



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 54.057:577.325

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/9340

### Разработка методики сорбционной иммобилизации бромелина на *N*-малеоилхитозане и изучение структурных особенностей полученного комплекса

Светлана Сергеевна Ольшанникова<sup>1</sup>,  
Наталья Викторовна Малыхина<sup>1</sup>, Мария Сергеевна Лавлинская<sup>1,2</sup>,  
Андрей Викторович Сорокин<sup>1,2</sup>, Марина Геннадьевна Холявка<sup>1,2</sup>✉,  
Анатолий Николаевич Лукин<sup>1</sup>, Юлия Михайловна Вышкворкина<sup>3</sup>,  
Николай Евгеньевич Юдин<sup>1</sup>, Валерий Григорьевич Артюхов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

**Аннотация.** Бромелин – протеолитический фермент, который нашел применение в медицине и промышленности. Однако использование свободных форм ферментов имеет свои недостатки, такие как их нестабильность к изменяющимся условиям среды, трудоёмкость и сложность отделения от исходных реагентов и продуктов реакции после завершения процесса. Решить эту проблему можно с помощью иммобилизации бромелина на полисахаридах.

В связи с вышесказанным, цель исследования заключалась в разработке методики сорбционной иммобилизации бромелина на *N*-малеоилхитозане с различными молекулярными массами и изучении структурных особенностей полученных комплексов.

Осуществлен синтез *N*-малеоилхитозана с различными молекулярными массами и степенями замещения. Предложена методика проведения сорбционной иммобилизации бромелина на *N*-малеоилхитозане. Взаимодействие между носителем и ферментом изучено методами ИК-спектроскопии и гибкого молекулярного докинга, выявлены функциональные группы полисахарида и аминокислоты поверхности глобул бромелина, принимающие участие в образовании комплекса. Измерение содержания белка в иммобилизованных препаратах бромелина проводили по модифицированному методу Лоури, протеазную активность образцов определяли на субстрате – азоказеине.

Показано, что взаимодействие бромелина и *N*-малеоилхитозана обусловлено электростатическими и гидрофобными взаимодействиями, а также образованием водородных связей между компонентами. Связи и взаимодействия с *N*-малеоилхитозаном образуются в том числе с участием аминокислотных остатков, составляющих активный центр энзима (Cys26 и His158), что отражается на протеолитической активности получаемых препаратов.

Установлено, что оптимальное соотношение содержания белка (мг на г носителя), общей активности (в ед на мл раствора) и удельной активности (в ед на мг белка) достигается в случае использования в качестве матрицы-носителя *N*-малеоилхитозана с молекулярной массой 200 кДа.

Полученные препараты бромелина, иммобилизованного на *N*-малеоилхитозане, могут стать основой для решения ряда проблем в биомедицине, возникающих при создании препаратов бактерицидного, противоотечного, антитромбического и противовирусного действий. Благодаря сочетанию относительно недорогих компонентов предлагаемый нами метод доступен для отечественных лабораторий и перспективен для дальнейшего применения в промышленности.

**Ключевые слова:** бромелин, *N*-малеоилхитозан, иммобилизация, комплексообразование, протеазная активность.



**Благодарности:** Работа выполнена при поддержке программы Приоритет-2030 Севастопольского государственного университета, стратегический проект № 3 (синтез носителя и сорбционная иммобилизация бромелина), и Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020-2022 годы, проект № FZGU-2020-0044 (ИК-спектроскопия и докинг)

Данные ИК спектроскопии получены с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета

**Для цитирования:** Ольшанникова С.С., Малыхина Н.В., Лавлинская М.С., Сорокин А.В., Холявка М.Г., Лукин А.Н., Вышкворкина Ю.М., Юдин Н.Е., Артюхов В.Г. Разработка методики сорбционной иммобилизации бромелина на *N*-малеоилхитозане и изучение структурных особенностей полученного комплекса // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 3. С. 335-346.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9340>

Original article

## Development of a method for the sorption immobilization of bromelain on *N*-maleoylchitosan and the study of the structural features of the obtained complex

Svetlana S. Olshannikova<sup>1</sup>, Natalya V. Malykhina<sup>1</sup>, Maria S. Lavlinskaya<sup>1,2</sup>,  
Andrey V. Sorokin<sup>1,2</sup>, Marina G. Holyavka<sup>1,2</sup>✉, Anatoliy N. Lukin<sup>1</sup>,  
Yulia M. Vyshkvorкина<sup>3</sup>, Nikolay E. Yudin<sup>1</sup>, Valery G. Artyukhov<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

<sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russian Federation

**Abstract.** Bromelain is a proteolytic enzyme that has found application in medicine and industry. However, the use of free forms of enzymes has its drawbacks, such as their instability to changing environmental conditions, labor intensity and complexity of separation from the initial reagents and reaction products after the completion of the process. This problem can be solved by immobilizing bromelain on polysaccharides. In connection with the above, the aim of the study was to develop a technique for the sorption immobilization of bromelain on *N*-maleoylchitosan with different molecular weights and to study the structural features of the resulting complexes.

The synthesis of *N*-maleoylchitosan with different molecular weights and degrees of substitution was carried out. A technique for carrying out sorption immobilization of bromelain on *N*-maleoylchitosan has been proposed. The interaction between the carrier and the enzyme was studied by IR spectroscopy and flexible molecular docking, the functional groups of the polysaccharide and amino acids of the surface of bromelain globules involved in the formation of the complex were identified. The protein content in the immobilized preparations of bromelain was measured by the modified Lowry method; the protease activity of the samples was determined on the azocasein as substrate.

It is shown that the interaction of bromelain and *N*-maleoylchitosan is due to electrostatic and hydrophobic interactions, as well as the formation of hydrogen bonds between the components. Bonds and interactions with *N*-maleoylchitosan are formed, among other things, with the participation of amino acid residues that make up the active site of the enzyme (Cys26 and His158), which affects the proteolytic activity of the samples obtained. It has been established that the optimal ratio of protein content (mg per g of carrier), total activity (in units per ml of solution) and specific activity (in units per mg of protein) is achieved when *N*-maleoylchitosan with a molecular weight of 200 kDa is used as a carrier matrix.

The resulting preparations of bromelain immobilized on *N*-maleoylchitosan can become the basis for solving a number of problems in biomedicine that arise when creating preparations of bactericidal, decongestant, antithrombic, and antiviral effects. Due to the combination of relatively inexpensive components, the method proposed by us is available for Russian laboratories and is promising for further application in industry.

**Keywords:** bromelain, *N*-maleoylchitosan, sorption immobilization, complexation, protease activity.

**Acknowledgments:** The work is partially funded by the program 'Prioritet-2030' of Sevastopol State University, strategic project №3 (*N*-maleoylchitosan synthesis and sorption immobilization of bromelain), 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 2020-2022, project No. FZGU-2020-0044 (FTIR spectroscopy and docking)

The FTIR data were obtained with the use of equipment of the Voronezh State University Research Core Center

**For citation:** Olshannikova S.S., Malykhina N.V., Lavlinskaya M.S., Sorokin A.V., Holyavka M.G., Lukin A.N., Vyshkvorkina Yu.M., Yudin N.E., Artyukhov V.G. Development of a method for the sorption immobilisation of bromelain on *N*-maleoylchitosan and the study of the structural features of the obtained complex. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2022. 22(3): 335-346. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9340>

## Введение

Природные полимерные материалы находят широкое применение в различных областях деятельности человека: они могут использоваться в создании систем доставки лекарственных средств [1], как матрицы для иммобилизации ферментов [2], как основы для косметических композиций [3], при создании филлеров для косметологии [4] и в прочих биомедицинских целях [5, 6].

Основными преимуществами натуральных материалов является их низкая токсичность, биосовместимость, неиммунногенность, возобновляемость сырья для их получения и его доступность [7]. Кроме того, стоит подчеркнуть, что значительная часть биомакромолекул, находящихся в водной среде, характеризуется высоким значением поверхностного заряда, позволяющего поддерживать стабильность образующейся коллоидной системы, необходимой для полноценного функционирования живого организма. Большая часть природных полимеров характеризуется отрицательными значениями поверхностного потенциала, в связи с чем на их фоне выделяется хитозан – модифицированный полисахарид, получаемый деацетилированием природного хитина [8]. Макромолекулы хитозана содержат стерически доступные первичные аминогруппы, благодаря чему в водных средах с кислыми значениями pH хитозан проявляет свойства поликатиона. Однако из-за особенностей строения хитозан не растворим в средах, pH которых превышает 6.5, что может ограничивать области его использования.

Химическая модификация, заключающаяся во введении гидрофильных групп,

может значительно расширить сферы применения такого уникального природного материала, как хитозан: широко описаны свойства карбоксиметилхитозана – водорастворимого производного полисахарида, содержащего одновременно как положительно, так и отрицательно заряженные функциональные группы. Кроме этого, отмечается, что карбоксиметилхитозан может использоваться для создания ожого- и ранозаживляющих препаратов и перевязочных материалов [9, 10], для концентрирования ионов металлов из растворов [11], в разработке инновационных упаковочных материалов, повышающих сроки хранения продуктов питания [12].

*N*-малеоилхитозан, водорастворимое производное хитозана, сохраняет все практически значимые свойства исходного вещества и может быть получен путем введения остатка малеиновой кислоты по свободной аминогруппе полисахарида. Взаимодействие протекает при комнатной температуре и для его осуществления не требуется дорогостоящих реактивов и оборудования. Однако при всех своих достоинствах, это соединение остается достаточно мало изученным. В литературе описаны возможности его использования в качестве добавки к различным наночастицам, обладающим потенциальным антибактериальным эффектом [13, 14]. Показано высокое сродство гелей на его основе к фибробластам кожи человека [15], а также возможность получения композиционных суперабсорбентов с высокой степенью набухания на его основе [16]. Однако практически полностью отсутствует информация о применении *N*-малеоилхитозана для получения

ферментных гибридных препаратов. Создание иммобилизованных форм ферментов позволяет расширить оптимумы каталитической активности последних и защитить их от негативного воздействия окружающей среды [17, 18].

Бромелин (КФ 3.4.22.4) – тиоловая эндопептидаза, выделяемая из *Ananas comosus* и состоящая из гликозилированной одноцепочечной молекулы с молекулярной массой 26 кДа. Он имеет довольно стабильную вторичную структуру и проявляет активность в диапазоне pH 7-10, при этом его активность необратимо теряется за пределами pH 10 [19-21]. Бромелин обладает рядом терапевтических свойств: улучшает биодоступность и снижает неблагоприятное воздействие различных антибиотиков, действует как иммуномодулятор, обладая антималярийным, противоотечным, антитромботическим, противовоспалительным и противовирусным действиями [22, 23].

В связи с вышесказанным, цель исследования заключалась в разработке методики сорбционной иммобилизации бромелина на *N*-малеоилхитозане с различными молекулярными массами и изучении структурных особенностей полученных комплексов.

### Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования был выбран бромелин из *Ananas comosus* (Sigma, США), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma, США), для синтеза *N*-малеоилхитозана был использован хитозан со средней молекулярной массой 600 кДа и степенью деацетилирования 0.85 (Биопрогресс, Россия).

Синтез *N*-малеоилхитозана осуществляли по следующей методике: для получения хитозана с различными молекулярными массами использовали кислотный гидролиз исходного полисахарида. Навеску хитозана массой 1 г растворяли в 100 см<sup>3</sup> 2%-ного водного раствора уксусной кислоты, после чего перенесли раствор в круглодонную колбу, снабженную

обратным холодильником, добавляли 50 см<sup>3</sup> 0.1 М водного раствора HCl и кипятили в течение 10 или 20 минут. После смесь охлаждали до комнатной температуры, раствор нейтрализовали водным раствором аммиака до слабощелочного значения pH. Полимер из реакционной массы выделяли осаждением в изопропиловый спирт, после чего промывали дистиллированной водой и этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы.

Фракционирование деструктированного хитозана проводили методом дробного растворения. Для этого смешивали 2%-ный водный раствор уксусной кислоты и ацетон в объемных соотношениях 0.1:0.9 – 0.9:0.1. Выделенный полимер сначала помещали в 100 см<sup>3</sup> растворяющей смеси наименьшей силы (содержащей 0.1 объемную долю раствора уксусной кислоты), интенсивно перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре, после чего отфильтровывали образовавшийся гель и помещали его в следующую растворяющую смесь, содержащую 0.2 объемной доли раствора уксусной кислоты. Процедуру повторяли со всеми растворяющими смесями. Фракционированные полимеры выделяли из фильтрата путем осаждения в изопропиловый спирт, осадок промывали этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы. Для дальнейших исследований выбиралась фракция, характеризующаяся наибольшим выходом продукта.

Молекулярные массы деструктированного хитозана определяли общепринятым вискозиметрическим методом с помощью вискозиметра Уббелодде в смеси водных растворов 0.3 М уксусной кислоты и 0.2 М ацетата натрия при 25°C. Из данных вискозиметрии с помощью уравнения Марка-Куна-Хаувинка-Сакурады вычисляли значения молекулярных масс:

$$[\eta] = K \times M^a,$$

где  $[\eta]$  – характеристическая вязкость, дл/г, рассчитанная из данных вискозиметрии,  $M$  – средневязкостная молекулярная масса полимера,  $K$  и  $\alpha$  – константы, равные  $82 \times 10^{-5}$  дл/г и 0.76 соответственно [16].

*N*-малеоилхитозан получали по следующей методике: навеску хитозана массой 1.6 г растворяли в  $100 \text{ см}^3$  2%-ного водного раствора уксусной кислоты и перемешивали до полного растворения хитозана. Затем растворяли 3 г малеинового ангидрида в  $50 \text{ см}^3$  этилового спирта и вносили в раствор хитозана. Смесь выдерживали 4 часа при комнатной температуре. Полимер из реакционной массы выделяли осаждением в 4-метил-2-пентанон, после чего промывали этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы.

Модификацию хитозана подтверждали с помощью метода ИК-спектроскопии. ИК-спектры регистрировали в диапазоне частот  $4000\text{-}400 \text{ см}^{-1}$  на спектрометре Bruker Vertex 70 с Фурье-преобразователем (Bruker Optics, Германия) методом нарушенного полного внутреннего отражения с шагом регистрации  $2 \text{ см}^{-1}$ . Образцы в виде тонких порошков перед регистрацией спектров выдерживали в вакууме при  $30^\circ\text{C}$  в течение суток. Степень замещения полученного полимера определяли титриметрически, согласно методике, представленной в работе [16].

Иммобилизация бромелина на матрице *N*-малеоилхитозана. К 1 г *N*-малеоилхитозана добавляли  $20 \text{ см}^3$  раствора фермента (в концентрации  $1 \text{ мг/см}^3$  глицинового буфера, pH 10.0), инкубировали в течение 2 часов. После окончания инкубации образовавшийся осадок промывали с помощью диализа против 50 мМ трис-HCl буфера (pH 7.5) через целлофановую мембрану с размером пор 25 кДа до отсутствия в промывных водах белка (контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при  $\lambda=280 \text{ нм}$ ).

Подготовку структуры бромелина [24] 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, буфера и лигандов. Центр молекулы и параметры бокса («ячейки») задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула протеазы полностью была внутри расчетной области пространства.

Модель структуры *N*-малеоилхитозана 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 молекуле полисахарида и ее протонирование/депротонирование осуществлялись автоматически в пакете MGLTools 1.5.6. Содержание белка в иммобилизованных препаратах бромелина определяли методом Лоури [25].

Метод определения протеолитической активности бромелина. Измерение протеолитической активности бромелина проводили по отношению к субстрату азоказеину (Sigma, США) [26]. К 50 мг образца добавляли 200 мкл трис-HCl буфера, pH 7.5, 800 мкл азоказеина (0.5% в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 7.5) и инкубировали 2 часа при  $37^\circ\text{C}$ . Далее добавляли 800 мкл ТХУ (5 %), инкубировали 10 минут при  $4^\circ\text{C}$ , затем центрифугировали в течение 3 мин при 11 700 g для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3% NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в 1 см кювете. Контрольная проба содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл ТХУ, 50 мг образца и 200 мкл трис-HCl буфера. За единицу каталитической активности принимали количество фермента, которое в

условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин. Удельную протеолитическую активность бромелина рассчитывали по формуле:

$$A = D \cdot 1000 / 120 / 200 / C,$$

где  $A$  – протеолитическая активность, мкМ/мин на 1 мг белка,  $D$  – оптическая плотность при 410 нм,  $C$  – концентрация белка в пробе, мг/см<sup>3</sup>, измеренная по методу Лоури, 120 – время инкубации в минутах, 200 – объем пробы, мкл, 1000 – коэффициент для пересчета в мкМ.

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

### Обсуждение результатов

Для подтверждения факта сорбционной иммобилизации молекул бромелина на  $N$ -малеоилхитозане были зарегистрированы и проанализированы ИК-спектры полученных образцов. На рис. 1 представлены ИК-спектры  $N$ -малеоилхитозана и его комплекса с бромелином. ИК-спектр полисахарида содержит следующие характеристические полосы поглощения: при 1031 и 1068 см<sup>-1</sup>, относящиеся к скелетным колебаниям пиранозных циклов и

содержащихся в них простозэфирных связей С-О-С, соответственно; при 1212 см<sup>-1</sup>, отвечающая валентным колебаниям связи С-ОН, при 1360 и 1394 см<sup>-1</sup>, отражающие симметричные и асимметричные колебания диссоциированных карбоксильных групп остатков малеиновой кислоты; при 1517 см<sup>-1</sup>, обусловленная валентными колебаниями первичной аминогруппы; при 1617 и 1666 см<sup>-1</sup>, описывающие валентные колебания карбонильных групп; при 2853 см<sup>-1</sup> и 2922 см<sup>-1</sup>, относящихся к валентным асимметричным колебаниям С-Н связей, и ряд полос при 3176, 3348 и 3491 см<sup>-1</sup>, отражающих колебания ассоциированных ОН-групп [16, 27, 28]. ИК-спектр комплекса полисахарида с бромелином содержит указанные выше полосы, кроме того, отмечается повышение их интенсивности, а также смещение максимумов некоторых из них. Например, понижение волнового числа полос, отвечающих колебаниям пиранозных циклов и простозэфирных связей с 1031 до 1023 см<sup>-1</sup> и с 1068 до 1060 см<sup>-1</sup>, соответственно. Подобные изменения в ИК-спектре свидетельствуют об ослаблении межсегментарных и

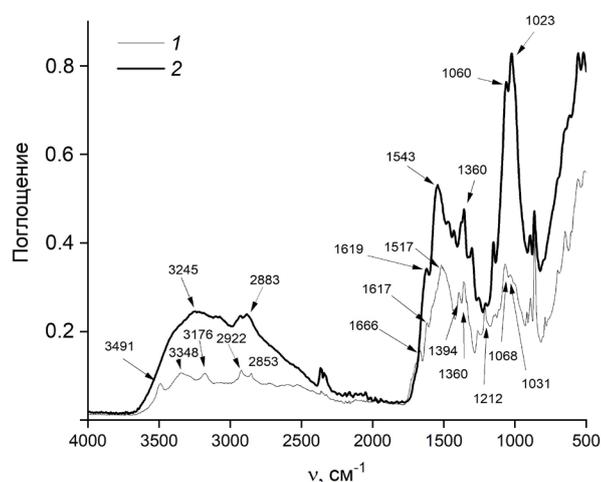


Рис. 1. ИК-спектры  $N$ -малеоилхитозана (1) и его комплекса с бромелином (2)  
Fig. 1. The IR-spectra of  $N$ -maleoylchitosan (1) and its complex with bromelain (2)

Таблица 1. Аминокислотные остатки бромелина, которые образуют связи и взаимодействия с *N*-малеоилхитозаном в ходе сорбционной иммобилизации фермента  
 Table 1. Amino acid residues of bromelain that form bonds and interactions with *N*-maleoylchitosan during sorption immobilisation of the enzyme

Аминокислотные остатки, формирующие	
водородные связи и длина связи	иные типы взаимодействий
Gln20, 2.90 Å Pro22, 3.19 Å Glu51, 2.86 Å Phe140, 3.10 Å Gln141, 3.24 Å Trp180, 2.96 Å Gly184, 3.23 Å Ile186, 2.89 Å	Ser16, Val17, Lys18, Asn19, Cys23, Gly24, Phe29, Ala33, Cys63, Asn137, Asn157, His158, Ala159, Val160, Thr161, Ala178, Lys179, Tyr185

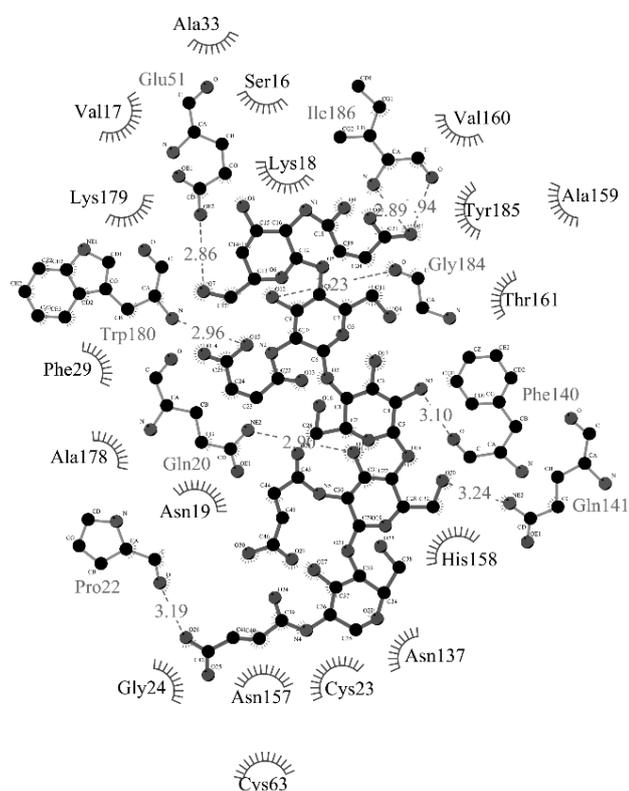


Рис. 2. Связи и взаимодействия между бромелином и *N*-малеоилхитозаном (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).

Fig. 2. Bonds and interactions between bromelain and *N*-maleoylchitosan (dotted lines show hydrogen bonds. bond lengths are given in Å).

межмолекулярных взаимодействий макромолекул полисахарида, что, по-видимому, обусловлено разрыхлением структуры *N*-малеоилхитозана из-за взаимодействия с бромелином. Повышение волнового числа наблюдается для полос, отвечающих колебаниям первичной аминогруппы (с 1517 до 1543 см<sup>-1</sup>), карбонильных групп

(с 1617 до 1619 см<sup>-1</sup>), метиленовых групп (с 2853 до 2883 см<sup>-1</sup>). Эти факторы указывают на образование комплекса между *N*-малеоилхитозаном и бромелином, а также на вовлечение перечисленных выше групп в процесс сорбционной иммобилизации. Таким образом, можно предположить, что взаимодействие энзима и полисахарида

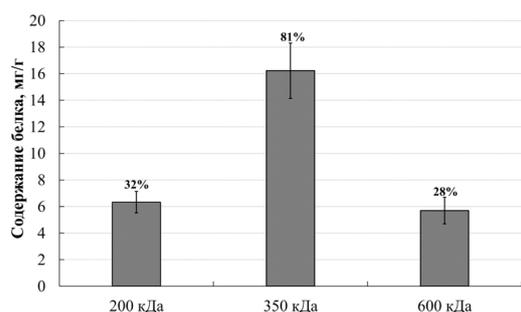


Рис. 3. Содержание белка (мг/г носителя) в комплексах бромелина с *N*-малеоилхитозаном. Отдельно указана эффективность сорбционной иммобилизации бромелина (по содержанию белка), выраженная в процентах сорбированного фермента от его количества в растворе в процессе иммобилизации, принятого за 100 %.

Fig. 3. Protein content (mg/g of the carrier) in the complexes of bromelain with *N*-maleoylchitosan. Separately, the efficiency of sorption immobilisation of bromelain (by protein content) is shown, expressed as a percentage of sorbed enzyme from its amount in solution during immobilisation, taken as 100%.

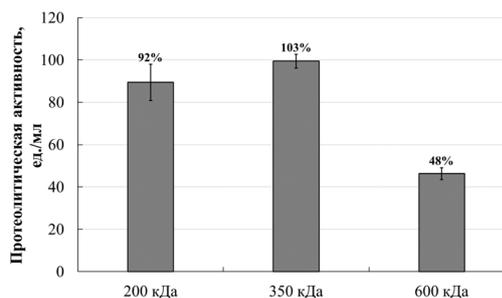


Рис. 4. Общая каталитическая активность (ед/см<sup>3</sup> раствора) комплексов бромелина с *N*-малеоилхитозаном. Отдельно указана эффективность сорбционной иммобилизации бромелина (по общей каталитической активности), выраженная в процентах сохранения протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к активности бромелина в растворе, принятой за 100 %.

Fig. 4. Total catalytic activity (units/ml of the solution) of bromelain complexes with *N*-maleoylchitosan. Separately, the efficiency of sorption immobilisation of bromelain (by total catalytic activity) is shown, expressed as a percentage of retained proteolytic activity of the enzyme after immobilisation in relation to the activity of bromelain in the solution, taken as 100%.

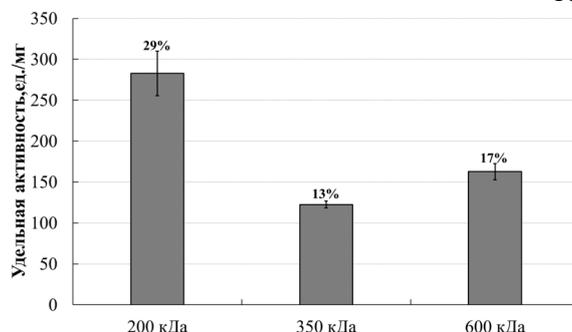


Рис. 5. Удельная каталитическая активность (ед/мг белка) комплексов бромелина с *N*-малеоилхитозаном. Отдельно указана эффективность сорбционной иммобилизации бромелина (по удельной каталитической активности), выраженная в процентах сохранения удельной протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к удельной каталитической активности бромелина в растворе, принятой за 100 %.

Fig. 5. Specific catalytic activity (units/mg of the protein) of bromelain complexes with *N*-maleoylchitosan. Separately, the efficiency of sorption immobilisation of bromelain (by specific catalytic activity) is shown, expressed as a percentage of retained specific proteolytic activity of the enzyme after immobilisation in relation to the specific catalytic activity of bromelain in the solution, taken as 100%.

обусловлено электростатическими и гидрофобными взаимодействиями, а также образованием водородных связей между компонентами.

Следующим этапом работы являлось изучение типов взаимодействий, энергии

связывания, аминокислотного состава поверхностей бромелина, взаимодействующего с носителем процессе сорбционной иммобилизации (табл. 1). Из рис. 2 видно, что связи и взаимодействия с *N*-малеоилхитозаном образуются в том



числе с участием аминокислотных остатков, расположенных вблизи активного центра фермента (Cys26 и His158), что, естественно, должно отразиться на активности полученных комплексов. Аффинность связывания бромелина с *N*-малеоилхитозаном составила  $-8.8$  ккал/моль.

Анализ содержания белка в препаратах показал, что наибольшее количество бромелина (в мг на г носителя) содержится в комплексах с *N*-малеоилхитозаном с молекулярной массой 350 кДа (рис. 3). Полученный результат, по-видимому, объясняется наибольшей стерической доступностью сорбционных центров указанного модифицированного хитозана для взаимодействия с бромелином. Общая активность бромелина (в ед на мл раствора) оказалась выше при его связывании с *N*-малеоилхитозаном с молекулярными массами 200 и 350 кДа (рис. 4). Наибольшую удельную активность показали образцы в комплексе с *N*-малеоилхитозаном с молекулярной массой 200 кДа (рис. 5).

Таким образом, оптимальное соотношение содержания белка (мг на г носителя), общей активности (в ед на мл раствора) и удельной активности (в ед на мг белка) выявлено при сорбционной иммобилизации бромелина на *N*-малеоилхитозане с молекулярной массой 200 кДа.

#### Список литературы/References

1. Sougata J., Subrata J. Functional Biomaterials. Springer. Singapore. 2022. 522 p.
2. Holyavka M., Faizullin Dzh., 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>

#### Заключение

Были синтезированы производные хитозана, а именно *N*-малеоилхитозан с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа. Предложена методика сорбционной иммобилизации бромелина на *N*-малеоилхитозане. Оптимальное соотношение содержания белка (мг на г носителя), общей активности (в ед на см<sup>3</sup> раствора) и удельной активности (в ед на мг белка) выявлено при формировании комплекса бромелина с *N*-малеоилхитозаном с молекулярной массой 200 кДа.

Полученные препараты бромелина и *N*-малеоилхитозана могут стать основой для решения ряда проблем в биомедицине, возникающих при создании препаратов бактерицидного, противоотечного, антитромботического и противовирусного действия.

#### 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.

3. Saha I., Rai V.K. Hyaluronic acid based microneedle array: Recent applications in drug delivery and cosmetology. *Carbohydr. Polym.* 2021; 267(118168): 14. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118168>
4. Huang Yu., Yu H., Wang L., Shen D., Ni Z., Ren Sh., Lu Ya., Chen X., Yang J., Hong Y. Research progress on cosmetic microneedle systems: Preparation, property and application. *Eur. Polym. J.* 2022; 163: 110942. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110942>
5. Slivkin D.A., Lapenko V.L., Safonova O.A., Suslina S.N., Belenova A.S. Chitosan dlya farmatsii i medicyny (Chitosan for pharmacy and medicine). *Vestnik VGU.*



- Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*. 2011; 2: 211-232. (in Russ.)
6. Varlamov V.P., Mysyakina I.S. Chitosan in biology, microbiology, medicine, and agriculture. *Microbiology*. 2018; 87(5): 712-715.
7. 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. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118427>
8. 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>
9. Yu N., Li Yu., Wang Ya., Xu H., Ye F., Fu Q. Healing effect of carboxymethyl chitosan-plantamajoside hydrogel on burn wound skin. *Burns*. 2022; 48(4): 902-914 <https://doi.org/10.1016/j.burns.2022.01.019>
10. Wei Q., Wang Ya., Wang H. et al. Photo-induced adhesive carboxymethyl chitosan-based hydrogels with antibacterial and antioxidant properties for accelerating wound healing. *Carbohydr. Polym.* 2022; 278: 119000. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.119000>
11. Ding Y., Liu D., Luo D., Sun X., Mei J., Wang Sh., Li Zh. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. *Colloid Surf A: Physicochem Engin Aspects*. 2022; 2022: 128576. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128576>
12. Liu X., Xue F., Li Ch., Adhikari B. Physicochemical properties of films produced using nanoemulsions stabilized by carboxymethyl chitosan-peptide conjugates and application in blueberry preservation. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022; 202: 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.186>
13. Long Y., Hu Sh., Lei P., Li Y. Preparation of green silver nanoparticles with high antibacterial ability using *N*-maleoylchitosan and montmorillonite. *Mat Lett*. 2022; 316: 132044. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2022.132044>
14. Hou X., Zhang W., He M., Lu Y., Lou K., Gao F. Preparation and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin grafted *N*-maleoyl chitosan nanoparticles for drug delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* 2017; 12(6): 558-568. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.007>
15. Zhu A., Pan Y., Liao T., Zhao F., Chen T. The synthesis and characterization of polymerizable and biocompatible *N*-maleic acyl-chitosan. *J. Biomed. Mat. Res. B: Appl. Biomat.* 2008; 85B (2): 489-495. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30970>
16. Sorokin A., Lavlinskaya M. Synthesis of the superabsorbents enriched in chitosan derivatives with excellent water absorption properties. *Polym. Bull.* 2022; 79: 407-427. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03521-9>
17. Salvesen G.S., Hempel A., Coll N.S. Protease signaling in animal and plant-regulated cell death. *FEBS J.* 2015; 283(14): 2577-2598. <https://doi.org/10.1111/febs.13616>
18. 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. *Pharm. Chem. J.* 2022; 55: 1240-1244. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02564-8>
19. Hikisz P., Bernasinska-Slomczewska J. Beneficial Properties of Bromelain. *Nutrients*. 2021; 13: 4313. <https://doi.org/10.3390/nu13124313>
20. 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. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020; 164: 4205-4217. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.030>
21. Holyavka M., Pankova S., Koroleva V. Vyshkvorkina Yu., Lukin A., Kondratyev



- M., Artyukhov V. Influence of UV radiation on molecular structure and catalytic activity of free and immobilized bromelain, ficin and papain. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2019; 201: 111681. <https://doi.org/10.1016/j.jphoto-biol.2019.111681>
22. Arefin P., Habib Sh., Arefin A., Arefin S. A review of clinical uses of Bromelain and concerned purification methods to obtain its pharmacological effects efficiently. *Int. J. Pharm. Res.* 2020; 1: 469-478. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2020.SP1.066>
23. Owoyele B.V., Bakare A.O., Ologe M.O. Review Article Bromelain: A Review of its Potential as a Therapy for the Management of Covid-19, Niger. *J. Physiol. Sci.* 2020; 35: 10-19.
24. Kasai M.R. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr. Polym.* 2007; 68: 477-488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>
25. 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)
26. 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>
27. Glazunov V.P., Odinokov S.E. ИК-спектроскопическое определение степени ацетилирования хитина (Determination of the Chitin Degree of Acetylation by IR spectroscopy), *Bioorganicheskaya Khimiya.* 1995; 21(11): 881-884. (in Russ.)
28. Lunkov A., Shagdarova B., Lyalina T., Dubinnyi M.A., Karpova N., Lopatin S., Il'ina A., Varlamov V. Simple method for ultrasound assisted «click» modification of azido-chitosan derivatives by CuAAC. *Carbohydr. Polym.* 2022; 282: 119109. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119109>

### Информация об авторах / Information about the authors

**С.С. Ольшаникова** – аспирант кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

**Н.В. Малыгина** – студент кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж

**М.С. Лавлинская** – к.х.н., старший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж; старший научный сотрудник НИЛ «Биоресурсный потенциал приморской территории», Севастопольский государственный университет; Севастополь

**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 НИЛ «Биоресурсный потенциал приморской территории», Севастопольский государственный университет; Севастополь

**S.S. Olshannikova** – postgraduate student, Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [Olshannikova@gmail.com](mailto:Olshannikova@gmail.com)

**N.V. Malykhina** – student, Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh

**M.S. Lavlinskaya** – PhD (Chem), Senior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh; Senior Researcher of Bioresource Potential of Seaside territory Laboratory, Sevastopol State University, Sevastopol, 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, Biophysics and Biotechnology Department, Voronezh State University, Voronezh; Junior Researcher, Bioresource Potential of Seaside territory Laboratory, Sevastopol State University, Sevastopol, e-mail: [andrew.v.sorokin@gmail.com](mailto:andrew.v.sorokin@gmail.com)



**М.Г. Холявка** – д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии, старший научный сотрудник кафедры биохимии и физиологии клетки Воронежский государственный университет, Воронеж; профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета, Севастополь;

**А.Н. Лукин** – к.ф.-м.н., инженер Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета, Воронежский государственный университет, Воронеж;

**Ю.М. Вышкворкина** – студентка, Московский физико-технический институт, Долгопрудный;

**Н.Е. Юдин** – магистрант обучения кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет, Воронеж;

**В.Г. Артюхов** – д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии, старший научный сотрудник кафедры биохимии и физиологии клетки Воронежский государственный университет, Воронеж.

**M.G. Holyavka** – Ph.D. (biology), professor, Biophysics and Biotechnology Department, senior researcher of Biochemistry and Cell Physiology Department, Voronezh State University, Voronezh, Professor of Physics Department, Sevastopol State University, Sevastopol, e-mail: [holyavka@rambler.ru](mailto:holyavka@rambler.ru)

**A.N. Lukin** – PhD (physics), engineer of Voronezh State University Research Core Center, Voronezh State University, Voronezh;

**Yu. M. Vyshkvorkina** – student of Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny;

**N.E. Yudin** – master student, Department of Polymer Science and Colloid Chemistry, Voronezh State University, Voronezh;

**V.G. Artyukhov** – Ph.D. (biology), professor, Head of the Biophysics and Biotechnology Department, senior researcher of Biochemistry and Cell Physiology Department, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: [artyukhov@bio.vsu.ru](mailto:artyukhov@bio.vsu.ru)

*Статья поступила в редакцию 25.04.2022; одобрена после рецензирования 15.06.2022; принята к публикации 17.06.2022.*

*The article was submitted 25.04.2022; approved after reviewing 15.06.2022; accepted for publication 17.06.2022.*