



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.723.2:577.322

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12242

Исследование особенностей взаимодействия поверхности бромелина и карбоксиметилцеллюлозы в процессе их адсорбционной иммобилизации

Мария Сергеевна Лавлинская¹, Андрей Викторович Сорокин¹,
Светлана Сергеевна Гончарова¹, Максим Сергеевич Кондратьев^{1,2},
Анастасия Алексеевна Михайлова¹, Егор Игоревич Кузнецов¹,
Никита Александрович Балбеков¹, Марина Геннадьевна Холявка^{1,3✉},
Валерий Григорьевич Артюхов¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, holyavka@ Rambler.ru✉

²Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Россия

³Севастопольский государственный университет, Севастополь

Аннотация. Адсорбционная иммобилизация – распространенный подход для стабилизации каталитической активности ферментов, заключающийся в присоединении их макромолекул к поверхности какого-либо носителя за счет слабых физических взаимодействий и водородных связей. Согласно современным представлениям, этот процесс является наиболее «щадящей» техникой иммобилизации по отношению к структуре глобулы фермента. Однако несмотря на этот факт, часто наблюдается снижение активности иммобилизованного препарата по сравнению с нативным ферментом. Для выяснения причин этого процесса следует изучить особенности взаимодействия в системе фермент-носитель и выявить типы взаимодействий, возникающие между ее компонентами. При исследовании структуры ферментов критически важным становится установление природы и качественного состава аминокислотных остатков на поверхности макромолекулы энзима, взаимодействующих с носителем, так как в случае, если каталитически значимые остатки вовлекаются в этот процесс, может наблюдаться значительное снижение активности фермента. В связи с этим целью настоящей работы является исследование особенностей взаимодействия цистеиновой протеазы бромелина с карбоксиметилцеллюлозой с помощью десорбции фермента из образуемого комплекса в различных условиях (в присутствии сульфата аммония или поверхностно-активного вещества Тритон X-100, в том числе при различных температурах), а также методом гибкого молекулярного докинга. Выбранные объекты исследования – перспективные компоненты для получения биокатализаторов пищевого или биомедицинского назначения, поэтому исследование особенностей их взаимодействия будет способствовать расширению сфер применения бромелина. В ходе исследования установлено, что инкубация иммобилизованного на карбоксиметилцеллюлозе бромелина в растворах сульфата аммония с концентрацией 32 мМ или выше, а также Тритона X-100 с концентрацией 100 мМ или выше приводит к разрушению комплекса и десорбции фермента. Этот факт подтверждает вклад нековалентных взаимодействий в образование иммобилизованного препарата. При повышении температуры инкубации комплекса выше 60 °С также наблюдалось высвобождение фермента из препарата, что указывает на образование водородных связей между ферментом и носителем. *In silico* исследование подтвердило образование этих типов связей и взаимодействий, причем показано, что аминокислотные остатки, образующие активный центр бромелина, также связываются с носителем.

Ключевые слова: бромелин, карбоксиметилцеллюлоза, адсорбционная иммобилизация, десорбция.

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект 21-74-20053.

Для цитирования: Лавлинская М.С., Сорокин А.В., Гончарова С.С., Кондратьев М.С., Михайлова А.А., Кузнецов Е.И., Балбеков Н.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Исследование особенностей взаимодействия поверхности бромелина и карбоксиметилцеллюлозы в процессе их адсорбционной иммобилизации // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 3. С. 403-414. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12242>

Original article

Study of bromelain and carboxymethyl cellulose surface interaction features in the process of their adsorption immobilisation

Maria S. Lavlinskaya¹, Andrey V. Sorokin¹, Svetlana S. Goncharova¹,
Maxim S. Kondratiev^{1,2}, Anastasia A. Mikhaylova¹, Egor I. Kuznetsov¹,
Nikita A. Balbekov¹, Marina G. Holyavka^{1,3}✉, Valeriy G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russia, holyavka@rambler.ru✉

²Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

³Sevastopol State University, Sevastopol

Abstract. Adsorption immobilisation is a common approach to stabilise the catalytic activity of enzymes. It involves the attachment of their macromolecules to the surface of a carrier due to weak physical interactions and hydrogen bonds. According to modern concepts, this process is the ‘gentlest’ immobilisation technique in terms of the structure of the enzyme globule. Despite this fact, the activity of the immobilised preparation is often lower compared to the native enzyme. To understand the reasons, it is necessary to study the specific features of interactions within the enzyme-carrier system and to identify the types of interactions occurring between its components. When studying the structure of enzymes, it is critical to determine the nature and qualitative composition of amino acid residues on the surface of the enzyme macromolecule that interact with the carrier. If catalytically important residues are involved in the process, there may be a significant decrease in the enzyme activity. In this regard, the aim of the work was to study the features of interaction between bromelain, which is a cysteine protease, and carboxymethyl cellulose by desorption of the enzyme from the formed complex under different conditions (in the presence of ammonium sulphate or surfactant Triton X-100, including at different temperatures), as well as by flexible molecular docking. The studied substances are promising components for the production of biocatalysts for food or biomedical applications, so the study of their interaction features will expand the applications of bromelain. We determined that incubation of bromelain immobilised on carboxymethyl cellulose in solutions of ammonium sulphate with a concentration of 32 mM or higher and Triton X-100 with a concentration of 100 mM or higher resulted in the destruction of the complex and the desorption of the enzyme. It confirms that non-covalent interactions contribute to the formation of immobilised preparation. When we increased the incubation temperature of the complex above 60 °C, we also observed the release of the enzyme from the preparation, indicating the formation of hydrogen bonds between the enzyme and the carrier. *In silico* study confirmed the formation of these types of bonds and interactions. It was determined that the amino acid residues forming the active site of bromelain also formed bonds with the carrier.

Keywords: bromelain, carboxymethyl cellulose, adsorption immobilization, desorption

Acknowledgements: the research was supported by the Russian Science Foundation as part of project No. 21-74-20053.

For citation: Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Goncharova S.S., Kondratiev M.S., Mikhaylova A.A., Kuznetsov E.I., Balbekov N.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. Study of bromelain and carboxymethyl cellulose surface interaction features in the process of their adsorption immobilisation. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 403-414. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12242>

Введение

Ферменты – природные катализаторы, на порядки превосходящие по эффективности существующие в настоящий момент химические аналоги. Благодаря своей низкой токсичности энзимы находят различные сферы применения в биотехнологии, пищевой промышленности, фармации и биомедицине. Однако из-за

особенностей строения биокатализаторы чувствительны к изменениям параметров окружающей среды, в первую очередь – температуры, pH и присутствию денатурирующих агентов: резкие изменения указанных факторов в микроокружении приводят к потере нативной структуры и каталитической активности фермента [1]. Кроме того, большая часть энзимов является глобулярными водорастворимыми



белками [2], что делает невозможным многократное применение этих достаточно дорогостоящих компонентов и затрудняет их массовое внедрение в различные технологические процессы.

Доступным и эффективным способом стабилизации структуры и каталитической активности фермента является его иммобилизация – фиксация молекул энзимов на каком-либо носителе. В результате этого процесса становится возможным варьирование параметров непосредственного микроокружения макромолекулы биокатализатора и создание условий, в которых нативная структура глобулы будет минимально изменяться независимо от свойств макрофазы, в которой она находится [3-5]. Из всех известных к настоящему моменту техник иммобилизации наименее деструктивной по отношению к глобулярной структуре ферментов является адсорбционная, заключающаяся в сорбции энзима на поверхности носителя за счет образования водородных связей и прочих нековалентных взаимодействий (ван-дер-ваальсовых, лондоновских, электростатических и др.) [6, 7]. Отдельно стоит подчеркнуть, что адсорбционная иммобилизация наиболее экономически выгодна при получении биокатализаторов для пищевых или биомедицинских задач, так как не требует использования токсичных активаторов и дополнительных затрат на стадиях их введения и очистки иммобилизованного препарата от непрореагировавшего компонента.

На типы образуемых связей и взаимодействий между белком и носителем влияют свойства поверхности их молекул, в первую очередь – наличие функциональных групп, способных вступать в те или иные типы взаимодействий. Однако несмотря на достаточный накопленный массив знаний о принципах взаимодействия ферментов с различными носителями, к настоящему времени не выработан единый принцип, позволяющий вы-

брать идеальную подложку, не изменяющую каталитически выгодную структуру глобулы и не затрудняющую массоперенос субстрата и продуктов к активному центру фермента или от него. В настоящее время подбор оптимальной пары фермент-носитель осуществляется преимущественно эмпирическим путем [8]. Анализ литературных данных показывает, что в присутствии микроокружения, сформированного из полисахаридов, нарушения каталитически выгодной конформации фермента практически не наблюдается [4, 5, 9]. Однако, подобные взаимодействия все равно могут приводить к снижению активности фермента, и для выяснения причин этого процесса требуется изучение особенностей взаимодействия фермента и носителя, а также вклада различных сил в этот процесс [10].

В связи со сказанным выше, целью настоящей работы является исследование особенностей взаимодействия цистеиновой протеазы бромелина (КФ 3.4.22.32) с карбоксиметилцеллюлозой с помощью десорбции фермента из образуемого комплекса в различных условиях, а также методом гибкого молекулярного докинга. Бромелин – протеолитический фермент растительного происхождения, широко используемый в биомедицине для терапии раневых повреждений, а также в пищевой промышленности для повышения качества ряда продуктов питания, таких как хлебобулочные изделия, сыры и напитки [11-14]. Карбоксиметилцеллюлоза (схема 1) представляет собой доступный нетоксичный и биоинертный полимер, содержащий не- и ионогенные функциональные группы, что позволяет использовать ее в качестве компонента для получения катализаторов для пищевой промышленности или биомедицины [15-17].

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования был выбран бромелин из стебля *Ananas*

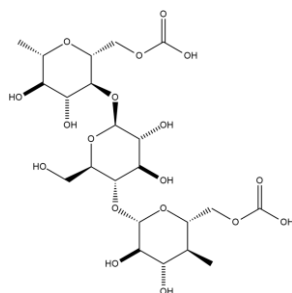


Схема 1. Схематичное изображение фрагмента макромолекулы карбоксиметилцеллюлозы со степенью замещения 0.7

Scheme 1. Schematic representation of a fragment of a carboxymethyl cellulose macromolecule with the degree of substitution of 0.7

comosus (каталожный номер В4882, Sigma, США), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma, США), в качестве носителя для иммобилизации использовали карбоксиметилцеллюлозу в Н-форме с молекулярной массой 90 кДа и степенью замещения 0.7 (Реахим, Россия). В экспериментах по десорбции использован сульфат аммония (ХЧ, Вектон, Россия) и Тритон Х-100 (>98%, Sigma, США)

Иммобилизация бромелина на матрице карбоксиметилцеллюлозы. К 1 г карбоксиметилцеллюлозы добавляли 20 см³ раствора фермента (в концентрации 1 мг/см³ в буфере с рН 8.6±0.01, получаемого смешением рассчитанных количеств 100 мМ раствора глицина и 100 мМ раствора NaOH), инкубировали в течение 2 часов. После окончания времени инкубации образовавшийся осадок промывали с помощью диализа против 50 мМ трис-HCl буфера (рН 7.5) через целлофановую мембрану с размером пор 25 кДа до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при λ=280 нм).

Содержание белка в иммобилизованных препаратах бромелина определяли методом Лоури [18]. Для экспериментов по десорбции белка перед определением его содержания иммобилизованный препарат выдерживали в растворе сульфата аммония (рН 4.9±0.02) или Тритона Х-100 в концентрации 4-500 ммоль или при температурах в интервале 20-80°C в течение

1 часа, после чего образец центрифугировали при 10 000 g и отдельно анализировали осадок и супернатант.

Методика определения протеолитической активности бромелина. Измерение протеолитической активности бромелина проводили по отношению к субстрату азоказеину (Sigma, США), как описано в [19].

Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по *t*-критерию Стьюдента (при *p*<0.05), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

Молекулярный докинг. Подготовку структуры бромелина [20] для докинга выполняли по стандартной для Autodock Vina схеме, описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя и иных соединений. Центр молекулы и параметры бокса («ячейки») мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула протеазы полностью была внутри расчетной области пространства.

Модель структуры карбоксиметилцеллюлозы была нарисована в молекулярном конструкторе HyperChem, последовательно оптимизирована сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически – в PM3. Лиганд в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановка зарядов на

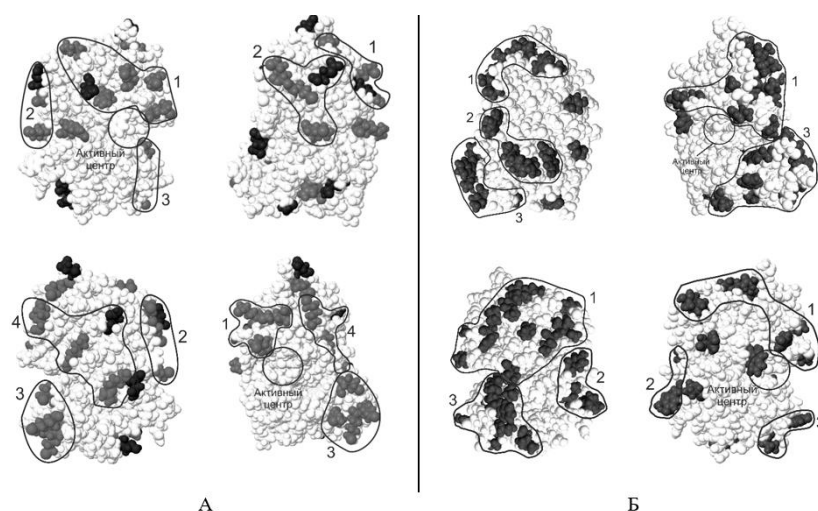


Рис. 1. Кластеры заряженных (А) и гидрофобных (Б) аминокислотных остатков на поверхности молекулы бромелина (1, 2, 3, 4 – номера кластеров; кругом обозначен активный центр фермента; каждое следующее изображение представляет собой молекулу, повернутую на 90° относительно предыдущего изображения). Для рисунка 1А: серым цветом обозначены положительно заряженные скопления, черным цветом – отрицательно заряженные.

Fig. 1. Clusters of charged (A) and hydrophobic (B) amino acid residues on the surface of a bromelain molecule (1, 2, 3, and 4 are the cluster numbers; the circle indicates active site of the enzyme; each subsequent image represents the molecule rotated by 90° relative to the previous image). In Figure 1A, grey indicates positively charged clusters and black indicates negatively charged clusters.

молекуле полисахарида и ее протонирование/депротонирование осуществлялись автоматически в пакете MGLTools 1.5.6.

Обсуждение результатов

Для выявления типов возможных взаимодействий, в которые может вступать поверхность глобулы бромелина нами проведен анализ поверхности 3D-модели его макромолекулы и выявлены кластеры аминокислот с различными свойствами (рис. 1). Как видно из представленных данных, на поверхности глобулы белка присутствуют скопления как заряженных, так и гидрофобных аминокислотных остатков, что указывает на возможность образования водородных связей, электростатических взаимодействий и гидрофобных эффектов, обусловленных ван-дер-ваальсовыми и лондоновскими взаимодействиями.

Для исследования взаимодействий, принимающих участие в образовании

комплекса бромелин-карбоксиметилцеллюлоза, нами проведены эксперименты по десорбции фермента в различных условиях – в присутствии сульфата аммония, Тритона X-100, а также при различных температурах. Сульфат аммония – легко растворимая в воде соль, сильный электролит, изменение концентрации которого оказывает существенное влияние на ионную силу раствора. Таким образом, варьируя этот параметр, становится возможным оценить вклад электростатических взаимодействий в образование ассоциата фермент-носитель.

Тритон X-100 (схема 2) представляет собой поверхностно-активное вещество, сочетающее в себе гидрофильную цепь полиэтиленоксида и гидрофобный ароматический фрагмент. Благодаря своей неионогенной природе этот детергент оказывает влияние преимущественно на гидрофобные эффекты, возникающие в системе бромелин-карбоксиметилцеллюлоза.

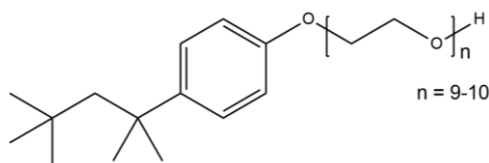


Схема 2. Схематичное изображение молекулы Тритон X-100
Scheme 2. Schematic representation of the Triton X-100 molecule

Температура также оказывает значительное влияние на процесс взаимодействия белка с элементами микроокружения. С повышением температуры повышается сегментарная подвижность глобулы бромелина, в результате чего происходит перестроение внутри- и межмолекулярных водородных связей, образующих как элементы вторичной структуры фермента, так и связей с элементами микроокружения белка, в том числе – с карбоксиметилцеллюлозой. На основании этого можно заключить, что с повышением температуры может наблюдаться частичное разрушение комплекса бромелин-карбоксиметилцеллюлоза за счет разрушения Н-связей, образованных между их макромолекулами. Таким образом, варьирование температуры и изменение содержания белка в комплексе в этих условиях можно рассматривать как косвенное подтверждение вклада водородных связей в образование комплекса.

На рисунке 2 представлены зависимости содержания белка и его общей активности в комплексе и супернатанте в зависимости от указанных выше факторов. Зависимость интенсивности процессов десорбции бромелина была исследована в присутствии сульфата аммония и Тритона X-100 в диапазоне концентраций 4-500 мМ, а также при температурах в области 25-80°C. Как видно из представленных данных, содержание белка в иммобилизованном препарате практически неизменно при концентрации сульфата аммония 32 мМ или ниже, при возрастании концентрации соли наблюдается снижение концентрации белка в препарате (осадке) и ее рост в супернатанте. Полученные данные по содержанию белка в

комплексе коррелируют с результатами определения общей активности: при концентрациях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 32 мМ и выше наблюдается снижение протеолитической активности иммобилизованного препарата (осадка) и рост активности супернатанта. Таким образом, при использовании раствора сульфата аммония с концентрацией 32 мМ или выше происходит десорбция белка с поверхности карбоксиметилцеллюлозы, причем интенсивность процесса возрастает с ростом концентрации электролита. На основании этого можно заключить, что в образовании комплекса бромелин-карбоксиметилцеллюлоза принимают участие электростатические силы.

При обработке комплекса бромелина Тритоном X-100 наблюдается снижение количества фермента и его активности в иммобилизованном препарате и возрастание значений этих параметров в супернатанте при достижении концентрации 100 мМ детергента. Таким образом, можно сделать вывод о том, что гидрофобные эффекты также вносят вклад в процесс образования комплекса белок-полисахарид, однако в меньшей степени по сравнению с электростатическими взаимодействиями. Стоит отметить, что величина общей активности препаратов в присутствии детергента значительно ниже, чем в присутствии сульфата аммония. По-видимому, это может быть связано с неспецифической адсорбцией белка на мицеллах ПАВ (критическая концентрация мицеллообразования Три-

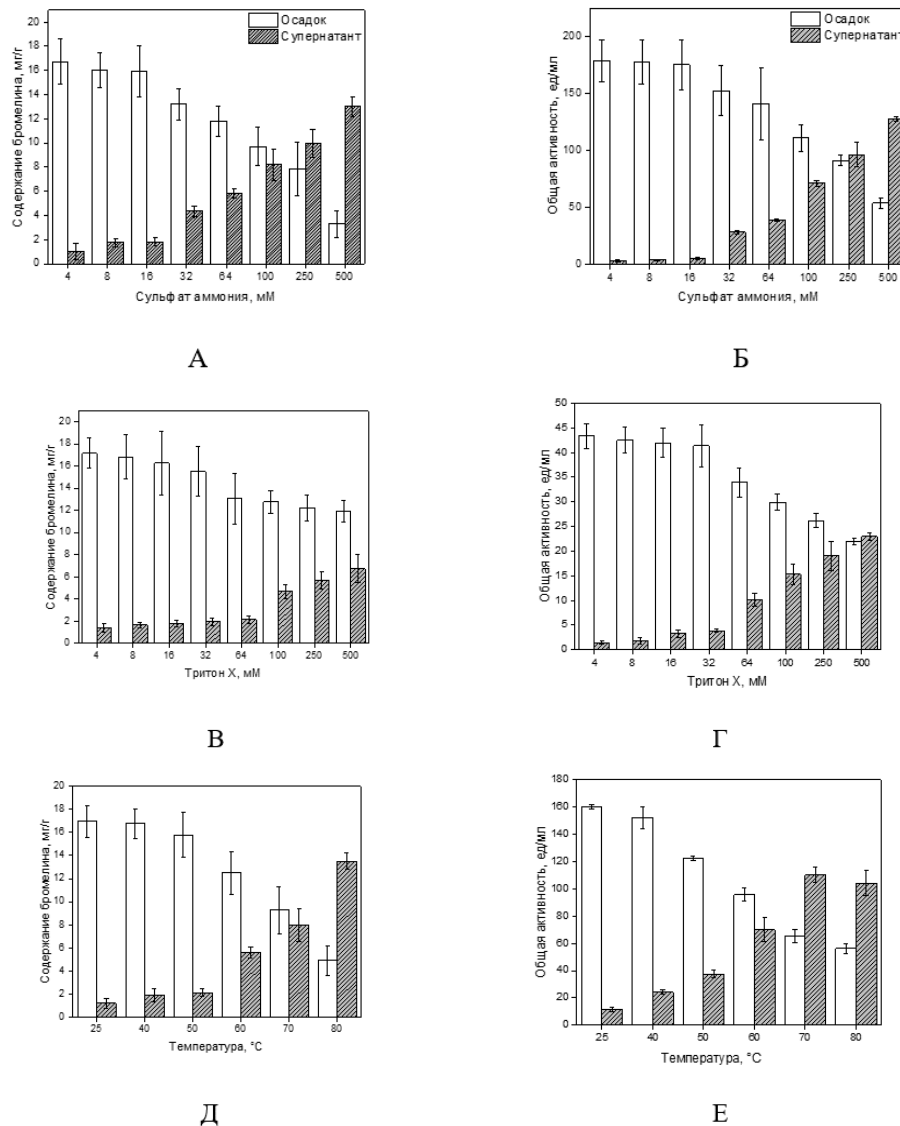


Рис. 2. Зависимость содержания белка и общей протеолитической активности бромелина в зависимости от: А, Б – присутствия сульфата аммония; В, Г – присутствия Тритона X-100; Д, Е – температуры.

Fig. 2. The dependency of bromelain's content or proteolytic activity on: А, Б in the presence of ammonia sulfate; В, Г in the presence of Triton X-100; Д, Е at different temperatures.

тона X-100 составляет 0.24 мМ [21]), в результате чего может происходить изменение конформации макромолекулы бромелина, связанное с переходом гидрофобных аминокислотных остатков из ядра глобулы к ее поверхности [22, 23].

Исследование зависимости содержания бромелина в комплексе с карбоксиметилцеллюлозой от температуры показывает, что при достижении 60°C наблюдается снижение количества белка в иммобилизованном препарате и его рост в

супернатанте. При 80°C, доля десорбированного белка значительно превосходит это значение для иммобилизованного, что указывает на существенный вклад водородных связей в образование комплекса. Данные зависимости общей активности комплекса и супернатанта коррелируют с содержанием белка и также свидетельствует о частичной десорбции бромелина при температурах выше 60°C.

Для детализации особенностей взаимодействия бромелина и карбоксиметилцеллюлозы было осуществлено *in silico*

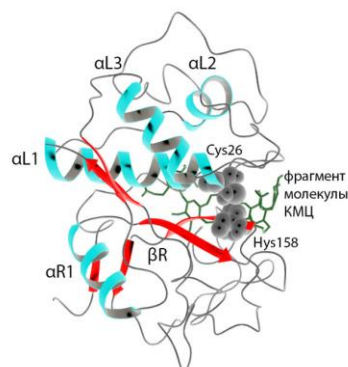


Рис. 3. Топология комплекса бромелина и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ).
 Fig. 3. Topology of the bromelain-carboxymethyl cellulose complex.

Таблица. Аминокислотные остатки бромелина, которые образуют связи и взаимодействия с карбоксиметилцеллюлозой (в скобках указана принадлежность аминокислотного остатка к упорядоченным элементам вторичной структуры белка, если скобки отсутствуют, то аминокислота входит в состав неупорядоченных участков молекулы белка)

Table. Bromelain's aminoacid residues interacting with carboxymethyl cellulose (the assignment of the aminoacid residues with the ordered elements of the secondary protein structure is indicated in brackets; if the brackets are absent, then the amino acid is part of the disordered regions of the protein)

Аминокислотные остатки, участвующие в образовании		
водородных связей, длина, Å	электростатических взаимодействий	гидрофобных эффектов, обусловленных лондоновскими и ван-дер- ваальсовыми взаимодействиями
Thr15, 3.01, 3.07; Lys18, 3.67, 3.91; Asn19, 3.8, 3.35; Gln20, 3.89, 2.98; Asn21, 3.09; Cys23, 3.31; Ser37 (α L1), 3.35; Glu51(α L2), 2.70; His158 (β R), 4.09; Lys179, 2.80; Trp180, 3.14; Tyr185, 4.09	Arg9, Lys18, His158 (β R), Arg187	Pro48 (α L1)
Количество аминокислотных остатков, участвующих в образовании связей и взаимодействий		
12 (участвуют в образовании 16 Н-связей)	4	1

исследование. Молекула бромелина представляет собой полипептидную цепь, свернутую в глобулу, в которой отчетливо выделяются два домена: L-домен, содержащий три α -спирали (α L1, α L2, α L3), и R-домен, образуемый одной α -спиралью и β -складчатостью (α R1 и β R). На их стыке образуется полость («ка-

талитический карман»), в которой расположен активный центр фермента, включающий Cys26, входящий в состав α L1-спирали, и His158, относящийся к β R-складчатости.

На рис. 3 представлена топология комплекса бромелин-карбоксиметилцеллюлоза. Молекула полисахарида локализуется в полости глобулы, что указывает на



возможность взаимодействия полигликозида как с каталитически значимыми аминокислотными остатками, так и с прочими поверхностными аминокислотами. Детализация взаимодействий по типам (таблица) показывает, что в образовании комплекса бромелин-карбоксиметилцеллюлоза преобладает вклад водородных связей (16 шт.), формируемых, в том числе, и с участием His158 – аминокислотного остатка, непосредственно входящего в активный центр фермента. В электростатические взаимодействия, представленные в виде так называемых «солевых мостиков», вступают заряженные поверхностные аминокислотные остатки Arg9, Lys18, His158, Arg187 со стороны фермента и карбоксильные группы карбоксиметилцеллюлозы. Гидрофобные эффекты представлены в минимальном количестве (только с участием Pro48), что, по-видимому, обусловлено высокой гидрофильностью карбоксиметилцеллюлозы. Отдельно стоит отметить, что комплексообразование протекает, в основном, через взаимодействия с аминокислотными остатками, относящимся к неупорядоченным областям глобулы бромелина, что обусловлено их стерической доступностью, а также с вовлечением аминокислот α L1-спирали и β R-складчатости, формирующих область

«каталитического кармана» макромолекулы. В целом, результаты молекулярного докинга и экспериментов по десорбции фермента согласуются достаточно хорошо и указывают на наличие одних и тех же типов взаимодействия.

Заключение

Таким образом, исследованы особенности взаимодействия бромелина с карбоксиметилцеллюлозой. Выявлено, что вклад в образование ассоциата между ними вносят водородные связи, электростатические взаимодействия и гидрофобные эффекты, обусловленные лондоновскими и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. Методом молекулярного докинга показано, что аминокислотные остатки, образующие активный центр фермента, вовлечены в образование комплекса, разрушение которого происходит при концентрации сульфата аммония 32 мМ и выше, для Тритона X-100 – выше 100 мМ или при температуре более 60°C.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Zheng Q., Wang Z., Xiong F., Zhang G., Enzyme inactivation induced by thermal stabilization in highland barley and impact on lipid oxidation and aroma profiles, *Front. Nutr.*, 2023; 10: 1-11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1097775>
2. Robinson P.K. Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays Biochem.*, 2015; 59: 1-41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
3. Secundo F. Conformational changes of enzymes upon immobilization, *Chem. Soc. Rev.*, 2013; 42: 6250-6261. <https://doi.org/10.1039/c3cs35495d>

4. Sorokin A.V., Goncharova S.S., Lavlinskaya M.S., Holyavka M.G., Faizullin D.A., Zuev Yu.F., Kondratyev M.S., Artyukhov V.G., Complexation of Bromelain, Ficin, and Papain with the Graft Copolymer of Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt and N-Vinylimidazole Enhances Enzyme Proteolytic Activity, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023; 24(14): 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms241411246>
5. Sorokin A.V., Goncharova S.S., Lavlinskaya, M.S., Holyavka M.G., Faizullin D.A., Kondratyev M.S., Kannykin S.V., Zuev Yu.F., Artyukhov V.G., Carboxymethyl Cellulose-Based Polymers as Promising Matrices for Ficin Immobilization,



- Polymers.*, 2023; 15(3): 1-23. <https://doi.org/10.3390/polym15030649>
6. 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, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021; 180: 161-176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.016>
 7. Zheng J., Van der Meeren P., Sun W., New insights into protein-polysaccharide complex coacervation: Dynamics, molecular parameters, and applications, *Aggregate*, 2023; 5(5): Article Number e449. <https://doi.org/10.1002/agt2.449>
 8. Maghraby Y.R., El-Shabasy R.M., Ibrahim A.H., El-Said Azzazy H.M., Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications, *ACS Omega.*, 2023; 8(6): 5184-5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
 9. 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>
 10. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Sazykina S.M., Nakvasina M.A., Physical, chemical, and kinetic properties of trypsin-based heterogeneous biocatalysts immobilized on ion-exchange fiber matrices, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2017; 51(8): 702-706. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1678-0>
 11. Holyavka M.G., Goncharova S.S., Sorokin A.V., Lavlinskaya M.S., Redko Y.A., Faizullin D.A., Baidamshina D.R., Zuev Yu.F., Kondratyev M.S., Kayumov A.R., Artyukhov V.G., Novel Biocatalysts Based on Bromelain Immobilized on Functionalized Chitosans and Research on Their Structural Features, *Polymers.*, 2022; 14(23): 1-19. <https://doi.org/10.3390/polym14235110>
 12. Sorokin A.V., Olshannikova S.S., Lavlinskaya M.S., Holyavka M.G., Faizullin D.A., Zuev Yu.F., Artukhov V.G., Chitosan Graft Copolymers with N-Vinylimidazole as Promising Matrices for Immobilization of Bromelain, Ficin, and Papain, *Polymers.*, 2022; 14(11): 1-15. <https://doi.org/10.3390/polym14112279>
 13. Jančić U., Gorgieva S., Bromelain and Nisin: The Natural Antimicrobials with High Potential in Biomedicine, *Pharmaceutics.*, 2022; 14(1): 1-39. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010076>
 14. Lavrinenko I.A., Holyavka M.G., Chernov V.E., Artyukhov V.G., Second derivative analysis of synthesized spectra for resolution and identification of overlapped absorption bands of amino acid residues in proteins: bromelain and ficin spectra in the 240-320 nm range, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020; 227: 117722. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117722>
 15. Sorokin A.V., Kuznetsov V.A., Lavlinskaya M.S., Synthesis of graft copolymers of carboxymethyl cellulose and N,N-dimethylaminoethyl methacrylate and their study as Paclitaxel carriers, *Polymer Bulletin.*, 2021; 78(6): 2975-2992. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03250-z>
 16. Sorokin A., Sukhanov P., Popov V., Kannykin S., Lavlinskaya M., A new approach to increasing the equilibrium swelling ratio of the composite superabsorbents based on carboxymethyl cellulose sodium salt, *Cellulose.*, 2022; 29(5): 159-173. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04326-3>
 17. Sorokin A.V., Goncharova S.S., Lavlinskaya M.S., Holyavka M.G., Zuev Yu.F., Faizullin D.A., Kondratyev M.S., Artyukhov V.G., Study of the Mechanism of Interaction of Ficin with a Graft Copolymer of Carboxymethyl Cellulose Sodium Salt and N-vinylimidazole Using Molecular Docking, as Well as Infrared and Raman Spectroscopy, *Biophysics.*, 2023; 68(2): 182-189. <https://doi.org/10.1134/S0006350923020227>



18. 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)

19. 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>

20. Malykhina N.V., Olshannikova S.S., Holyavka M.G., Sorokin A.V., Lavlinskaya M.S., Artyukhov V.G., Faizullin D.A., Zuev Yu.F., Preparation of Ficin Complexes with Carboxymethylchitosan and N-(2-Hydroxy)Propyl-3-Trimethylammoniumchitosan and Studies of Their Structural Features, *Russ. J. Bioorganic Chem.*, 2023; 48(S1): S50-S60. <https://doi.org/10.1134/S1068162022060176>

21. Machado A.E. da H., de Oliveira H.P.M., dos Santos L.M., Alves H. de O., Machado W.A., Caixeta B.P., da Silva, T.A., Araújo D.M. da S., Determination of the Critical Micelle Concentration of Triton X-100 Using the Compound 3-(benzoxazol-2-yl)-7-(N,N-diethylamino)chromen-2-one as Fluorescent Probe, *Orbital: Electron. J. Chem.*, 2016; 8(6): 329-333. <https://doi.org/10.17807/orbital.v0i0.923>

22. Yadav J.K., Prakash V., Stabilization of α -Amylase, the Key Enzyme in Carbohydrates Properties Alterations, at Low pH, *Int. J. Food Prop.*, 2011; 14(6): 1182-1196. <https://doi.org/10.1080/10942911003592795>

23. van Dijk E., Hoogeveen A., Abeln S., The Hydrophobic Temperature Dependence of Amino Acids Directly Calculated from Protein Structures, *PLoS Comput. Biol.*, 2015; 11(5): 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004277>

Информация об авторах / Information about the authors

М.С. Лавлинская – к.х.н., старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.В. Сорокин – к.б.н., старший научный сотрудник 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. Кондратьев – к. ф.-м. н., заведующий лабораторией структуры и динамики биомолекулярных систем, Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино Московской области; старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

А.А. Михайлова – студент кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Е.И. Кузнецов – студент кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

M.S. Lavlinskaya – PhD (Chem), Senior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia; e-mail: maria.lavlinskaya@gmail.com

A.V. Sorokin – PhD (Biol) Senior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: andrew.v.sorokin@gmail.com

S.S. Goncharova – Junior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: olshannikovas@gmail.com

M.S. Kondratyev – PhD (Physics), Head of the Laboratory of Structure and Dynamics of Biomolecular Systems, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino; Senior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: ma-ko@bk.ru

A.A. Mikhaylova – Student, Polymer Science and Colloid Chemistry Department, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: minas36@yandex.ru

E.I. Kuznetsov – Student, Polymer Science and Colloid Chemistry Department, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: kuznetsoffegorr@gmail.com



Н.А. Балбеков – студент кафедры физической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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

В.Г. Артюхов – д.б.н., проф., заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

N.A. Balbekov – Student, Physical Chemistry Department, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: balbekov.nikita@yandex.ru

M.G. Holyavka – Doctor of Science (Biol), professor, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, professor of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol, Russia, e-mail: holyavka@rambler.ru

V.G. Artyukhov – Doctor of Science (Biol), professor, Head of the Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, Russia, e-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 15.04.2024; одобрена после рецензирования 10.05.2024; принята к публикации 15.05.2024.

The article was submitted 15.04.2024; approved after reviewing 10.05.2024; accepted for publication 15.05.2024.