



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 577.325

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12518

Разработка методики получения ассоциатов бромелина с микро- и наночастицами карбоксиметилхитозана

Юлия Александровна Редько¹, Светлана Сергеевна Гончарова¹,
Марина Геннадьевна Холявка^{1,2}✉, Мария Сергеевна Лавлинская¹,
Анастасия Алексеевна Михайлова¹, Андрей Викторович Сорокин¹,
Максим Сергеевич Кондратьев^{1,3}, Валерий Григорьевич Артюхов¹

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

²Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

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

Аннотация. Бромелин – цистеиновая протеаза растительного происхождения, имеет высокие перспективы применения в медицине и промышленности. Растворимые формы фермента подвержены быстрой инактивации вследствие конформационных перестроек, вызванных действием многих химических веществ и физических факторов, поэтому их использование ограничено. Одним из способов преодоления названных затруднений является адсорбция бромелина на различных биополимерах. Адсорбция является наиболее простым методом иммобилизации ферментов, которая влияет на активность биокатализаторов. В связи с вышесказанным, целью исследования было получение комплексов бромелина с микро- и наночастицами карбоксиметилхитозана без и с добавлением аскорбиновой кислоты, определение каталитической активности биокатализаторов и оценка их стабильности при оптимальных условиях функционирования.

В ходе работы были синтезированы микро- и наночастицы среднемолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) карбоксиметилхитозанов без и с добавлением аскорбиновой кислоты, а также получены комплексы бромелина с микро- и наночастицами карбоксиметилхитозана. Функциональная активность препаратов снижалась в течение семи суток эксперимента. Каталитическая способность ассоциатов бромелина с микрочастицами карбоксиметилхитозана с молекулярными массами 200 и 350 кДа увеличилась на 63 и 52 % по сравнению со свободным ферментом. При получении этих же комплексов в присутствии аскорбиновой кислоты, активность увеличилась на 69 % для среднемолекулярного карбоксиметилхитозана и на 55 % для высокомолекулярного карбоксиметилхитозана.

Каталитическая способность ассоциатов бромелина с наночастицами карбоксиметилхитозана с молекулярными массами 200 и 350 кДа по сравнению со свободным ферментом увеличилась на 62 и 30 %. При добавлении аскорбиновой кислоты, активность комплексов увеличилась на 65 % для среднемолекулярного карбоксиметилхитозана и на 50 % для высокомолекулярного карбоксиметилхитозана.

Ключевые слова: бромелин, карбоксиметилхитозан, наночастицы карбоксиметилхитозана, микрочастицы карбоксиметилхитозана, адсорбция.

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №21-74-20053).

Для цитирования: Редько Ю.А., Гончарова С.С., Холявка М.Г., Лавлинская М.С., Михайлова А.А., Сорокин А.В., Кондратьев М.С., Артюхов В.Г. Разработка методики получения ассоциатов бромелина с микро- и наночастицами карбоксиметилхитозана // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2024. Т. 24, № 5. С. 795-805. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12518>

Original article

Development of a technique for obtaining bromelain associates with carboxymethyl chitosan micro- and nanoparticles



**Yulia A. Redko¹, Svetlana S. Goncharova¹, Marina G. Holyavka^{1,2,*},
Maria S. Lavlinskaya¹, Anastasia A. Mikhaylova¹, Andrey V. Sorokin¹,
Maksim S. Kondratyev^{1,3}, Valeriy G. Artyukhov¹**

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, holyavka@rambler.ru[✉]

²Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

³Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, subdivision of the Federal Research Centre "Pushchino Scientific Centre for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Russian Federation

Abstract. Bromelain, a plant-derived cysteine protease, has great potential for medical and industrial applications. Soluble forms of the enzyme are subject to rapid inactivation due to conformational rearrangements caused by the influence of many chemicals and physical factors, so their use is limited. One of the ways to overcome these difficulties is to adsorb bromelain on various biopolymers. Adsorption is the simplest method of enzyme immobilisation, which influences the activity of biocatalysts. Therefore, the aim of the study was to obtain bromelain complexes with micro- and nanoparticles of carboxymethyl chitosan with and without ascorbic acid, to determine the catalytic activity of the biocatalysts, and to evaluate their stability under optimal functioning conditions.

We synthesised micro- and nanoparticles of medium molecular weight (200 kDa) and high molecular weight (350 kDa) carboxymethyl chitosans with and without ascorbic acid, and also obtained bromelain complexes with micro- and nanoparticles of carboxymethyl chitosan. The functional activity of the preparations decreased during seven days of the experiment. The catalytic capacity of bromelain associates with carboxymethyl chitosan microparticles with molecular weights of 200 and 350 kDa increased by 63 and 52 % compared to the free enzyme. When the same complexes were prepared with ascorbic acid, the activity increased by 69 % for medium molecular weight carboxymethyl chitosan and by 55 % for high molecular weight carboxymethyl chitosan.

The catalytic capacity of bromelain associates with carboxymethyl chitosan nanoparticles with molecular masses of 200 and 350 kDa increased by 62 and 30 % compared to the free enzyme. When ascorbic acid was added, the activity of the complexes increased by 65 % for medium molecular weight carboxymethyl chitosan and by 50 % for high molecular weight carboxymethyl chitosan.

Keywords: bromelain, carboxymethyl chitosan, carboxymethyl chitosan nanoparticles, carboxymethyl chitosan microparticles, adsorption.

Acknowledgments: the study was supported by the Russian Science Foundation grant (project No. 21-74-20053).

For citation: Redko Yu.A., Goncharova S.S., Holyavka M.G., Lavlinskaya M.S., Mikhaylova A.A., Sorokin A.V., Kondratyev M.S., Artyukhov V.G. Development of a technique for obtaining bromelain associates with carboxymethyl chitosan micro- and nanoparticles. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(5): 795-805. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12518>

Введение

Бромелин (КФ 3.4.22.4) – протеолитический фермент растительного происхождения, выделяемый из *Ananas comosus*. Молекулярная масса бромелина составляет 26-33 кДа. Молекула фермента представляет собой одну полипептидную цепь, состоящую из 285 аминокислотных остатков, стабилизированную пятью дисульфидными связями и свернутую в глобулу, в которой отчетливо выделяются два домена: L-домен, содержащий три α -спирали ($\alpha L1$, $\alpha L2$, $\alpha L3$), и R-домен, образуемый одной α -спиралью и β -складчатостью ($\alpha R1$ и βR). На их стыке образуется полость («каталитический

карман»), в которой расположен активный центр фермента, включающий Cys26, входящий в состав $\alpha L1$ -спирали, и His158, относящийся к βR -складчатости. Таким образом, бромелин содержит одну свободную сульфгидрильную группу цистеина, необходимую для его функционирования [1-3]. Наиболее благоприятными условиями для работы как нативного, так и иммобилизованного фермента являются значение pH 7.5 и температурный диапазон 50-70°C [4].

Помимо своего протеолитического действия, бромелин обладает противовоспалительными, кардиопротекторными, иммуномодулирующими и анти-

оксидантными свойствами [5]. Из литературных данных известно, что бромелин эффективно всасывается в организме и не вызывает значительных побочных эффектов [6]. Способность бромелина расщеплять ожоговый струп используется в составе лекарственного препарата «Нексобрин», входящего в Государственный реестр [7]. В Европе бромелин одобрен для применения в лечении хирургических ран, воспалений, вызванных травмами и хирургическими вмешательствами [8]. Его применения не ограничиваются только медицинской областью, но также распространяются на промышленность, например, текстиль, косметику, продукты питания. Производство самого фермента высокоэкологично, поскольку используются методы центрифугирования, ультрафильтрации и лиофилизации отходов переработки фруктов [5,9,10].

Известно, что даже на первый взгляд незначительные изменения конформации фермента, обусловленные воздействием физических и химических факторов, могут снижать его каталитическую активность, что ограничивает сферы использования биокатализатора в промышленности и биомедицине [11-13]. Комплексообразование бромелина является одним из способов сохранения его стабильности. В отличие от химических методов иммобилизации адсорбция ферментов на поверхности носителей в меньшей степени оказывает влияние на конформацию и активность биомакромолекулы, т.к. связывание фермента с носителем осуществляется в основном за счет Ван-дер-

Ваальсовых взаимодействий, водородных и ионных связей [14].

В качестве носителей для иммобилизации могут быть использованы наноразмерные частицы хитозана и его производных. Хитозан является биологически активным полисахаридом, растворимым только в кислых средах, что ограничивает его практическое применение в виде растворов [15]. Для повышения растворимости в воде, нейтральных и щелочных средах проводят химическую модификацию хитозана путём введения, например, гидроксильных и аминных групп. Эта модификация увеличивает его растворимость в нейтральных и основных средах и существенно улучшает антибактериальные свойства полимера [16,17].

Карбоксиметилхитозан (КМХ; схема 1) – это карбоксиметилированная растворимая форма хитозана. Благодаря простоте синтеза, растворимости в воде и амфолитному характеру карбоксиметилхитозан имеет широкое применение в биомедицинской и фармацевтической областях [18]. Карбоксиметилхитозан также обладает высокой биологической активностью, биodeградируемостью, пленко- и волокнообразующей способностью и способностью к комплексообразованию [19]. При уменьшении размеров частицы возникают новые поверхностные явления и реакции, приводящие к высокой химической и биологической активности биополимеров [20].

Целью нашего исследования было получение комплексов бромелина с микро(МЧ) и наночастицами (НЧ) карбоксиме-

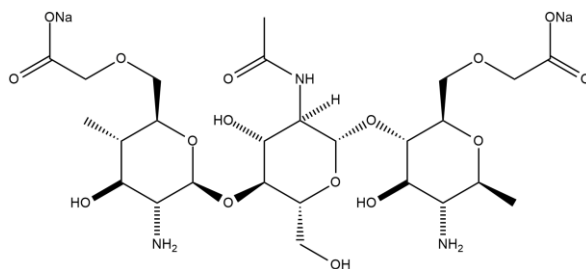


Схема 1. Схема фрагмента макромолекулы карбоксиметилхитозана
Scheme 1. Scheme of a fragment of a carboxymethyl chitosan macromolecule

тилхитозана без и с добавлением аскорбиновой кислоты, определение каталитической активности ферментов и оценка их стабильности по уровню ферментативной активности биокатализаторов.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования был выбран бромелин из стебля ананаса *Ananas comosus* (Sigma, США), субстратом для протеолиза служил азоказеин (Sigma, США). Для синтеза КМХ использовали хитозан с молекулярными массами 200 (среднемолекулярный, СМ) и 350 кДа (высокомолекулярный, ВМ) (ЗАО «Биопрогресс», Россия). Микро- и наночастицы в свою очередь получали из СМ-КМХ и ВМ-КМХ.

Получение КМХ осуществляли по методике, подробно описанной в работе [21]. Способ получения микрочастиц приведен в работе [22], для получения наночастиц на последнем этапе обработки время воздействия ультразвуком и его частота были увеличены до 10 мин (40 кГц).

Получение комплекса бромелина с микрочастицами карбоксиметилхитозана (МЧ-КМХ) и наночастицами карбоксиметилхитозана (НЧ-КМХ) осуществляли по следующей методике: раствор бромелина (2 мг/см³ в 50 мМ трис-глициновом буфере, рН 9.0) смешивали в равных объемах с раствором МЧ-КМХ и НЧ-КМХ и выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч.

Измерение протеазной активности комплексов проводили на субстрате азоказеине (Sigma) [23]. Стабильность комплексов оценивали согласно методике, описанной в [24,25]. Рассчитанные величины характеризовались нормальным распределением, поэтому для их статистической обработки применяли t-критерий Стьюдента (при $p < 0.05$).

Молекулярный докинг. Подготовку структуры бромелина 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 РМЗ. Лиганд в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановка зарядов на молекуле полисахарида и ее протонирование/депротонирование осуществлялись автоматически в пакете MGLTools 1.5.6.

Обсуждение результатов

Установлено, что при создании ассоциатов бромелина с микрочастицами среднемолекулярного карбоксиметилхитозана с молекулярной массой 200 кДа (МЧ-СМ-КМХ) и высокомолекулярного карбоксиметилхитозана с молекулярной массой 350 кДа (МЧ-ВМ-КМХ), полученными без добавления аскорбиновой кислоты, активность белок-полисахаридных комплексов по сравнению со свободным ферментом увеличилась на 63 и 52% соответственно. При образовании комплексов бромелина с микрочастицами обоих типов карбоксиметилхитозана, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты (МЧ-СМ-КМХ-Аск и МЧ-ВМ-КМХ-Аск), его активность стала выше на 69 и 55% (рис. 1).

При комплексообразовании бромелина с наночастицами среднемолекулярного (НЧ-СМ-КМХ) и высокомолекулярного (НЧ-ВМ-КМХ) карбоксиметилхитозанов, полученными без добавления аскорбиновой кислоты, активность гибридных биокатализаторов по сравнению со свободным ферментом увеличилась на 62

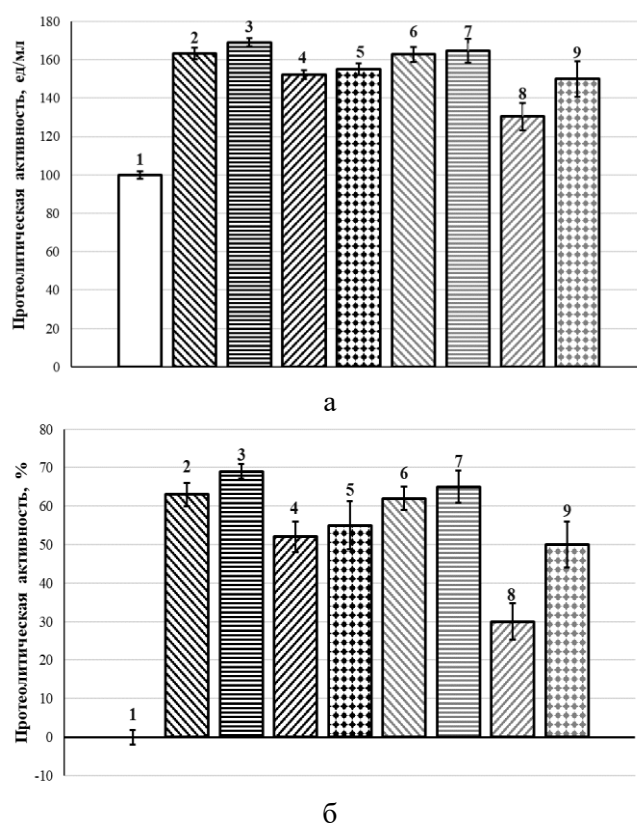


Рис. 1. Каталитическая активность бромелина, ед/мл (а) и её изменение, % (б): растворимый бромелин (1); бромелин в комплексе с МЧ-СМ-КМХ (2); бромелин с МЧ-СМ-КМХ-Аск (3); бромелин с МЧ-ВМ-КМХ (4); бромелин с МЧ-ВМ-КМХ-Аск (5); бромелин с НЧ-СМ-КМХ (6); бромелин с НЧ-СМ-КМХ-Аск (7); бромелин с НЧ-ВМ-КМХ (8); бромелин с НЧ-ВМ-КМХ-Аск (9). За 100 % принята активность свободного бромелина (1) при оптимальных условиях гидролиза.

Fig. 1. Catalytic activity of bromelain, units/ml (a) and its change, % (b): soluble bromelain (1); bromelain in complex with MP-MM-CMCh (2); bromelain with MP-MM-CMCh -Asc (3); bromelain with MP-HM-CMCh (4); bromelain with MP-HM-CMCh -Asc (5); bromelain with NP-MM-CMCh (6); bromelain with NP-MM-CMCh-Asc (7); bromelain with NP-HM-CMCh (8); bromelain with NP-HM-CMCh-Asc (9). The activity of free bromelain (1) under optimal hydrolysis conditions was taken as 100%.

и 30% соответственно. При формировании комплексов бромелина с наночастицами обоих типов карбоксиметилхитозана, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты (НЧ-СМ-КМХ-Аск и НЧ-ВМ-КМХ-Аск), его каталитическая способность увеличилась на 65 и 50% (рис. 1).

Комплексообразование бромелина со всеми изучаемыми нами типами микро- и наночастиц приводило к повышению стабильности фермента, начиная с 4 часов инкубации при 37°C в 0.05 М трис-НСl буфере (рН 7.5).

После 168 часов инкубации при 37°C в 0.05 М трис-НСl буфере (рН 7.5) бромелин сохранял 15% своей каталитической активности, комплексы с МЧ-СМ-КМХ и МЧ-ВМ-КМХ проявляли соответственно 59 и 54% своей каталитической способности, а комплексы с МЧ-СМ-КМХ-Аск и МЧ-ВМ-КМХ-Аск сохраняли 69 и 62% их протеолитической активности (рис. 2). При этом комплексы с НЧ-СМ-КМХ и НЧ-ВМ-КМХ проявляли соответственно 51 и 57 % своей каталитической способности, в то время как ассоциаты с НЧ-

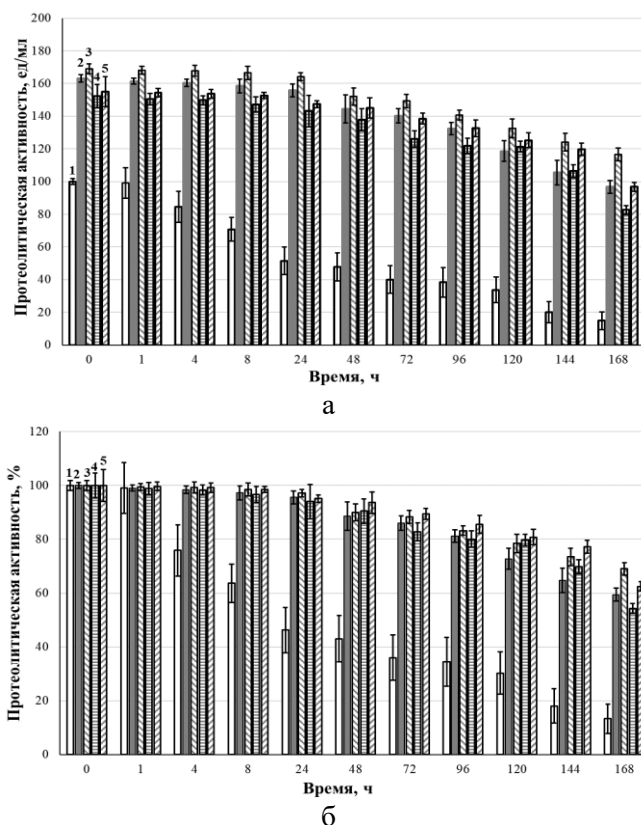


Рис. 2. Остаточная каталитическая активность бромелина после инкубации образцов при 37°C и pH 7.5 в ед/мл (а) и % (б) от первоначального уровня: свободный бромелин (1); бромелин в комплексе с МЧ-СМ-КМХ (2); бромелин с МЧ-СМ-КМХ-Аск (3); бромелин с МЧ-ВМ-КМХ (4); бромелин с МЧ-ВМ-КМХ-Аск (5). За 100 % принята ферментативная активность образцов, наблюдаемая без их предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза.

Fig. 2. Residual catalytic activity of bromelain after incubation of samples at 37°C and pH 7.5 in units/ml (a) and % (b) of the initial level: free bromelain (1); bromelain in complex with MP-MM-CMCh (2); bromelain with MP-MM-CMCh-Asc (3); bromelain with MP-NM-CMCh (4); bromelain with MP-NM-CMCh-Asc (5). The enzymatic activity of samples observed without prior incubation and under optimal hydrolysis conditions was taken as 100%.

СМ-КМХ-Аск и НЧ-ВМ-КМХ-Аск сохраняли 58 и 61% их протеолитической активности (рис. 3).

На заключительном этапе работы мы сравнили активность и стабильность полученных ассоциатов бромелина с нано- и микрочастицами карбоксиметилхитозана с препаратами на основе хитозана, полученными нами ранее [1]. Вне зависимости от выбранного для получения частиц полисахарида наблюдалось повышение стабильности фермента по сравнению с его растворимой формой. Однако в случае использования хитозана процент сохранения каталитической активности фермента был существенно ниже, чем

при применении в качестве носителя карбоксиметилхитозана, сорбция на котором позволяет повысить протеолитическую активность бромелина на 69 % (для комплекса бромелина с МЧ-СМ-КМХ-Аск) по сравнению со свободной формой фермента. Этот результат подчеркивает целесообразность модификации хитозана для его дальнейшего использования в качестве носителя цистеиновых протеаз, а также расширяет перспективы практического применения бромелина.

Для объяснения полученных результатов по активации бромелина при иммобилизации на карбоксиметилхитозане (в сравнении с использованием хитозана в

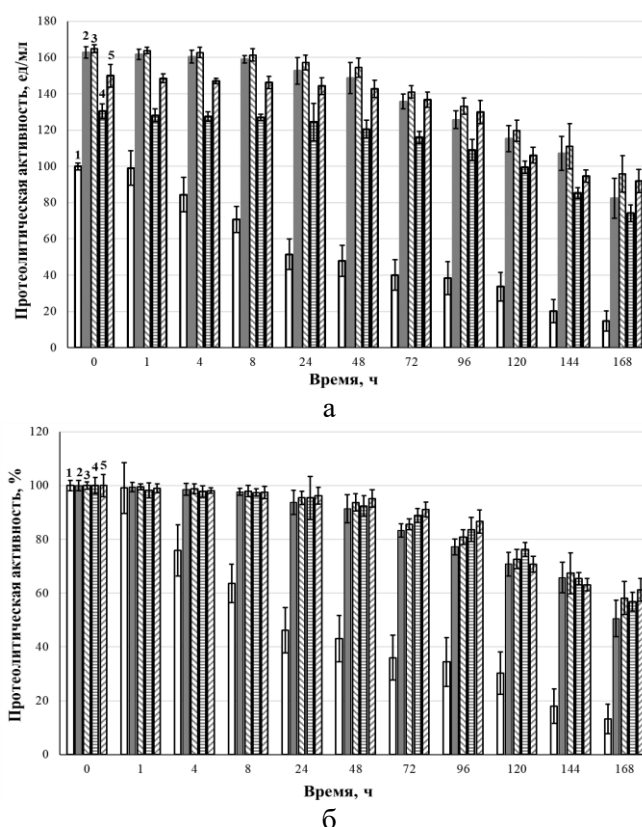


Рис. 3. Остаточная каталитическая активность бромелина после инкубации образцов при 37°C и pH 7.5 в ед/мл (а) и в % (б) от первоначального уровня: свободный бромелин (1); бромелин с НЧ-СМ-КМХ (2); бромелин с НЧ-СМ-КМХ-Аск (3); бромелин с НЧ-ВМ-КМХ (4); бромелин с НЧ-ВМ-КМХ-Аск (5). За 100 % принята ферментативная активность образцов, наблюдаемая без их предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза.

Fig. 3. Residual catalytic activity of bromelain after incubation of samples at 37°C and pH 7.5 in units/ml (a) and % (b) of the initial level: free bromelain (1); bromelain in complex with NP-MM-CMCh (2); bromelain with NP-MM-CMCh-Asc (3); bromelain with NP-HM-CMCh (4); bromelain with NP-HM-CMCh-Asc (5). The enzymatic activity of samples observed without prior incubation and under optimal hydrolysis conditions was taken as 100%.

качестве адсорбента) мы применили метод молекулярного докинга. На рис. 4 представлены топологии комплексов бромелин-хитозан и бромелин-карбоксиметилхитозан. Молекулы обоих полисахаридов локализуются в полости глобулы, указывая на возможность их взаимодействия как с каталитически значимыми аминокислотными остатками, так и с прочими поверхностными аминокислотами.

Детализация взаимодействий по типам (таблица) показывает, что при образовании комплекса бромелин-карбоксиметилхитозан формируется 13 водородных

связей, тогда как при адсорбции фермента на хитозане их 12, причем ряд аминокислотных остатков (Thr15, Lys18, Glu51, Trp161, Lys179) участвует в образовании водородных связей с обоими типами полисахаридов. Хотелось бы отметить, что в комплексе бромелин-хитозан одна из водородных связей образуется с участием His158 – аминокислотного остатка, непосредственно входящего в активный центр фермента. При сорбции на матрице карбоксиметилхитозана His158 образует два солевых мостика с матрицей носителя. Вероятно, этот факт и обуславливает выраженную активацию

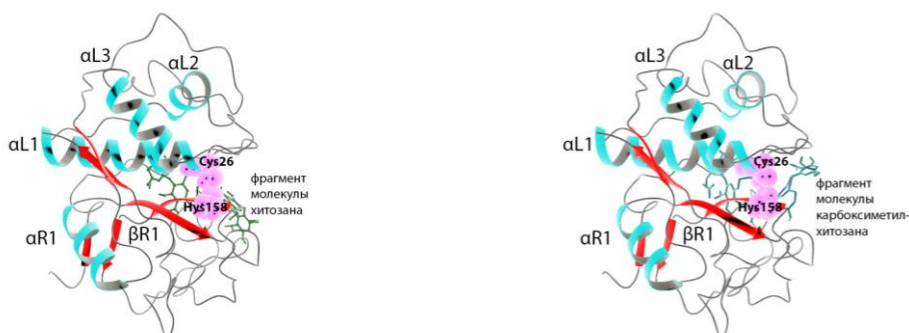


Рис. 4. Топология комплексов бромелина с хитозаном (слева) и карбоксиметилхитозаном (справа).
 Fig. 4. Topology of bromelain complexes with chitosan (left) and carboxymethyl chitosan (right).

Таблица. Аминокислотные остатки бромелина, которые образуют связи и взаимодействия с хитозаном и карбоксиметилхитозаном (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 chitosan and carboxymethylchitosan (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 (солевых мостиков)	гидрофобных эффектов, обусловленных лондоновскими и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями
в комплексе бромелина с хитозаном		
Thr15, 3.13, 3.13; Lys18, 3.08, 3.42; Glu51 (α L2), 3.80; Phe140, 3.12; His158 (β R), 2.83; Thr161 (β R), 3.15, 4.03; Lys179, 2.92, 3.61; Tyr185, 3.02	Lys144	Ala33(α L1)
в комплексе бромелина с карбоксиметилхитозаном		
Thr15, 3.83; Lys18, 3.35; Asn19, 3.29, 3.49; Gln20, 2.99, 3.94; Asn21, 3.92; Cys23, 3.09; Glu51 (α L2), 2.87; Trp161 (β R), 3.85; Lys179, 2.90; Trp180, 3.23; Gly184, 3.58	Lys18; His158 (β R, 2 мостика)	Pro22

бромелина в составе комплекса с карбоксиметилхитозаном.

Электростатические взаимодействия и гидрофобные эффекты представлены в

минимальном количестве в обоих комплексах. Отдельно стоит отметить, что комплексообразование протекает, в ос-



новном, через взаимодействия с аминокислотными остатками, относящимся к неупорядоченным областям глобулы бромелина, что обусловлено их стерической доступностью, а также с вовлечением аминокислот α L1 и α L2-спиралей и β R-складчатости в комплексе с хитозаном и α L2-спирали и β R-складчатости в комплексе с карбоксиметилхитозаном.

Заключение

В ходе проделанной работы нам удалось получить микро- и наночастицы карбоксиметилхитозанов с молекулярными массами 200 и 350 кДа без и с добавлением аскорбиновой кислоты. Белок-полисахаридные комплексы бромелина с микро- и наночастицами карбоксиметилхитозанов, сформированными как с добавлением аскорбиновой кислоты, так и без нее, проявляли протеазную активность в ~ 1.5 - 1.7 раз выше, чем фермент в

растворе. При этом образование комплекса бромелина с частицами карбоксиметилхитозана приводило к повышению стабильности фермента, начиная с 4 часов инкубации при 37°C в 0.05 М трис-HCl буфере (pH 7.5). После 168 часов хранения при 37°C эффект стабилизации протеолитической активности был более выражен: ассоциаты бромелина с частицами карбоксиметилхитозана всех изучаемых на конец срока инкубации были в 4 раза более активны, чем свободный бромелин в растворе.

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. Red'ko Y.A., Ol'shannikova S.S., Holyavka M.G., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Artyukhov V.G., Development of a method for obtaining bromelain associates with chitosan micro- and nanoparticles, *Pharm Chem J.* 2022; 56(7): 984-988. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02737-5>
2. Sakibaev F.A., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., *In silico* study of the composition and structure of internal cavities, tunnels and pores of the papain molecule at binding with different ligands, *Proceeding of Voronezh state university. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2021; 2(1): 50-54.
3. Ataide J.A., Gerald D.C., Gerios E.F., Bissaco F.M., Cefali L.C., Oliveira-Nascimento L., Mazzola P.G., Freeze-dried chitosan nanoparticles to stabilize and deliver bromelain, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2021; 61: 102225. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102225>.
4. Nanda R.F., Bahar R., Syukri D., Thu N.N.A., Kasim A., A review: Application of bromelain enzymes in animal food products, *Andalasian International Journal*

of Agriculture and Natural Sciences (AI-JANS), 2020; 1(01): 33-44. <https://doi.org/10.25077/aijans.v1.i01.33-44.2020>.

5. Hikiş P., Bernasinska-Slomczewska J., Beneficial Properties of Bromelain, *Nutrients*, 2021; 13: 4313. <https://doi.org/10.3390/nu13124313>.

6. Olshannikova S.S., Malykhina N.V., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., Development of a biocatalyst based on bromelain immobilized on *N*-succinylchitosan, *Proceeding of Voronezh state university. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2022; 3: 113-119.

7. Popova T.N., Rakhmanova T.I., Popov S.S. *Meditsinskaya enzimologiya*. Voronezh, Publishing and Printing Center of Voronezh State University, 2008, 64 p.

8. Muhammad Z. Abdul, Ahmad T., Therapeutic uses of pineapple-extracted bromelain in surgical care-A review, *JPMA: Journal of the Pakistan Medical Association*, 2017; 67(1): 121-125.

9. Ramli A.N., Aznan T.N., Ilias R.M., Bromelain: from production to commercialization, *J. Sci. Food Agric.*, 2017; 97: 1386-1395. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8122>.



10. Arshad Z.I.M., Amid A., Yusof F., Jaswir, I., Ahmad K., Loke S.P., Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2014; 98: 7283-7297. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y>.
11. Varilla C., Marccone M., Paiva L., Baptista J., Bromelain, a group of pineapple proteolytic complex enzymes (*Ananas comosus*) and their possible therapeutic and clinical effects. A summary, *Foods*, 2021; 10(10): 2249. <https://doi.org/10.3390/foods10102249>.
12. Hatano K.-I., Takahashi K., Tanokura M., Bromelain, a bromelain inhibitor from pineapple stem: structural and functional characteristics, *Protein Pept Lett.*, 2018; 25: 838-852. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180821115432>.
13. Ol'shannikova S.S., Red'ko Y.A., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G., Preparation of papain complexes with chitosan microparticles and evaluation of their stability using the enzyme activity level, *Pharm Chem J.*, 2022; 55(11): 1240-1244. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02564-8>.
14. Maslova N.E., Krylova T.S., Garaeva M.Ya., Mamichev D.A., Metodi funktsionalizatsii poverkhnosti sensorov biologicheskimi molekulami, *Molecular medicine*, 2013; 5: 8-15.
15. Sonia T.A., Sharma C.P., Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective, *Advances in Polymer Science*, 2011; 243: 23-53. https://doi.org/10.1007/12_2011_117.
16. Liu X.F., Guan Y.L., Yang D.Z., Li Z., Yao F., Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan, *Journal of applied polymer science*, 2001; 79: 1324-1335. [https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20010214\)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L).
17. Chen X-G., Park H-J., Chemical characteristics of *O*-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions, *Carbohydrate Polymers*, 2003; 53(4): 355-359. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00051-1).
18. He G., Chen X., Yin Y., Zhenga H., Xionga X., Du Y., Synthesis, characterization and antibacterial activity of salicyloyl chitosan, *Carbohydrate polymers*, 2011; 83(3): 1274-1278. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.029>.
19. Galbreich L.S., Chitin and chitosan: structure, properties, application, *Sorovsky educational journal*, 2001; 7(1): 51-56.
20. Olshannikova S.S., Redko Yu.A., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., M. G. Holyavka M.G., Yudin N.E., Artyukhov V.G., Study of the proteolytic activity of ficin associates with chitosan nanoparticles, *Condensed Matter and Interphases*, 2022; 24(4): 523-528. <https://doi.org/10.17308/kcmf.2022.24/10556>.
21. 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, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2022, 48(Suppl. 1): S50-S60. <https://doi.org/10.1134/S1068162022060176>.
22. 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>.
23. 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>.
24. Koroleva V.A., Holyavka M.G., Olshannikova S.S., Artyukhov V.G., Formation of ficin complexes with chitosan nanoparticles with a high level of proteolytic activity,



Biopharmaceutical Journal, 2018; 10(4): 36-40.

25. García-Carreño F.L., The digestive proteases of langostilla (Pleuroncodes

planipes, Decapoda): their partial characterization, and the effect of feed on their composition, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1992; 103: 575-578.

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.Г. Холявка – д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж; профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

М.С. Лавлинская – к.х.н., 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

А.В. Сорокин – к.б.н., старший 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 «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино Московской области; старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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, e-mail: redkoju@yandex.ru

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

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

M.S. Lavlinskaya – PhD (Chem), Senior Researcher, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: maria.lavlinskaya@gmail.com

A.A. Mikhailova – student, department of high molecular compounds and colloidal chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, minas36@yandex.ru

A.V. Sorokin – Senior Researcher, department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: andrew.v.sorokin@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, Russian Federation, e-mail: ma-ko@bk.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

Статья поступила в редакцию 03.04.2024; одобрена после рецензирования 21.05.2024; принята к публикации 05.06.2024.

The article was submitted 03.04.2024; approved after reviewing 21.05.2024; accepted for publication 05.06.2024.