатки, образующие H-связи, также участвуют и в прочих слабых физических взаимодействиях, преимущественно – гидрофобных, или в случае Cys25 и His159 – ионных.

Гидрофобные взаимодействия, в которые чаще всего вступают остатки Tyr67, Val133, Trp177, Gly180, Trp181 и Thr204, дополнительно стабилизируют образующиеся комплексы. Кроме того, докинг папаина со всеми рассматриваемыми производными целлюлозы обнаруживает наличие ионных связей с участием His159 и Cys25, являющихся частью активного центра. Их присутствие обусловлено взаимодействием гистидина с неподеленной парой атома серы из остатка цистеина.

Отдельно стоит отметить, что наибольшее число связей и взаимодействий образуется между папаином и сополимером с *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом, в то время как величина аффинности для этой пары имеет наименьшее значение по сравнению с остальными полисахаридами.

Таблица 6.

## Остатки аминокислот папаина, взаимодействующие с полисахаридами \*

Номер связывания	Аффинность, ккал/моль	Аминокислотные остатки, образующие	
		H-связи и их длина, Å	прочие типы взаимодействий
<b>Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы</b>			
1	-7.1	Asn18, 3.17; <b>Gln19</b> , 3.17; Gly20, 2.65; Cys22, 3.17; Cys63, 3.29; Gly66, 2.63; Asp158 (βR), 2.89	Asn18, <b>Gln19</b> , Gly20, Cys22, Gly23, <b>Cys25</b> (αL1), Tyr61, Cys63, Asn64, Gly65, Gly66, Tyr67 (αL2), Val133 (βR), Ala136, Gln142, Asp158 (βR), <b>His159</b> (βR), <b>Trp177</b>
2	-6.0	Ser21, 2.80 и 3.11	Asn64, Asn155, Lys156, Val157
3	-5.3	-	Ala137, Gly138 (αR2)
4	-5.8	-	Trp181
5	-6.3	Thr179, 2.80 и 3.06; Gly180, 2.82	Lys17, Tyr88, Gly90, Gly178
<b>Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и N,N-диметиламиноэтилметакрилата</b>			
1	-4.0	Val157, 2.98 и 3.00; <b>His159</b> (βR), 3.20	Gln19, Gly20, Ser21, Gly23, <b>Cys25</b> (αL1), Tyr61, Asn64, Gly65, Gly66, Tyr67 (αL2), Pro68 (αL2), Trp69 (αL2), Tyr116, Val133, Ala137, Gln142 (αR2), Tyr144, Asn155, Lys156, Val157, Asp158 (βR), <b>His159</b> (βR), <b>Trp177</b> , Gly180, Trp181, Tyr197, Thr204, Ser205
2	-3.6	Gln112 (βR), 2.99 и 3.07; Ser124 (αR1), 3.27	Arg41 (αL1), Arg59, Trp69 (αL2), Gln73 (αL2), Arg111, Gln112, Val113, Gln114, Pro115, Gly119 (αR1), Ala120 (αR1), Tyr123 (αR1), Ser124 (αR1), Asn127 (αR1), Gln128, Phe207 (βR), Tyr208 (βR), Val210 (βR)
3	-4.6	Arg145, 3.34; Trp177, 2.99; Thr179, 3.31; Gly180, 2.80; Asn184, 2.70	Arg8, Pro15, Val16, Lys17, Asn18, Ser21, Gln47, Arg83, Tyr88, Glu89, Gly90, Arg145, Gly146, Gly147, Tyr170 (βR), Glu178, Thr179, Gly180, Trp181, Glu183 (βR), Asn184, Tyr186 (βR), Arg188 (βR)
4	-3.8	Tyr61, 2.75; Asn64, 3.32	Arg58, Ser60, Tyr61, Asn64, Gln92, Ala137, Lys139 (αR2), Lys156
5	-3.2	-	Gln114, Pro115, Tyr116, Asn117 (αR1), Gln118 (αR1), Ser196
<b>Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и N-винилимидазола</b>			
1	-6.2	Asn64, 3.23; Val157, 3.00; Ser205, 2.99 и 2.85	Asn18, <b>Gln19</b> , Gly20, Ser21, Cys23, <b>Cys25</b> (αL1), Asn64, Gly65, Gly66, Tyr67 (αL3), Pro68 (αL3), Val133 (βR), Ala136, Ala137, Gln142 (αR2), Leu143 (αR2), Asn155, Lys156, Val157, Asp158 (βR), <b>His159</b> (βR), Ala160 (βR), <b>Trp177</b> , Gly180, Trp181, Ser205
2	-4.8	<b>Gln19</b> , 2.92; Arg83, 2.93; Asn84, 3.79	Val13, Thr14, Pro15, Lys17, Asn18, <b>Gln19</b> , Gly20, Ser21, Cys22, Asn46, Gln47, Arg83, Asn84, Pro87, Tyr88, Glu89, Gly90, Thr179, Gly180
3	-5.5	-	Cys63, Asn64, Val91, Gln92
4	-4.5	Arg8, 3.23; Val13, 2.85 и 3.09; Asn184, 3.07 и 3.24	Arg8, Val13, Thr14, Pro15, Thr179, Gly180, Asn184, Tyr186 (βR)
5	-4.9	Arg93, 3.31	Asn84, Glu89, Gln92, Arg93, Tyr94, Arg96

\* – жирным шрифтом выделены каталитически значимые аминокислотные остатки, в скобках – их принадлежность к элементам вторичной структуры глобулы папаина

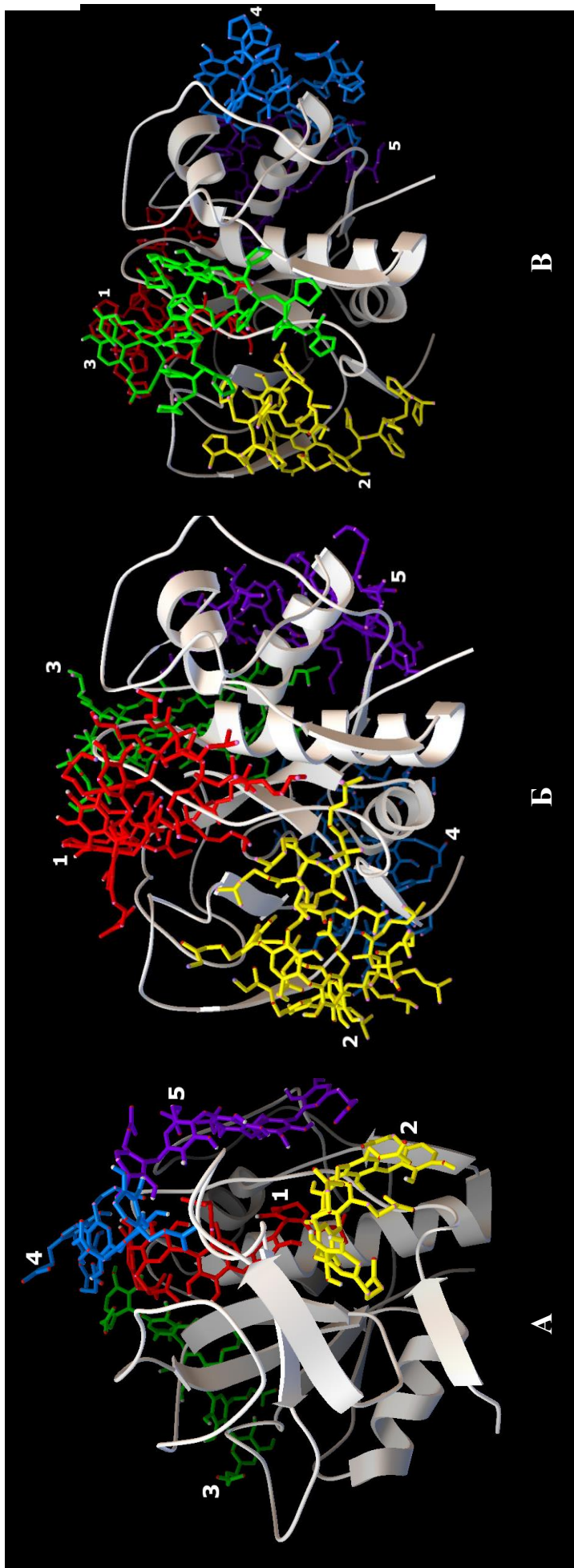
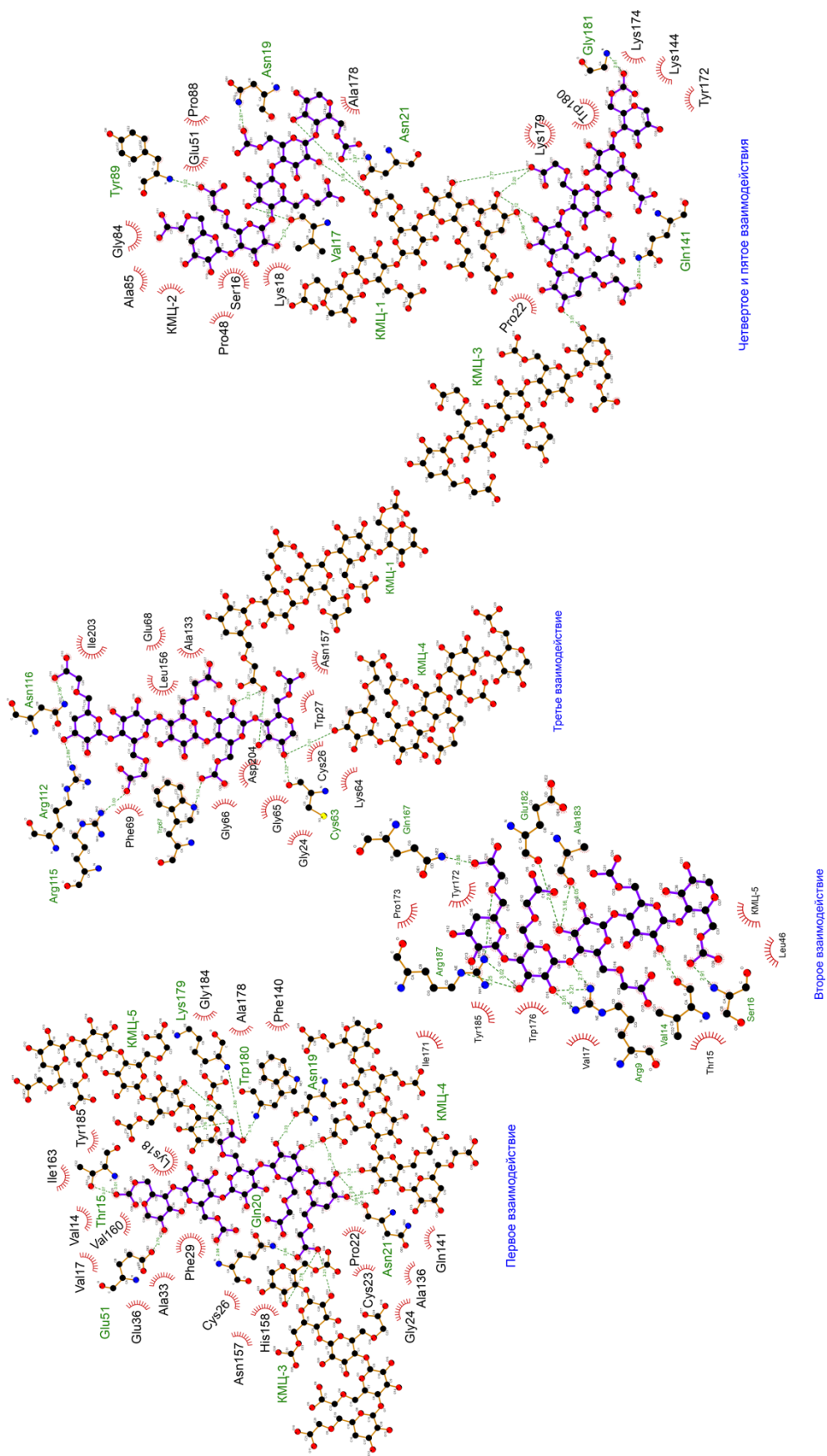


Рис. 10. Расположение полисахаридов на поверхности молекулы бромелина:

**А** – натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы;

**Б** –сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата;

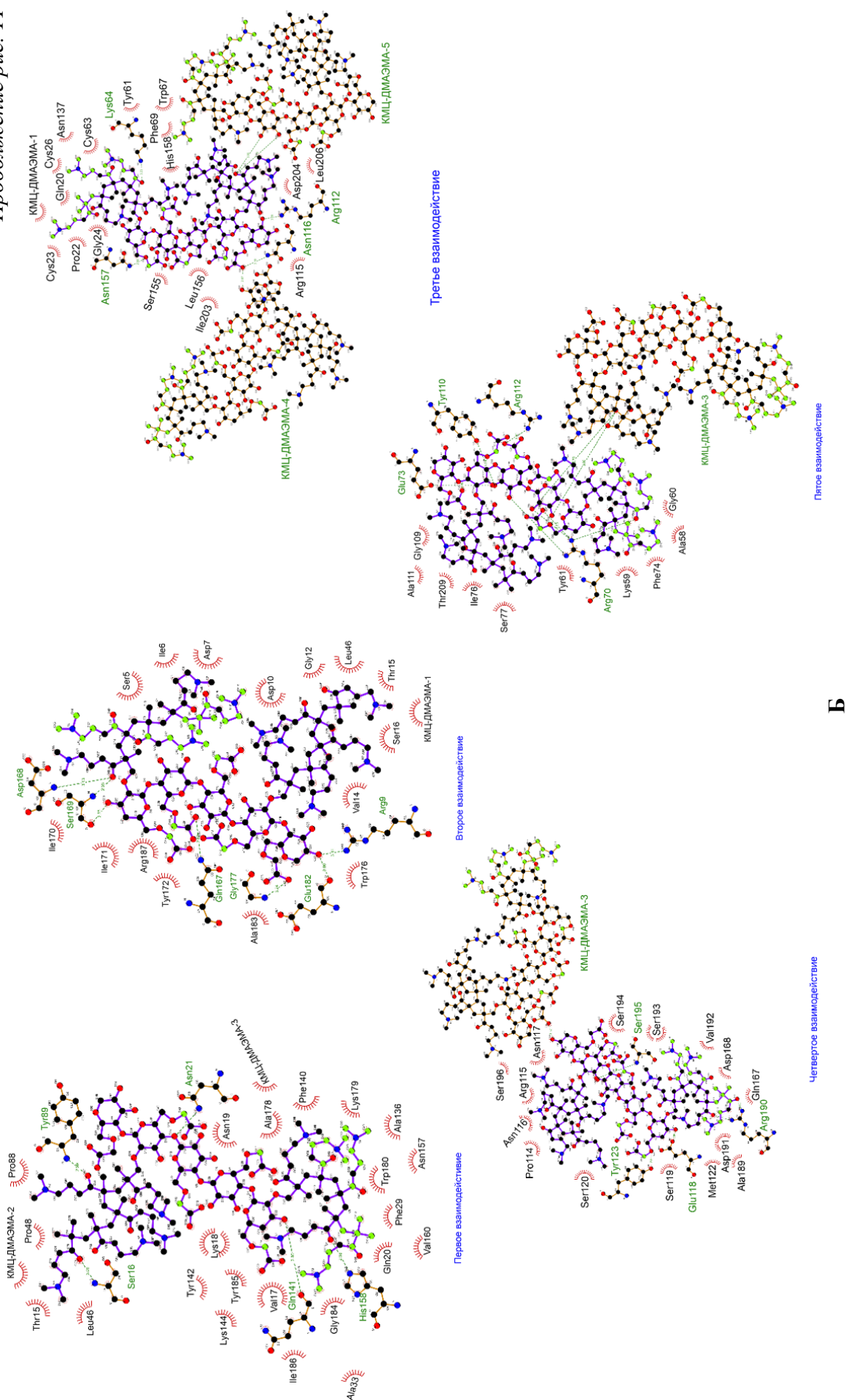
**В** –сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола.



**А**

Рис. 11. Связи и взаимодействия между бромелином и полисахаридами (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å): **А** – натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы; **Б** – сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом; **В** – сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазолом (продолжение рисунка на следующих листах).

Продолжение рис. 11



Б



Таким образом, установлено, что также как и в случае с бромелином, образование комплексов папаина с рассматриваемыми производными целлюлозы протекает с участием остатков аминокислот активного центра фермента, а также принадлежащим к упорядоченным элементам вторичной структуры глобул, что требует дальнейшего исследования для оценки влияния этих взаимодействий на структуру и каталитическую активность энзима.

### **3.1.3 Детализация результатов гибкого молекулярного докинга фицина и модифицированных полисахаридов**

Результаты расчетов показали, что для фицина наблюдается те же топологические закономерности, что и для рассмотренных выше ферментов: полисахариды располагаются вблизи каталитического кармана, который у фицина более вытянутый и длинный, по сравнению с бромелином и папаином. Из-за размерных особенностей сополимеры полностью «не помещаются» в пространстве между доменами глобулы белка, что приводит к их взаимодействию не только с аминокислотными остатками активного центра фицина, но и с фрагментами, располагающимися на поверхности макромолекулы (рис. 14). При увеличении числа фрагментов макромолекул производных целлюлозы для них также сохраняется тенденция к взаимодействию с друг другом и формированию плотного покрывала над активным центром фицина. По сравнению с бромелином и папаином, самым заметным отличием во взаимодействии фицина с рассматриваемыми полисахаридами является тот факт, что и каталитически значимые, и непосредственно входящие в активный центр фермента аминокислотные остатки не образуют водородных связей с молекулами полисахаридов (табл. 7, рис. 15).

Фицин, также как и остальные рассматриваемые энзимы, формирует водородные связи преимущественно путем взаимодействия с аминокислотными остатками неупорядоченных областей глобулы или, как и в случае с бромелином – посредством аминокислот, образующих  $\alpha$ -спирали.



Поэтому можно предположить некоторые нарушения в нативной структуре белка. Производные целлюлозы же, также как и в случае других рассматриваемых ферментов, вступают в эти взаимодействия преимущественно посредством углеводного остова, а для боковых цепей более характерны взаимодействия других типов. При увеличении числа фрагментов полисахаридных макромолекул последние более склонны к образованию водородных связей друг с другом, чем с глобулой фермента.

Расчеты показали, что важным стабилизирующим фактором для комплексов фицина выступают гидрофобные взаимодействия, в которые вовлечены аминокислотные остатки Trp184, Asn187 и Trp188.

Кроме того, гидрофобные взаимодействия образуют некоторые каталитические значимые аминокислотные остатки фицина: при формировании комплексов с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимером с поли-*N*-винилимидазолом по этому типу взаимодействуют Gln19, Cys25 и His162. В случае комплекса с сополимером, содержащим звенья *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата, образуется солевой мостик между аминокислотными остатками, входящими в активный центр фермента – Cys25 и His162. Поэтому взаимодействие фицина с рассматриваемыми соединениями может оказывать различное влияние на каталитическую активность энзима.

Для фицина, как и для папаина, наблюдается образование наибольшего числа взаимодействий с сополимером, содержащим поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилат, наименьшего – с карбоксиметилцеллюлозой.

Таким образом, для фицина, также как для бромелина, характерно расположение производных целлюлозы вблизи от активного центра фермента, взаимодействия с ними и с аминокислотными остатками, образующими  $\alpha$ -спирали. Все это может оказать влияние на каталитическую активность фицина и требует дальнейших экспериментальных проверок выдвинутых предположений с помощью дополнительных инструментальных методов.

Таблица 7.

## Остатки аминокислот фицина, взаимодействующие с полисахаридами \*

Номер связывания	Аффинность ккал/моль	Аминокислотные остатки, образующие	
		H-связи и их длина, Å	прочие типы взаимодействий
<b>Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы</b>			
1	-6.7	Gly20, 2.73; Cys22, 2.9; Ser66, 3.09; Glu145 ( $\alpha$ R2), 2.66 и 3.10; Asp161, 2.76 и 3.06	<b>Gln19</b> , Arg21, Gly23, <b>Cys25</b> ( $\alpha$ L1), Tyr60, Gly140, Asn187, Trp188
2	-6.5	Gly140, 3.13; Leu160, 2.70 и 3.34	Arg21, Tyr60, Gly68, Trp69, Thr136 ( $\beta$ R), Glu145 ( $\alpha$ R2), Asp161, Gln212
3	-6.3	Arg118, 2.96; Thr158, 2.97 и 2.77; Met211, 2.97	Trp69, Met70 ( $\alpha$ L3), Thr71 ( $\alpha$ L3), Lys72 ( $\alpha$ L3), Arg118, Thr158, Lys159, Leu160, Met211, Gln212
4	-6.3	Ser213, 3.16	His115 ( $\beta$ R), Val116, Pro117
5	-6.3	-	His115 ( $\beta$ R)
<b>Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и N,N-диметиламиноэтилметакрилата</b>			
1	-5.0	Cys65, 3.28; Ser66, 2.80; Gly68, 3.25; Asp161, 2.79	Asn18, Arg21, Cys22, Gly23, <b>Cys25</b> ( $\alpha$ L1), Trp26, Tyr60, Cys65, Ser66, Gly67, Gly68, Trp69, Met70 ( $\alpha$ L3), Thr136 ( $\beta$ R), Glu138, Gly140, Gly141, Glu145 ( $\alpha$ R2), Leu146, Thr158, Lys159, Leu160, Asp161, <b>His162</b> ( $\beta$ R), Trp184, Asn187, Trp188, Gln212
2	-3.7	Asn14, 2.79; Asp43, 2.93; Glu44, 2.10; Leu45, 3.11; Ser47, 3.33	Arg8, Ile9, Gly11, Val13, Asn14, Pro15, Ile16, Arg17, Asn18, Asp43, Glu44, Leu45, Pro46, Ser47, Gln86, Ser87, Pro90, Tyr91 Val107, Gly185, Thr186, Arg191
3	-3.6	Asn80, 2.79 и 2.76; Ser104, 2.94, 3.01, 3.10 и 3.07; Ile106, 3.16	Ser38 ( $\alpha$ L1), Val41 ( $\alpha$ L1), Thr42 ( $\alpha$ L1), Glu44, Pro46, Ile78 ( $\alpha$ L3), Lys79 ( $\alpha$ L3), Asn80, Gly81, Lys100 ( $\alpha$ R1), Asp101 ( $\alpha$ R1), Ser104, Gln105, Ile106, Val107, Ala108, Thr109, Ile110, Asp111
4	-3.7	Thr92, 2.93	Gly20, Arg21, Gln51 ( $\alpha$ L2), Asp55 ( $\alpha$ L2), Ser87, Asn88, Tyr89, Pro90, Thr92, Ala93, Lys94, Gly96, Glu97, Cys98, Asn99, Lys100 ( $\alpha$ R1), Asp101 ( $\alpha$ R1), Leu102 ( $\alpha$ R1)
5	-3.9	Trp69, 2.81; Val116, 3.13 и 3.28; Arg118, 3.28; Thr71 ( $\alpha$ L3), 3.31	Thr58, Ser59, Tyr60, Lys61, Trp69, Thr71 ( $\alpha$ L3), Lys72 ( $\alpha$ L3), Glu114 ( $\beta$ R), His115 ( $\beta$ R), Val116, Pro117, Arg118, Leu160, Met211, Gln212, Tyr215 ( $\beta$ R)
<b>Сополимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и N-винилимидазола</b>			
1	-5.7	Glu145 ( $\alpha$ R2), 2.77 и 3.05 Asp161, 3.34 и 2.77	Asn18, Gly20, Arg21, Cys22, Gly23, Tyr60, Cys65, Ser66, Gly67, Gly68, Trp69, Gly140, Glu145 ( $\alpha$ R2), Leu146, Lys148, Leu160, Asp161, <b>His162</b> ( $\beta$ R), Trp184, Asn187, Trp188
2	-4.8	-	Arg8, Asn14, Val13, Pro15, Ile16, Arg17, Leu45, Ser47, Gln68, Ser87, Pro90, Tyr91, Thr92, Tyr193 ( $\beta$ R)
3	-5.8	-	Asn18, Arg21, Ala93, Lys94, Lys148, Gly185, Thr186, Asn187, Gly189, Arg191
4	-4.7	Asp55, 3.03; Glu97, 2.97	Asn88, Tyr89, Pro90, Gly96, Glu97, Cys98, Asn99, Lys100, Asp101, Leu102
5	-4.5	Cys65, 2.83; Ser66, 2.71 и 2.95; Lys95, 2.92 и 3.15	Arg21, Tyr60, Leu63, Cys65, Ser66, Lys94, Lys95

\* – жирным шрифтом выделены каталитически значимые аминокислотные остатки, в скобках – их принадлежность к элементам вторичной структуры глобулы фицина

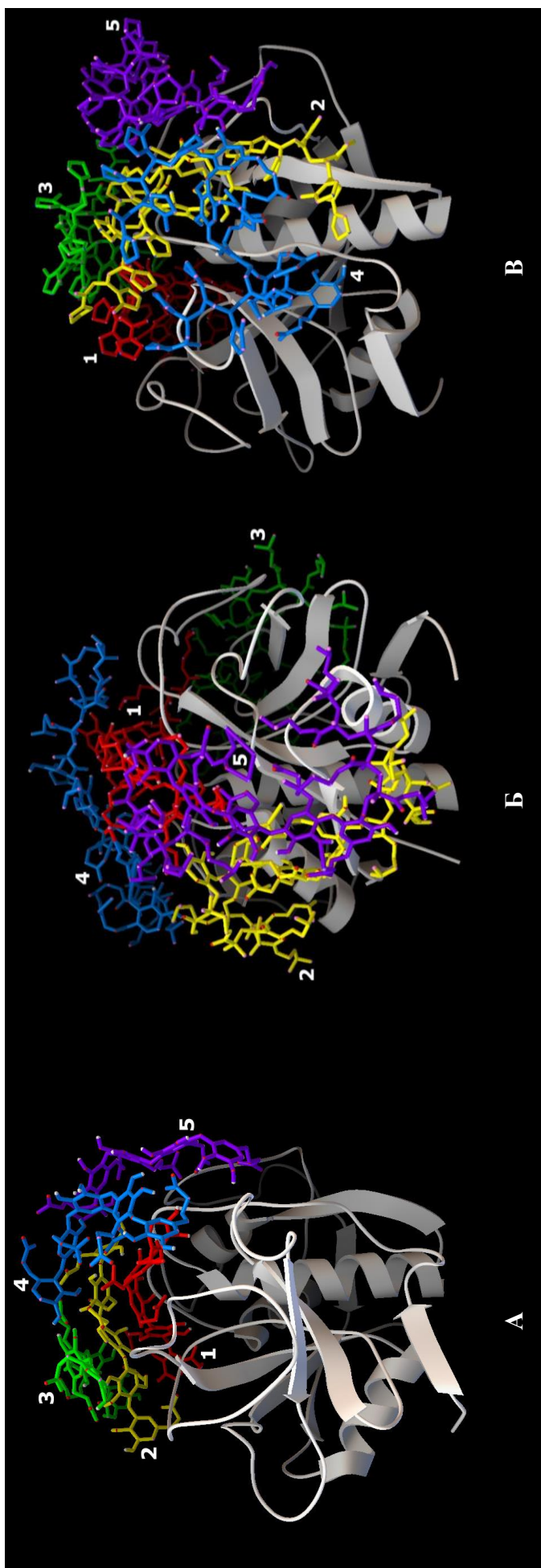
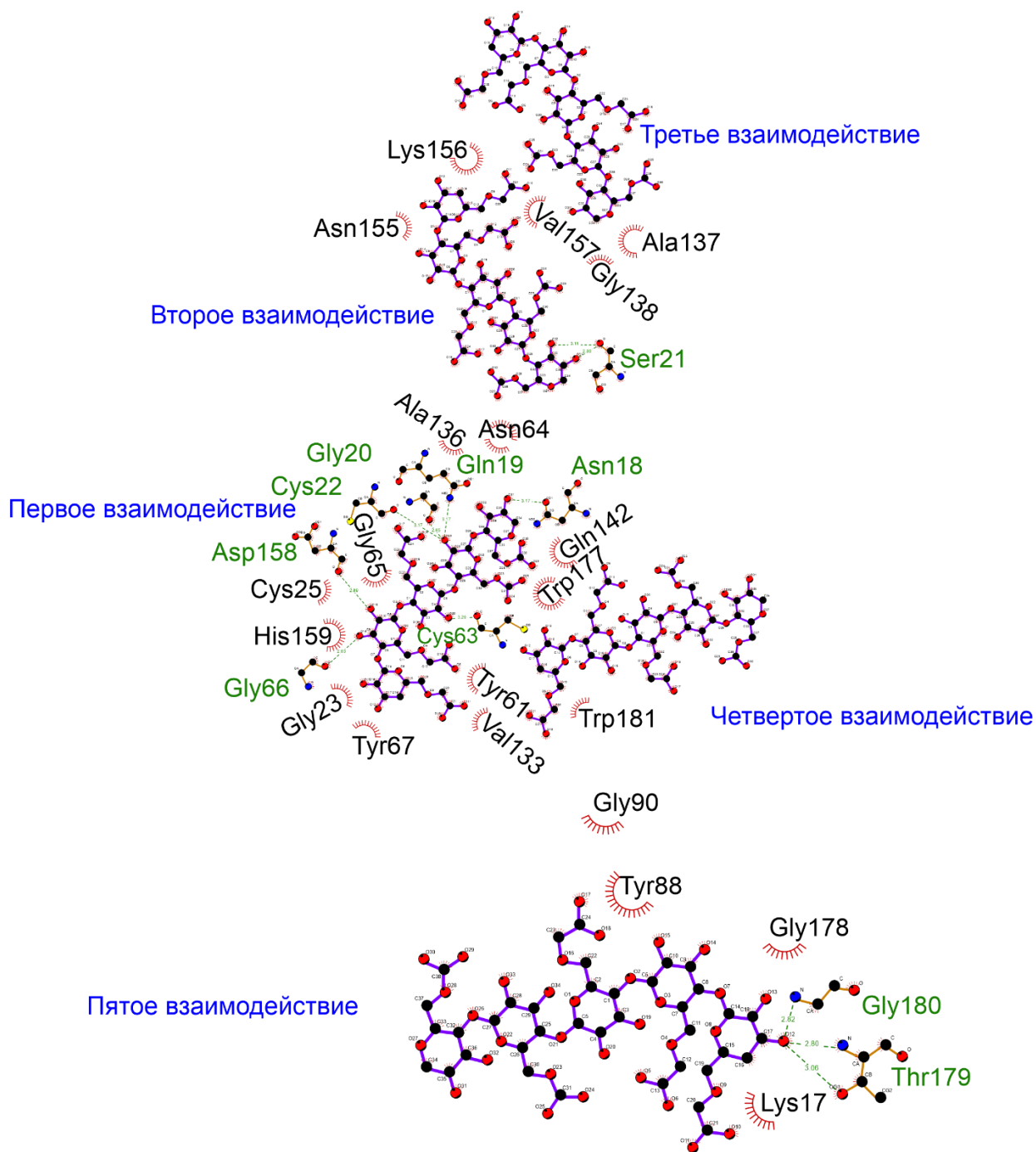


Рис. 12. Расположение полисахаридов на поверхности молекулы папаина:

**А** – натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы;

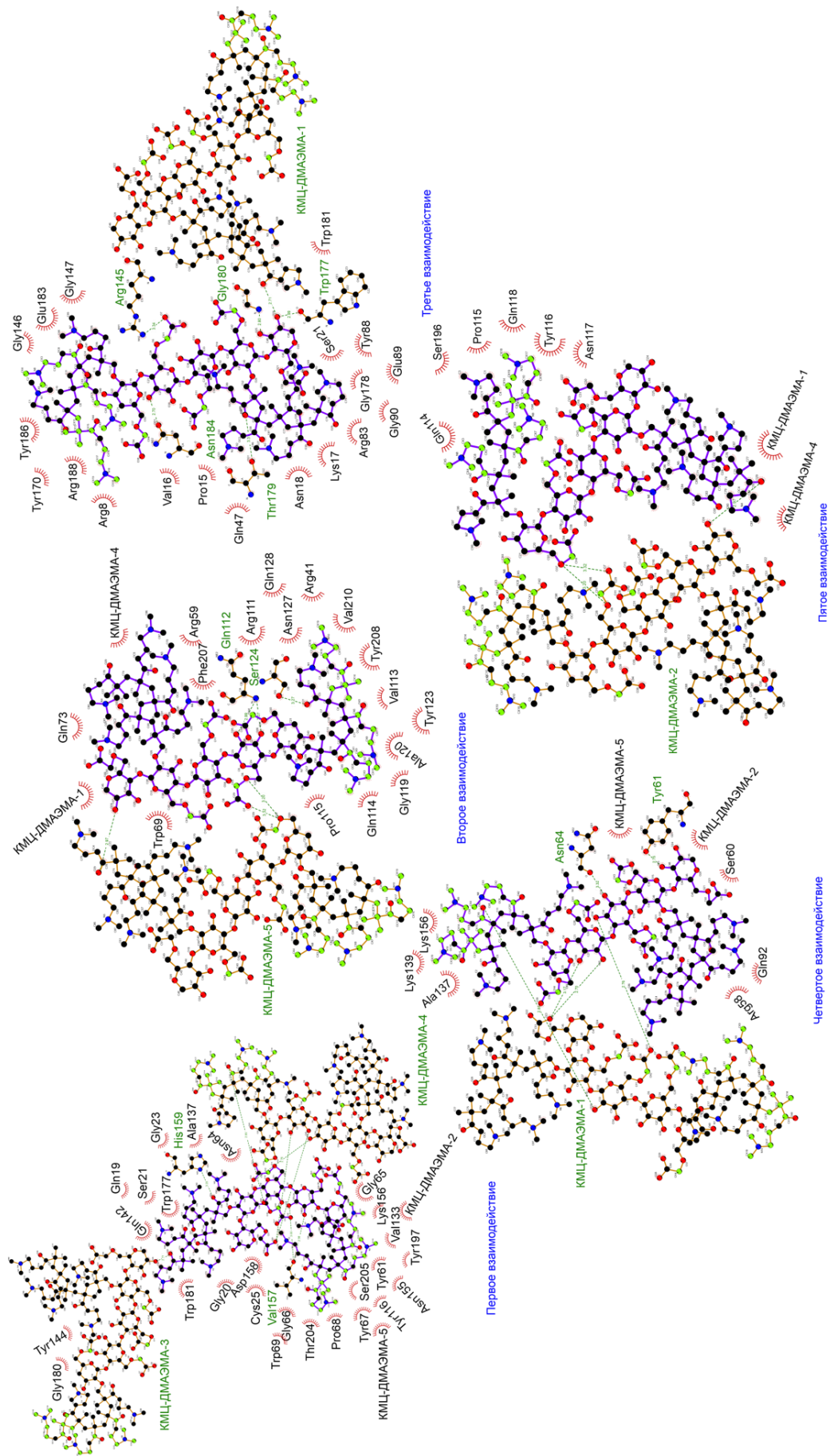
**Б** – сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата;

**В** – сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *M*-винилимидазола.

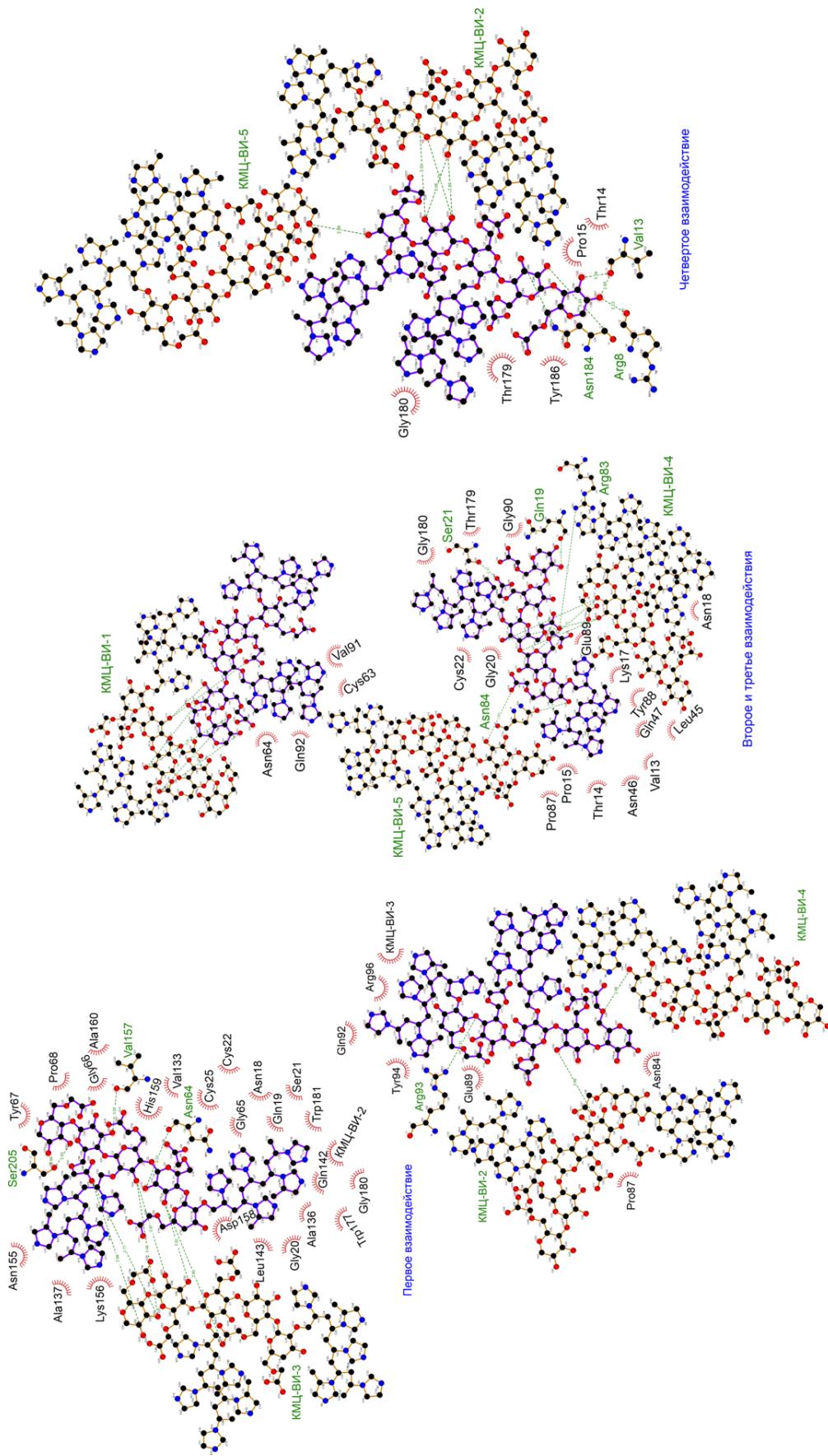


А

Рис. 13. Связи и взаимодействия между папаином и полисахаридами (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å): **А** – натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы; **Б** – сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата; **В** – сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола (продолжение рисунка на следующих листах).



Б



Первое взаимодействие

Второе и третье взаимодействие

Четвертое взаимодействие

**В**

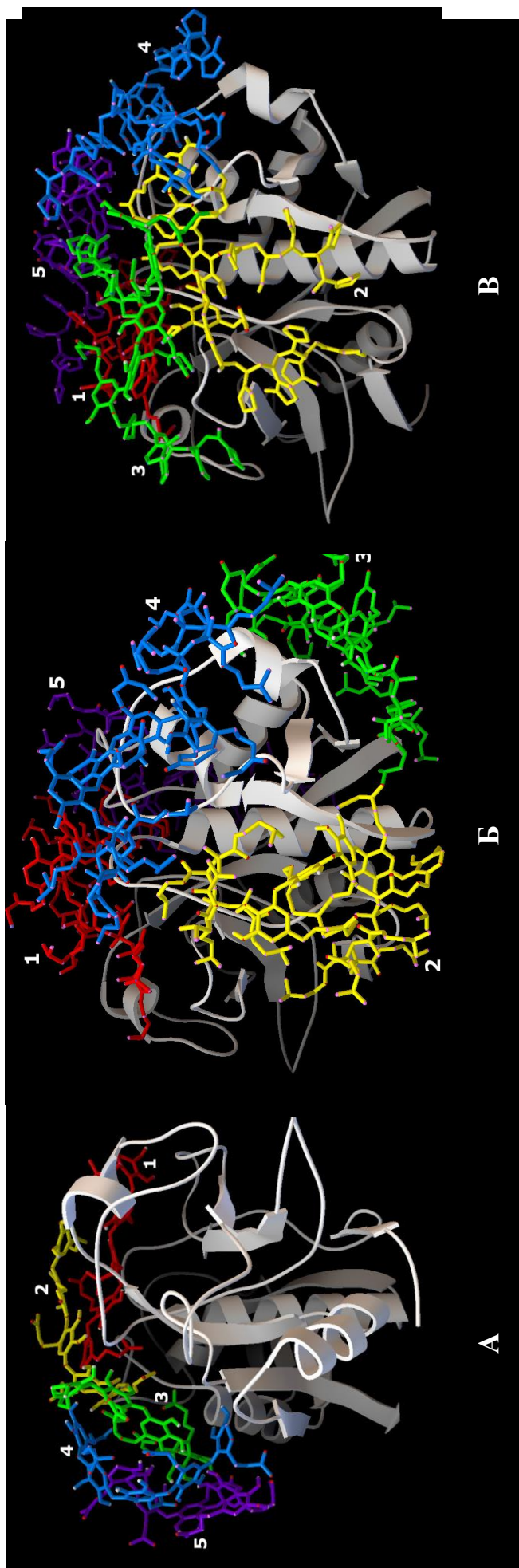


Рис. 14. Расположение полисахаридов на поверхности молекулы фицина: **А** – натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы; **Б** – сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата; **В** – сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола.

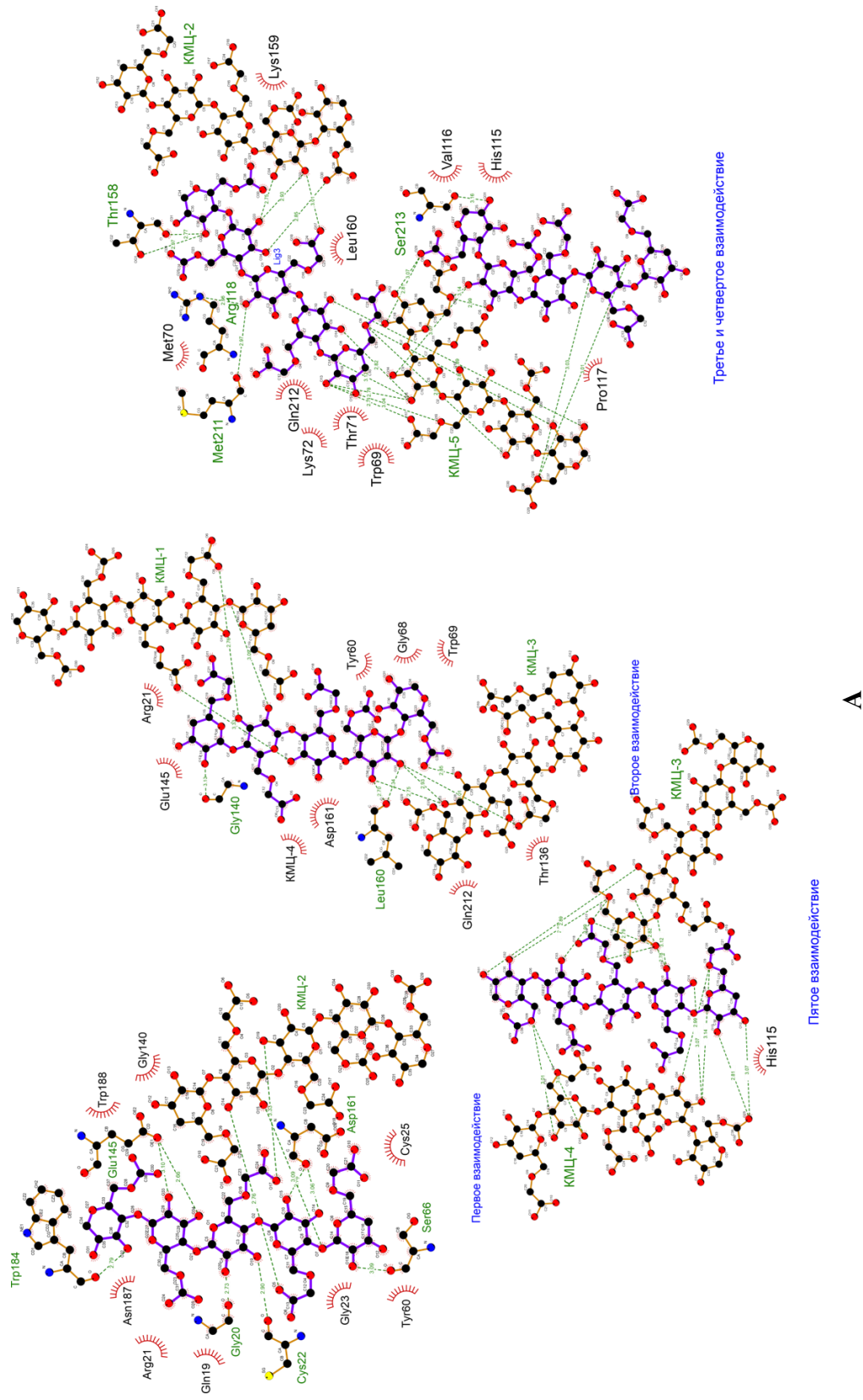


Рис. 15. Связи и взаимодействия между фицином и полисахаридами (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å): **А** – натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы; **Б** – сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилата; **В** – сополимером натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола (продолжение рисунка на следующих листах).







\*\*\*

В целом из представленной в разделе 3.1 информации можно сделать вывод о том, что *in silico* исследование взаимодействия всех рассматриваемых цистеиновых протеаз – бромелина, папаина и фицина – с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимерами с *N*-винилимидазолом или *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом – показало, что процесс термодинамически разрешен и приводит к образованию комплексов, в которых макромолекулы полисахаридов располагаются в непосредственной близости от каталитического кармана ферментов, вовлекая в различные типы взаимодействий как каталитически значимые остатки аминокислот, так и фрагменты, расположенные на поверхности глобул или принадлежащие к упорядоченным элементам вторичной структуры глобул. Все это может оказывать влияние на структуру и каталитическую активность бромелина, папаина и фицина и требует дальнейших экспериментальных исследований для более точной оценки особенностей взаимодействий в комплексах белок-полисахарид.

### 3.2 Синтез и свойства сополимеров карбоксиметилцеллюлозы

Анализ литературы показывает, что бромелин, папаин и фицин широко используются в медицине в качестве антибактериальных препаратов или активных веществ в терапии ран различной этиологии [64, 65, 108, 127, 169, 170]. Поэтому выбирая потенциальные компоненты лекарственных средств, в т.ч. и носители для ферментов, следует обратить особое внимание на такие их характеристики как низкая токсичность, биосовместимость и биоинертность, способность к резорбции. Достаточно полно этим характеристикам отвечает натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы – ее высоковязкие водные растворы используются в хирургии для предотвращения спайкообразования, а в сухом виде этот полисахарид применяется как пищевой загуститель или наполнитель фармацевтических форм пролонгированного действия. Кроме того, при высушивании растворы КМЦ образуют эластичные пористые пленки, способные стать перспективной основой для создания инновационных ранозакрывающих материалов [156, 157].

Макромолекулы карбоксиметилцеллюлозы содержат два типа функциональных групп – гидроксильные и карбоксилатные – характеризующиеся высокой гидрофильностью и отрицательным зарядом. Поэтому взаимодействие с глобулами белков может быть затруднено как ввиду кулоновского отталкивания (в области своих рН-оптимумов глобулы исследуемых ферментов имеют отрицательный заряд), так и из-за недостаточности центров, способных к гидрофобным взаимодействиям. Таким образом, несмотря на ряд практически значимых свойств, КМЦ может характеризоваться низкой сорбционной емкостью по отношению к бромелину, папаину и фицину.

Перспективным решением описанной проблемы является химическая модификация полисахарида путем прививки боковых полимерных цепей с высокой комплексообразующей способностью. Макромолекулы, содержащие в себе как неполярную углеродную цепь, так и функциональные боковые

заместители, способные к кислотно-основным реакциям, сочетают в себе одновременно центры для гидрофобных, ионных и прочих физических взаимодействий. Строение сополимера, содержащего боковые цепи, обеспечивает их стерическую доступность в водной среде, формируя агрегаты макромолекул различной архитектуры, наружная оболочка которых состоит из синтетических фрагментов с высокой комплексообразующей способностью [156, 157].

Учитывая результаты *in silico* исследования взаимодействий бромелина, папаина и фицина с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимерами с *N*-винилимидазолом и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом, демонстрирующие самопроизвольно образование комплексов с участием каталитически значимых остатков аминокислот, что, несомненно, должно сказаться на структурно-функциональных особенностях выше названных белков, следующим этапом работы был модификация рассмотренных полисахаридов и исследование их поведения в водных растворах.

### 3.2.1 Синтез сополимеров

Синтез сополимеров осуществлялся растворной радикальной полимеризацией с вещественным иницированием. В качестве инициатора была использована смесь персульфата калия (ПСК) и метабисульфита натрия (МБС). Выбор инициатора обусловлен рядом различных факторов. Применение классических иницирующих систем на основе металлов с переменной валентностью ( $\text{Ce}^{4+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  и т.д.) невозможно, ввиду особенностей строения молекул карбоксиметилцеллюлозы – при введении в раствор многозарядных катионов может происходить ионотропное гелеобразование, т.е. образование пространственно сшитой структуры за счет взаимодействия с отрицательно заряженными карбоксильными группами. Избежать подобной проблемы позволяет использование вещественных инициаторов, например, таких как персульфат калия. Известно, что использование только персульфата калия в качестве инициатора

полимеризации с участием полисахаридов способствует их деструкции, а также требует высоких температур, что приводит к уменьшению выхода целевого продукта [180]. Использование иницирующей смеси, содержащей метабисульфит натрия, снижает температуру распада персульфата, а также «защищает» полисахарид от деструкции, что повышает эффективность прививочной полимеризации [181].

В результате осуществленного нами исследования установлено, что в случае состава иницирующей смеси  $n(\text{МБС}) < n(\text{ПСК})$  происходит снижение степени прививки как при температуре ниже температуры распада персульфата ( $\sim 50$  °С), так и при температуре выше нее. В первом случае это может быть связано с недостаточной концентрацией радикалов, обусловленной лишь частичным распадом персульфата, во втором – наиболее вероятно происходит деструкция основной полисахаридной цепи. Снижение эффективности прививки также наблюдается при использовании иницирующей системы, в которой содержание метабисульфита превышает количество персульфата ( $n(\text{МБС}) > n(\text{ПСК})$ ). Вероятным объяснением этого факта может быть накопление значительного количества сульфат ион-радикалов, что, согласно литературным данным [182], приводит к обрыву растущих прививаемых цепей. В результате проведенных экспериментов, найдено, что наиболее оптимальным составом иницирующей смеси является практически равное мольное соотношение компонентов, т.е.  $n(\text{МБС}) \approx n(\text{ПСК})$ . В этом случае наблюдается наибольшая степень прививки.

Большое влияние на скорость полимеризации и характеристики получаемых сополимеров оказывает концентрация инициатора. При использовании его низких концентраций реакция полимеризации значительно замедляется, уменьшая конверсию мономера. При проведении синтеза с высокой концентрацией инициатора возрастает вероятность протекания побочных процессов, таких как деструкция полисахаридов и продуктов реакции, а также образование гомополимера прививаемого мономера.

Методика синтеза была оптимизирована при получении сополимеров КМЦ с *N*-винилимидазолом.

Таблица 8.

Условия синтеза сополимеров карбоксиметилцеллюлозы и *N*-винилимидазола ( $n(\text{КМЦ})$ - $n(\text{ВИ}) = 1-5$ )

Т, °С	[ПСК], моль×л <sup>-1</sup>	$n(\text{ПСК})$ - $n(\text{МБС})$	Конверсия ВИ, %	ЭП, %
30	$2 \times 10^{-3}$	1-1	13	5
40	$2 \times 10^{-3}$	1-1	59	38
50	$2 \times 10^{-3}$	1-1	61	24
40	$2 \times 10^{-2}$	1-1	58	17
40	$2 \times 10^{-4}$	1-1	28	11
40	$2 \times 10^{-3}$	1-0.5	31	16
40	$2 \times 10^{-3}$	1-2	16	7

Для сополимера КМЦ-ВИ была подробно изучена кинетика полимеризации, рис. 16. Было установлено, что на кинетической кривой присутствуют участки резкого роста скорости полимеризации и выхода на плато, что характерно для радикального процесса, при этом наблюдается третий участок, характеризующийся снижением выхода сополимера. Это явление, вероятно, связано с превалированием скорости деструкции полисахаридной цепи над скоростью роста полимерных цепей. В дальнейшем полимеризация останавливалась до достижения данной стадии.

Таблица 9.

Некоторые характеристики сополимеров

№	Сополимер	Конверсия, %	Винилового полимера в сополимере, % мол	ЭП, %	ЧП × 10 <sup>2</sup>	Mw боковых цепей
1	КМЦ-ВИ	40	43	38	1.19	12900
2	КМЦ-ДМАЭМА	59	36	19	1.46	7500

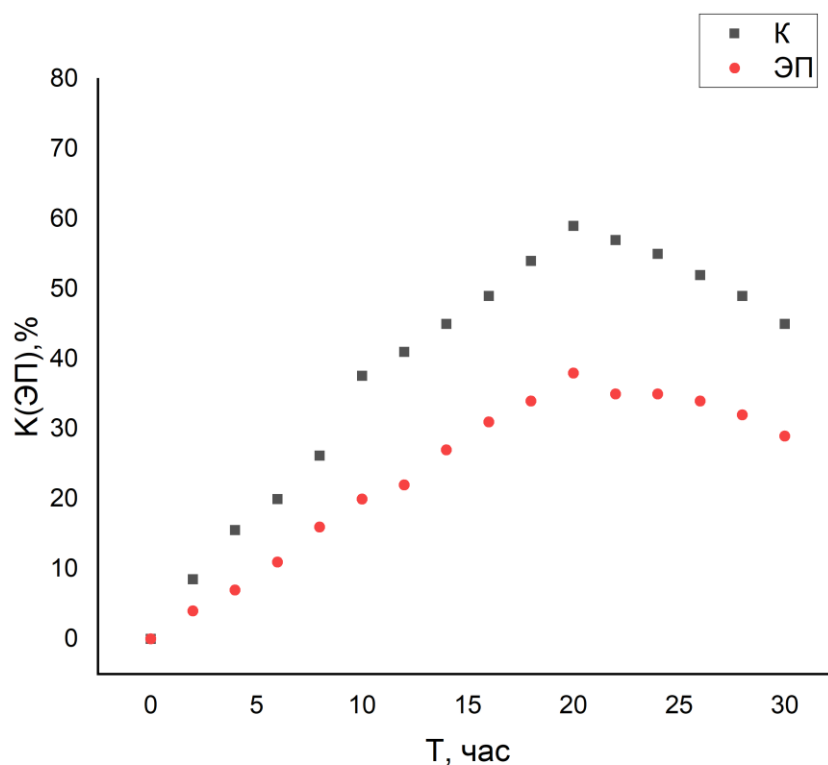


Рис. 16. Кинетика полимеризации сополимера КМЦ-ВИ ( $n(\text{КМЦ}) - n(\text{ВИ}) = 1-5$ ,  $C[\text{ПСК}] = 2 \times 10^{-3} \text{ моль} \times \text{л}^{-1}$ ,  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Синтез сополимера КМЦ-ДМАЭМА осуществлялся по аналогичной методике. Сравнивая прививочную полимеризацию *N*-винилимидазола и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом к различными полисахаридам, становится видно, что эффективность процесса для первого мономера выше, также в этом случае образуется меньшее количество гомополимера. Вероятно, это связано с относительно высокой активностью ДМАЭМА, что характерно для акриловых мономеров.

Образование сополимеров подтверждалось методами ИК- и  $^1\text{H}$  ЯМР-спектроскопии. На рис. 17 представлены спектры сухих порошков исходной КМЦ, КМЦ-ВИ и КМЦ-ДМАЭМА. На спектре КМЦ присутствуют характеристические полосы поглощения при  $1026$  и  $1051 \text{ см}^{-1}$ , относящиеся к скелетным колебаниям пиранозных циклов и содержащихся в них связях С-О-С и С-ОН; при  $1325$ ,  $1413$  и  $1591 \text{ см}^{-1}$ , соответствующие колебаниям диссоциированных карбоксильных групп [183].



В ИК-спектре сополимера КМЦ-ВИ сохраняются полосы поглощения, относящиеся к звеньям КМЦ, при этом появляются новые максимумы, характеризующие синтетические цепи ПВИ, при: 916, 1500, 3111 и 1648  $\text{см}^{-1}$ , отвечающие валентным и деформационным колебаниям имидазольного цикла и связи  $\text{C}=\text{N}$  соответственно [184].

ИК-спектр сополимера КМЦ-ДМАЭМА также содержит полосы, относящиеся к колебаниям полисахаридного остова и боковых карбоксильных групп, помимо этого появляются новые полосы, подтверждающие прививку цепей ДМАЭМА: при 1730  $\text{см}^{-1}$  – валентные колебания карбонила  $\text{C}=\text{O}$  [185].

На спектрах сополимеров наблюдается изменение значения волнового числа, а также формы полос поглощения, относящихся к колебаниям пиранозных циклов и связей  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  и  $\text{C}-\text{OH}$  карбоксиметилцеллюлозы, что свидетельствует о прививке боковых цепей через  $\text{OH}$ -группы КМЦ.

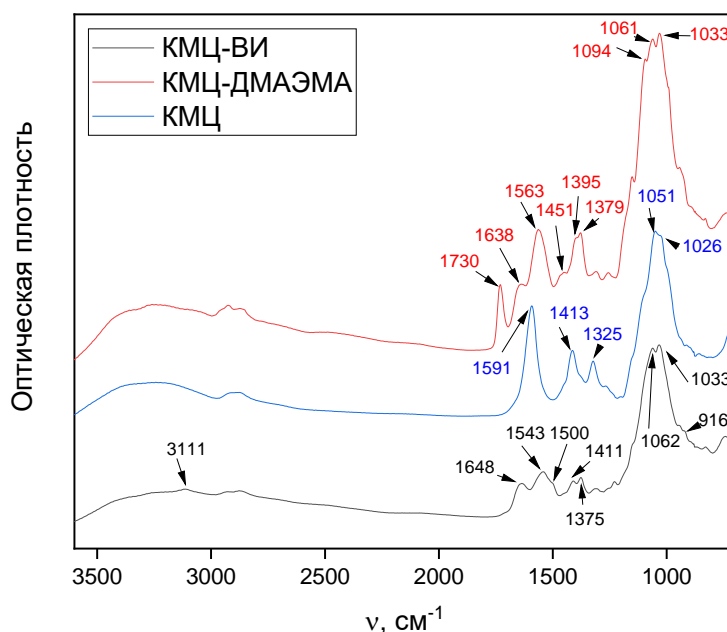
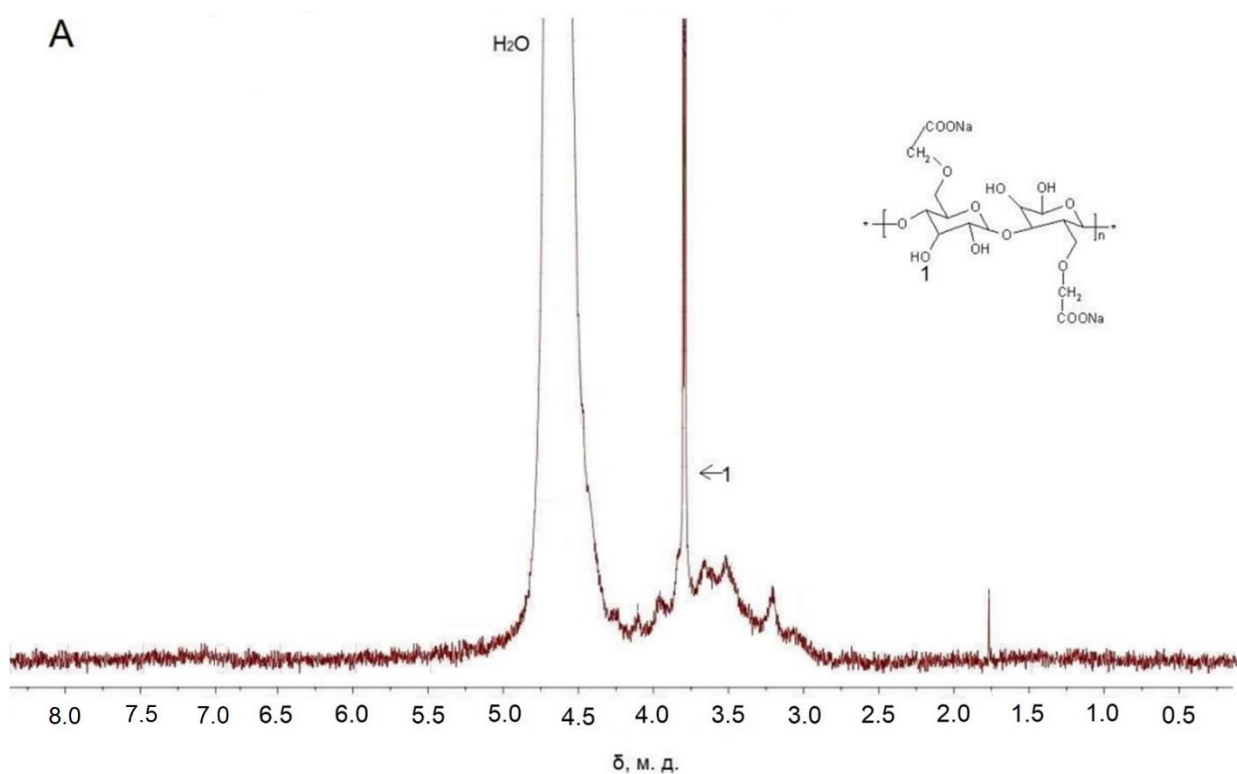


Рис. 17. ИК-спектры сухих порошков исходной КМЦ и сополимеров КМЦ-ВИ, КМЦ-ДМАЭМА

На рис. 18 представлены  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры Na-КМЦ (А) и сополимера КМЦ-ВИ (Б). Спектр модифицированного полисахарида содержит интенсивный сигнал при  $\delta=3.7-3.8$  м.д., соответствующий протонам гидроксильных групп, соединенных с 2 и 3 атомами углерода глюкопиранозного цикла Na-КМЦ [186]. На ЯМР-спектре сополимера интенсивность этого сигнала уменьшается, что свидетельствует о том, что прививка цепей ПВИ происходит за счет этих групп. Кроме того, в спектре появляются новые сигналы при  $\delta=6.8-7.8$  м.д., соответствующие протонам у 2, 4 и 5 атомов имидазольного цикла.



Б

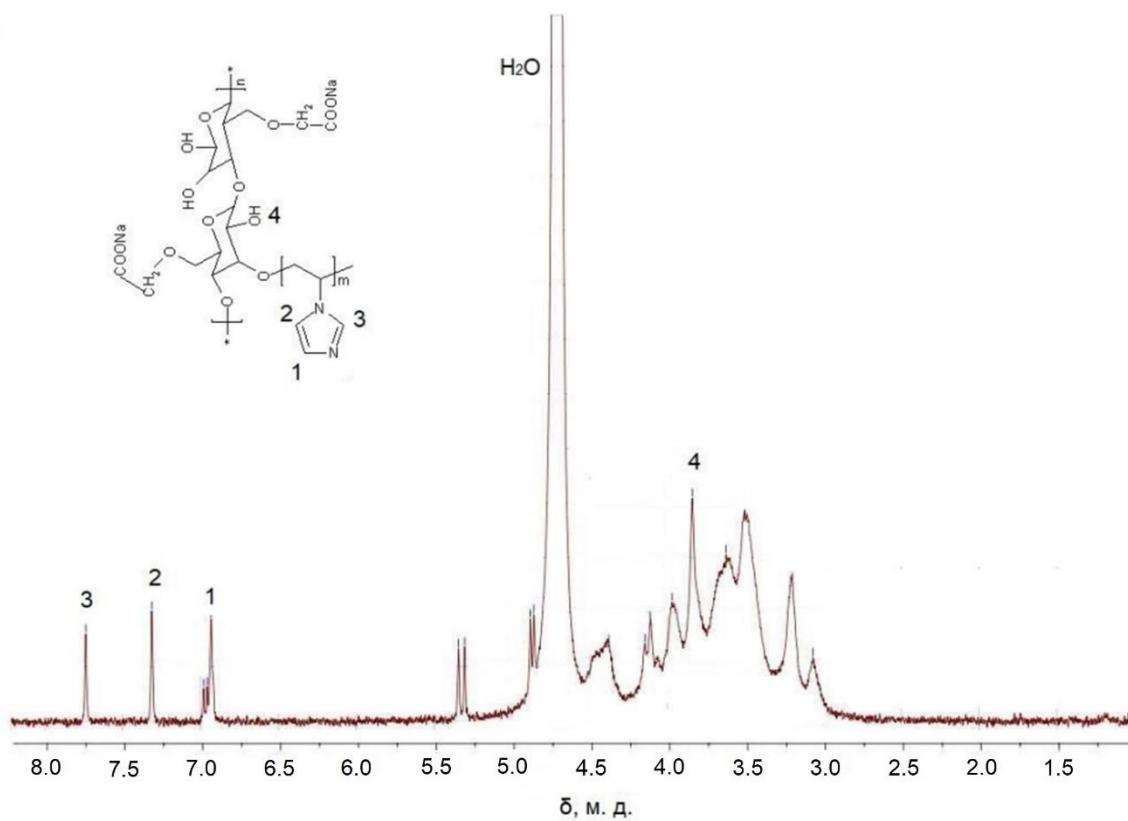


Рис. 18. ЯМР-спектры Na-КМЦ (А) и КМЦ-ВИ (Б)

Аналогичным образом подтверждалось образование сополимера КМЦ-ДМАЭМА.

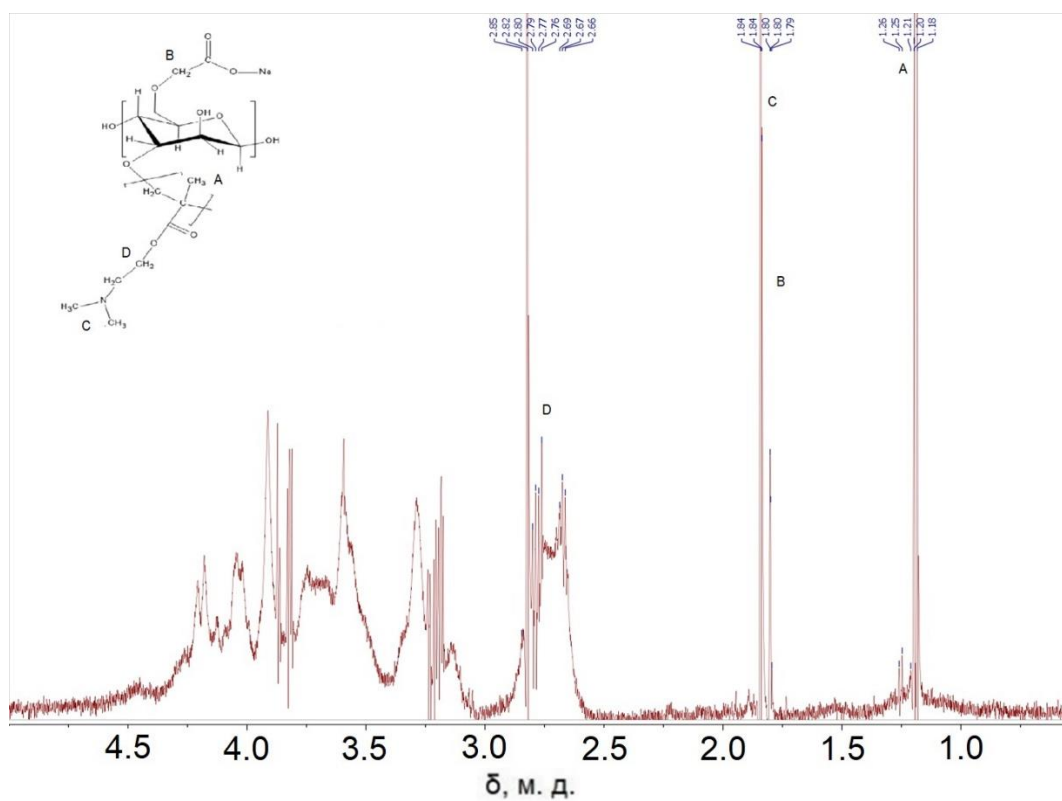


Рис. 19. ЯМР-спектр КМЦ-ДМАЭМА

### 3.2.2 Свойства водных дисперсий сополимеров

Одним из ключевых требований, предъявляемым к полимерам-компонентам биологически активных веществ, является устойчивость к действию компонентов плазмы крови человека, содержащей различные электролиты. Для оценки влияния ионной силы раствора на гидродинамический радиус полимерных частиц был использован изотонический раствор хлорида натрия с концентрацией 0.15 М. Для всех сополимеров было установлено отсутствие значительного увеличения гидродинамического радиуса в растворе хлорида натрия в течение 180 минут, что свидетельствует об устойчивости дисперсий к действию однозарядных электролитов. Однако для образцов, содержащих относительно небольшое количество боковых цепей, наблюдается некоторая агрегация частиц сополимера, что можно объяснить наличием незамещенных гидроксильных групп полисахарида, склонных к образованию межмолекулярных водородных связей. Таким образом, небольшие боковые цепи могут служить стабилизаторами полимерных дисперсий таких сополимеров. Типичная зависимость размера частиц от времени на примере сополимера КМЦ-ДМАЭМА представлена на рис. 20 [156, 157].

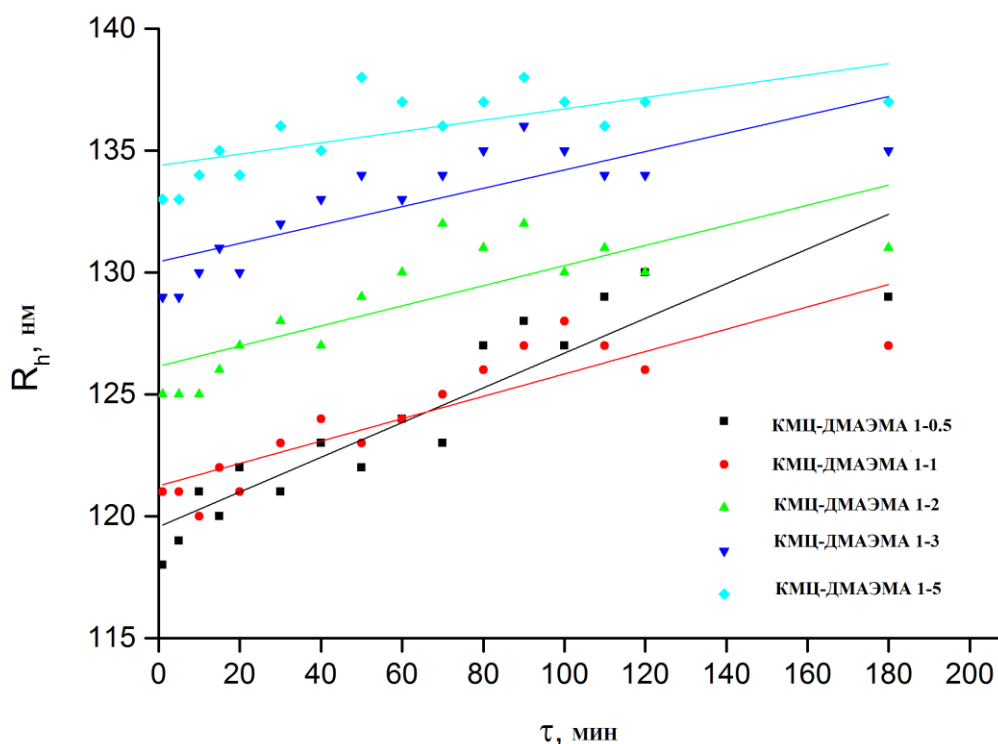


Рис. 20. Зависимость гидродинамического радиуса частиц сополимеров от времени в присутствии 0.15 M NaCl.

Изменения значений pH внутри организма, в том числе в полости раны, могут лежать в довольно широком интервале, поэтому важнейшим требованием для полимеров-носителей является их устойчивость при различных значениях pH среды. КМЦ содержит карбоксильные группы, которые способствуют растворимости полисахарида в щелочной и нейтральной среде, однако ухудшают ее в кислой среде, вследствие снижения степени диссоциации в избытке ионов гидроксония. Эти недостатки полисахаридов могут быть устранены, в том числе, при помощи прививочной сополимеризации. *N,N*-диметиламиноэтилметакрилат и *N*-винилимидазол содержат в своем составе способные к кватернизации атомы азота, которые, во-первых, могут обладать буферными свойствами в некотором диапазоне pH, а во-вторых, повышать растворимость сополимера в различных средах,

расширяя таким образом диапазон потенциального применения таких соединений [156, 157].

Гидродинамический радиус частиц сополимеров измерялся методом динамического светорассеяния (Табл. 10). Как видно из представленных данных, все исследуемые образцы представляют собой ассоциаты полимерных цепей, что характерно для полисахаридов. Для сополимеров наблюдается увеличение размеров частиц по сравнению с немодифицированной КМЦ, что также подтверждает дополнительную прививку боковых цепей.

Таблица 10.

Значения гидродинамического радиуса и электрокинетического потенциала КМЦ и ее сополимеров.

Полимер	$R_h$ , нм	$\zeta$ , мВ
КМЦ	$101 \pm 2$	$-38.5 \pm 0.9$
КМЦ-ВИ	$158 \pm 5$	$-23.8 \pm 0.6$
КМЦ-ДМАЭМА	$140 \pm 11$	$-50.1 \pm 1.6$

Электрокинетический потенциал частиц как исходного полисахарида, так и сополимеров отрицательный, при прививке цепей ДМАЭМА наблюдается рост величины показателя, что, по-видимому, обусловлено введением дополнительных отрицательно заряженных карбонильных групп. Боковые цепи ВИ несут положительный заряд за счет атома азота с неподеленной электронной парой, что приводит к снижению величины отрицательного заряда сополимера КМЦ-ВИ по сравнению с исходным полисахаридом. Величина заряда достаточна для агрегативной устойчивости частиц КМЦ и КМЦ-ДМАЭМА, обусловленной электростатическим фактором. Частицы КМЦ-ВИ более склонны к образованию ассоциатов, так как величина заряда ниже. Образование ассоциатов сополимерами приводит к образованию структур типа «ядро-корона», форма которых близка к сферической [187]. Микрофотографии, полученные при помощи просвечивающей электронной микроскопии, подтверждают образование подобных структур для сополимера

КМЦ-ВИ (рис. 21), форма частиц сополимера КМЦ-ДМАЭМА отклонена от сферической и представляет собой стержнеобразные частицы, менее склонные к самоассоциации, чем частицы КМЦ-ВИ, что объясняется значительной величиной заряда как цепей, так и сополимера в целом. Различия в форме и размерах сополимеров обусловлены частотой прививки и зарядом боковых цепей.

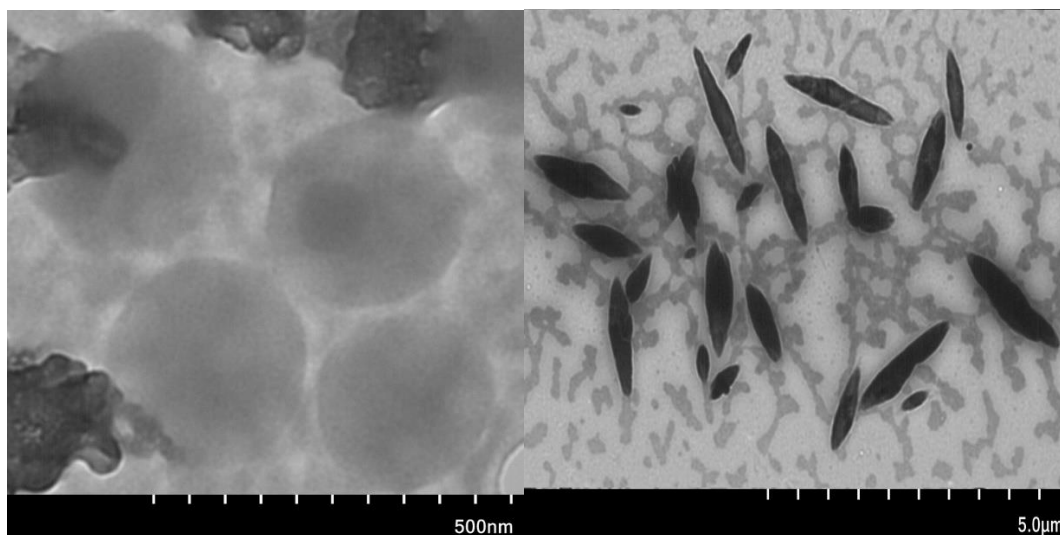


Рис. 21. ПЭМ снимки частиц сополимеров КМЦ-ВИ и КМЦ-ДМАЭМА в водном растворе.

\*\*\*

Таким образом, модификация карбоксиметилцеллюлозы прививочной сополимеризацией позволяет изменить структуру исходного полисахарида и придать новые свойства, благодаря чему они могут образовывать более устойчивые комплексы ферментов, эффективно регулирующие их практически значимые свойства. Комплексообразование с полисахаридами различного строения может оказать влияние на структуру и каталитическую активность бромелина, папаина и фицина и требует дальнейших экспериментальных исследований для более точной оценки особенностей взаимодействий в комплексах белок-полисахарид.

### 3.3 Исследование особенностей взаимодействия бромелина, папаина и фицина с полисахаридами методом ИК-спектроскопии

Результатом взаимодействия белковых макромолекул с инфракрасным излучением является спектр, содержащий в себе ряд полос, наиболее значимыми из которых являются амид I, II и III. Полоса амид I крайне информативна для определения изменений во вторичной структуре белка благодаря тому, что она соответствует колебательным модам карбонильных групп пептидных связей. Полоса амид I обычно проявляется вблизи  $1650\text{ см}^{-1}$ , однако ее точное положение определяется водородными связями, а также конформацией белкового остова [188].

Известно, что анализ белка с помощью ИК-спектроскопии ограничен сильным поглощением воды, особенно при измерениях «на просвет» – таблетках или на подложках из прозрачных в ИК-диапазоне материалов. Частично решить эту проблему позволяет использование метода нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО): в этом случае сканируется только несколько микрометров образца, находящихся в непосредственном контакте с кристаллом призмы спектрометра, минимизируя таким образом поглощение излучения водной фазой [189].

Однако часто использование НПВО-ИК-спектроскопии бывает недостаточно для получения качественных разрешенных спектров белков, так как полоса амид I перекрывается с модой деформационных колебаний воды ( $\sim 1650\text{ см}^{-1}$ ). Решением этой проблемы является использование дейтерированной воды для смещения «мешающего» сигнала легкой воды от полосы амид I [190].

Выбор тяжелой воды в качестве растворителя обусловлен тем, что ее физические и химические свойства схожи с протиевой водой. С точки зрения ИК-спектроскопии, этот растворитель имеет преимущество, заключающееся в том, что полоса деформационных колебаний D-O-D расположена при  $\sim 1200\text{ см}^{-1}$ , что создает область относительно низкого поглощения растворителя в диапазоне  $1500\text{--}1800\text{ см}^{-1}$ . При замене растворителя полоса амид II, связанная



преимущественно с колебаниями N-H, смещается с 1550 до 1450  $\text{см}^{-1}$ . Поскольку полоса амид I состоит в основном из различных мод валентных колебаний C=O, ее сдвиг относительно невелик (5–10  $\text{см}^{-1}$ ) по сравнению с полосой амид II. Сдвиг в сторону меньших волновых чисел интенсивных полос поглощения растворителя по своей сути позволяет использовать большую длину пути для ИК-измерений в амидной области. Таким образом, дейтерирование белковых образцов перед исследованием ИК-спектроскопией – прием, способствующий повышению качества получаемой информации о вторичной структуре белков [191]. Поэтому следующим этапом работы явилось исследование особенностей взаимодействия бромелина, папаина и фицина с полисахаридами, а также оценка влияния этого взаимодействия на вторичную структуру энзимов методом ИК-НПВО-Фурье-спектроскопии с предварительной обработкой исследуемых образцов боратным буферным раствором с рН 9.0, приготовленным на тяжелой воде.

На рис. 22 представлены ИК-спектры натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и ее комплексов с исследуемыми ферментами. ИК-спектр полисахарида содержит следующие характеристические полосы поглощения, положение которых смещается по сравнению с максимумами сухих полисахаридов из-за дейтерирования образцов: при 1068 и 1079  $\text{см}^{-1}$  – максимумы мод, образующих сложную полосу, описывающую колебания пиранозных циклов, в том числе связей C-OH; полосы при 1326, 1414 и 1593  $\text{см}^{-1}$ , отвечающие колебаниям диссоциированных карбоксильных групп:  $\rho_w\text{CH}_2$ ,  $\nu_s\text{COO}^-$  и  $\nu_{as}\text{COO}^-$ . В комплексах Na-КМЦ-фермент присутствуют описанные выше полосы, а также появляется новый максимум в области 1622–1640  $\text{см}^{-1}$  для образца с папаином, а для фицина и бромелина в виде плеча на изгибах полос при 1593  $\text{см}^{-1}$  и 1591  $\text{см}^{-1}$  соответственно – амид I белков. Стоит также отметить изменения в форме и количестве мод полосы, отвечающей колебаниям пиранозных циклов: на основании этого можно заключить, что гидроксильные группы полисахарида вовлечены во взаимодействия с ферментами, которые разрыхляют внутри- и

межмолекулярные водородные связи макромолекул КМЦ. Для полос, характеризующих колебания карбоксильных групп столь резких изменений не наблюдается, что говорит об их меньшей вовлеченности в образование водородных связей с энзимами.

Полученные результаты согласуются с данными молекулярного докинга (табл. 5-7): все три фермента образуют водородные связи с молекулами КМЦ преимущественно с ОН-группами последней, в то время как для карбоксиметильных фрагментов более характерно участие в других типах физических взаимодействий, наличие которых оказывает меньшее влияние на положение сигнала в ИК-спектре.

На рис. 23 представлены ИК-спектры сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и поли-*N*-винилимидазола (КМЦ-ВИ) и его комплексов с бромелином, папаином и фицином. ИК-спектр сополимера КМЦ-ВИ содержит полосы, описывающие колебания пиранозных циклов ( $1065$  и  $1085$   $\text{см}^{-1}$ ) и диссоциированных карбоксильных групп ( $1326$ ,  $1413$  и  $1593$   $\text{см}^{-1}$ ) фрагментов КМЦ, а также новые сигналы – при  $916$  (деформационные колебания имидазольного цикла). В ИК-спектрах комплексов появляется новая интенсивная полоса амид I белка в области  $1633$ – $1643$   $\text{см}^{-1}$ , подтверждающая присутствие ферментов в полученных препаратах. Кроме того, как и в случае с КМЦ, наблюдается изменение числа мод и положения их максимумов для сложной полосы, отвечающей колебаниям пиранозных циклов. В отличие от спектров комплексов с КМЦ, здесь наблюдаются значительные изменения в форме и положении максимумов полос, описывающих колебания карбоксильных групп, что обусловлено вовлеченностью карбоксиметильных групп в комплексообразование с ферментами, в первую очередь – посредством образования Н-связей (табл. 5-7). Также наблюдается практически полное отсутствие изменений полосы деформационных колебаний имидазольных циклов цепей ( $\Delta\nu = 3$   $\text{см}^{-1}$ ): азольные циклы вступают только в слабые

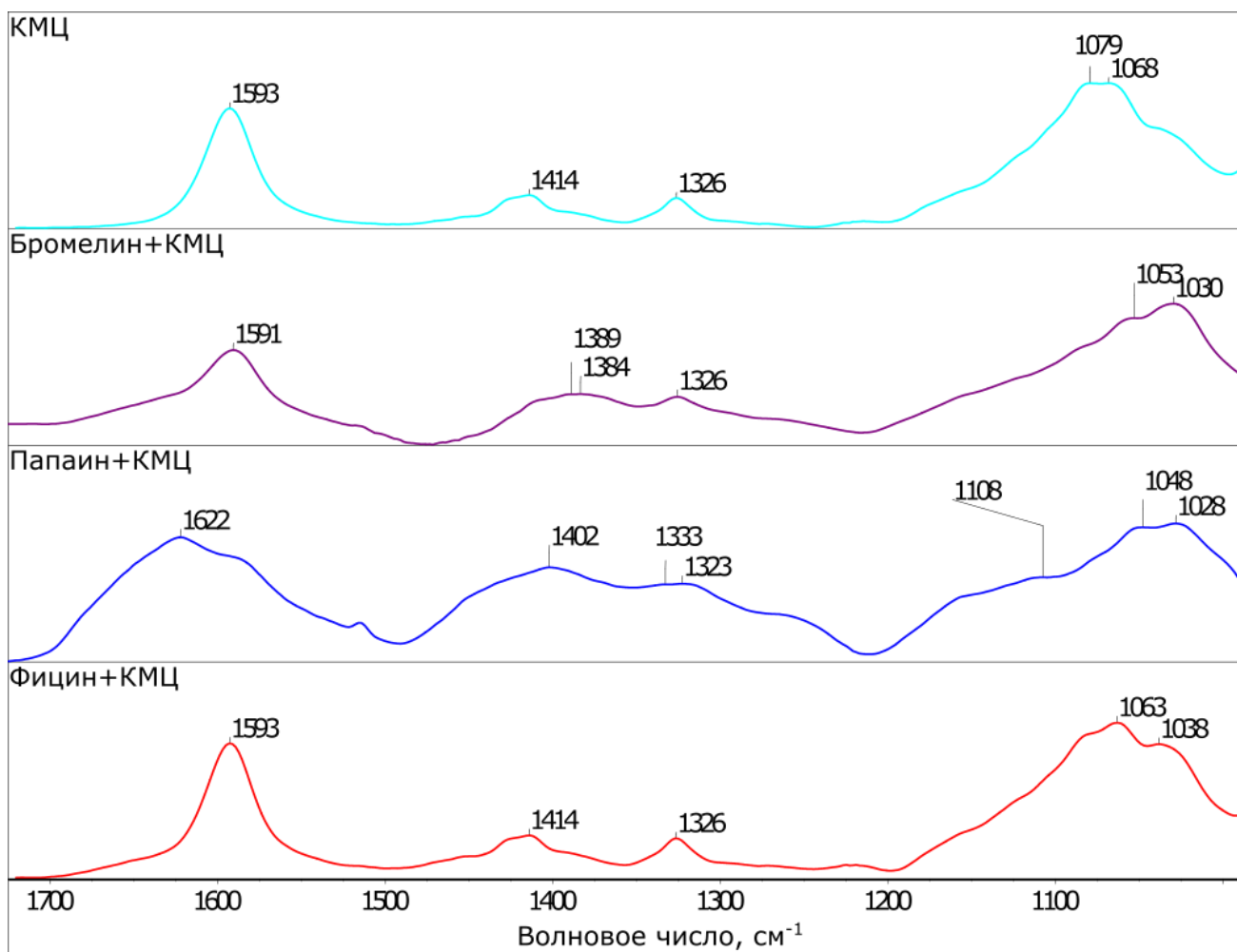


Рис. 22. ИК-спектры КМЦ и ее комплексов с бромелином, папаином и фицином в дейтерированном боратном буфере с рН 9.0

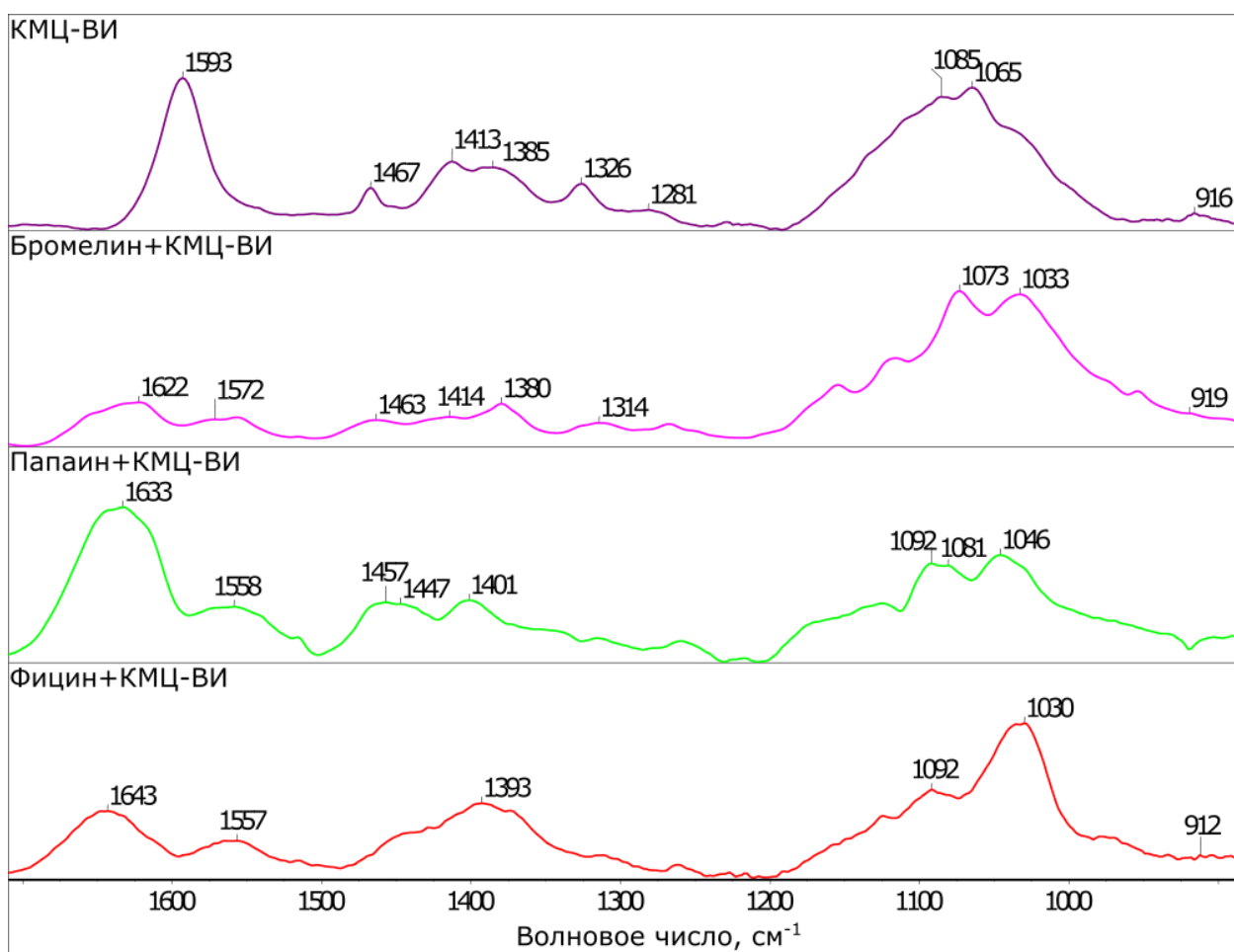


Рис. 23. ИК-спектры сополимера КМЦ-ВИ и его комплексов с бромелином, папаином и фицином в дейтерированном боратном буфере с рН 9.0.

физические взаимодействия, не образуя с белками водородных связей, что отчетливо видно из результатов *in silico* исследования.

На рис. 24 представлены ИК-спектры сополимера натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и поли-*N,N*-диметиламиноэтилметакрилата (КМЦ-ДМАЭМА). ИК-спектр полимера содержит полосы, отвечающие колебаниям звеньев КМЦ (1044, 1065, 1081, 1326, 1405 и 1568  $\text{см}^{-1}$ ), а также интенсивную полосу при 1728 и 1165  $\text{см}^{-1}$ , описывающую валентные колебания сложноэфирной группы  $>\text{COO}-$  и  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  ДМАЭМА. Анализ ИК-спектров комплексов исследуемых ферментов с КМЦ-ДМАЭМА позволяет выявить те же закономерности во взаимодействии фермент-полисахарид, что и для КМЦ-ВИ: в процесс вовлечены как гидроксильные, так и карбоксильные группы модифицированного полисахарида. Кроме того, значительное смещение волнового числа полосы  $\nu\text{COO}$  (в некоторых случаях  $\Delta\nu$  достигает 7  $\text{см}^{-1}$ ) указывает на вовлеченность боковых цепей в процесс комплексообразования. Данные молекулярного докинга подтверждают эту гипотезу, и показывают образование водородных связей между ферментами и полисахаридом с участием  $\text{COO}^-$ ,  $\text{OH}$  и  $\text{C}=\text{O}$  групп последнего (табл. 5-7).

Таким образом, наблюдается корреляция между результатами ИК-спектроскопии и *in silico* исследования взаимодействия бромелина, папаина и фицина с рассматриваемыми полисахаридами. Как уже отмечалось раньше, выводы о структурных изменениях белков можно получить путем сравнения положения полосы амид I нативного и иммобилизованного фермента. В табл. 11 представлены полосы амид I нативных бромелина, папаина и фицина в буферном растворе, а также в их комплексах с КМЦ, КМЦ-ВИ и КМЦ-ДМАЭМА.

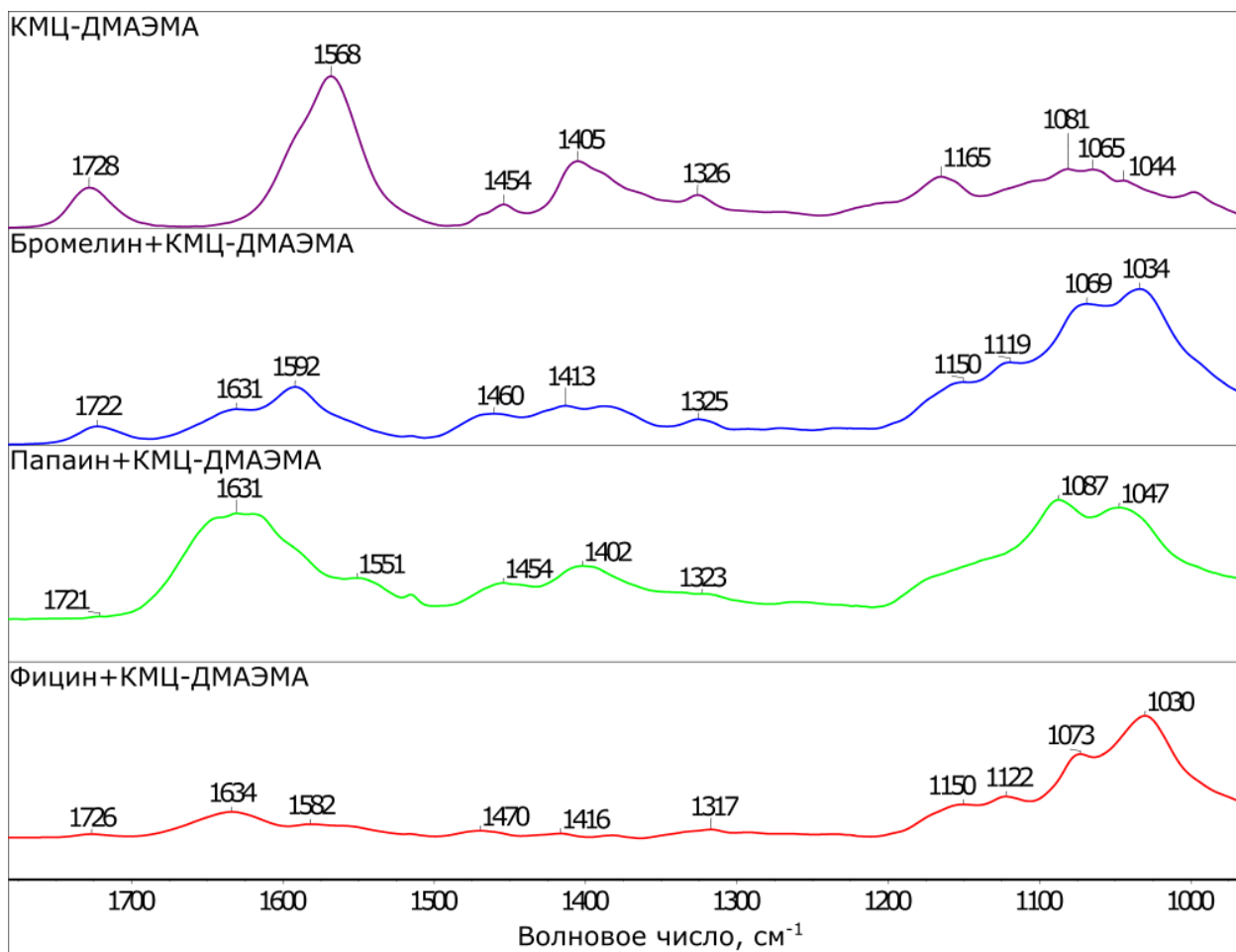


Рис. 24. ИК-спектры сополимера КМЦ-ДМАЭМА и его комплексов с бромелином, папаином и фицином в дейтерированном боратном буфере с рН 9.0.

Как видно из приведенных данных взаимодействие бромелина и фицина со всеми полисахаридами, за исключением пары фицин–КМЦ-ДМАЭМА, не приводит к существенным изменениям в форме полосы или ее положении в спектре. Некоторое повышение волнового числа амида I фицина и бромелина при взаимодействии с КМЦ и ее сополимером с *N*-винилимидазолом обусловлено формированием водородных связей аминокислотными остатками, входящими в состав  $\alpha$ -спиралей глобул ферментов [189]. Кроме того, эти результаты коррелируют с данными молекулярного докинга (табл. 5, табл. 7): расчет показал, что бромелин и фицин формирует H-связи и прочие слабые физические взаимодействия преимущественно аминокислотами, образующими  $\alpha$ -спирали или находящимися в неупорядоченных областях глобул белков.

В случае же взаимодействия фицина с КМЦ-ДМАЭМА наблюдается значительное снижение волнового числа амида I ( $\Delta\nu = 8 \text{ см}^{-1}$ ), что свидетельствует о более существенных изменениях во вторичной структуре белка, обусловленных увеличением доли антипараллельных  $\beta$ -слоев в глобулах фицина [189].

Более сложная картина наблюдается для комплексов папаина. Прежде всего, стоит отметить, что поглощение в области амид I этого фермента на спектрах имеет сложную форму и простирается за пределы диапазона 1700–1600  $\text{см}^{-1}$ , что говорит о наличии неудаляемых примесей в исходном белке, использованном для получения комплексов. Были дополнительно зарегистрированы спектры растворов папаина различных партий, с помощью которых удалось выделить спектр искомой примеси. В дальнейшем полученный таким образом спектр примеси вычитали как из спектра нативного, так и комплекса папаина. Поэтому последующие количественные выводы, формулируемые для этого энзима, являются оценочными и характеризуются более высокими погрешностями по сравнению со значениями, полученными для бромелина и фицина.

Таблица 11.

Волновое число полосы амид I,  $\text{см}^{-1}$ , ферментов в растворе и их комплексов с полисахаридами

Фермент	Фермент в растворе	В комплексе с		
		КМЦ	КМЦ-ВИ	КМЦ-ДМАЭМА
Бромелин	1641	1640	1642	1641
Папаин	1645	1639	1649	1653
Фицин	1642	1645	1643	1634

Из полученных данных видно (табл. 11), что при взаимодействии папаина с КМЦ происходит смещение полосы амид I в область более низких значений волнового числа, что может свидетельствовать о возрастании количества  $\beta$ -структур, в то время как в случае комплексообразования с сополимерами происходит повышение волнового числа до значений, соответствующих сигналам  $\alpha$ -спиралей, указывая на рост их содержания в глобулах фермента [189].

Высказанные выше предположения о конформационных изменениях глобул исследуемых энзимов подтверждаются результатами расчета соотношения  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур для нативных и комплексов белков (Табл. 12). При взаимодействии бромелина и фицина со всеми рассматриваемыми полисахаридами наблюдается снижение доли  $\alpha$ -спиралей: по-видимому, образование водородных связей аминокислотами, формирующими эти элементы вторичной структуры белка, приводит к разрушению последних. В случае образования комплекса фицина с КМЦ-ДМАЭМА происходит резкое увеличение количества  $\beta$ -слоев, что нашло отражение в его ИК-спектре [192]. Для папаина же, который, согласно данным молекулярного докинга, взаимодействует с полимерами преимущественно через аминокислотные остатки неупорядоченных областей или  $\beta$ -структур, зависимость имеет более сложный характер.



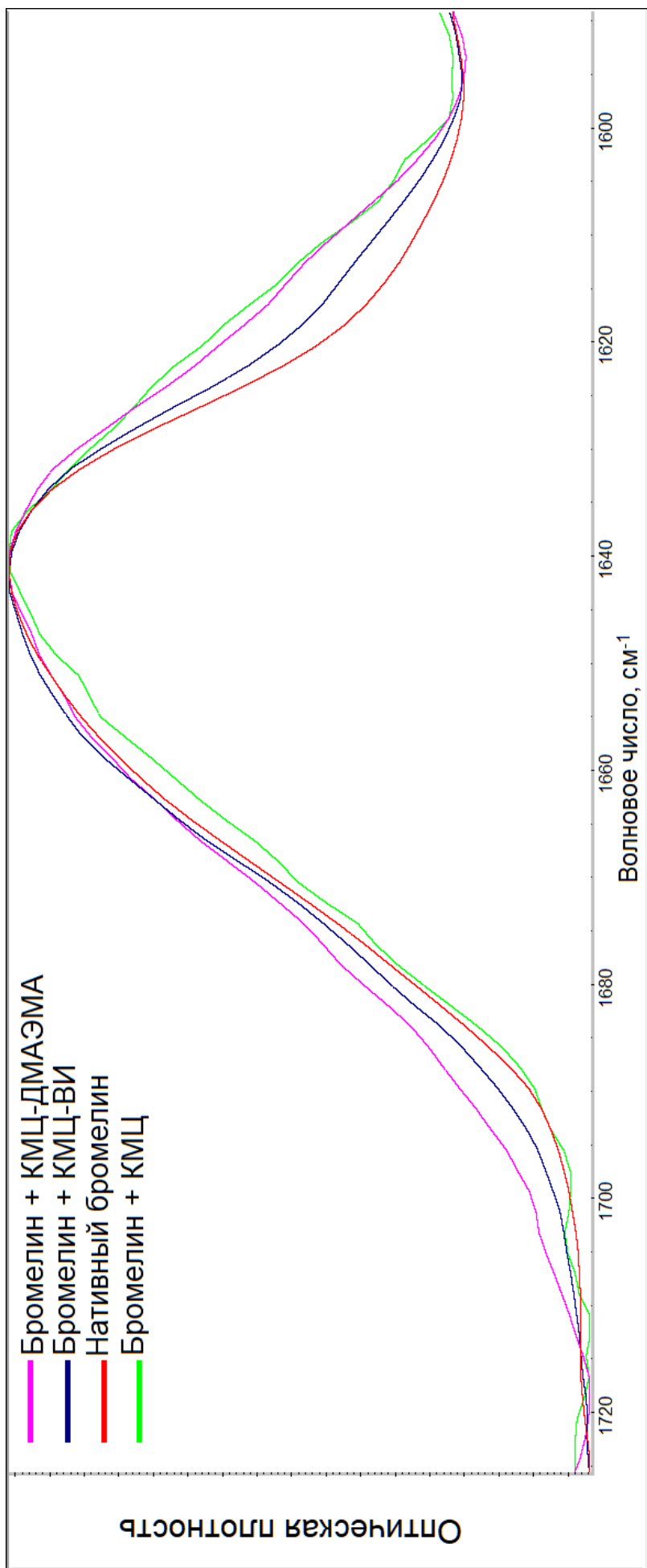


Рис. 25. Полосы амид I бромелина в растворе и в комплексах с полисахаридами.

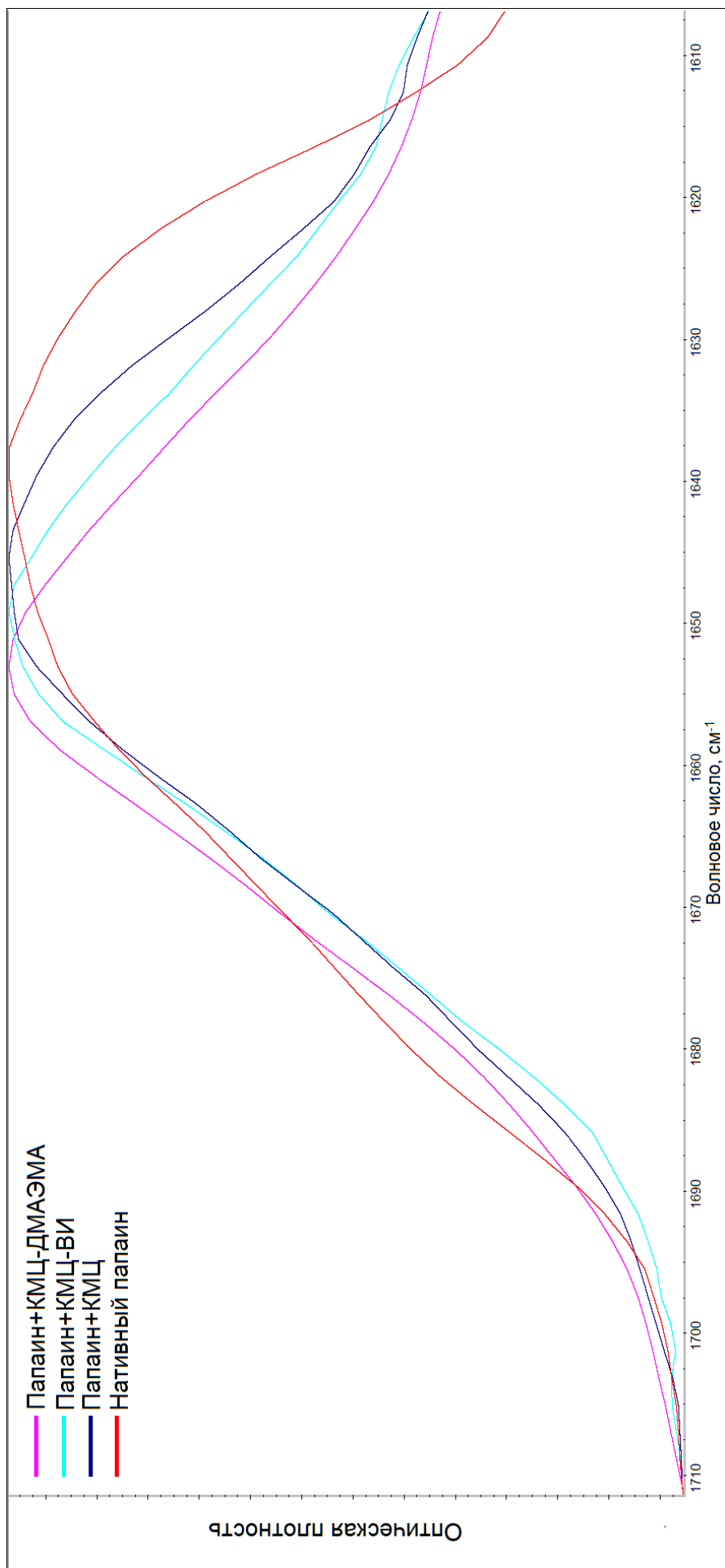


Рис. 26. Полосы амид I папаина в растворе и в комплексах с полисахаридами.

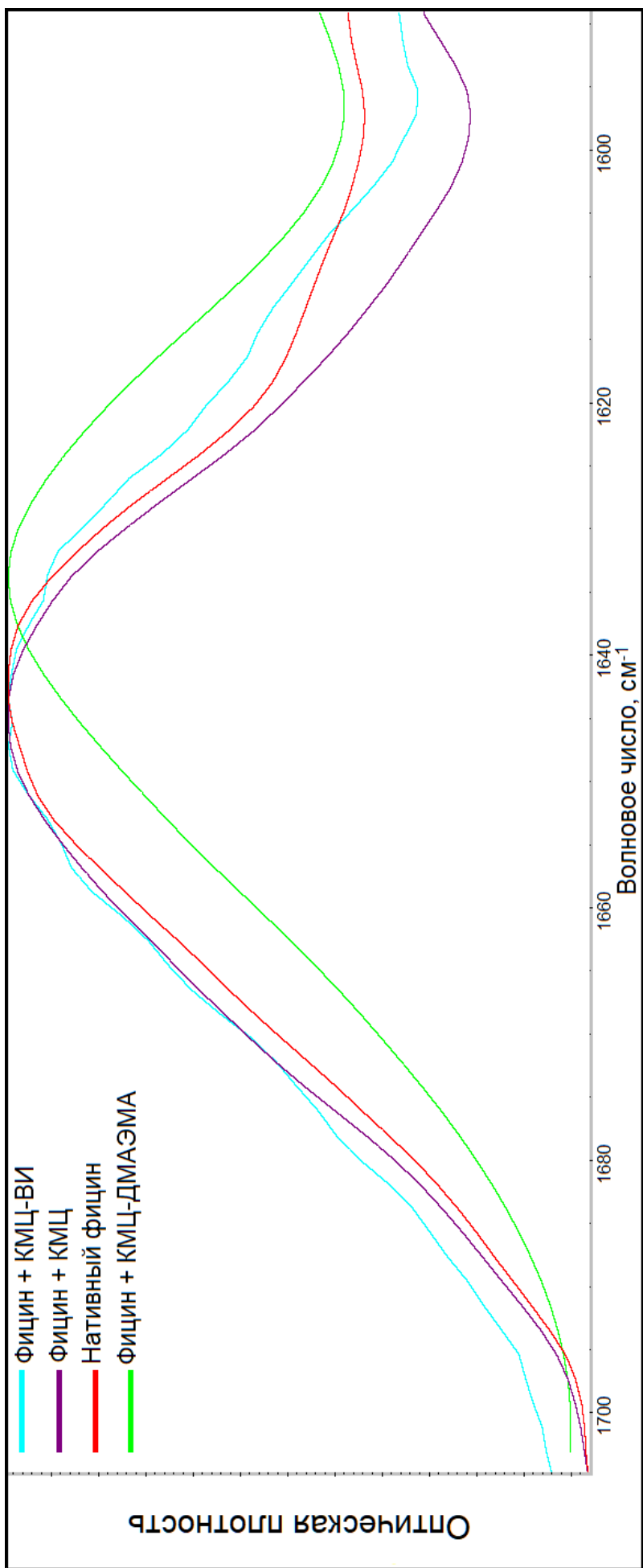


Рис. 27. Полосы амид I фицина в растворе и в комплексах с полисахаридами.

При формировании связей с КМЦ происходит возрастание доли  $\beta$ -слоев, а в результате комплексообразования с сополимерами происходит резкое снижение их количества, что, по-видимому, является следствием их разрушения в результате взаимодействия с модифицированными полисахаридами путем образования водородных связей.

Полученные для папаина значения содержания  $\beta$ -структур в комплексах сополимеров имеют экстремально низкие значения, однако, стоит отметить, что это обусловлено, в первую очередь, влиянием компенсационных манипуляций со спектральными данными для удаления сигналов примеси, искажающих форму полосы амид I папаина.

Таблица 12.

Соотношение  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур в глобулах ферментов.

Элементы структуры	Нативный фермент в буфере	Фермент в комплексе с		
		КМЦ	КМЦ-ВИ	КМЦ-ДМАЭМА
Бромелин				
$\alpha$ -спирали	0.24	0.22	0.25	0.18
$\beta$ -складки	0.23	0.19	0.26	0.44
прочие	0.53	0.59	0.49	0.62
Папаин				
$\alpha$ -спирали	0.35	0.25	0.48	0.69
$\beta$ -складки	0.19	0.55	0.06	0.05
прочие	0.46	0.20	0.46	0.26
Фицин				
$\alpha$ -спирали	0.26	0.15	0.20	0.19
$\beta$ -складки	0.22	0.21	0.30	0.46
прочие	0.52	0.64	0.50	0.35

Таким образом, на основании спектрального исследования образцов бромелина, папаина и фицина в растворе и в комплексе с исследуемыми полисахаридами показано, что в образовании связей и взаимодействиях с молекулами белков принимают участие преимущественно ОН-группы полисахаридами, в меньшей степени – С=О и имидазольные циклы синтетических боковых цепей. Эти взаимодействия приводят к отклонениям от нативной конформации глобул бромелина и фицина, приводя к разрушению  $\alpha$ -спиралей и увеличению количества  $\beta$ -структур. Для папаина зависимость

имеет более сложный характер: в результате взаимодействия с КМЦ происходит увеличение содержания  $\beta$ -структур, а случае комплексообразования с сополимерами – их резкое снижение и возрастание доли  $\alpha$ -спиралей. Подобные конформационные изменения, несомненно, должны сказаться на каталитической активности рассматриваемых энзимов.

### **3.4 Исследование протеолитической активности комплексов бромелина, фицина и папаина с полимерными матрицами**

Исследование особенностей комплексообразования бромелина, папаина и фицина с полисахаридами на основе карбоксиметилцеллюлозы методами молекулярного докинга и ИК-спектроскопии выявило, что модифицированные полисахариды располагаются в непосредственной близости от активных центров энзимов, в результате чего поверхностные и каталитически значимые аминокислотные остатки вовлекаются в различные физические взаимодействия, приводящие к изменениям во вторичной структуре белков. Подобные конформационные изменения, несомненно, отражаются на каталитической активности исследуемых ферментов. В связи с этим представляет интерес оценить влияние процессов комплексообразования на протеолитическую активность комплексов бромелина, папаина и фицина, а также оценить эффективность связывания фермент-полисахарид путем определения содержания белка в полученных препаратах.

Одним из наиболее точных методов количественного определения белка является его кислотный гидролиз с последующим анализом образующейся аминокислотной смеси. Основным преимуществом кислотного гидролиза является практически полное отсутствие побочных реакций высвобождаемых аминокислот, искажающих аналитический сигнал и снижающих точность количественного определения [193]. Однако ввиду длительности пробоподготовки, заключающейся в полном разложении исследуемого

образца, использование подобного подхода не всегда доступно и целесообразно. Поэтому широкое распространение получили различные колориметрические техники определения концентрации белка. Среди них особо стоит отметить количественное определение белка методом Лоури [173], в основе которого лежит сочетание взаимодействий аналита с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  – биуретовая реакция – и смесью фосфомолибденовой и фосфовольфрамовой кислот – реагентом Фолина-Чокалтеу. Последний, реагируя с боковыми заместителями тирозина, триптофана и цистеина в присутствии ионов меди, образует комплексы характерного сине-зеленого цвета, имеющие максимумы светопоглощения в области 650–750 нм.

Как и всякий количественный спектральный анализ белка, метод Лоури имеет недостатки, связанные с высокой чувствительностью к аминокислотной последовательности исследуемого объекта или изменениям pH среды. Однако благодаря сочетанию двух качественных реакций на различные функциональные группы белка этот подход является экспрессным, а также позволяет получать достаточно точные и хорошо воспроизводимые результаты. Также важнейшим преимуществом метода Лоури является его высокая чувствительность: нижний предел детектирования белка составляет ~25 мкг/мл [194].

Протеазы – наиболее часто используемые в практической деятельности человека энзимы: на них приходится около 60 % промышленно выпускаемых ферментных препаратов [194]. Поэтому постоянно ведется поиск и оптимизация новых методов и реагентов для определения их каталитической активности, включая синтез как высоко-, так и низкомолекулярных модельных субстратов. Так, например, для этих целей широко используются азопротеины – класс химически модифицированных производных природных белков [195]. В ходе ферментативного гидролиза субстрата происходит высвобождение хромофорной азогруппы, растворимой в трихлоруксусной кислоте и придающей раствору характерную красно-оранжевую окраску. Регистрируя изменения оптической плотности при 440 нм, возможно оценить

каталитическую (протеолитическую) активность энзима. Благодаря своей простоте, воспроизводимости и отсутствию необходимости использования дополнительных окрашивающих агентов, метод нашел широкое применение в анализе активности протеаз.

Комплексы цистеиновых протеаз получали согласно методике, представленной в [196] и апробированной в работах [197–198].

В связи со сказанным выше, для количественного определения белка в комплексах бромелина, папаина и фицина был использован метод Лоури, а эксперименты по определению протеолитической активности проводились с использованием субстрата азоказеина. Сочетание этих методов успешно зарекомендовало себя для анализа многокомпонентных систем на основе цистеиновых протеаз и полисахаридов различного строения [199 – 201].

На рис. 28 представлены результаты определения содержания белка в полученных комплексах. Установлено, что для каждого из исследуемых ферментов содержание белка минимально для комплексов с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы. Этот результат можно объяснить с использованием расчетов докинга: между ферментами и КМЦ образуется наименьшее число связей по сравнению с сополимерами, содержащими большее количество центров для взаимодействия с ферментами. Наибольшее количество белка содержится в комплексах с сополимером карбоксиметилцеллюлозы с *N*-винилимидазолом, образующим наибольшее количество водородных связей с папаином. Этот факт также косвенно подтверждает эффективность синтеза сополимеров и целесообразность их комплексообразования с исследуемыми цистеиновыми протеазами. В целом, для всех трех ферментов получены сопоставимые значения содержания белка в комплексах, и выход иммобилизации составляет более 50 %.

Анализ результатов экспериментов по определению протеолитической активности полученных комплексов бромелина, папаина и фицина выявил, что величины протеолитической активности их комплексов превышают соответствующие значения для нативных ферментов (рис. 29), причем это

обусловлено не более высоким содержанием белка в полученных системах, а конформационными изменениями глобул белков и влиянием микроокружения, состоящего из модифицированных полисахаридов, на среду, в которой протекали реакции гидролиза.

По всей видимости, структурные изменения, произошедшие с глобулами ферментов в микроокружении макромолекул карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимеров с *N*-винилимидазолом и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом способствуют модуляции активного центра за счет принятия глобулой более каталитически выгодной конформации. Кроме того, нельзя исключать влияние физического состояния выбранных полисахаридов: натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимеры образуют в условиях экспериментов густые физические гели, защищающие активный центр цистеиновых протеаз от воздействия кислорода воздуха. Это предположение также коррелирует с результатами докинга: согласно расчетам, полисахариды располагаются в непосредственной близости от каталитического кармана, формируя защитную «шапочку» вокруг активного центра ферментов.

Немаловажную роль в повышении протеолитической активности играет тот факт, что полисахариды имеют отрицательный заряд. В условиях эксперимента субстрат азоказеин имеет положительный заряд, а наличие сильно отрицательно заряженных полисахаридов способствует усилению кулоновского взаимодействия и направленной диффузии субстрата к ферменту.



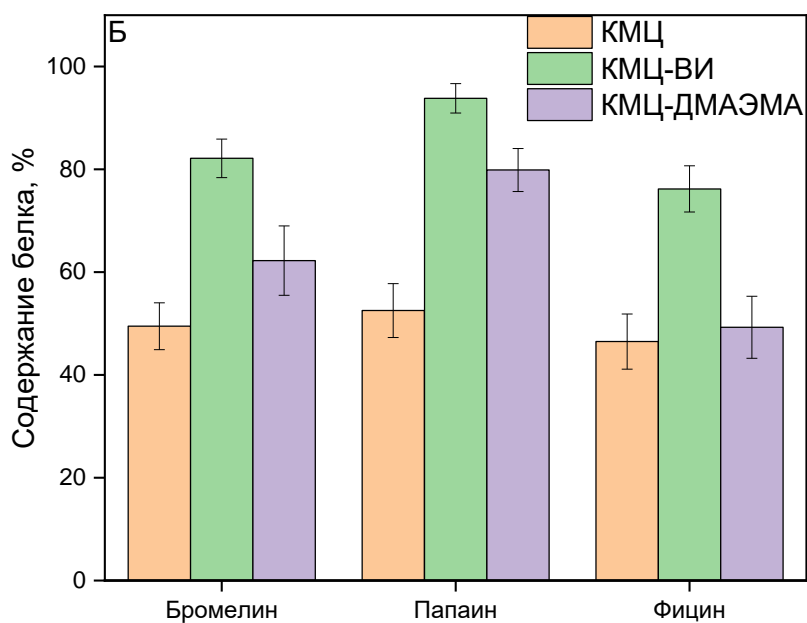
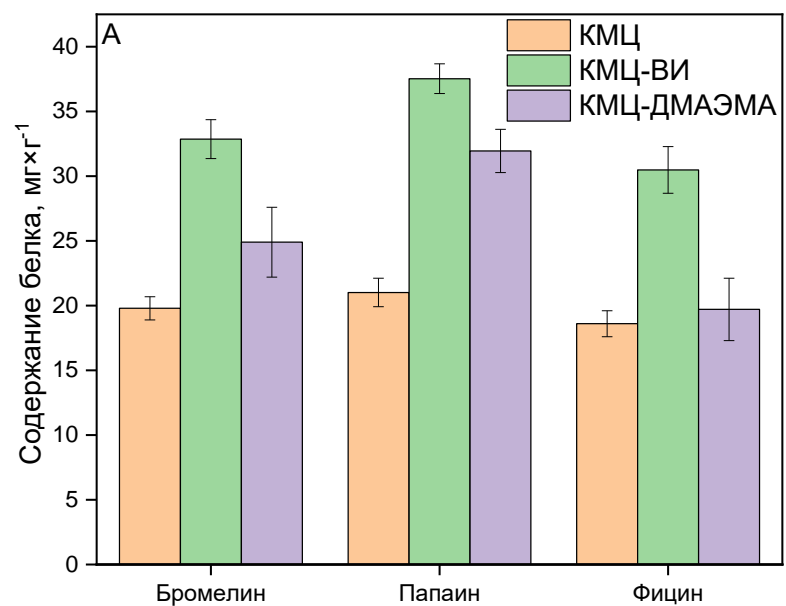


Рис. 28. Содержание белка в комплексах бромелина, папаина и фицина в  $\text{мг} \times \text{г}^{-1}$  (А) и в % (Б). За 100 % принимали содержание белка в растворе, используемом для получения гибридного препарата.

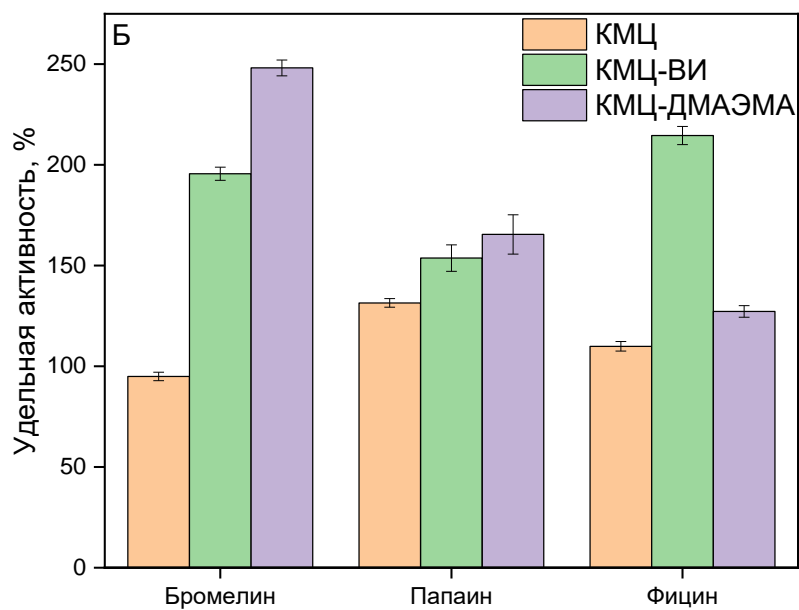
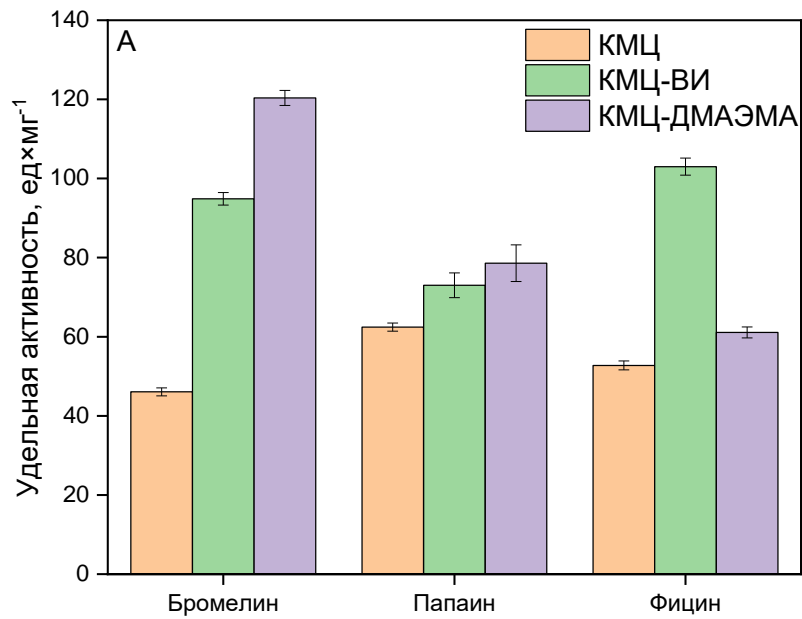


Рис. 29. Удельная активность ферментов в комплексах с исследуемыми полисахаридами в ед×мг<sup>-1</sup> (А) и в % от величины удельной активности нативных энзимов (Б). За 100% принимали удельную активность свободного фермента в растворе.

Довольно часто комплексные ферментные препараты обладают более высокой стабильностью и временем полужизни по сравнению с белками в растворе [12], что расширяет возможности практического применения таких систем в различных сферах деятельности человека. В связи с этим, на заключительном этапе работы были проведены эксперименты по оценке стабильности полученных комплексов бромелина, папаина и фицина, а именно измерена их остаточная каталитическая активность при инкубировании в течение 21 суток при 37 °С в 50 мМ Трис-НСl буфере с рН 7.5. Зависимости остаточной удельной протеолитической активности нативных и комплексов ферментов от времени инкубирования представлены на рис. 30. Отчетливо видно, что для комплексов бромелина и фицина значительное превышение каталитической активности над растворами свободных энзимов наблюдается уже после первых суток инкубации, в то время как для папаина разница в остаточной удельной протеазной активности для свободного и образцов в комплексах через 24 часа минимальна. По-видимому, это связано с различными конформационными изменениями, которые претерпевают энзимы в результате взаимодействия с полисахаридами.

На третьи сутки инкубации для всех исследуемых ферментов каталитическая активность комплексов превышает эту величину для нативных практически в два раза. Наиболее заметной разница в активности становится после пяти суток инкубации: процент сохраненной активности для комплексов бромелина, папаина и фицина выше в 2.5–3 раза. На 21 сутки инкубации свободные ферменты сохраняют не более 20 % активности, в то время как для комплексных препаратов это величина достигает 70 %.

Как уже отмечалось выше, повышение стабильности сопровождается увеличением времени полужизни фермента  $t^{1/2}$  – промежутком времени, в котором фермент сохраняет 50 % или более своей изначальной каталитической активности. В табл. 13 представлены результаты определения

времени полужизни для свободной и комплексных форм бромелина, папаина и фицина.

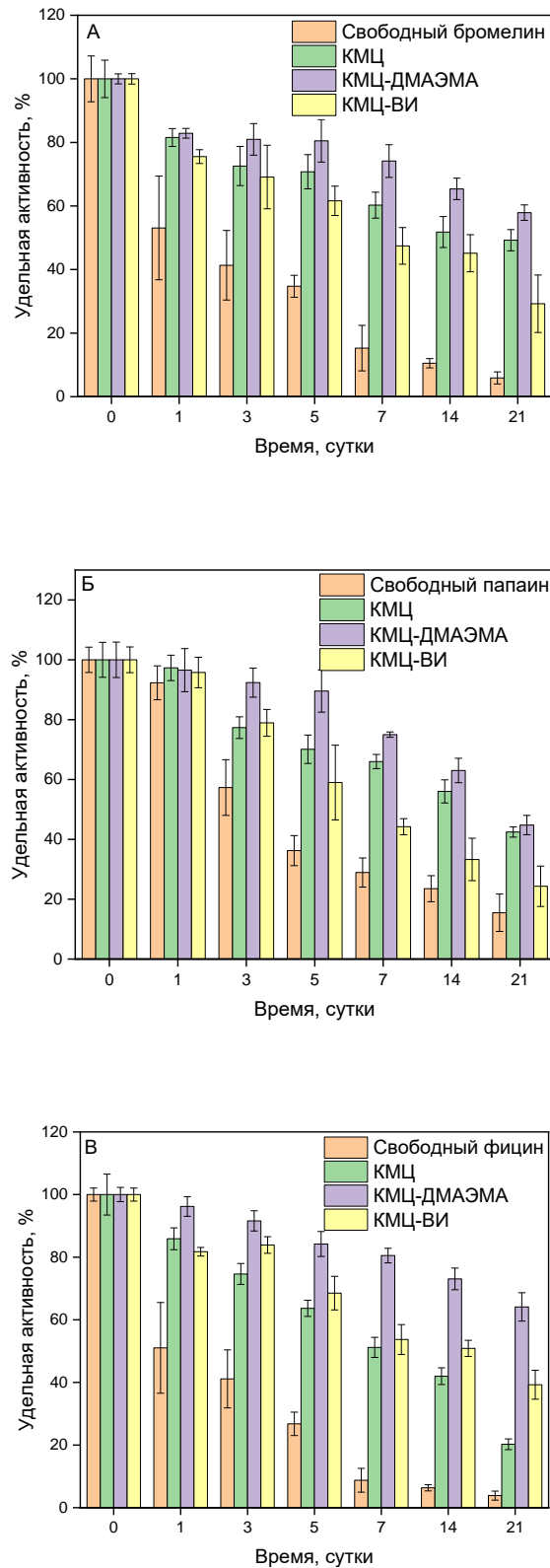


Рис. 30. Исследование стабильности при хранении растворов бромелина (А), папаина (Б) и фицина (В) и их комплексов при 37 °С в 50 мМ Трис-НСl буфере с рН 7.5.

Зависимость носит нелинейный характер: так наибольшее значение  $t^{1/2}$  достигается в случае комплексообразования всех исследуемых белков с сополимером КМЦ-ДМАЭМА, для бромелина и папаина взаимодействие с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы способствует пролонгированию времени полужизни более эффективно, чем с сополимером КМЦ-ВИ, а для фицина наблюдается обратная картина. Стоит отметить, что для него эффект присутствия полисахаридов на рассматриваемый параметр выражен наиболее ярко. Однако комплексообразование со всеми исследуемыми соединениями способствует повышению значений  $t^{1/2}$  в полтора или более раз для всех ферментов.

Таблица 13.

Время полужизни,  $t^{1/2}$ , сутки, свободных ферментов и их комплексов при инкубировании при 37 °С в 50 мМ Трис-НСl буфере с рН 7.5

	Свободный	КМЦ	КМЦ-ДМАЭМА	КМЦ-ВИ
Бромелин	2.9	20.7	24.0	6.4
Папаин	3.4	17.3	19.3	5.3
Фицин	1.9	6.4	23.1	14.3

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что структурные изменения бромелина, папаина и фицина, обусловленные взаимодействиями с изучаемыми полисахаридами приводят к повышению каталитической активности и их стабильности при хранении. Стоит отметить, что различные конформационные изменения сказываются на стабильности исследуемых образцов, что проявляется уже в течение первых суток инкубации. Свою роль в повышении активности ферментов также играет и природа предложенных полисахаридов: располагаясь в непосредственной близости от активных центров ферментов, молекулы полимеров защищают их от воздействия окружающей среды, препятствуют автолизу протеаз и, благодаря отрицательному заряду матриц, способствуют направленной диффузии субстрата азоказеина к глобулам ферментов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из фундаментальных задач молекулярной биофизики и биоинженерии является установление связи пространственной организации биомакромолекул с их функциональными свойствами для получения новых данных о молекулярных механизмах функционирования макромолекул в составе сложных молекулярных комплексов. Подобная информация также абсолютно необходима в различных технологиях для получения биокатализаторов с регулируемыми характеристиками.

В результате выполнения диссертационной работы исследованы межмолекулярные взаимодействия, структура и функциональная активность бромелина, папаина и фицина в составе комплексов с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы и ее сополимерами с *N*-винилимидазолом и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом. Показано, что протеолитическая активность комплексов увеличивается до 2.5 раз, по сравнению со свободными ферментами.

Объекты исследования охарактеризованы рядом биофизических методов, среди которых молекулярный докинг, просвечивающая электронная микроскопия, ИК- и <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопия, лазерный доплеровский микроэлектрофорез, гель-проникающая хроматография и динамическое рассеяние света.

С помощью гибкого каскадного молекулярного докинга установлено, что в процессе комплексообразования все исследуемые полисахариды располагаются в непосредственной близости от каталитического кармана ферментов, в которой находятся их активный центр.

С использованием метода ИК-спектроскопии выявлены функциональные группы натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и ее производных, участвующие в процессах комплексообразования с бромелином, папаином и фицином. Кроме того, показано, что в результате взаимодействия с производными целлюлозы молекулы ферментов

претерпевают структурные изменения, что приводит к разрушению части  $\alpha$ -спиралей и увеличению доли  $\beta$ -структур в глобулах бромелина и фицина. Для папаина эта зависимость имеет более сложный характер: в результате взаимодействия с натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы происходит увеличение содержания  $\beta$ -структур, а в случае комплексообразования с ее производными – их резкое снижение и возрастание доли  $\alpha$ -спиралей.

Решение сформулированных в рамках диссертационного исследования задач о влиянии микроокружения, состоящего из натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и ее производных, на структуру, каталитическую активность и время полужизни комплексов бромелина, папаина и фицина способствует пониманию взаимосвязи «состав-структура-свойство» для ответа на ряд фундаментальных вопросов о взаимодействиях и свойствах функциональных комплексов на основе белков и полисахаридов. Полученные результаты будут полезны при разработке различных биокатализаторов, в том числе биомедицинского назначения, на основе цистеиновых протеаз. Представленные в диссертационной работе материалы расширяют современные представления о механизмах функционирования цистеиновых протеаз, а также открывают новые возможности для регуляции активности и стабильности их молекул. Воздействия карбоксиметилцеллюлозы и ее производных на функциональную активность и стабильность цистеиновых протеаз позволяют модифицировать структуру белков в промышленных и медицинских препаратах с целью повышения их устойчивости и исходной каталитической активности.

По результатам исследований получено три патента РФ на изобретения.

## ВЫВОДЫ

1. Методом молекулярного докинга показано, что взаимодействие цистеиновых протеаз – бромелина, папаина и фицина – с карбоксиметилцеллюлозой и ее сополимерами с *N*-винилимидазолом и *N,N*-диметиламиноэтилметакрилатом протекает самопроизвольно: образуются комплексы, в которых полисахариды расположены в непосредственной близости от каталитического кармана ферментов. В комплексе белок-полисахарид преобладающая часть водородных связей, образуемых бромелином и фицином с полисахаридом, сформирована с участием аминокислотных остатков, расположенных в неупорядоченных областях и  $\alpha$ -спиралях молекул белка. Глобулы папаина формируют водородные связи с полисахаридами в основном за счет неупорядоченных областей и с участием аминокислотных остатков в составе  $\beta$ -структур.
2. Методом ИК-спектроскопии установлено, что в образовании изучаемых комплексов принимают участие преимущественно ОН-группы полисахаридов, в меньшей степени – группы С=О и имидазольные циклы боковых цепей полимеров.
3. Взаимодействия с карбоксиметилцеллюлозой и ее производными вызывают изменения нативной конформации молекул бромелина и фицина, проявляющиеся в снижении доли  $\alpha$ -спиральных участков в пределах 11 % и увеличении числа  $\beta$ -структур до 24 %. При комплексообразовании папаина с сополимерами карбоксиметилцеллюлозы выявлено снижение доли  $\beta$ -структур в несколько раз и возрастание содержания  $\alpha$ -спиралей, а в случае применения немодифицированного полисахарида наблюдается обратная зависимость.
4. Показано, что выбор типа структуры полисахарида позволяет регулировать активность цистеиновых протеаз, увеличивая скорость



ферментативной реакции до 2.5 раз. При этом увеличивается время полужизни комплексных препаратов до 12 раз по сравнению с нативными ферментами. Это обусловлено не только изменениями во вторичной структуре ферментов, но также ориентацией цепи полисахарида на поверхности белковых макромолекул.

## ПЕРЕЧЕНЬ ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dual-Responsive Enzyme–Polysaccharide Conjugate as a Nanocarrier System for Enzyme Prodrug Therapy / M. Konhauer [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2023. – Vol. 24. – P. 2138-2148.
2. Laccase immobilization onto natural polysaccharides for biosensing and biodegradation / Z. Shorki [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – Vol. 262. – Art. 117963
3. Employment of polysaccharides in enzyme immobilization / A. Sharma [et al.] // *Reactive and Functional Polymers*. – 2021. – Vol. 167. – P. 105-115
4. Pifferi C. Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action / C. Pifferi, R. Fuentes, A. Fernandez // *Nature Reviews Chemistry*. – 2021. – Vol. 5. – P. 197-216.
5. Papain-like proteases: applications of their inhibitors / V. K. Dubey [et al.] // *African Journal of Biotechnology*. – 2007. – Vol. 6. – P.1077-1086.
6. Novinec M. Papain-like peptidases: Structure, function, and evolution / M. Novinec, B. Lenarčič // *Biomolecular Concepts*. – 2013. – Vol. 4. – P. 287-308.
7. Rawlings N., Salvesen G. *Handbook of Proteolytic Enzymes* / N. Rawlings, G. Salvesen. – London: Academic Press, 2013. – 3932 p.
8. Cstorner A. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases / A. Cstorner, R. Ménard // *Methods in Enzymology*. – 1994. – Vol. 244. – P. 486-500.
9. Goldenzweig A. Principles of Protein Stability and Their Application in Computational Design / A. Goldenzweig, S. Fleishman // *Annual Review of Biochemistry*. – 2018. – Vol. 87. – P. 105-129.
10. Hernandez K. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance / K. Hernandez, R. Fernandez-Lafuente // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2011. – Vol. 48. – P. 107-122.

11. R. Fernandez-Lafuente, Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation / Fernandez-Lafuente R. // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2009. – Vol. 45. – P. 405-418.
12. Холявка М.Г. Иммуобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение: учебное пособие / М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов. — Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017. — 260 с.
13. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases / M. B. Rao [et al.] // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1998. – Vol. 62. – P. 597-635.
14. Brix K., Stöcker W. Proteases: Structure and Function / K. Brix, W. Stöcker. – Wien: Springer-Verlag, 2013. – 564 p.
15. Feijoo-Siota L. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications / L. Feijoo-Siota, T. Villa // *Food and Bioprocess Technology*. – 2011. – Vol. 4. – P. 1066-1088.
16. Aehle W. Enzymes in Industry: Production and Applications / W. Aehle. – Chichester: Wiley, 2004. – 516 p.
17. Papain-like proteases: applications of their inhibitors / V. K. Dubey [et al.] // *African Journal of Biotechnology*. – 2007. – Vol. 6. – P.1077-1086.
18. Fernández-Lucas J. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry / J. Fernández-Lucas, D. Castañeda, D. Hormigo // *Trends in Food Science & Technology*. – 2017. – Vol. 68. – P. 91-101.
19. Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain / T. Vernet [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270. – P. 16645-16652.
20. Inhibition mechanism of cathepsin L-specific inhibitors based on the crystal structure of papain–CLIK148 complex / H. Tsuge [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1999. – Vol. 266. – P. 411-416.
21. Heinicke R. Complementary enzyme actions in the clotting of milk / R. Heinicke // *Science*. – 1953. – Vol. 118. – P. 753-754.

22. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain / T. Harrach [et al.] // *Journal of Protein Chemistry*. – 1995. – Vol. 14. – P. 41-52.
23. A three-dimensional structural model of Stem Bromelain [Электронный ресурс] / Protein Data Bank. – URL: <https://www.rcsb.org/structure/1W0Q>
24. Khan R. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain / R. Khan, S. Rasheedi, S. Haq // *Journal of Biosciences*. – 2003. – Vol 6. – P. 709-714.
25. Rasheedi S. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain / S. Rasheedi, S. Haq, R. Khan // *Biochemistry*. – 2003. – Vol. 68. – P. 1097-1100.
26. pH-Dependent urea-induced unfolding of stem bromelain: unusual stability against urea at neutral pH / B. Ahmad [et al.] // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. – 74. – P. 1337-1343.
27. Bhattacharya, R. Resistance of bromelain to SDS binding / R. Bhattacharya, D. Bhattacharya // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009. – Vol. 4. – P. 698-708.
28. Identification and characterization of functional intermediates of stem bromelain during urea and guanidine hydrochloride unfolding / B. Ahmad [et al.] // *The Journal of Biochemistry*. – 2007. – Vol. 2. – P. 251-259.
29. Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin / A. Ritonja [et al.] // *FEBS Letters*. – 1989. – Vol. 247. – P. 419-424.
30. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain / A. Napper [et al.] // *Biochemical Journal*. – 1994. – Vol. 301. – P. 727-735.
31. Specific molten globule conformation of stem bromelain at alkaline pH / S. Dave [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2010. – Vol. 499. – P. 26-31.

32. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies / Z. Arshad [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 98. – P. 7283–7297.
33. Rowan A. The cysteine proteinases of the pineapple plant / A. Rowan, D. Buttle, A. Barrett // *Biochemical Journal*. – 1990. – Vol. 266. – P. 869-875.
34. Ota S. Preparation and chemical properties of purified stem and fruit bromelains / S. Ota, S. Moore, W. Stein // *Biochemistry*. – 1964. – Vol. 3. – P. 180-185.
35. Reinvestigation of fractionation and some properties of the proteolytically active components of stem and fruit bromelains / S. Ota [et al.] // *Journal of Biochemistry*. – 1985. – Vol. 98. – P. 219-228.
36. Yamada F. Purification and characterization of a proteinase from pineapple fruit, fruit bromelain FA2 / F. Yamada, N. Takahashi, T. Murachi // *Journal of Biochemistry*. – 1976. – Vol. – 79. – P. 1223-1234.
37. Toro-Goyco E. Isolation, purification, and partial characterization of pinguinain, the proteolytic enzyme from *Bromelia pinguin L.* / E. Toro-Goyco, A. Maretzki, M. Matos // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1968. – Vol. 126. – P. 91-104.
38. Rowan A. Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem / A. Rowan, D. Buttle, A. Barrett // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1988. – Vol. 267. – P. 262-270.
39. Singh, L. Purification and characterization of a pineapple crown leaf thiol protease / L. Singh, T. Devi, S. Devi // *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. – 2004. – Vol. 34. – P. 25-43.
40. High throughput substrate specificity profiling of serine and cysteine proteases using solution-phase fluorogenic peptide microarrays / D. Gosalia [ et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2005. – Vol. 4. – P. 626-636.
41. Murachi T. Bromelain enzymes / T. Murachi // *Methods in Enzymology*. – 1970. – Vol. 19. – P. 273-284.

42. Perlstein S. Isolation and characterization of a protease inhibitor from commercial stem bromelain acetone powder / S. Perlstein, F. Kezdy // *Journal of supramolecular structure*. – 1973. – Vol. 1. – P. 249-254.
43. Absolute side-chain structure at position 13 is required for the inhibitory activity of the bromelain / Y. Sawano [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 52. – P. 36338-36343.
44. Kong X. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. / X. Kong, H. Zhou, H. Qian // *Food Chemistry*. – 2007. – Vol. 102. – P. 759-763.
45. Tanabe S. Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients / S. Tanabe, S. Arai, M. Watanabe // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 1996. – Vol. 60. – P. 1269-1272.
46. Novel method for producing hypoallergenic wheat flour by enzymatic fragmentation of the constituent allergens and its application to food processing / M. Watanabe [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2000. – Vol. 64. – P. 2663-2667.
47. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments / D. Hage [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2012. – Vol. 69. – P. 1-13.
48. Sullivan G. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue / G. Sullivan, C. Calkins // *Meat science*. – 2010. – Vol. 85. – P. 730-734.
49. Ketnawa S. Application of bromelain extract for muscle foods tenderization / S. Ketnawa, S. Rawdkuen // *Food Science & Nutrition*. – 2011. – Vol. 2. – P. 393-401.
50. Chuapoehuk P. Use of papain and bromelain in the production of oyster sauce / P. Chuapoehuk, N. Raksakulthai // *ASEAN Food Journal*. – 1992. – Vol. 7. – P. 196-199.
51. Elavarasan K. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla catla*) as influenced by the nature of

enzyme / K. Elavarasan, V. Kumar, B. Shamasundar // Journal of Food Processing and Preservation. – 2013. – Vol. 38. – P. 1207-1214.

52. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry / J. Ren [et al.] // Food Chemistry. – 2008. – Vol. 108. – P. 727-736.

53. Composition, functional properties and antioxidative activity of hydrolysates prepared from the frame meat of Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) / S. Tanuja [et al.] // Egyptian Journal of Biology. – 2012. – Vol. 14. P. 27-35.

54. Enzymatic browning inhibited in fresh and dried apple rings by pineapple juice / P. Lozano-De-Gonzalez // Journal of Food Science. – 1993. – Vol. 58. – P. 399-404.

55. Srinath R. Isolation and characterization of bromelain from pineapple (*Ananas comosus*) and comparing its anti-browning activity on apple juice with commercial antibrowning agents / R. Srinath, C. Ramalingam, N. Nasimun // Food Science. – 2012. – Vol. 45. – P. 7822-7826.

56. Bromelain from pineapple stem in alcoholic–acidic buffers for wine application / I. Benucci [et al.] // Food Chemistry. – 2011. – Vol. 124. – P. 1349-1353.

57. Application of bromelain enzymes in animal food products / R. Nanda [et al.] // Andalusian International Journal of Agricultural and Natural Sciences. – 2020. – Vol. 1. – P. 33-44.

58. Devi R. Biotechnological application of proteolytic enzymes in post cocoon technology / R. Devi // International Journal of Natural Sciences. – 2012. – Vol. 3. – P. 237-240.

59. Chakraborty J. Optimization of Bromelain Treatment pH with Wool for Antifelting and Reduced Pilling Behaviour: Objective Assessment Approach / J.Chakraborty, A. Kaur // Journal of Textiles. – 2015. – Vol. 3. – P. 23-30.

60. Chakravarthy P. Efficacy of extrinsic stain removal by novel dentifrice containing papain and bromelain extracts / P. Chakravarthy, S. Acharya // Journal of Young Pharmacists. – 2012. – Vol. 4. – P. 245-249.
61. Stain removal efficacy of a novel dentifrice containing papain and bromelain extracts—an *in vitro* study / P. Kalyana [et al.] // International Journal of Dental Hygiene. – 2011. – Vol. 9. – P. 229-233.
62. Levy L. Complications of minimally invasive cosmetic procedures: prevention and management / L. Levy, J. Emer // Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery. – 2012. – Vol. 5. – P. 121-132.
63. Therapeutic application of pineapple protease (Bromelain): A review / B. Tochi [et al.] // Pakistan Journal of Nutrition. – 2008. – Vol. 7. – P. 513-520.
64. Rajan P. A comprehensive overview on the anti-inflammatory, antitumor, and ferroptosis functions of bromelain: an emerging cysteine protease / P. Rajan, N. Dunna, S. Venkatabalasubramanian // Expert Opinion on Biological Therapy. – 2022. – Vol. 22. – P. 615-625.
65. Potential role of bromelain in clinical and therapeutic applications (Review) / V. Rathnavelu [et al.] // Biomedical Reports. – 2016. – Vol. 5. – P. 283-288.
66. Effects on fibrinogen, fibrin, and blood coagulation of proteolytic extracts from fruits of *Pseudananas macrodontes*, *Bromelia balansae*, and *B. hieronymi* (*Bromeliaceae*) in comparison with bromelain / M. Errasti [et al.] // Blood Coagulation & Fibrinolysis. – 2016. – Vol. 27. – P. 441-449.
67. Mamo J. Antibacterial and Anticancer Property of Bromelain: A Plant Protease Enzyme from Pineapples (*Ananas comosus*) / J. Mamo, F. Assefa // Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences. – 2019. – Vol. 19. – P. 60-68.
68. Bromelain inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in human THP-1 monocytes via the removal of CD14 / J. Huang [et al.] // Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. – 2008. – Vol. 37. – P. 263-277.



69. Bromelain: Methods of Extraction, Purification and Therapeutic Applications / Z. Manzoor [et al.] // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2016. – Vol. 59. – P. 38-49.
70. Bromelain a Potential Bioactive Compound: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective / A. Chakraborty [et al.] // Life. – 2021. – Vol. 11. – P. 357-370.
71. Wurtz A. Sur le ferment digestif du *Carica papaya* / A. Wurtz, E. Bouchut. // Comptes Rendus Chimie. – 1879. – Vol. 89. – P. 425-430.
72. Brocklehurst K. Papain and other constituents of *Carica papaya L.* / K. Brocklehurst, B. Baines, M. Kierstan // Topics in enzyme and fermentation biotechnology. – 1981. -Vol. 5. – P. 262-335.
73. Kimmel J. Crystalline papain. I. Preparation, specificity, and activation / J. Kimmel, E. Smith // Journal of Biological Chemistry. – 1954. – Vol. 207. – P. 515-531.
74. Baker E., Drenth J. The thiol proteases: structure and mechanism, in Biological Macromolecules and Assemblies / E. Baker, J. Drenth. – New York: John Wiley, 1987. – 368 p.
75. Structure of papain / J. Drenth [et al.] // Nature. – 1968. – Vol. 218. – P. 929-932.
76. Pickersgill R. Structure of Monoclinic Papain at 1.60 Angstroms Resolution / R. Pickersgill, G. Harris, E. Garman // Acta Crystallographica Section B. – 1992. – Vol. 48. – P. 59-67.
77. Insight into the catalysis of hydrolysis of four newly synthesized substrates by papain: a proton inventory study / L. Theodorou [et al.] // Biochemistry. – 2001. – Vol. 40. – P. 3996-4004.
78. A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain / R. Menard [et al.] // Biochemistry. – 1990. – Vol. 29. – P. 6706-6713.

79. Edwin F. Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state / F. Edwin, M. Jagannadham // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2000. – Vol. 1479. – P. 69-82.
80. Ghosh S. Physicochemical and conformational studies of papain/sodium dodecyl sulfate system in aqueous medium / S. Ghosh // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2005. – Vol. 264. – P. 6-16.
81. Stevenson E. Papain in organic solvents: Determination of conditions suitable for biocatalysis and the effect on substrate specificity and inhibition / E. Stevenson, C. Storer // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1991. – Vol. 37. – P. 519-527.
82. Amri E. Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance: A Review / E. Amri, F. Mamboya // *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 8. – P. 99-104.
83. A histidine/tryptophan  $\pi$ -stacking interaction stabilizes the heme-independent folding core of microsomal apocytochrome b5 relative to that of mitochondrial apocytochrome b5 / L. Wang [et al.] // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45. – P. 13750-13759.
84. Exogenous proteases for meat tenderization / A. Bekhit [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2014. – Vol. 54. – P. 1012-1031.
85. Piertasik Z. Effects of moisture enhancement, enzyme treatment, and blade tenderization on the processing characteristics and tenderness of beef semimembranosus steaks / Z. Piertasik, P. Shand // *Meat Science*. – 2011. -Vol. 88. – P. 8-13.
86. A simple and convenient method for the preparation of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia L.*) protein hydrolysates / M. Liu [et al.] // *Chemistry Central Journal*. – 2016. – Vol. 10. – P. 1-11.
87. Enzymatic treatment of soy protein isolates: Effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties / P. Schweiggert-Weisz [et al.] // *Food Science & Nutrition*. – 2016. – Vol. 4. – P. 11-23.

88. Mahajan R. Plant latex as vegetable source for milk clotting enzymes and their use in cheese preparation / R. Mahajan, G. Chaudhari // *International Journal*. – 2014. – Vol. 2. – P. 1173-1181.
89. Development of an efficient soymilk cream production method by papain digestion, heat treatment, and low-speed centrifugation / N. Abe [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2015. – Vol. 79. – P. 1890-1892
90. The potential of papain and alcalase enzymes and process optimizations to reduce allergenic gliadins in wheat flour / Y. Li [et al.] // *Food Chemistry*. – 2016. -Vol. 196. – P. 1338-1345.
91. Upgrading food wastes by means of bromelain and papain to enhance growth and immunity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) / W. Choi [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – Vol. 23. – P. 7186-7194.
92. Use of soybean meal and papain to partially replace animal protein for culturing three marine fish species: Fish growth and water quality / W. Mo [et al.] // *Environmental Pollution*. – 2016. – Vol. 219. – P. 815-820.
93. Papain from papaya (*Carica papaya L.*) fruit and latex: Preliminary characterization in alcoholic–acidic buffer for wine application / M. Esti [et al.] // *Food and Bioproducts Processing*. – 2013. – Vol. 91. – P. 595-598.
94. Immobilization of papain on chitin and chitosan and recycling of soluble enzyme for deflocculation of *saccharomyces cerevisiae* from bioethanol distilleries / D. Silva [et al.] // *Enzyme Research*. – 2015. – Vol. 4. – P. 1-10.
95. Metin A. Fibrous polymer-grafted chitosan/clay composite beads as a carrier for immobilization of papain and its usability for mercury elimination / A. Metin, E. Alver // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2016. – Vol. 39. – P. 1137-1149.
96. Stain removal effect of novel papain-and bromelain-containing gels applied to enamel / E. Münchow [et al.] // *Clinical Oral Investigations*. – 2016. – Vol. 20. – P. 2315-2320.

97. Use of proteolytic enzymes in the treatment of proteinaceous esophageal food impaction / C. Morse [et al.] // *The Journal of Emergency Medicine*. – 2016. – Vol. 50. – P. 183-186.
98. Treatment of mild to moderate acne with a fixed combination of hydroxypinacolone retinoate, retinol glycospheres and papain glycospheres / S. Veraldi [et al.] // *Italian Journal of Dermatology and Venerology*. – 2015. – Vol. 150. – P. 143-147.
99. A novel elastic liposome for skin delivery of papain and its application on hypertrophic scar / Y. Chen [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2017. – Vol. 87. P. 82-91.
100. Effectiveness Of 2% And 4% Papain Gels In The Healing Of Venous Ulcers / A. Ribeiro [et al.] // *Revista da Escola de Enfermagem*. – 2015. – Vol. 49. – P. 394-400.
101. Chemo-mechanical caries removal with (Papacarie<sup>TM</sup>): Case series with 84 reports and 12 months of follow-up / S. Bussadori [et al.] // *The Journal of Contemporary Dental Practice*. – 2014. – Vol. 15. – P. 250-253.
102. The antibacterial effects of apacaries gel on *Streptococcus mutans*: An in vitro study / A. Juntavee [et al.] // *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. – 2014. – Vol. 7. – P. 77-81.
103. The antibacterial effects of apacaries gel on *Streptococcus mutans*: An in vitro study / P. Subramaniam [et al.] // *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. – 2011. – Vol. 2. – P. 13-16.
104. Chemomechanical caries removal: A review and study of an indigenously developed agent (carie care<sup>TM</sup> gel) in children / K. Venkataraghavan [et al.] // *Journal of International Oral Health*. – 2013. – Vol. 5. – P. 84-90.
105. Stain removal effect of novel papain-and bromelain-containing gels applied to enamel / E.A. Münchow [et al.] // *Clinical Oral Investigations*. – 2016. – Vol. 20. – P. 2315-2320.
106. Flindt, M. Allergy to alpha-amylase and papain / M. Flindt // *Lancet*. – 1979. – Vol. 1. – P. 1407-1408.

107. Beeley J. Chemochemical caries removal: A review of the techniques and latest developments / J. Beeley, H. Yip, A. Stevenson // *British Dental Journal*. – 2000. – Vol. 188. – P. 427-430.
108. Dietrich R. Oral proteolytic enzymes in the treatment of athletic injuries: a double-blind study / R. Dietrich // *The Pennsylvania Medical Journal*. – 1965. – Vol. 68. – P. 35-37.
109. The incidence and clinical implications of hypersensitivity to papain in an allergic population, confirmed by blinded oral challenge / L. Mansfield [et al.] // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. – 1985. – Vol. 55. – P. 541-543.
110. Cynthia M. Papain immobilized polyurethane film as antimicrobial food package / M. Cynthia, V. Prabhawathi, D. Mukesh // *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. – 2014. – Vol. 8. – P. 1367-1370.
111. Design of a papain immobilized antimicrobial food package with curcumin as a crosslinker / C. Manohar [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – P. 121-125.
112. Robbins B. A proteolytic enzyme in ficin, the anthelmintic principle of leche de higueron / B. Robbins // *Journal of Biological Chemistry*. – 1930. – Vol. 87. – P. 251-257.
113. Walti A. Crystalline ficin / A. Walti // *Journal of the American Chemical Society*. – 1938. – Vol. 60. – P. 493
114. Williams D. Proteolytic activity in the genus *Ficus* / D. Williams, V. Sgarbieri, J. Whitaker // *Plant Physiology*. – 1968. – Vol. 43. – P. 1083-1088.
115. Separation of the proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* latices / V. Sgarbieri [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1964. – Vol. 239. – P. 2170-2177.
116. Crystal structure of four variants of the protease Ficin [Электронный ресурс] / Protein Data Bank. – URL: <https://www.rcsb.org/structure/4YYW>
117. Studies on ficin. Its isolation and characterization / P. Englund [et al.] // *Biochemistry*. – 1968. – Vol. 7. – P. 163-175.

118. Husain S. The amino acid sequence around the active-site cysteine and histidine residues, and the buried cysteine residue in ficin / S. Husain, G. Lowe // *Biochemistry*. – 1970. – Vol. 117. – P. 333-340.
119. Ficin: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis / R. Morellon-Sterling [et al.] // *International journal of biological macromolecules*. – 2020. – Vol. 162. – P. 394-404.
120. Johansen J. The proteolytic degradation of the B-chain of oxidized insulin by papain, chymopapain and papaya peptidase / J. Johansen, M. Ottesen // *C R Trav Lab Carlsberg*. – 1968. – Vol. 36. – P. 265-283.
121. Whitaker J. Papain- and ficin-catalyzed reactions. Effect of pH on activity and conformation of ficin / J. Whitaker // *Biochemistry*. – 1969. – Vol. 8. – P. 1896-1901.
122. Rawlings N., Salvesen G. *Handbook of Proteolytic Enzymes* / N. Rawlings, G. Salvesen. – London: Academic Press, 2013. – 3932 p.
123. Degradation of myofibrillar, sarcoplasmic and connective tissue proteins by plant proteolytic enzymes and their impact on camel meat tenderness / S. Maqsood [et al.] // *Journal of Food Science and Technology*. – 2018. – Vol. 55. – P. 3427-3438.
124. Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk / Y. Low [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2006. – Vol. 16. – P. 335-343.
125. A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab)<sub>2</sub> suitable for clinical use from mouse IgG1 / M. Mariant [et al.] // *Molecular Immunology*. – 1991. – Vol. 28. – P. 69-77.
126. Glypican-3-targeting F(ab')<sub>2</sub> for <sup>89</sup>Zr PET of hepatocellular carcinoma / J. Sham [et al.] // *The Journal of Nuclear Medicine*. – 2014. – Vol. 55. – P. 2032-2037.
127. Assessment of the inhibitory effects of ficin-hydrolyzed gelatin derived from squid (*Uroteuthis duvauceli*) on breast cancer cell lines and animal model / S.

Shahidi [et al.] // Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology. – 2018. – Vol. 17. – P. 436-452.

128. Protease-catalysed coupling of N-protected amino acids and peptides with 4-aminoantipyrine / A. Lang [et al.] // Amino Acids. – 2009. – Vol. 36. – P. 333-340.

129. Ficin-catalyzed asymmetric aldol reactions of heterocyclic ketones with aldehydes / J. Fu [et al.] // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2013. – Vol. 97. – P. 1-4.

130. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, *in vitro* / G. Stepek [et al.] // Parasitology. – 2005. – Vol. 130. – P. 203-211.

131. Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from *Ficus carica* / G. Richter [et al.] // British Journal of Haematology. – 2002. – Vol. 119. – P. 1042-1051.

132. Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework, Advances and Some Applications / J. Bié [et al.] // Processes. – 2022. – Vol. 10. – P. 494

133. Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity / M. Holyavka [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 180. P. 161-176.

134. Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology / J. Chalker [et al.] // Chemistry – An Asian Journal. – 2015. – Vol. 115. – P. 3351-3367.

135. Renata H. Expanding the enzyme universe: accessing non-natural reactions by mechanism-guided directed evolution / H. Renata, Z.J. Wang, F.H. Arnold // Angewandte Chemie. – 2015. – Vol. 54. – P. 3351-3367.

136. Directed evolution of enzyme stability / V. Eijsink [et al.] // Biomolecular Engineering. – 2005. – Vol. 22. – P. 21-30.

137. Chemical modification in the design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities / N. Rueda [et al.] // *The Chemical Record*. – 2016. – Vol. 16. – P. 1436-1455.
138. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies / R. Rodrigues [et al.] // *Biotechnology Advances*. – 2021. – Vol. 52. – P. 107-121.
139. Immobilization of papain: A review / V. Tacias-Pascacio // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 188. – P. 94-113.
140. Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications / M. Verma [et al.] // *Environmental Chemistry Letters*. – 2020. – Vol. 18. – P. 315-323.
141. Enzyme Immobilization on Chitin and Chitosan-Based Supports for Biotechnological Applications / M. Verma [et al.] // *Sustainable Agriculture Reviews*. – 2019. – Vol. 35. – P. 141-173.
142. Sorokin A. Synthesis of the superabsorbents enriched in chitosan derivatives with excellent water absorption properties / A. Sorokin, M. Lavlinskaya // *Polymer Bulletin*. – 2022. – Vol. 79. – P. 407-422.
143. A new approach to increasing the equilibrium swelling ratio of the composite superabsorbents based on carboxymethyl cellulose sodium salt / M. Lavlinskaya [et al.] // *Cellulose*. – 2022. Vol. 29. – P. 159-173.
144. Liu Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes / Y. Liu, J. Chen // *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. – 2016. – Vol. 10. – P. 1-15.
145. Girelli A. Use of lipase immobilized on cellulose support for cleaning aged oil layers / A. Girelli, L. Salvagni, A. Tarola // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2012. – Vol. 23. – P. 585-592.
146. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane / X. Huang [et al.] // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2011. Vol. 70. – P. 95-100.



147. Xing Q. Cellulose fiber-enzyme composites fabricated through layer-by-layer nanoassembly / Q. Xing, S. Eadula, Y. Lvov // *Biomacromolecules*. – 2007. – Vol. 8. – P. 1987-1991.
148. Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin / T. Nikolic [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2010. – Vol. 82. – P. 976-981.
149. Covalent attachment of lysozyme to cotton/cellulose materials: protein versus solid support activation / J. Edwards [et al.] // *Cellulose*. – 2011. – Vol. 18. – P. 1239-1249.
150. Immobilization–stabilization of proteins on nanofibrillated cellulose derivatives and their bioactive film formation / A. Tammeling [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2012. – Vol. 13. – P. 594-603.
151. Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly(HEMA-co-EDMA) and magnetic poly(HEMA-co-EDMA) microspheres / Z. Bílková [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2002. – Vol. 770. – P. 25-34.
152. Arica M. Immobilization of polyphenol oxidase on carboxymethyl cellulose hydrogel beads preparation and characterization / M. Arica // *Polymer International*. – 2000. – Vol. 49. – P. 775-781.
153. Generic method for attaching biomolecules via avidin–biotin complexes immobilized on films of regenerated and nanofibrillar cellulose / H. Orelma [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2012. – Vol. 13. – P. 2802-2810.
154. Singh V. Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose-silver nanoparticle (AgNp)-silica hybrid for amylase immobilization / V. Singh, S. Ahmad // *Cellulose*. – 2012. – Vol. 19. – P. 1759-1769.
155. Altawi F. Amino functionalization of carboxymethyl cellulose for efficient immobilization of urease / F. Altawi, M. Monier, N. Elsayed // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – Vol. 114. – P. 1018-1025.
156. Sorokin A. Synthesis of graft copolymers of carboxymethyl cellulose and *N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate and their study as Paclitaxel carriers / A.

Sorokin, M. Lavlinskaya, V. Kuznetsov // Polymer Bulletin. – 2021. Vol. 78. – P. 2975-2992.

157. Graft copolymers of carboxymethyl cellulose with N-vinylimidazole: synthesis and application for drug delivery / V. Kuznetsov [et al.] // Polymer Bulletin. – 2019. – Vol. 76. – P. 4929-4949.

158. Hsiue G. Studies on the physical properties of polyethylene-g-acrylic acid to immobilizing glucose oxidase / G. Hsiue, C. Wang // Journal of Applied Polymer Science. – 1990. – Vol. 40. – P. 235-247.

159. The immobilization of enzymes, bovine serum albumin, and phenylpropylamine to poly(acrylic acid)-polyethylene-based copolymers / C. Beddows [et al.] // Biotechnology and Bioengineering. – 1982. – Vol. 24. – P. 1371-1387.

160. Stabilization of Multimeric Enzymes against Heat Inactivation by Chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) in Confined Spaces / L. Shi [et al.] // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2017. – Vol. 3. – P. 3141-3145.

161. Graft copolymerization of acrylamide on chitosan-co-chitin and its application for immobilization of *Aspergillus* sp. RL2Ct cutinase / V. Kumari [et al.] // Bioorganic Chemistry. – 2017. – Vol. 70. – p. 34-43.

162. Fabrication of a tunable glucose biosensor based on zinc oxide/chitosan-graft-poly(vinyl alcohol) core-shell nanocomposite / S. Shukla [et al.] // Talanta. – 2012. – Vol. 99. – P. 283-287.

163. Chemical and physical Chitosan modification for designing enzymatic industrial biocatalysts: How to choose the best strategy? / Y. Nunes [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 181. – P. 1124-1170.

164. Холявка М.Г. Исследование структурно-функциональных свойств гомогенных и гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Холявка Марина Геннадьевна; Воронежский государственный университет. – Воронеж, 2010. – 178 с.

165. Холявка М.Г. Исследование физико-химических, структурно-функциональных свойств инулиназ и закономерностей формирования ими надмолекулярных комплексов в условиях различного микроокружения: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Холявка Марина Геннадьевна; Воронежский государственный университет. – Воронеж, 2018. – 392 с.

166. Холявка М.Г. Хитозан как фотопротектор для иммобилизованного на его матрице папаина / М.Г. Холявка // Биофизика. – 2022. – № 67. – С. 467-476.

167. Королева В.А. Термическая инактивация цистеиновых протеаз: "ключевые стадии" / В.А. Королева [и др.] // Биофизика. 2021. – № 66. – С. 429-439.

168. Панкова С.М. Матрица хитозана как фотомодулятор для бромелина / С.М. Панкова [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2021. – № 61. – С. 451-459.

169. Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain / D. Baidamshina [et al.] // Marine Drugs. – 2021. – Vol. 19. – P. 197-198.

170. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized ficin / D. Baidamshina [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 164. – P. 4205-4217.

171. Preparation of papain complexes with chitosan microparticles and evaluation of their stability using the enzyme activity level / S. Ol'shannikova [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2022. – Vol. 55. – P. 1240-1244.

172. Acyl-Modified Water-Soluble Chitosan Derivatives as Carriers for Adsorption Immobilization of Papain / A. Sorokin [et al.] // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2022. – Vol. 48. – P. 310-320.

Тут кончился литобзор

173. Lowry O. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
174. V.G. Artyukhov Thermal inactivation of free and immobilized inulinase / V. Artyukhov [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2010. – Vol. 46. – P. 422-427.
175. Wojdyr M. Fityk: a general-purpose peak fitting program / M. Wojdyr // *Journal of Applied Crystallography*. – 2010. – Vol. 43. – P. 1126–1128.
176. Supramolecular Organization of Inulinases from *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ficuum* and *Kluyveromyces marxianus*: A Comparative Aspect / M. Holyavka [et al.] // *Biophysics*. – 2018. – Vol. 63. – P. 866–875.
177. Hernández-Santoyo, A. Protein-Protein and Protein-Ligand Docking in Protein Engineering - Technology and Application / A. Hernández-Santoyo. – London: IntechOpen, 2013 [Online]. Available: <https://www.intechopen.com/chapters/44790> doi: 10.5772/56376
178. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions / I. Kuntz [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 1982. – Vol. 161. – P. 269-282.
179. Sousa S. Protein–ligand docking: Current status and future challenges / S. Sousa, P. Fernandes, M. Ramos // *Proteins*. – 2006. – Vol. 65. – P. 15-26.
180. McDowall D. Grafting of vinyl monomers to cellulose by ceric ion initiation / D. McDowall, B. Gupta, V. Stannet // *Progress in Polymer Science*. – 1984. – Vol. 10. – P. 1-50.
181. Omidian H. Aqueous solution polymerization of neutralized acrylic acid using  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  redox pair system under atmospheric conditions / H. Omidian, M. Zohuriaan-Mehr, H. Bouhendi // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. – 2010. – Vol. 52. – P. 307-321.
182. Кисленко В. Н. Кинетика радикальной привитой полимеризации метилакрилата к альгинату натрия / В. Н. Кисленко, А. А. Берлин // *Высокомолекулярные соединения. Серия Б*. – 1987. – № 29. – С. 109-113.

183. Habibi N. Preparation of biocompatible magnetite-carboxymethyl cellulose nanocomposite: Characterization of nanocomposite by FTIR, XRD, FESEM and TEM / N. Habibi // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2014. – Vol. 131. – P. 55-58.

184. Karkhari R. Javanbakht, V. A polyurethane foam membrane filled with double cross-linked chitosan/carboxymethyl cellulose gel and decorated with ZSM-5 nano zeolite: Simultaneous dye removal / R. Karkhari, V. Javanbakht // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2022. – Vol. 213. – P. 699-717

185. Pochina A. Ultrasonic Irradiation Synthesis and Properties of Copolymers of N,N-Dimethylaminoethylmethacrylate with Chitosan / Pochina A. [et al.] // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2022. – <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02714-9>

186. Voronov V. NMR Spectra of 1-Vinylimidazole, Transformed by Paramagnetic Complexes / V. Voronov, I. Ushakov, E. Funtikova // *Applied Magnetic Resonance*. – 2019. – Vol. 50. – P. 569-577.

187. Park M. Influence of graft copolymer structure on the dimensions and morphology of core-corona type microgels / M. Park, K. Ishizu, T. Fukutomi // *Polymer*. – 1989. – Vol. 30. – P. 202-206.

188. Ozaki Y., Baranska I., Lednev B. *Vibrational Spectroscopy in Protein Research. From Purified Proteins to Aggregates and Assemblies* / Y. Ozaki, I. Baranska, B. Lednev. – London: Academic Press, 2020. – 609 p.

189. Barth A. What vibrations tell us about proteins / A. Barth, C. Zscherp // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 2002. – Vol. 35. – P. 369-430.

190. Glassford S. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins / S.E. Glassford, B. Byrne, S.G. Kazarian // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. – 2013. – Vol. 1834. – P. 2849-2858.

191. Stuart B.H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. / B. Stuart. – Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2004. – 224 p.

192. Carboxymethyl cellulose-based polymers as promising matrices for ficin immobilization / A.V. Sorokin [et al.] // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – Art. 15.
193. Sapan C. Colorimetric protein assay techniques / C. Sapan, R. Lundblad, N. Price. // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 1999. – Vol. 29. – P. 99–108.
194. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples / D. Coehlo [et al.] // *BioMed Research International*. – 2016. – Vol. 1. – P. 1-6.
195. Charney J. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice / J. Charney, R. Tomarelli // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1947. – Vol. 171. – P. 501-505.
196. Ацильномодифицированные водорастворимые производные хитозана – носители для адсорбционной иммобилизации папаина. / А. В. Сорокин [и др.] // *Биоорганическая химия*. – 2022. – Т. 48. № 2. – С. 310-320.
197. Chitosan graft copolymers with N-vinylimidazole as promising matrices for immobilization of bromelain, ficin, and papain / A.V. Sorokin [et al.] // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14. – Art. 2279.
198. Novel immobilized biocatalysts based on cysteine proteases bound to 2-(4-acetamido-2-sulfanilamide) chitosan and research on their structural features. / S.S. Olshannikova [et al.] // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14. – Art. 3223.
199. Патент РФ № 2744457. Способ получения иммобилизованного ферментного препарата на основе фицина, гиалуроновой кислоты и полисахаридов, модифицированных виниловыми мономерами: № 2020125780: заявл. 28.07.2020: опубл. 09.03.2021 / М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов, А. В. Сорокин [и др.].
200. Патент РФ № 2750377. Способ получения иммобилизованного ферментного препарата на основе бромелина, гиалуроновой кислоты и полисахаридов, модифицированных виниловыми мономерами: №

2020125715: заявл. 27.07.2020: опубл. 28.06.2021 / М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов, А.В. Сорокин [и др.].

201. Патент РФ № 2750378. Способ получения иммобилизованного ферментного препарата на основе папаина, гиалуроновой кислоты и полисахаридов, модифицированных виниловыми мономерами: № 2020125781: заявл. 28.07.2020: опубл. 28.06.2021 / М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов, А.В. Сорокин [и др.].