**МИНОБРНАУКИ РОССИИ**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
**(ФГБОУ ВО «ВГУ»)**

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по науке, инновациям
и цифровизации ВГУ
Д.В. Костин

«28» ноября 2024 г.

УДК 541.64
Коды ГРНТИ 31.25.15; 34.17.15

# ОТЧЕТ
# О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ ПОЛИСАХАРИД-БЕЛОК ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ – ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ РАСТИТЕЛЬНЫЕ ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕАЗЫ С ПОВЫШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ И ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Руководитель темы:
доктор биологических наук, доцент М.Г. Холявка

Воронеж 2024

# СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:

д.б.н., доц. М.Г. Холявка
(весь отчет)

Исполнители темы:

к.х.н. М.С. Лавлинская
(весь отчет)

к.б.н. А.В. Сорокин
(весь отчет)

## Реферат

Отчет 38 с., 15 рис., 3 табл., 24 источника.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ, ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕАЗЫ, КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ, ПЕРИОД ПОЛУИНАКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТОВ, КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

В настоящем отчете исследованы свойства водных растворов привитых сополимеров хитозана и поли-*N*-винилпирролидона: размер и заряд частиц, архитектура образуемых макромолекулами агрегатов. Получены комплексные препараты бромелина, папаина и фицина с привитыми сополимерами, определена их протеазная активность и период полуинактивации. Установлено, что при образовании комплексных препаратов удается сохранить до 100 % активности ферментов и повысить их период полуинактивации до ~ 12 раз. Исследование особенностей взаимодействия привитых сополимеров и ферментов методами ИК-спектроскопии и молекулярного докинга показало, что молекула модифицированного полисахарида локализуется в «каталитическом кармане» глобул ферментов, а также непосредственно взаимодействует с аминокислотными остатками, образующими активный центр ферментов. По-видимому, эти взаимодействия приводят к повышению стабильности ферментов и некоторому снижению протеазной активности. Со стороны привитого сополимера взаимодействие, в первую очередь – образование водородных связей, осуществляется посредством гидроксильных групп пиранозных циклов углеводного остова сополимера.

Полученные результаты перспективны для практического применения в пищевых технологиях.

**Оглавление**

## Введение

Иммобилизация ферментов – распространенный подход, используемый для модуляции их практически значимых свойств, в первую очередь – стабильности, а также для придания возможности многократного применения довольно дорогостоящих биокатализаторов. На настоящем этапе развития энзимологии, биотехнологии и биофизики не выработана единая концепция, позволяющая выявить оптимальный носитель для определенного класса или вида фермента, что приводит к необходимости реализации значительного количества экспериментальной работы.

С уверенностью можно сказать, что используемое в качестве подложки для фермента соединение должно быть способно взаимодействовать или непосредственно с белковой глобулой энзима, или же с сшивающим агентом, с помощью которого осуществляется ковалентное присоединение фермента к поверхности. В связи с этим, критически важным становится исследование свойств самого носителя, таких как морфология и строение поверхности, поведение его в водном растворе (размер частиц, их архитектура и т.д.) в случае иммобилизации путем комплексообразования, а также особенностей взаимодействия в системе фермент-носитель: включаются ли аминокислотные остатки, образующие активный центр, в образование связей с носителей, как изменяется вторичная и третичная структура белка в результате этого процесса и др.

В связи с этим на текущем этапе работы для выяснения перспектив использования привитых сополимеров хитозана и поли-*N*-винилпирролидона (ХТЗ-ВП) в качестве носителей для цистеиновых протеаз бромелина (КФ 3.4.22.32/33), папаина (КФ 3.4.22.2) и фицина (КФ 3.4.22.3) нами были осуществлены следующие этапы:

1 Исследование свойств привитых сополимеров хитозана и поли-*N*-винилпирролидона различными физико-химическими методами (просвечивающая электронная микроскопия, лазерный допплеровский микроэлектрофорез, динамическое рассеяние света) для определения размеров

частиц сополимеров в водном растворе, их электрокинетического потенциала, формы и архитектуры частиц. Оценка изменения величины вязкости привитых сополимеров по сравнению с немодифицированным хитозаном.

2 Получение комплексов фицина, папаина и бромелина с модифицированными полисахаридами, обладающих протеолитической активностью не менее 30 % от величины активности свободных ферментов и временем полуинактивации, превышающим таковой для протеаз в растворе.

3 Изучение процессов комплексообразования привитых сополимеров хитозана и поли-*N*-винилпирролидона с цистеиновыми протеазами методами ИК-спектроскопии и гибким молекулярным докингом, включая оценку изменений вторичной структуры ферментов в результате взаимодействия с модифицированным полисахаридом.

# 1 Исследование свойств водных растворов привитых сополимеров хитозана и поли-*N*-винилпирролидона

Свойства водных растворов привитых сополимеров ХТЗ-ВП исследовали методами динамического светорассеяния и лазерного допплеровского микроэлектрофореза на приборе Malvern ZetaSizer ZS (Malvern PanAnalytical Ltd., США), оснащенном He/Ne-лазером мощностью 4 мВт с λ=632.8 нм, угол рассеяния – 173 ° при 25 °С. Для исследования готовили 0.05 % масс. растворы хитозана 350 кДа и сополимеров в буферном растворе, содержащем равные объемы 0.25 М раствора уксусной кислоты и 0.25 М ацетата натрия, или в дистиллированной воде. Перед съемкой образцов растворы отфильтровывались через нейлоновую мембрану с диаметром пор 0.45 мкм, после чего 0.5 мл полученного фильтрата помещали в полистирольную кювету шириной 1 см и осуществляли регистрацию значений гидродинамических диаметров $D_h$.

Определение электрокинетического (дзета, ζ) потенциала осуществляли с использованием указанного выше оборудования и приборов в кюветах, оснащенных золотыми электродами.

Приведенные в работе величины представляют собой среднее значение, полученное из трех независимых экспериментов (не менее 20 сканов в каждом эксперименте), ± стандартное отклонение.

В таблице 1 представлены значения исследуемых параметров для хитозана 350 кДа и привитых сополимеров на его основе.

Таблица 1.

Некоторые характеристики водных растворов хитозана и его привитых сополимеров с поли-*N*-винилпирролидоном

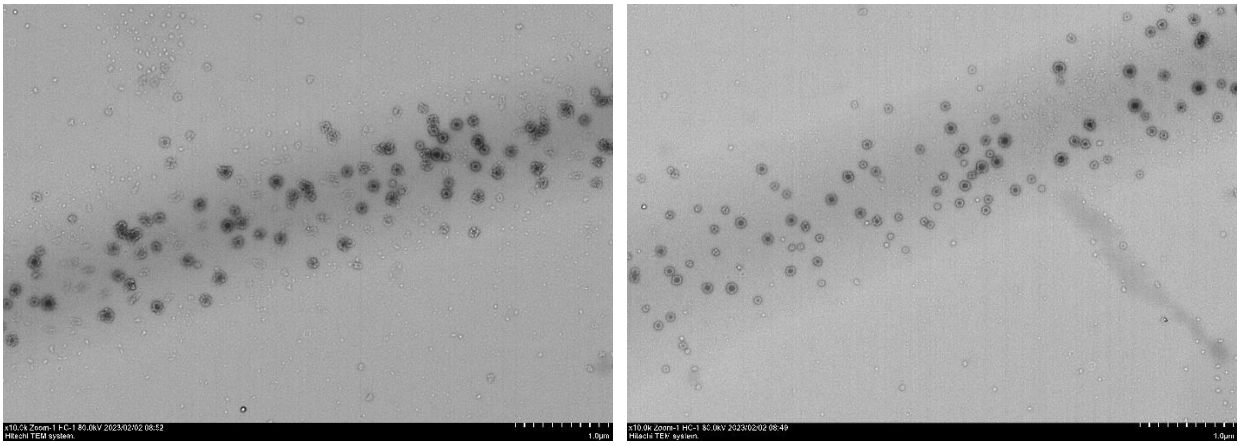
| Полимер | Содержание ПВП, % масс. | *Mw* ПВП | $D_h$, нм, буфер | $D_h$, нм, вода | Поли-дисперсность, буфер | ζ-потенциал, мВ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ХТЗ 350 кДа | - | - | 216±37 | - | 0.642 | 25±6 |
| ХТЗ-ВП-1 | 43 | 8 500 | 112±15 | 167±14 | 0.879 | 14±2 |
| ХТЗ-ВП-2 | 51 | 10 000 | 94±9 | 189±16 | 0.984 | 12±3 |
| ХТЗ-ВП-3 | 24 | 8 000 | 151±13 | 136±11 | 0.796 | 19±2 |

Как видно из полученных данных, частицы хитозана в исследуемом

растворе представляют собой ассоциаты нескольких макромолекул. Этот вывод обусловлен как значением гидродинамического диаметра частиц, так и значением параметра полидисперсности, указывающим на образование неравномерно распределенных по размерам частиц, содержащих в своем составе либо макромолекулы с различной молекулярной массой, либо их различное количество. Полученный результат достаточно ожидаем и хорошо согласуется с представленными в литературе данными о склонности полисахаридных молекул к самоассоциации [1–3].

Результаты динамического светорассеяния для привитых сополимеров в ацетатном буфере, указывают на то, что их частицы в растворе также представляют собой агломераты нескольких макромолекул. Введение боковых цепей ПВП приводит к уменьшению значений гидродинамических диаметров, при этом, чем больше содержание звеньев привитого синтетического полимера, тем ярче выражен этот эффект. По-видимому, это связано с высаливающим действием электролитов, что приводит к сжатию полимерных цепей и уменьшению размеров агрегатов, т.к. при осуществлении эксперимента в дистиллированной воде наблюдается обратная зависимость. Таким образом, сополимеры являются pH-чувствительными. Отдельно стоит отметить, что для всех синтезированных сополимеров значения параметра полидисперсности более приближены к единице по сравнению с величиной этого параметра для хитозана. Этот факт указывает на более равномерное распределение частиц по размерам в водном растворе.

Данные просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) достаточно хорошо согласуются с результатами исследования методом динамического светорассеяния. ПЭМ-снимки получали с использованием просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7700 (Hitachi Ltd., Япония). Образцы сополимеров для исследования растворяли в дистиллированной воде, получая 0.05 % масс. раствор, затем 10 мкл раствора помещали на медную сетку диаметром 3 мм, покрытую формваром и углеродом, и оставляли на 24 часа для высушивания. Результаты исследования представлены на рис. 1.



А Б

**Рис. 1.** ПЭМ-изображения частиц сополимеров ХТЗ-ВП-2 (А) и ХТЗ-ВП-3 (Б).

Как видно из рис. 1, частицы обоих сополимеров представляют собой равномерно распределенные по размерам агрегаты типа «ядро-оболочка». Однако, частицы сополимера ХТЗ-ВП-2 характеризуются большим размером по сравнению с образцом ХТЗ-ВП-3.

Исследование зависимости величины электрокинетического потенциала от состава привитого сополимера (табл. 1) показало, что его значение снижается с возрастанием доли привитых цепей ПВП в макромолекулах сополимеров. Известно, что хитозан проявляет поликатионные свойства в средах с pH < 6.5. Настоящее исследование проводилось в ацетатном буфере с pH ~ 4.5, т.е. в таких условиях аминогруппы хитозана находятся в протонированном состоянии ($-NH_3^+$), что обуславливает достаточно высокое положительное значение ζ-потенциала немодифицированного хитозана. В составе лактамного кольца звеньев поли-*N*-винилпирролидона присутствует карбонильная группа, на атоме кислорода которой образуется частичный отрицательный заряд, обеспечивающий аналогичный тип заряда всей макромолекулы ПВП. Таким образом, с увеличением содержания отрицательно заряженных звеньев привитого синтетического полимера снижается суммарный положительный заряд макромолекул, что обусловлено как введением отрицательно заряженных лактамных циклов, так и частичным экранированием аминогрупп хитозана привитой синтетической цепью ПВП.

Этот результат хорошо согласуется с литературными данными [4], а также подтверждает эффективность модификации хитозана.

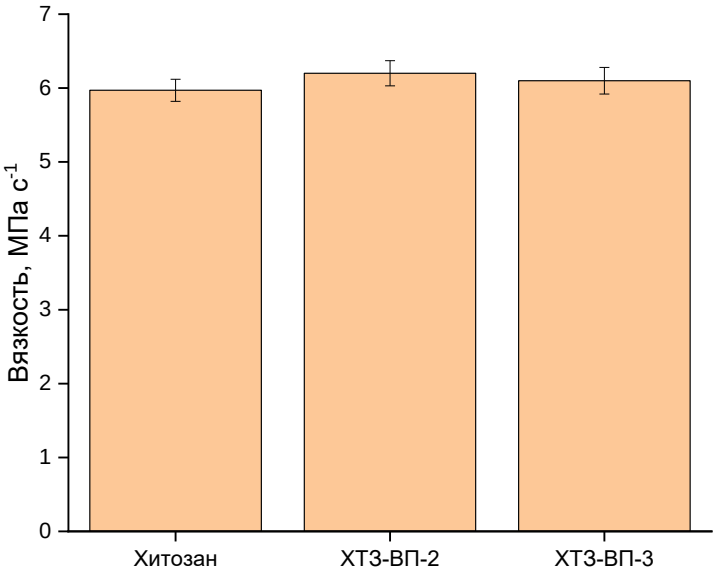



**Рис. 2.** Величины вязкости 0.4 %-ных растворов хитозана и его привитых сополимеров с поли-*N*-винилпирролидоном.

На рис. 2 представлено влияние прививки цепей ПВП на вязкость растворов хитозана и его сополимеров. Измерения вязкости 0.4 % масс. растворов в 2 % масс. уксусной кислоте для хитозана или в дистиллированной воде для привитых сополимеров проводили при 20 °C на вибровискозиметре AND-SV-1A (AND Company, Токио, Япония) в термостатируемой кювете. Каждый образец измерялся трижды, значение вязкости представлялось как среднее значение ± стандартное отклонение. Как видно из полученных данных, прививка цепей поли-*N*-винилпирролидона практически не оказывает влияния на вязкость сополимеров, что обусловлено низкими значения молекулярных масс привитых цепей (табл. 1). Кроме того, следует отметить, что значения вязкости, близкие по величине к показателям немодифицированного хитозана, свидетельствуют о том, что хитозан практически не деструктируется в процессе синтеза сополимеров, что указывает на грамотный выбор и состав инициирующей системы.

В ходе проведенных исследований установлено, что частицы привитых сополимеров в водном растворе представляют собой агрегаты нескольких макромолекул типа «ядро-оболочка», размер которых уменьшается с увеличением содержания звеньев ПВП в буферном растворе и возрастает в дистиллированной воде. Таким образом, полученные сополимеры являются стимулочувствительными: их свойства зависят не только от количественного состава, но и от ионной силы раствора. Синтезированные продукты характеризуются положительным значением электрокинетического потенциала, величина которого снижается с возрастанием доли ПВП в макромолекулах. Прививка боковых цепей не оказывает существенного влияния на вязкость раствора хитозана, что обусловлено низкими молекулярными массами боковых цепей.

## 2 Получение комплексов фицина, папаина и бромелина с привитыми сополимерами хитозана и поли-*N*-винилпирролидона

Цистеиновые протеазы находят широкое применение в различных областях деятельности человека, среди которых особо следует выделить биомедицину – создание антибактериальных и ранозаживляющих композиций [5–7], производство биоактивных пептидов [8], в стоматологии для неинвазивной терапии кариеса и других заболеваний полости рта [9], для лечения заболеваний ЖКТ связанных с непроходимостью пищевых путей [10]; а также пищевые биотехнологии. В указанной сфере цистеиновые протеазы применяются для тендеризации белковых продуктов [11], повышения органолептических характеристик муки [12] и напитков [13], производства детских пищевых смесей [14], в создании «умных» упаковок для продления сроков хранения продуктов питания [15]. Однако особенности строения цистеиновых протеаз – склонность к автолизу и легко окисляемый тиольный фрагмент в активном центре – требуют модулирования их свойств, в первую очередь пролонгацию периода полуинактивации. Для достижения этой цели нами проведена иммобилизация ферментов методом комплексообразования с использованием привитых сополимеров хитозана и поли-*N*-винилпирролидона в качестве носителей. Для экспериментов были выбраны сополимеры с наибольшим и наименьшим содержанием звеньев привитого поли-*N*-винилпирролидона, т.е. ХТЗ-ВП-2 и ХТЗ-ВП-3.

Условия иммобилизации определялись нами экспериментально путем варьирования соотношения фермента и носителя, времени контакта, состава и pH буферного раствора [16]. Условия иммобилизации играют ключевую роль в достижении практически значимых свойств ферментов, поскольку, например, ориентацию их молекул на носителе можно изменить, варьируя pH среды, в которой протекает процесс [17].

К навеске привитого сополимера массой 1 г добавляли 20 мл раствора фермента с концентрацией 1 мг/мл, что соответствует 20 мг фермента на 1 г носителя, также содержащего $8\times10^{-4}$ моль цистеина для активации фермента.

После инкубации в течение 4 ч при 25 °С и постоянном перемешивании, полученный препарат промывали 60 мл того же буфера до исчезновения в промывных водах сигнала при длине волны 280 нм. Для иммобилизации использовали следующие буферные системы: для бромелина использовали 0.05 М трис-глициновый буфер с pH 9.0; для папаина – 0.05 М боратный буфер с 0.1 М KCl, pH 10.0; для фицина использовали 0.05 М глициновый буфер с pH 8.6.

Определение содержания белка в иммобилизованных препаратах бромелина, папаина и фицина проводили по модифицированному методу Лоури. Модификация заключалась в следующем: на первом этапе разрушались связи между матрицей сополимера и молекулами ферментов. Для этого иммобилизованный фермент обрабатывали раствором К, Na-тартрата (в концентрации 20 мг/мл или 0.7 М), приготовленного в 1 М NaOH, при 50 °С в течение 10 мин. В этих условиях фермент полностью десорбируется [18].

Протеолитическую активность оценивали путем измерения оптической плотности продуктов гидролиза азоказеина (Sigma, США) при 410 нм по методике, описанной в [19] с небольшими модификациями. Исследуемый образец растворяли в 200 мкл 0.05 М Трис-HCl буфера с pH 7.5, смешивали с 800 мкл раствора азоказеина (0.5 %, в том же буфере) и инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. Затем добавляли 800 мкл 5 %-ной трихлоруксусной кислоты и после 10-минутной инкубации при 4 °С выпавший осадок негидролизованного азоказеина удаляли центрифугированием в течение трех минут на скорости 13 000 об/мин. Полученный супернатант объемом 1200 мкл смешивали с 240 мкл 1 М раствора NaOH и измеряли его оптическую плотность при 410 нм. Образец сравнения готовили аналогичным образом, но трихлоруксусную кислоту добавляли перед внесением фермента. Активность выражали в мкМ/мин×мг. В процессе измерения активности свободный фермент, т.е. белок, в растворе отсутствовал.

Все эксперименты проводились не менее чем в восьмикратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью

программного пакета «Stadia 8.0 (Professional)». Статистическую значимость различий значений контрольных и экспериментальных данных определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента ($p < 0.05$), поскольку все результаты характеризовались нормальным распределением.

Период полуинактивации ферментов, $t_{1/2}$, рассчитывали графически с помощью ПО «Origin Pro 2019b» путем определения значения величины зависимости активности фермента от времени инкубации в 0.05 М Трис-HCl буфере с pH 7.5 при 37 ˚C, выраженной в процентах по отношению к контролю, при пересечении прямой, соответствующей 50 % активности.

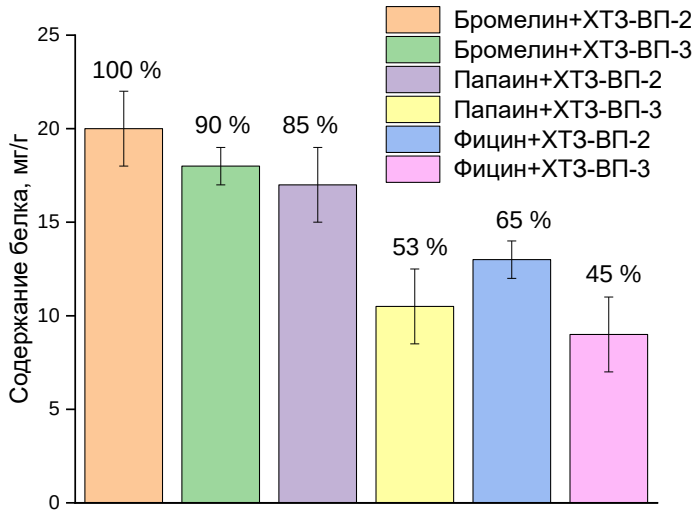


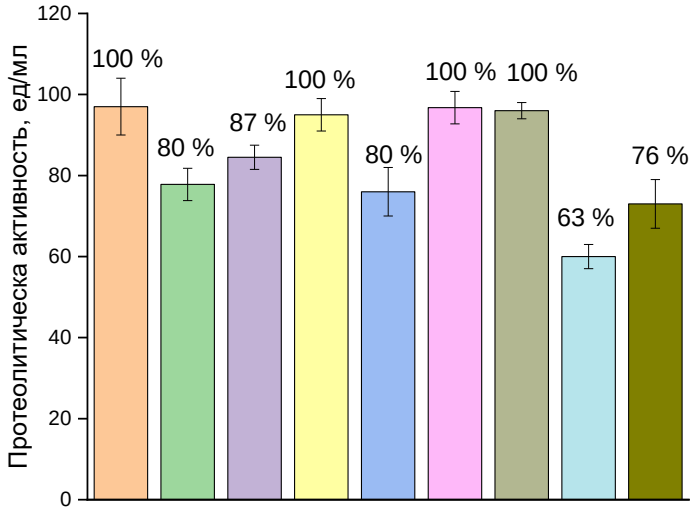

**Рис. 3.** Содержание белка, мг/г носителя, в препаратах бромелина, папаина и фицина с привитыми сополимерами хитозана. Указан выход комплексообразования по белку, выраженный в процентах сорбированного фермента от его количества в растворе в процессе взаимодействия, принятого за 100%.

На рис. 3 представлены значения содержания белка в комплексах цистеиновых протеаз с привитыми сополимерами хитозана. Как видно из представленных данных, наибольшая эффективность сорбции белка наблюдается для сополимера, характеризующегося наибольшим размером частиц в водной среде и содержащего наибольшее количество звеньев привитого поли-*N*-винилпирролидона, что указывает на их вклад в процесс

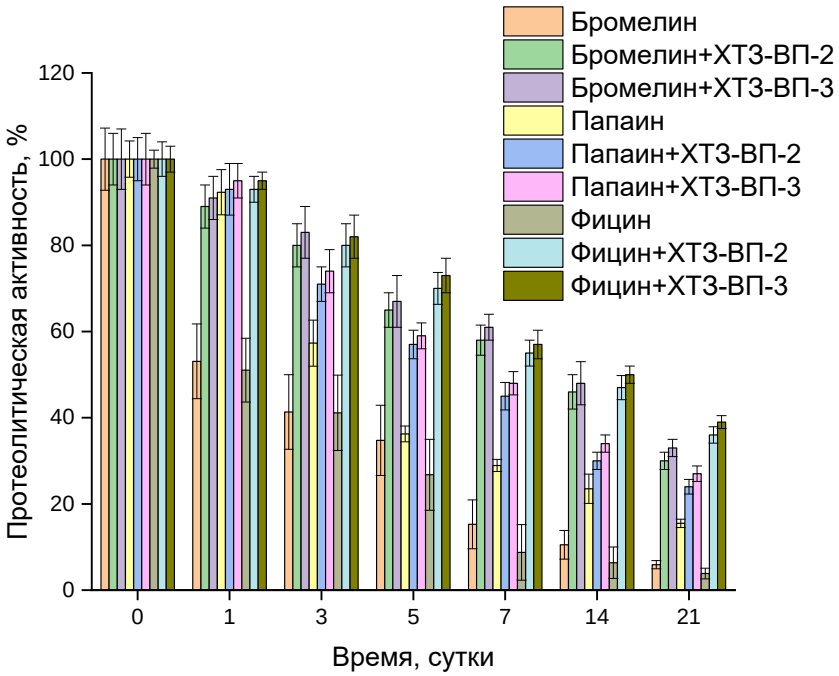
взаимодействия. Для бромелина достигаются наивысшие значения содержания белка в комплексе: 20 и 18 мг/г для сополимеров ХТЗ-ВП-2 и ХТЗ-ВП-3 соответственно, для фицина – наименьшие: 13 и 9 мг/г в тех же условиях.

На рис. 4А представлены результаты исследования протеолитической активности препаратов цистеиновых протеаз. Прежде всего стоит отметить, что полученные комплексы сохраняют не менее 63 % от активности свободных ферментов, что, безусловно, подчеркивает высокие перспективы применения полученных комплексов в пищевой промышленности. Согласно традиционным биотехнологическим представлениям, иммобилизацию фермента можно считать экономически выгодной и обоснованной, если сохраняется не менее 30 % от активности свободного фермента. В нашем же случае это значение превышено более чем в два раза. Наибольший процент активности сохраняется в случае взаимодействия папаина с сополимером ХТЗ-ВП-3: в рассматриваемом случае не происходит статистически достоверного снижения активности фермента. В целом, для сополимера ХТЗ-ВП-3, содержащего меньший процент звеньев привитого поли-*N*-винилпирролидона, наблюдается сохранение более высокого процента активности. Исследуемые протеазы можно выстроить в следующий ряд по убыванию активности в полученных комплексах: папаин> бромелин> фицин.

Другим не менее важным параметром, определяющим возможность практического применения ферментного препарата, является его стабильность при хранении, т.е. способность сохранять каталитическую активность во времени. На рис. 4Б представлены результаты исследования степени сохранения каталитической активности от времени при инкубации при 37 ˚С в 0.05 М Трис-HCl буфере с pH 7.5.




**А**




**Б**

**Рис. 4. А**: общая каталитическая активность, ед/мл раствора комплексов бромелина, папаина и фицина с привитыми сополимерами хитозана. Указана также эффективность комплексообразования ферментов (по общей каталитической активности), выраженная в процентах сохранения протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к активности ферментов в растворе, принятой за 100 %. **Б**: остаточная каталитическая активность ферментов после инкубации образцов при 37 °С в процентах от первоначального уровня. Обозначения для обеих диаграмм приведены на рис. 4Б.

Для свободных бромелина и фицина наблюдается значительное снижение каталитической активности, а именно на 49–47 %, уже в течение первых суток инкубации, в то время как их комплексы сохраняют до 95 % активности. В дальнейшем эта тенденция продолжает усиливаться и к третьим суткам инкубации папаин проявляет ~57 % активности, фицин и бромелин – не более 42 %. В то же время комплексные препараты сохраняют до 83 % активности. Наиболее ярко выраженной разница в сохранении активности становится на 14 и 21 сутки инкубации: свободные ферменты проявляют не более 23 и 15 % активности соответственно, а их иммобилизованные формы – до 50 и 39 % соответственно.

Важным количественным параметром, характеризующим стабильность фермента или его комплекса является период полуинактивации – временной интервал, в течение которого биокатализатор теряет половину своей активности. На рис. 5 представлены результаты графического определения периода полуинактивации из данных по исследованию стабильности цистеиновых протеаз и их комплексов с привитыми сополимерами хитозана и поли-*N*-винилпирролидона.

Результаты обработки экспериментальных данных и численные значения периода полуинактивации ферментов и их комплексов представлены в табл. 2. Взаимодействие исследуемых ферментов с привитыми сополимерами хитозана и поли-*N*-винилпирролидона приводит к увеличению величины $t_{1/2}$ до ~8.5 раз для бромелина, до ~ 2 раз для папаина и до ~ 12 раз для фицина. При этом наибольшее повышение параметра достигается в случае использования сополимера с наименьшим содержанием звеньев привитого поли-*N*-винилпирролидона, а наибольший эффект наблюдается для фицина – фермента, с наименьшим значением $t_{1/2}$ для свободной формы.

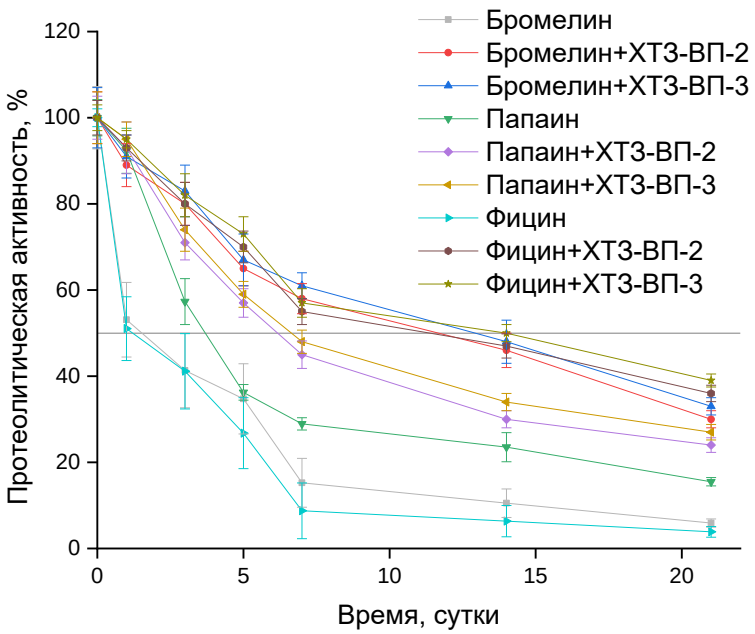



**Рис. 5.** Графическое определение периода полуинактивации бромелина, папаина, фицина и их комплексов с привитыми сополимерами хитозана и поли-*N*-винилпирролидона.

Таблица 2.

Величины периодов полуинактивации цистеиновых протеаз и их комплексов с привитыми сополимерами хитозана и поли-*N*-винилпирролидона

| № п/п | Фермент/Препарат | Период полуинактивации, $t_{1/2}$, сутки |
|---|---|---|
| 1 | Бромелин | 1.53 |
| 2 | Бромелин+ХТЗ-ВП-2 | 11.68 |
| 3 | Бромелин+ХТЗ-ВП-3 | 12.95 |
| 4 | Папаин | 3.69 |
| 5 | Папаин+ХТЗ-ВП-2 | 6.18 |
| 6 | Папаин+ХТЗ-ВП-3 | 6.65 |
| 7 | Фицин | 1.18 |
| 8 | Фицин+ХТЗ-ВП-2 | 11.38 |
| 9 | Фицин+ХТЗ-ВП-3 | 14.01 |

Таким образом, в результате проведенного исследования нами получены комплексы цистеиновых протеаз бромелина, фицина и папаина, сохраняющие более 63 % протеолитической активности ферментов и повышающие период их полуинактивации до ~ 12 раз. Отдельно стоит отметить, что синтезированные привитые сополимеры показали себя как эффективные

сорбенты для рассматриваемых ферментов, способные удерживать в исследуемом диапазоне концентраций до 100 % вносимого фермента. На основании сказанного выше становится очевидным, что использование в пищевых биотехнологиях полученных ферментных препаратов более экономически и технически целесообразно, чем применение их свободных форм.

## 3 Изучение особенностей процессов комплексообразования привитых сополимеров хитозана и поли-*N*-винилпирролидона с цистеиновыми протеазами

Для интерпретации результатов изменения каталитической активности и стабильности ферментов, представленных в п. 2, нами были изучены особенности их взаимодействия с привитыми сополимерами методами молекулярного докинга и ИК-спектроскопии.

Важнейшим методом, детализирующим взаимодействия белковых макромолекул вплоть до номера аминокислотного остатка в последовательности, является гибкий молекулярный докинг. Благодаря его применению можно получить визуализацию комплекса белка, отражающую топологию и положение лиганда относительно активного центра фермента. Кроме того, результатом *in silico* расчета является тип взаимодействия, в который вступает тот или иной аминокислотный остаток макромолекулы белка [20, 21].

Расчеты для *in silico* исследования осуществляли с использованием трехмерных структур бромелина (PDB ID: 1W0Q, https://www.rcsb.org/structure/1W0Q), папаина (PDB ID: 9PAP, https://www.rcsb.org/structure/9PAP) и фицина (PDB ID: 4YYW, https://www.rcsb.org/structure/4YYW) в программном пакете Autodock Vina (https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit/). Подготовку структур для докинга выполняли по стандартной схеме, описанной авторами пакета на сайте: из входных PDB-файла были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя, буфера и прочих структур, ковалентно не связанных с белком. Центр молекулы и параметры бокса («ячейки») задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула протеазы полностью была внутри расчетной области пространства.

Модели структур привитых сополимеров хитозана с поли-*N*-винилпирролидоном были нарисованы в молекулярном конструкторе HyperChem (http://www.hypercubeusa.com/), последовательно оптимизированы 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. Расстановку зарядов на молекулах полисахаридов и их протонирование/депротонирование проводили автоматически в пакете MGLTools 1.5.6.

На рис. 6–8 представлена топология комплексов глобула фермента – привитой сополимер хитозана с поли-*N*-винилпирролидоном. Исследуемые ферменты относятся к близкородственным и имеют как схожие аминокислотные последовательности, так и их организацию в пространстве. Они представляют собой полипептидную цепь, свернутую в глобулу, в которой отчетливо выделяются два домена: L-домен, содержащий три α-спирали (αL1, αL2, αL3), и R-домен, формируемый β-складчатостью и одной α-спиралью в случае бромелина или двумя α-спиралями у фицина и папаина (αR1, αR2 и βR). На их стыке образуется полость («каталитический карман»), в которой расположен активный центр фермента, включающий остаток цистеина, входящий в состав αL1-спирали, и остаток гистидина, относящийся к βR-складчатости. Акт катализа осуществляется за счет нуклеофильной атаки депротонированного тиола цистина на карбонил субстрата, азольный цикл гистидина при этом способствует диссоциации SH-группы. Результаты *in silico* исследования показывают, что для всех исследуемых ферментов молекула полисахарида локализуется в «каталитическом кармане». Этим фактом может быть объяснено снижение активности ферментов в комплексных препаратах, так как объемный лиганд может затруднять диффузию субстрата и продуктов гидролиза к активному центру.

Более детализированное исследование процессов взаимодействия (рис. 9–11, табл. 3) указывает также на тот факт, что аминокислотные остатки активных центров ферментов непосредственно участвуют во взаимодействии с сополимером: в случае папаина и фицина происходит связывание водородной связью гистидина, а цистеин бромелина вступает в ионные взаимодействия. Полученные результаты хорошо согласуются с

экспериментальными данными по исследованию протеолитической активности ферментов: для бромелина, аминокислотные остатки из активного центра которого образуют только слабые ионные взаимодействия, сохраняется высокое значение активности, в то время как для фицина, активный центр которого связан более прочной водородной связью, наблюдается большее снижение каталитической активности. Механизм катализа папаина несколько отличается от описанного выше: известно, что тиольная группа его активного центра способна диссоциировать без участия гистидина еще до начала акта катализа [22]. Поэтому связывание His159 водородной связью не оказывает значительного влияния на активность этой протеазы, и в случае комплексообразования с сополимером ХТЗ-ВП-3 сохраняется практически 100 % активности свободного фермента.

Отдельно стоит отметить, что водородные связи, характеризующиеся самой высокой энергией из всех взаимодействий, возникающих в исследуемых системах, образуются преимущественно за счет углеводного остова сополимера. Кроме того, необычно образование достаточно большого количества Н-связей (11 шт) молекулой фицина, в том числе с привитыми боковыми цепями поли-*N*-винилпирролидона, что может указывать на некое сродство между их макромолекулами.

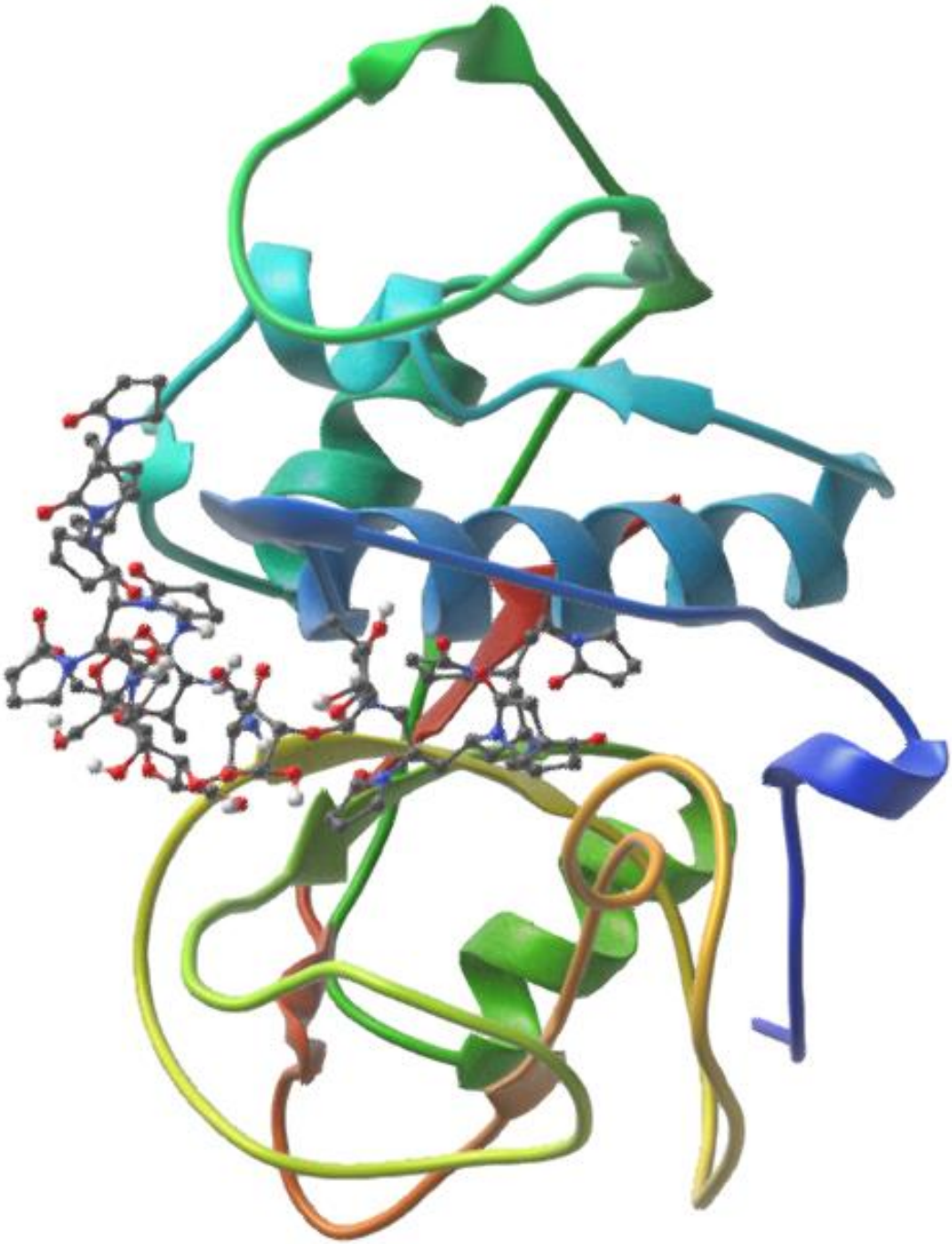


**Рис. 6.** Топология комплекса бромелина с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона.

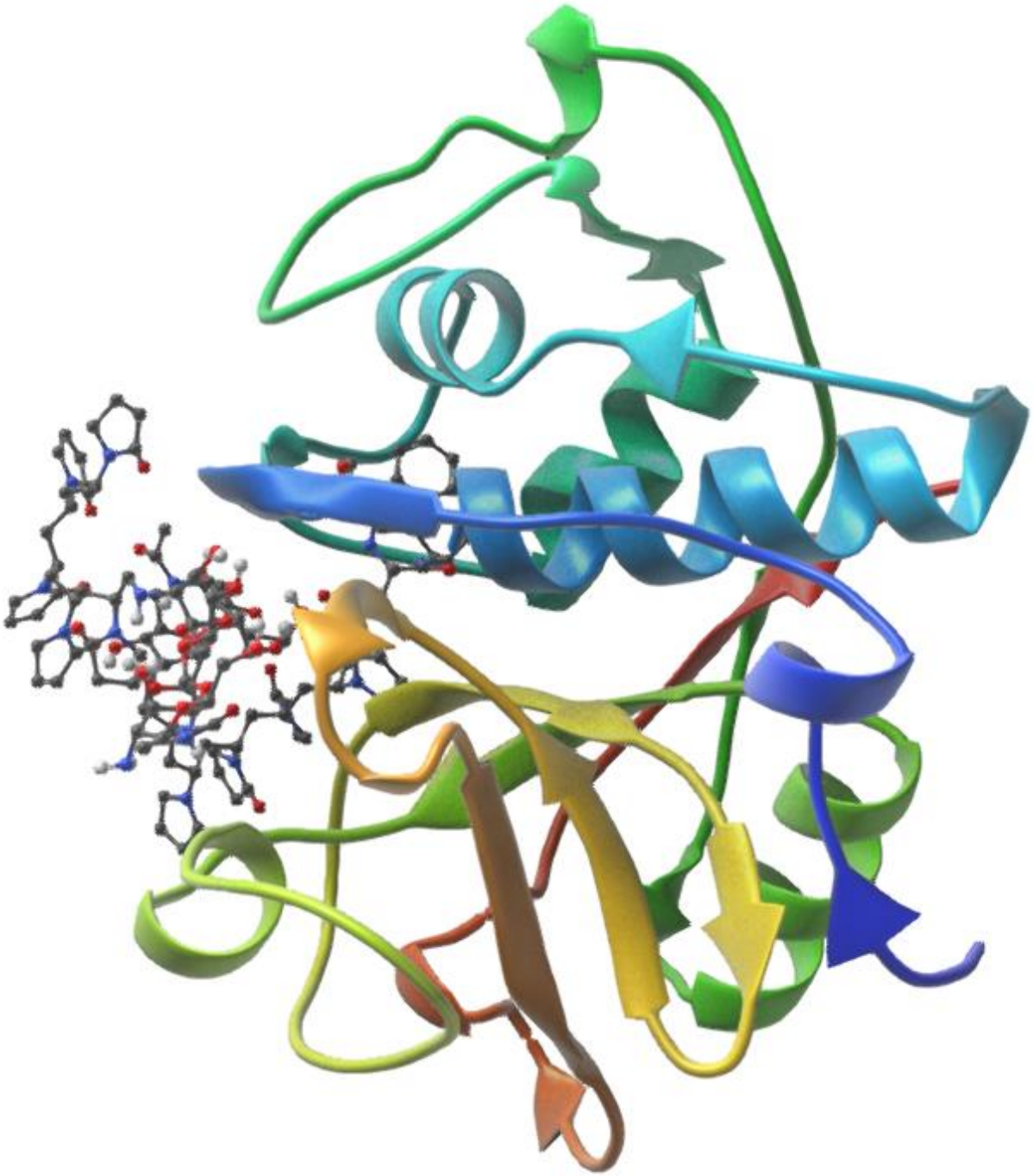


**Рис. 7.** Топология комплекса папаина с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона.

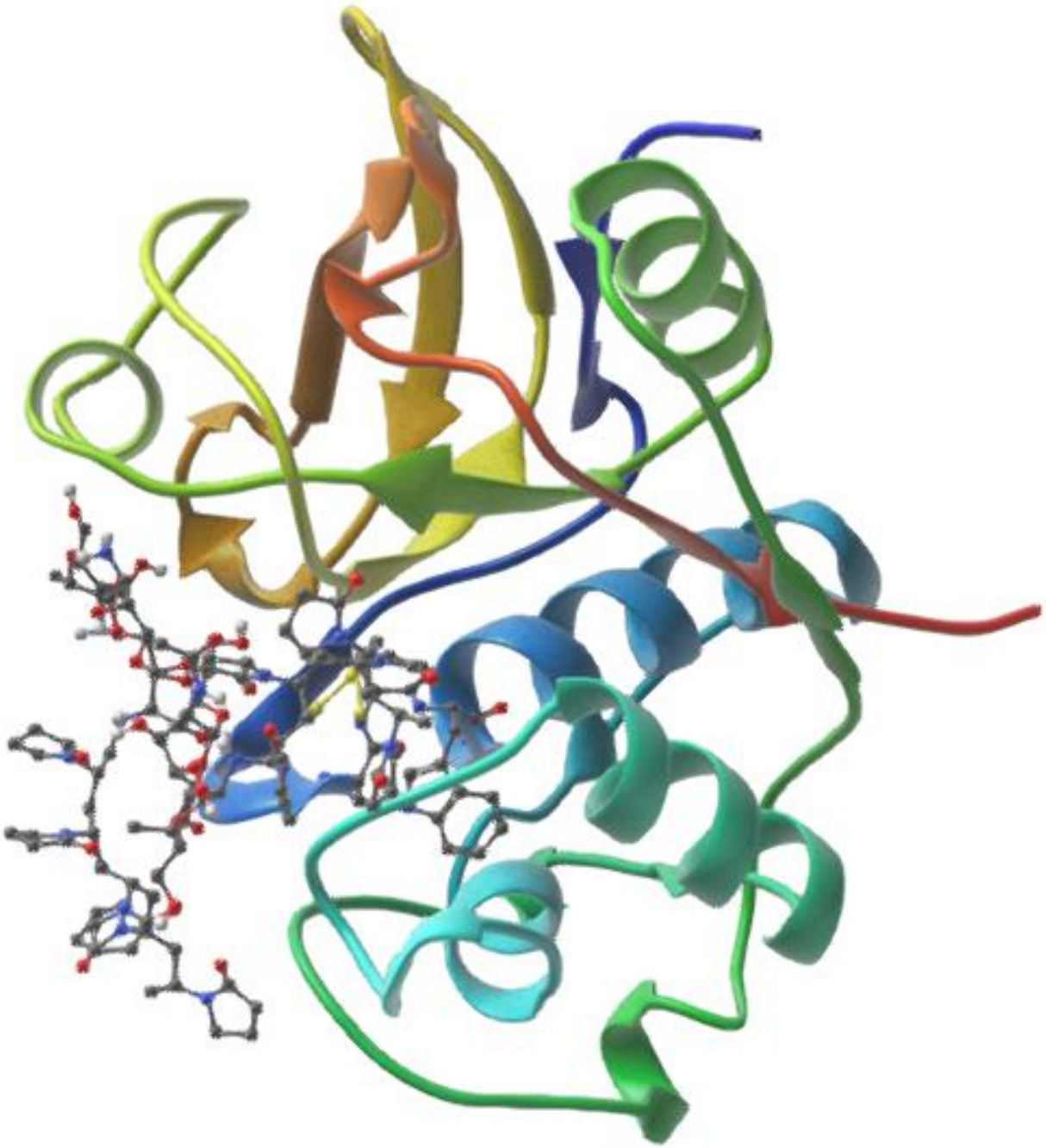


**Рис. 8.** Топология комплекса фицина с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона.

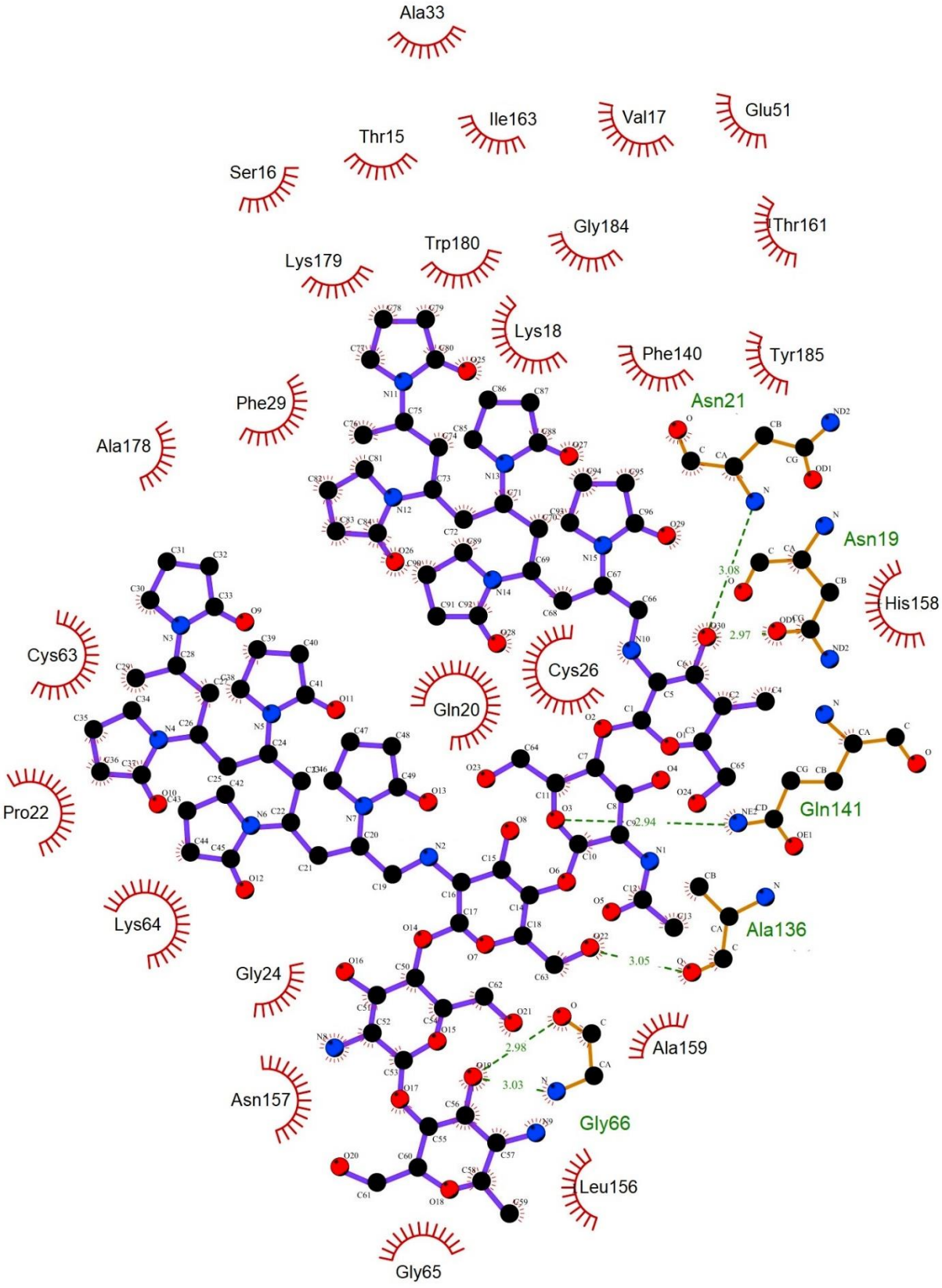



**Рис. 9.** Аминокислотные остатки бромелина, формирующие связи и взаимодействия с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона. Зелеными пунктирными линиями обозначены водородные связи.

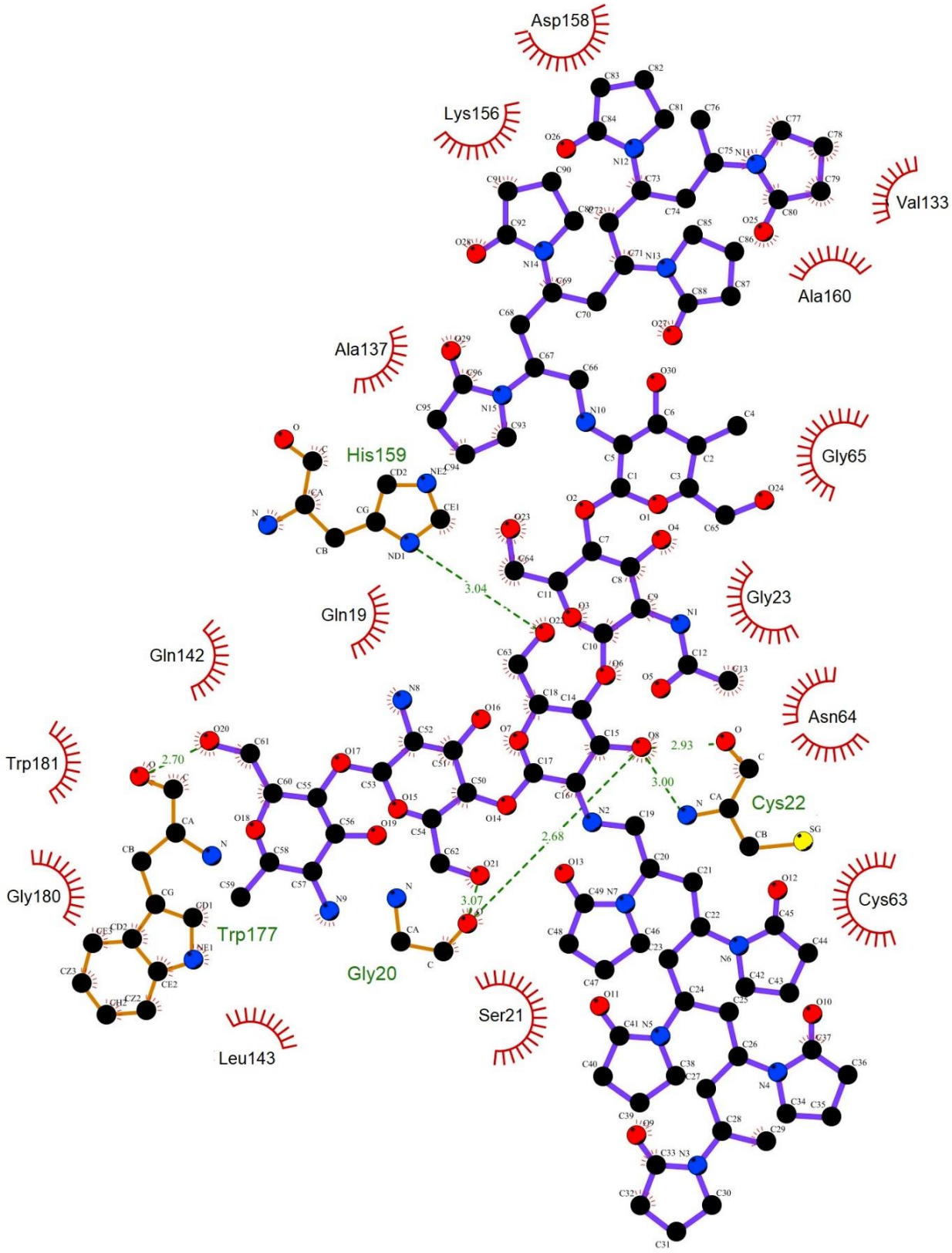



**Рис.10.** Аминокислотные остатки папаина, формирующие связи и взаимодействия с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона. Зелеными пунктирными линиями обозначены водородные связи.

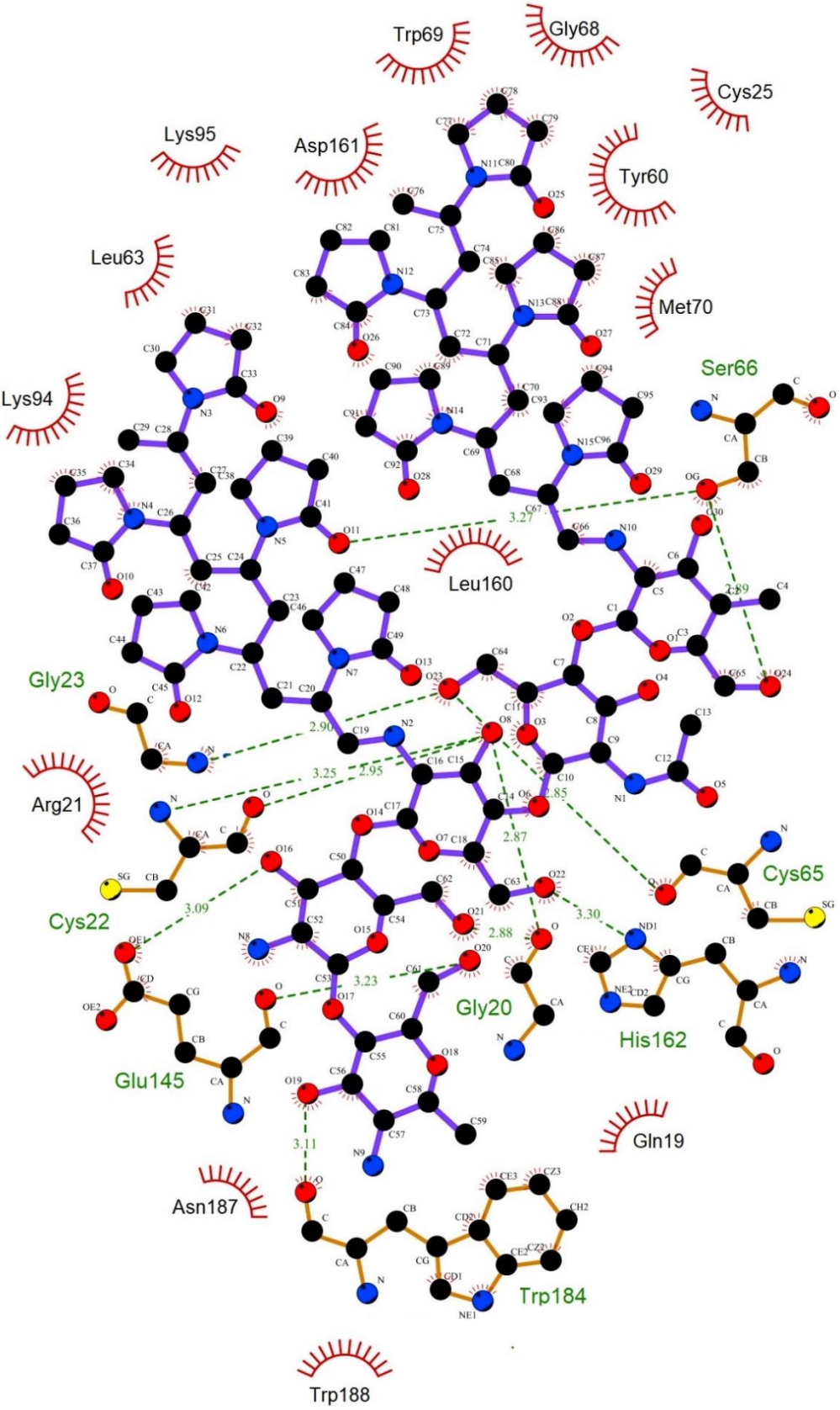



**Рис.11.** Аминокислотные остатки фицина, формирующие связи и взаимодействия с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона. Зелеными пунктирными линиями обозначены водородные связи.

Таблица 3.

Аминокислотные остатки ферментов, формирующие связи и взаимодействия с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона *

| Аффинность, ккал/моль | Аминокислотные остатки, образующие | |
|---|---|---|
| | Н-связи, длина, Å | прочие взаимодействия |
| Бромелин | | |
| –8.1 | Asn19, 2.97; Asn21, 3.08; Gly66, 2.98 и 3.03; Ala136, 3.05; Gln141, 2.94 | Thr15, Ser16, Val17, Lys18, Asn19, Gln20, Asn21, Pro22, Gly24, **Cys26** (αL1), Phe29(αL1), Ala33 (αL1), Glu51 (αL2), Cys63, Lys64, Gly65, Gly66, Ala136, Phe140, Gln141, Leu156, Asn157, **His158**(βR), Ala159(βR), Thr161(βR), Ile163(βR), Ala178, Lys179, Trp180, Gly184, Trp185 |
| Папаин | | |
| –6.1 | Gly20, 2.68 и 3.07; Cys22, 2.93 и 3.00; **His159** (βR), 3.04; Trp177, 2.70 | Gln19, Gly20, Ser21, Cys22, Gly23, Cys63, Asn64, Gly65, Val133(βR), Ala137, Gln142, Leu143 (αR2), Lys156, Asp158(βR), **His159**(βR), Ala160(βR), Trp177, Gly180, Trp181 |
| Фицин | | |
| –7.3 | Gly20, 2.87; Cys22, 2.95 и 3.25; Gly23, 2.90; Glu145, 3.09 и 3.23; Trp184, 3.11; **His162** (βR), 3.30; Cys65, 2.85; Ser66, 2.89 и 3.27 | Gln19, Gly20; Arg21, Cys22, Gly23, **Cys25**(αL1), Tyr60, Leu63, Cys65, Ser66, Gly68, Trp69, Met70 (αL3), Lys94, Lys95, Glu145 (αR2), Leu160, Asp161, His162 (βR), Trp184, Asn187, Trp188 |

* - жирным шрифтом выделены каталитически значимые аминокислотные остатки, в скобках – их принадлежность к упорядоченным элементам вторичной структуры

Исследование взаимодействия фермент-сополимер методом ИК-спектроскопии также подтверждает вклад углеводного остова в образование комплексов. ИК-спектры образцов, представляющих собой сухие тонкодисперсные порошки, регистрировали на ИК-спектрометре IRAffinity1 (Shimadzu Scientific Instruments, Япония) методом нарушенного полного отражения с использованием приставки с призмой из селенида цинка, диапазон регистрации – 900–4000 $см^{-1}$, спектральное разрешение – 4 $см^{-1}$. Спектр накапливали в течение четырех циклов регистрации по 28 сканирований в каждом.

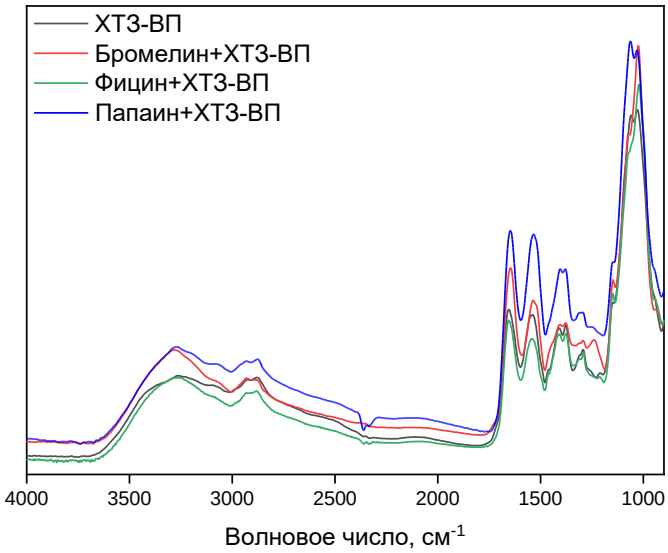



**Рис. 12.** ИК-спектры комплексов цистеиновых протеаз с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона.

На рис. 12 представлены ИК-спектры сухих порошков привитого сополимера ХТЗ-ВП-2 и его комплексов с цистеиновыми протеазами, полученных в 0.05 М боратном буфере с 0.1 М KCl с pH 9.0. Как видно из представленных данных, полосы белка, в первую очередь – амид I (~ 1650 $см^{-1}$), не проявляются на спектре из-за невысокого содержания ферментов в препарате, а также наложения полос на колебания амидной группы пирролидонового цикла. ИК-спектр сополимера содержит следующие характеристические полосы поглощения: полосы в области 1028–1148 $см^{-1}$, описывающие колебания глюкопиранозных циклов хитозана, в том числе связей С-ОН и гликозидных; полосы в области 1377–1410 и 2878–2931$см^{-1}$, соответствующие колебаниям С-Н связей, 1537 и 1655 $см^{-1}$ – амид II и амид I лактамного цикла соответственно, и широкая полоса в области 3100 – 3400 $см^{-1}$, отвечающая колебаниям ассоциированных гидроксильных и аминогрупп [23].

Как уже отмечалось выше, в виду ряда объективных причин, новые полосы не проявляются в комплексных препаратах, однако, детальное исследование спектров, нормированных по полосе поглощения гликозидной связи (1148 $см^{-1}$) в области 1000–1700 $см^{-1}$ (рис. 13–15), показывает, что

взаимодействие с ферментами приводит к ряду изменений в полосе, отвечающей колебаниям пиранозных циклов (1028–1148 $см^{-1}$). Эта полоса – комплексная, в ней может выделяться от одной до десяти мод, изменение в их количестве или форме указывает на тот факт, что взаимодействие протекает с участием гидроксильных групп хитозана, присоединенных к углеродному скелету пиранозного цикла, и нарушает внутреннюю самоорганизацию углеводных цепей. В случае папаина происходит изменение соотношений интенсивности мод при 1028 и 1059 $см^{-1}$, в случае фицина и бромелина – наблюдается резкое снижение интенсивности моды при 1059 $см^{-1}$. Таким образом, исследование методом ИК-спектроскопии подтверждает результаты молекулярного докинга и также указывает, что белки связываются преимущественно с гидроксильными группами углеводного остова привитого сополимера.

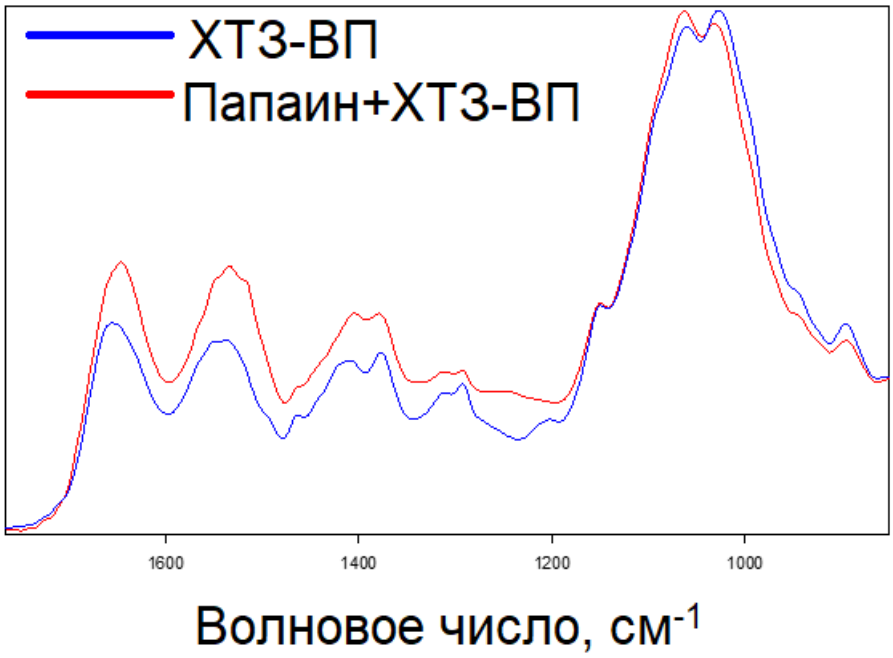



**Рис. 13.** Нормированные ИК-спектры комплекса папаина с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона.

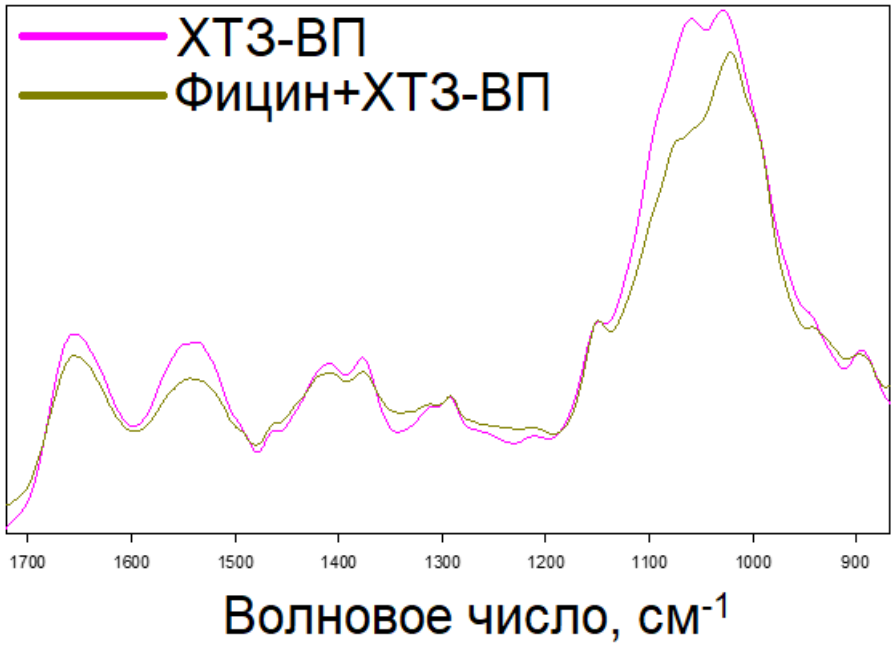



**Рис. 14.** Нормированные ИК-спектры комплекса фицина с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона.

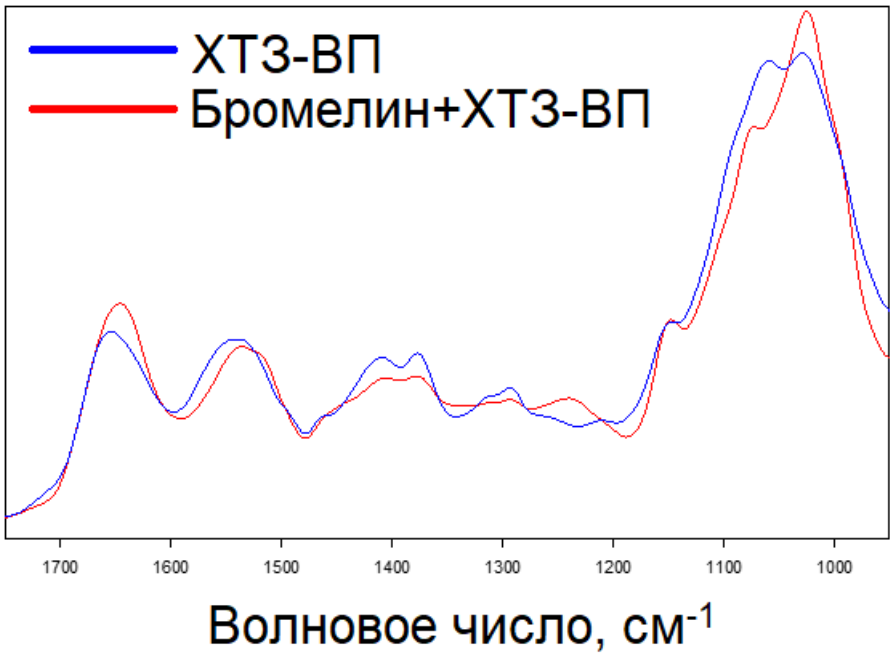



**Рис. 15.** Нормированные ИК-спектры комплекса бромелина с привитым сополимером хитозана и поли-*N*-винилпирролидона.

Наиболее информативным исследованием белков и процессов их взаимодействия с различными лигандами методом ИК-спектроскопии является количественная оценка вторичной структуры, исследуемая путем

анализа деконволюции полосы амид I. Однако для выбранных лигандов – привитых сополимеров хитозана и поли-*N*-винилпирролидона попытки произвести подобные исследования не увенчались успехом в виду перекрывания полосы амид I белка и поглощения комплексной полосы сополимера, включающей поглощение C=O групп лактамного цикла и остаточных *N*-ацетильных групп самого хитозана.

Таким образом, в результате сочетания методов молекулярного докинга и ИК-спектроскопии показано, что ферменты взаимодействуют с сополимером, в основном, через образование связей с гидроксильными группами последнего. При этом, полисахарид локализуется вблизи активного центра фермента и образует ионные или Н-связи непосредственно с аминокислотными остатками, образующими активный центр папаина, бромелина и фицина. Этим обусловлены более низкие значения каталитической активности полученных комплексов по сравнению с величинами, характерными для свободных ферментов.

## Заключение

Протеазы являются самыми широко используемыми в промышленности биокатализаторами, на их долю приходится порядка 60 % рынка энзимов [24]. Однако они представляют собой водорастворимые, подверженные автолизу ферменты, для которых невозможно многократное технологическое использование. Эти факторы подчеркивают необходимость проведения исследований, направленных на нивелирование указанных недостатков и способствующих дальнейшей экспансии эффективных биокатализаторов в сферы пищевой промышленности, биотехнологий и биомедицины.

В ходе выполнения настоящего исследования нам удалось получить носители для цистеиновых протеаз – бромелина, папаина и фицина, стабилизирующие их практически значимые свойства. Ферментные комплексные препараты, не требующие применения токсичных реагентов в процессе их получения, сохраняют до 100 % начальной активности ферментов, при этом способствуют ее пролонгации, удерживая до 50 % величины параметра после 21 суток инкубации. Таким образом, нам удалось повысить период полуинактивации ферментов до ~ 12 раз.

Достигнуть указанных результатов удалось за счет удачной локализации молекул модифицированного полисахарида вблизи активного центра, что, с одной стороны, затрудняет диффузию субстрата и продуктов к/от активного центра, а с другой стороны защищает тиольный нуклеофил от окисления кислородом воздуха и процессов автолиза.

Таким образом, полученные продукты обладают высоким потенциалом для применения в пищевых биотехнологиях, например, для производства «умных» упаковок для продуктов питания, защищающих их от преждевременной порчи и продляющих их срок годности.

## Выводы

1. Исследованы свойства водных растворов привитых сополимеров хитозана с поли-*N*-винилпирролидоном различного состава. Установлено, что частицы полученных сополимеров характеризуются положительным поверхностным зарядом, величина которого снижается при увеличении доли привитого поли-*N*-винилпирролидона в нем. Частицы представляют собой агрегаты нескольких макромолекул, характеризующиеся архитектурой типа «ядро-оболочка».

2. Полученные иммобилизованные комплексные препараты бромелина, папаина и фицина с привитыми сополимерами хитозана и поли-*N*-винилпирролидона, для которых период полуинактивации фермента повышается до ~ 12 раз, а сохранение каталитической активности достигает 100 % по сравнению со свободным ферментом. Кроме того, полученные носители характеризуются достаточно высокой сорбционной емкость по отношению к исследуемым ферментам. Эти факторы делают полученные препараты перспективными для практического применения, в том числе, в пищевой промышленности.

3. *In silico* исследование особенностей взаимодействия рассматриваемых протеаз с полученными привитыми сополимерами позволило выявить, что молекула модифицированного полисахарида локализуется в «каталитическом кармане» глобулы ферментов, а также непосредственно взаимодействует с аминокислотными остатками, образующими их активный центр. По-видимому, эти взаимодействия приводят к повышению стабильности цистеиновых протеаз и некоторому снижению каталитической активности. Со стороны привитого сополимера взаимодействие, в первую очередь, образование водородных связей, осуществляется посредством гидроксильных групп пиранозных циклов углеводного остова сополимера, что подтверждается методами ИК-спектроскопии и гибкого молекулярного докинга.

## Перечень цитируемой литературы


1. Kuznetsov V. A. и др. Graft copolymers of carboxymethyl cellulose with N-vinylimidazole: synthesis and application for drug delivery // Polym. Bull. 2019. Т. 76. № 10. С. 4929–4949.
2. 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 // Polym. Bull. 2021. Т. 78. № 6. С. 2975–2992.
3. Sorokin A. V. и др. Chitosan Graft Copolymers with N-Vinylimidazole as Promising Matrices for Immobilization of Bromelain, Ficin, and Papain // Polymers. 2022. Т. 14. № 11. С. 2279.
4. Chen Q. и др. Progress in Research of Chitosan Chemical Modification Technologies and Their Applications // Marine Drugs. 2022. Т. 20. № 8. С. 536.
5. Baidamshina D. R. и др. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease // Sci Rep. 2017. Т. 7. № 1. С. 46068.
6. Jančič U., Gorgieva S. Bromelain and Nisin: The Natural Antimicrobials with High Potential in Biomedicine // Pharmaceutics. 2021. Т. 14. № 1. С. 76.
7. Baidamshina D. R. и др. The Effect of Ficin Immobilized on Carboxymethyl Chitosan on Biofilms of Oral Pathogens // IJMS. 2023. Т. 24. № 22. С. 16090.
8. Dar-Fu Tai, Hui-Yao Huang, Ching-Chong Huang. Immobilized ficin catalyzed synthesis of peptides in organic solvent // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1995. Т. 5. № 14. С. 1475–1478.
9. Mancini L. и др. BRIX3000® Papain Gel for Cavity Treatment in the Adult Patient // Case Reports in Dentistry. 2021. Т. 2021. С. 1–6.
10. Fernández-Lucas J., Castañeda D., Hormigo D. New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry // Trends in Food Science & Technology. 2017. Т. 68. С. 91–101.
11. Gagaoua M. и др. Artificial meat tenderization using plant cysteine proteases // Current Opinion in Food Science. 2021. Т. 38. С. 177–188.

12. Tanabe S., Arai S., Watanabe M. Modification of Wheat Flour with Bromelain and Baking Hypoallergenic Bread with Added Ingredients // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 1996. Т. 60. № 8. С. 1269–1272.

13. Tochi B. N. и др. Effect of Stem Bromelain on the Browning of Apple Juice // American J. of Food Technology. 2009. Т. 4. № 4. С. 146–153.

14. Aider M. Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates // JDS Communications. 2021. Т. 2. № 5. С. 233–237.

15. Sharma V. K. и др. Tailored enzymes as next-generation food-packaging tools // Trends in Biotechnology. 2022. Т. 40. № 8. С. 1004–1017.

16. Baidamshina D. R. и др. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Т. 164. С. 4205–4217.

17. Dos Santos J. C. S. и др. Bovine trypsin immobilization on agarose activated with divinylsulfone: Improved activity and stability via multipoint covalent attachment // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2015. Т. 117. С. 38–44.

18. Artyukhov V. G. и др. Thermal inactivation of free and immobilized inulinase // Appl Biochem Microbiol. 2010. Т. 46. № 4. С. 385–389.

19. Sabirova A. R. и др. A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius* // FEBS Letters. 2010. Т. 584. № 21. С. 4419–4425.

20. Tu M. и др. Typical organic pollutant-protein interactions studies through spectroscopy, molecular docking and crystallography: A review // Science of The Total Environment. 2021. Т. 763. С. 142959.

21. Vavra O., Damborsky J., Bednar D. Fast approximative methods for study of ligand transport and rational design of improved enzymes for biotechnologies // Biotechnology Advances. 2022. Т. 60. С. 108009.

22. Beveridge A. J. A theoretical study of the active sites of papain and S195C rat trypsin: Implications for the low reactivity of mutant serine proteinases // Protein Science. 1996. Т. 5. № 7. С. 1355–1365.

23. Lavlinskaya M. S. и др. The Low-Waste Grafting Copolymerization Modification of Chitosan Is a Promising Approach to Obtaining Materials for Food Applications // Polymers. 2024. Т. 16. № 11. С. 1596.
24. Kumar V. и др. Global scenario of industrial enzyme market // 2014.