



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 54.057:577.325

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11323

### Разработка гибридных биокатализаторов на основе комплексов фицина и папаина с сульфатом хитозана и изучение их структурных особенностей

Юлия Александровна Редько<sup>1</sup>, Светлана Сергеевна Гончарова<sup>1</sup>,  
Мария Сергеевна Лавлинская<sup>1,2</sup>, Андрей Викторович Сорокин<sup>1,2</sup>,  
Николай Евгеньевич Юдин<sup>1</sup>, Максим Сергеевич Кондратьев<sup>1,3</sup>,  
Марина Геннадьевна Холявка<sup>1,4</sup>✉, Валерий Григорьевич Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, holyavka@rambler.ru✉

<sup>2</sup>Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

<sup>3</sup>Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

<sup>4</sup>Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

**Аннотация.** Фицин и папаин – протеолитические ферменты растительного происхождения, применяемые в биомедицине и промышленности. Растворимые формы ферментов имеют ряд недостатков, например, быстрая инактивация, микробная деградация, автолиз и другие. Благодаря иммобилизации энзимов на полисахаридах можно исключить названные проблемы.

В связи с вышесказанным, цель исследования заключалась в разработке методики получения комплексов фицина и папаина с сульфатом хитозана с различными молекулярными массами и изучении их структурных особенностей

Проведен синтез сульфата хитозана с различными значениями молекулярных масс: 200, 350 и 600 кДа. Разработана методика комплексообразования фицина и папаина с сульфатом хитозана. Исследование содержания белка в иммобилизованных препаратах фицина и папаина проводили по методу Лоури, протеазную активность образцов определяли по скорости гидролиза субстрата – азоказеина.

Из анализа результатов экспериментов *in silico* вытекает, что взаимодействие фицина и папаина с сульфатом хитозана обусловлено образованием водородных связей между компонентами, а также электростатическими и гидрофобными взаимодействиями. Связи и взаимодействия с сульфатом хитозана образуются, в том числе, с участием аминокислотных остатков, образующих активный центр энзимов (Cys25 и His162 для фицина, Cys25 и His159 для папаина) или находящихся в непосредственной близости от них.

Выявлено, что оптимальное соотношение таких параметров, как содержание белка (в мг на г носителя) и общей активности (в ед. на мл раствора) полученных комплексов фицина и папаина, наблюдается при их взаимодействии с носителем, молекулярная масса которого составляет 600 кДа.

Предложенный подход открывает широкие перспективы для его внедрения в практику иммобилизации протеиназ благодаря предсказанию структурных особенностей биокатализатора на основе *in silico* расчетов, не требующих использования дорогостоящих реактивов.

**Ключевые слова:** фицин, папаин, сульфат хитозана, иммобилизация, комплексообразование, протеазная активность.

**Благодарности:** исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, номер гранта МК-2517.2022.1.3.(синтез носителя и его комплексообразование с ферментами), и Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009 (молекулярный докинг)



Для цитирования: Редько Ю.А., Гончарова С.С., Лавлинская М.С., Сорокин А.В., Юдин Н.Е., Кондратьев М.С., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Разработка гибридных биокатализаторов на основе комплексов фицина и папаина с сульфатом хитозана и изучение их структурных особенностей // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 3. С. 435-443. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11323>

Original article

## Development of the hybrid biocatalysts based on ficin and papain complexes with chitosan sulfate and the study of their structural features

Yulia A. Redko<sup>1</sup>, Svetlana S. Goncharova<sup>1</sup>, Maria S. Lavlinskaya<sup>1,2</sup>,  
Andrey V. Sorokin<sup>1,2</sup>, Nikolay E. Yudin<sup>1</sup>, Maxim S. Kondratyev<sup>1,3</sup>,  
Marina G. Holyavka<sup>1,4</sup>✉, Valeriy G. Artyukhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, holyavka@rambler.ru✉

<sup>2</sup>Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation

<sup>3</sup>Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

<sup>4</sup>Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

**Abstract.** Ficin and papain are proteolytic enzymes of plant origin used in biomedicine and industry. Soluble forms of enzymes have several disadvantages, such as rapid inactivation, microbial degradation, autolysis, etc. Immobilization of enzymes on polysaccharides can exclude these problems.

In connection with the above, the purpose of the study was to develop a technique for the complexation of ficin and papain with sulfate chitosan with different molecular weights and to study their structural features.

Sulfate chitosan with different molecular weights (200, 350, and 600 kDa) was successfully obtained. A technique for the complexation of ficin and papain with sulfate chitosan has been proposed. The protein content in the immobilized formulations of ficin and papain was estimated by the Lowry method; the protease activity of the samples was evaluated on the substrate azocasein.

It was shown by *in silico* experiments that the interaction of ficin and papain with sulfate chitosan is due to electrostatic and hydrophobic interactions, as well as the formation of hydrogen bonds between the components. Bonds and interactions with sulfate chitosan are also formed with the participation of amino acid residues forming the active site of the enzymes (Cys25 and His162 for ficin, Cys25 and His159 for papain) and near-locating ones.

It was found that the optimal ratio of protein content (mg per g of carrier), total activity (in units per mL of solution) is achieved for ficin and papain complexes with sulfate chitosan with a molecular weight of 600 kDa. The proposed approach has broad prospects for practical use in the field of proteinase immobilization due to the prediction of the structural features of the biocatalyst based on *in silico* simulations that do not require the use of expensive reagents.

**Keywords:** ficin, papain, sulfate chitosan, immobilization, complexation, protease activity.

**Acknowledgments:** the work is partially funded by the Council on Grants of the President of the Russian Federation for State Support to Young Russian scientists – Candidates of Sciences, Grant number is MK-2517.2022.1.3 (sulfate chitosan synthesis with ficin and papain complexation), and partially funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of the state task for universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project No. № FZGU-2022-0009 (molecular docking).

**For citation:** Redko Yu.A., Goncharova S.S., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Yudin N.E., Kondratyev M.S., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. Development of the hybrid biocatalysts obtaining based on ficin and papain complexes with chitosan sulfate and the study of their structural features. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(3): 435-443. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11323>

### Введение

Цистеиновые протеазы – семейство гидролаз, объединенных тем фактом, что в их активном центре, расщепляющем

пептидные связи, содержится остаток серосодержащей аминокислоты – цистеина. Эти ферменты широко распространены в природе и принимают участие в



процессах жизнедеятельности представителей всех таксонов живых организмов [1]. Учитывая этот факт, цистеиновые протеазы нашли эффективное применение в различных областях практической деятельности человека, среди которых особо следует выделить биотехнологии [2, 3], косметологию [4], фармацию [5, 6], медицину [7, 8] и пищевую промышленность [9].

Папаин (КФ 3.4.22.2) и фицин (КФ 3.4.22.3) являются перспективными для фармации ферментами. Папаин получают из латекса папайи *Carica papaya*. Он стабилен при высоких температурах и активен в диапазоне рН 3.0-9.0. Изoeлектрическая точка равна 8.75 [10]. Папаин обладает противовоспалительными и антимикробными свойствами, так как гидролизует токсиканты белковой природы в области воспалений. Кроме того, фермент обладает стимулирующим действием по отношению к метаболизму и регенерации тканей, а также способствует проникновению других лекарственных средств через кожные покровы без нарушения целостности здоровых тканей [11, 12].

Фицин – протеолитический фермент, выделяемый из латекса инжира *Ficus carica*. Фицин, как и папаин, активен в широком диапазоне значений рН среды. Изoeлектрическая точка составляет 9.0. Характеризуется довольно высокой термической стабильностью: температура инактивации составляет порядка 80°C, а оптимум активности приходится на диапазон 60-65°C [13]. Фицин способен к гидролизу многих типов белков и обладает противовирусными свойствами [14].

Многие энзимы часто характеризуются низкой устойчивостью к действию различных денатурирующих факторов, в связи с чем для стабилизации их активности целесообразно иммобилизовать молекулы энзимов на матрице полимеров [16, 17]. Идеальные носители, применяемые для иммобилизации биокатализато-

ров, должны отвечать следующим условиям: стабильность и прочность в условиях эксплуатации, отсутствие неспецифических взаимодействий, приводящих к конформационным изменениям глобул энзимов, а также доступность реакционных центров для вступления в реакции активации. Все вышеперечисленные особенности характерны для хитозана и его сульфатированных производных [18]. Анализ литературных данных показывает, что взаимодействие ферментов с хитозаном приводит к повышению их термостабильности и резистентности к воздействию микроорганизмов [19].

Сульфат хитозана – один из его структурных аналогов, в котором сульфатная группа может быть присоединена непосредственно к аминогруппе хитозана [20]. Сульфат хитозана – полисахарид, в макромолекулах которого содержатся сульфатные- и аминогруппы. Помимо всех вышеперечисленных свойств хитозана, которые присущи и сульфату хитозана, полисахарид обладает антикоагулянтной активностью, возрастающей при увеличении степени сульфатирования, а также резко снижает интенсивность деления раковых клеток. Хитозан и его сульфатированные формы обладают антиоксидантным действием, эффективность которого сопоставима с фенольными антиоксидантами, но по сравнению с последними, хитозан и его производные имеют преимущество из-за их нетоксичной природы [21]. Данные полимеры нашли широкое применение в медицине и фармакологии благодаря их низкой стоимости, доступности, нетоксичности, неиммуногенности, биodeградируемости, антибактериальной и противогрибковой активности, биоразлагаемости, выраженным адгезивным свойствам, биосовместимости, влиянию на процессы регенерации поврежденных кожных покровов [22]. Однако механизмы формирования комплексов сульфата хитозана с различными белками мало изучены.

Таблица 1. Аминокислотные остатки фицина и папаина, которые формируют связи и взаимодействия с сульфатом хитозана в процессе комплексообразования  
Table 1. Amino acid residues of ficin and papain, which form bonds and interactions with chitosan sulfate during the complexation between them

Аминокислотные остатки, формирующие	
водородные связи и длина связи, Å	иные типы взаимодействий
Аминокислоты фицина, которые образуют связи и взаимодействия с сульфатом хитозана	
Asn18, 2.71 Å; Gly20, 3.08 и 3.06 Å; Ser66, 2.70 Å; Gly68, 2.93 и 2.98 Å; Glu145, 2.96 и 3.04 Å; Asp161, 3.07 Å; His162, 3.23 Å; Trp184, 3.16 Å	Gln19, Cys22, Gly23, Tyr60, Cys65, Gly67, Trp69, Trp188
Аминокислоты папаина, которые образуют связи и взаимодействия с сульфатом хитозана	
Gly20, 2.73 Å; Cys22, 3.06 Å; Cys25, 2.89 Å; Cys63, 2.91 Å; Gly66, 2.87 и 3.13 Å; Gln142, 2.88 Å	Asn18, Ser21, Gly23, Asn64, Gly65, Ala136, Val157, Asp158, Trp177

В связи с вышесказанным, целью проведенного исследования являлась разработка методики получения комплексов фицина и папаина с сульфатом хитозана и изучение их структурных особенностей.

### Экспериментальная часть

Объектами исследования выступали фицин, выделенный из *Ficus carica*, папаин, полученный из *Carica papaya* (Sigma, США), в экспериментах по определению протеолитической активности в качестве субстрата для гидролиза использовали азоказеин (Sigma, США), для синтеза сульфата хитозана применяли хитозан со средней молекулярной массой 200, 350 и 600 кДа и степенью деацетилирования 0.85 (Биопрогресс, Россия).

Получение сульфата хитозана осуществляли по следующей методике: для приготовления сульфата хитозана 5.0 г хитозана растворяли в 500 см<sup>3</sup> 2 мас./об. водного раствора уксусной кислоты, затем 20 см<sup>3</sup> 10 % масс. водного раствора серной кислоты и выдерживали при перемешивании в течение 24 ч при 25±2°C. Образовавшийся гель помещали в ацетон

на 5 суток, трижды промывали метанолом и сушили в вакуумной шкафу при 55±2°C до постоянной массы. Выход продукта находился в диапазоне 85-96%.

Иммобилизацию фицина и папаина на матрице сульфата хитозана осуществляли путем комплексообразования, согласно [23].

Подготовку структуры фицина и папаина [23] для докинга выполняли по стандартной для Autodock Vina схеме. Модель структуры сульфата хитозана была нарисована в молекулярном конструкторе HyperChem, последовательно оптимизирована сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически – в PM3. Расстановка зарядов на молекуле полисахарида и ее протонирование/депротонирование осуществлялись автоматически в пакете MGLTools 1.5.6.

Содержание белка в комплексных препаратах фицина и папаина определяли методом Лоури [24]. Анализ протеолитической активности комплексов проводили по отношению к субстрату азоказеину [25]. Рассчитанные величины характеризовались нормальным распределе-

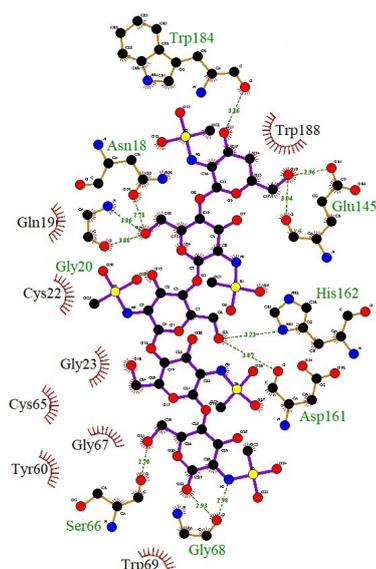


Рис. 1. Связи и взаимодействия между фицином и сульфатом хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).  
 Fig. 1. Bonds and interactions between ficin and chitosan sulfate (dotted lines indicate hydrogen bonds, the length of the bonds is given in Å).

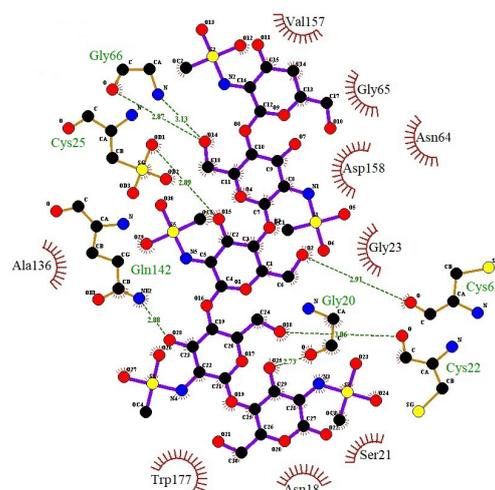


Рис. 2. Связи и взаимодействия между папаином и сульфатом хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).  
 Fig. 2. Bonds and interactions between papain and chitosan sulfate (dotted lines indicate hydrogen bonds, the length of the bonds is given in Å).

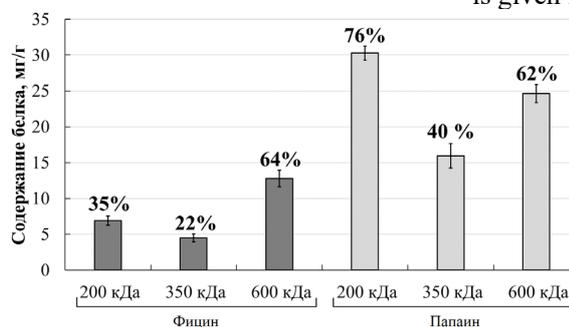


Рис. 3. Содержание белка (в мг/г носителя) в комплексах фицина и папаина с сульфатом хитозана. Отдельно указана эффективность комплексообразования фицина и папаина (по содержанию белка), выраженная в процентах сорбированного фермента от его количества в растворе в процессе комплексообразования, принятого за 100%.

Fig. 3. Protein content (in mg/g of carrier) in complexes of ficin and papain with chitosan sulfate. The effectiveness of the complexation of ficin and papain (in terms of protein content) is indicated above bars, expressed as a percentage of the sorbed enzyme from its amount in solution during complexation, taken as 100%.

нием, поэтому для их статистической обработки применяли t-критерий Стьюдента ( $p < 0.05$ ).

### Обсуждение результатов

В результате осуществленного *in silico* исследования были выявлены типы химических связей и физических взаимо-

действий, аминокислотный состав поверхностей молекул фицина и папаина, которые в процессе комплексообразования взаимодействуют с носителем, а также энергетическая характеристика процесса первого взаимодействия – аффинность связывания (табл. 1, рис. 1-2).

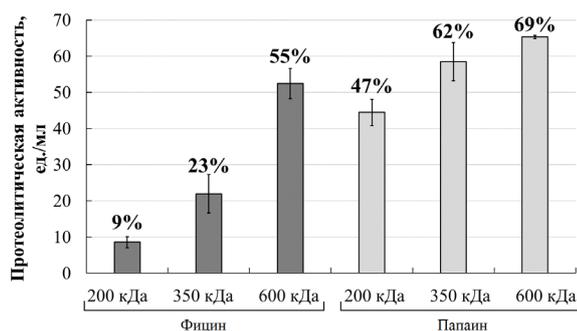


Рис. 4. Общая каталитическая активность (ед./мл раствора) комплексов фичина и папаина с сульфатом хитозана. Отдельно указана эффективность комплексообразования фичина и папаина (по общей каталитической активности), выраженная в процентах сохранения протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к активности фичина и папаина в растворе, принятой за 100 %.

Fig. 4. Total catalytic activity (units/mL of solution) of complexes of ficin and papain with chitosan sulfate. The efficiency of the complexation of ficin and papain (by total catalytic activity) is indicated above the bar, expressed as a percentage of the preservation of the proteolytic activity of the enzyme after immobilization in relation to the activity of ficin and papain in solution, taken as 100%.

Из полученных данных видно, что образование комплексов исследуемых ферментов с сульфатом хитозана происходит, в том числе, с участием аминокислотных остатков, формирующих активные центры энзимов (Cys25 и His162 для фичина, Cys25 и His159 для папаина) или расположенных в непосредственной близости от них, что оказывает влияние на каталитическую активность целевых препаратов. Энергия первого взаимодействия (аффинность связывания) фичина и папаина с сульфатом хитозана составила -8.0 и -7.1 ккал/моль, соответственно, что указывает на самопроизвольное протекание процессов.

В ходе анализа содержания белка в полученных гибридных препаратах, выявлено, что наибольшее количество фичина содержится в комплексах с сульфатом хитозана с молекулярной массой 600 кДа. Для папаина наблюдается более сложная картина: содержание фермента максимально в комплексах с носителем с молекулярными массами 200 и 600 кДа (рис. 3). Наибольшая протеолитическая активность фичина достигается в результате его взаимодействия с сульфатом хитозана с молекулярной массой 600 кДа, для папаина – при его комплексообразовании

с сульфатом хитозана с молекулярными массами 350 и 600 кДа (рис. 4).

Оптимальное соотношение содержания белка и общей протеолитической активности комплексов фичина и папаина с сульфатом хитозана наблюдается при использовании носителя с молекулярной массой 600 кДа.

### Заключение

Таким образом, нами предложена методика иммобилизации фичина и папаина путем комплексообразования с сульфатом хитозана с различными величинами молекулярных масс (200, 350 и 600 кДа). Оптимальное значение соотношения содержания белка (в мг на г носителя) и общей активности (в ед. на мл раствора) полученных комплексов наблюдается при использовании носителя с молекулярной массой 600 кДа.

Благодаря сохранению относительно высокого процента каталитической активности, полученные гибридные препараты фичина и папаина с сульфатом хитозана могут стать основой для создания инновационных лекарственных средств, сочетающих в себе антибактериальное, антитромботическое и противовирусное действия.



### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые

### Список литературы/References

1. Salvesen G.S., Hempel A., Coll N.S., Protease signaling in animal and plant-regulated cell death, *FEBS Journal*, 2015; 283: 2577-2598. <https://doi.org/10.1111/febs.13616>

2. Silva M.Z.R., Oliveira J.P.B., Ramos M.V., Farias D.F., de Sa Ch. A., Ribeiro J.A.C., Silva A.F.B., Sousa J.S., Zambelli R.A., Silva A.C., Furtado G.P., Grangeiro Th.B., Vasconcelos M.S., Silveira S.R., Freitas C.D.T., Biotechnological potential of a cysteine protease (CpCP3) from *Calotropis procera* latex for cheesemaking, *Food Chemistry*, 2020; 307: 125574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125574>

3. Holyavka M., Faizullin D., Koroleva V., Olshannikova S., Zakhartchenko N., Zuev Yu., Kondratyev M., Zakharova E., Artyukhov V., Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021; 180: 161-176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.016>

4. Secchi G., Role of protein in cosmetics, *Clinics in Dermatology*, 2008; 26: 321-325. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.04.004>

5. Baidamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Yu., Pankova S.M., Agafonova M.N., Chirkova M.N., Vasileva O.S., Akhmetov N., Shubina V.V., Porfiryev A.G., Semenova E.V., Sachenkov O.A., Bogachev M.I., Artyukhov V.G., Baltina T.V., Holyavka M.G., Kayumova A.R., Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020; 164: 4205-4217. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.030>

могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

6. McKerrow J.H., The diverse roles of cysteine proteases in parasites and their suitability as drug targets, *PLoS Negl Trop Dis*, 2018; 12: e0005639. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005639>

7. Ariizumi T., Murata Sh., Fujisawa S., Isezaki M., Sato T., Oishi E., Taneno A., Ichii O., Maekawa N., Okagawa T., Konnai S., Ohashi K., In vitro evaluation of a cysteine protease from poultry red mites, *Dermanyssus gallinae*, as a vaccine antigen for chickens, *Poultry Science*, 2022;101:101638. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101638>

8. Baidamshina D.R., Koroleva V.A., Olshannikova S.S., Trizna E.Yu., Bogachev M.I., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kayumov A.R., Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain, *Marine Drugs*, 2021; 19: 197. <https://doi.org/10.3390/md19040197>

9. Gagaoua M., Dib A.L., Lakhdara N., Lamri M., Botineştean Ch., Lorenzo J.M., Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases, *Current Opinion in Food Science*, 2021; 38: 177-188. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.002>

10. Kong Y.R., Jong Y.X., Balakrishnan M., Bok Z.K., Weng J.K.K., Tay K.C., Goh B.H., Ong Y.S., Chan K.G., Lee L.H., Khaw K.Y., Beneficial Role of *Carica papaya* Extracts and Phytochemicals on Oxidative Stress and Related Diseases: A Mini Review, *Biology*, 2021; 10: 287-307. <https://doi.org/10.3390/biology10040287>

11. Armutcu C., Çorman M. E., Bayram E., Uzun L., Purification of Fab and Fc using papain immobilized cryogel bioreactor separator system, *Journal of Chromatography*, 2020; 1158: 122396. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122396>

12. Ol'shannikova S. S., Red'ko Yu. A., Lavlinskaya M. S., Sorokin A. V., Holyavka M. G., Artyukhov V. G., Preparation of papain complexes with chitosan microparticles



- and evaluation of their stability using the enzyme activity level, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2022; 55(11): 1240-1244. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02564-8>
13. Morellon-Sterling R., El-Siar H., Tavano O.L. Berenguer-Murcia A., Fernández-Lafuente R., *Ficin*: A protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020; 162: 394-404. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.144>
14. Poltronieri P., Plant Immunity and pathogen interfering mechanisms: effectors and bodyguards, *International Journal of Plant Research*, 2017; 7: 21-28. <https://doi.org/10.5923/j.plant.20170701.04>
15. Kaur N., Bhardwaj P., Singh G., Arya S.K., Applicative Insights on Nascent Role of Biochar Production, Tailoring and Immobilization in Enzyme Industry -A Review, *Process Biochem.*, 2021; 107: 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.017>
16. Das R., Dwevedi A., Kayastha A.M., Chapter 1 – Current and future trends on polymer-based enzyme immobilization. In *Polymeric Supports for Enzyme Immobilization* ed. by A. Dwevedi. London, Academic Press, 2021; pp. 1-25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819206-1.00004-1>
17. Kou Sh., Peters L., Mucalo M., Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms, *Carbohydr. Polym.*, 2022; 282: 119132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119132>
18. Sorokin A., Lavlinskaya M., Synthesis of the superabsorbents enriched in chitosan derivatives with excellent water absorption properties, *Polymer Bulletin*, 2022; 79: 407-427. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03521-9>
19. Banshee P. S., Selvakumara D., Kadirvelub K., Kumara N. S., Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020; 150: 1072-1083. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113>
20. Huang R., Mendis E., Kim Se-Kwon, Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan sulfate, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005; 36: 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.05.001>
21. Hu B., Guo Yu., Li H., Liu X., Fu Yu., Ding F., Recent advances in chitosan-based layer-by-layer biomaterials and their biomedical applications, *Carbohydr. Polym.*, 2021; 271(118427): 17 p. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118427>
22. Khalid A.K., Alamry A., Recent advances of emerging green chitosan-based biomaterials with potential biomedical applications: A review, *Carbohydr. Res.*, 2021; 506: 108368. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108368>
23. Kasai M. R., Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscosimetric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscosimetric constants data, *Carbohydr. Polym.*, 2007; 68: 477-488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>
24. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
25. Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R., A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius*, *FEBS Lett.*, 2010; 584 (21): 4419-4425. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.049>



### Информация об авторах / Information about the authors

**Ю.А. Редько** – магистрант кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**С.С. Гончарова** – младший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**М.С. Лавлинская** – к.х.н., старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж; старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

**А.В. Сорокин** – аспирант кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет, Воронеж; младший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж; младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

**Н.Е. Юдин** – магистрант 2го года обучения кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**М.С. Кондратьев** – к.ф.-м.н., зав. лабораторией структуры и динамики биомолекулярных систем, Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

**М.Г. Холявка** – д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия; профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета, Севастополь

**В.Г. Артюхов** – д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**Yu.A. Redko** – master student, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

**S.S. Goncharova** – Junior Researcher, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: [Olshannikovas@gmail.com](mailto:Olshannikovas@gmail.com)

**M.S. Lavlinskaya** – PhD (Chem), Senior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh; Senior Researcher of Metagenomics and Food Biotechnologies Laboratory, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, e-mail: [maria.lavlinskaya@gmail.com](mailto:maria.lavlinskaya@gmail.com)

**A.V. Sorokin** – postgraduate student, department of department of Macromolecular Compounds and Colloidal Chemistry, Voronezh State University, Voronezh; Junior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh; Junior Researcher of Metagenomics and Food Biotechnologies Laboratory, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, e-mail: [andrew.v.sorokin@gmail.com](mailto:andrew.v.sorokin@gmail.com)

**N.E. Yudin** – master student, department of polymer science and colloid chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

**M.S. Kondratiev** – Ph.D. (physical and mathematical sciences), Head of the Laboratory of Structure and Dynamics of Biomolecular Systems, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

**M.G. Holyavka** – Doctor (biology), professor, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Professor of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation, e-mail: [holyavka@rambler.ru](mailto:holyavka@rambler.ru)

**V.G. Artyukhov** – Doctor (biology), professor, Head of the Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: [artyukhov@bio.vsu.ru](mailto:artyukhov@bio.vsu.ru)

*Статья поступила в редакцию 14.02.2023; одобрена после рецензирования 19.04.2023; принята к публикации 03.05.2023.*

*The article was submitted 14.02.2023; approved after reviewing 19.04.2023; accepted for publication 03.05.2023.*