

ФОРМИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ПАПАИНА С ЧАСТИЦАМИ ХИТОЗАНА И КАРБОКСИМЕТИЛХИТОЗАНА, ПОЛУЧЕННЫМИ В ПРИСУТСТВИИ И В ОТСУТСТВИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2025 г. М.Г. Холявка*, **, #, Ю.А. Редько*, С.С. Гончарова*, М.С. Лавлинская*, А.В. Сорокин*, М.С. Кондратьев*, ***, В.Г. Артюхов*

*Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия

**Севастопольский государственный университет, ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Россия

***Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 09.09.2024 г.

После доработки 02.12.2024 г.

Принята к публикации 04.12.2024 г.

Получены частицы среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозана и карбоксиметилхитозана без и с добавлением аскорбиновой кислоты. Разработаны методики получения комплексов этих частиц с растительной протеазой папаином. Установлено, что активность комплексов папаина с частицами карбоксиметилхитозана существенно выше по сравнению с его комплексами с частицами хитозана. При этом комплексы с частицами хитозана и карбоксиметилхитозана, полученными с использованием аскорбиновой кислоты, показали более высокие значения протеолитической активности, чем комплексы с частицами полисахаридов, полученные без ее добавления. С помощью молекулярного докинга установлено, что аминокислотные остатки папаина взаимодействуют как с хитозаном, так и с карбоксиметилхитозаном в основном путем образования водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Кроме того, молекулы аскорбиновой кислоты и обоих типов полисахаридов взаимодействуют с аминокислотными остатками из активного центра папаина – Cys25 и His159, что, вероятно, способствует повышению активности и стабильности фермента в составе комплексов с частицами хитозана и карбоксиметилхитозана, в том числе за счет того, что аскорбиновая кислота предотвращает окисление тиольной группы папаина, ответственной за акт катализа.

Ключевые слова: папаин, хитозан, карбоксиметилхитозан, комплексообразование.

DOI: 10.31857/S0006302925010036, **EDN:** LXTEFE

Цистeinовые протеазы растительного происхождения занимают особое место в фундаментальной науке, промышленности и медицине. Среди них наиболее изученным ферментом является папаин (КФ 3.4.22.2), получаемый из латекса *Carica papaya*. Он эффективен против бактериальных биопленок [1] и широко используется в хирургии для удаления некротических тканей из хронических ран и ожогов [2]. Кроме того, папаин активно применяется для тендеризации мяса [3], в процедурах, направленных на лечение и профилактику кариеса [4], для приготовления клинически значимых фрагментов антител [5], в качестве агента для диссоциации клеток и удаления клеточных дебрисов [6], в качестве компонента в косметике. Основным ограничением в использовании протеолитических ферментов во многих сферах является их низкая стабильность.

Названную проблему можно решить путем иммобилизации фермента на полимерных носителях [7] или образования растворимых или нерастворимых комплексов с ними [8].

Применение иммобилизованных ферментов имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием их растворимых форм. Иммобилизация на нерастворимых носителях позволяет избегать попадания биокатализатора в конечный продукт, дает возможность строго контролировать кинетику реакции и предотвращает некоторые негативные для потребителя последствия, например аллергенные эффекты [9]. Кроме того, свободные молекулы протеаз могут гидролизовать друг друга, способствуя инактивации биокатализатора, а также включению полученных пептидов и аминокислот в конечный продукт. Иммобилизация протеаз на пористых носителях существенно

снижает интенсивность автолиза, так как только крайне малая часть молекул фермента на поверхности гранул может подвергаться протеолизу [10].

Верно подобранный протокол иммобилизации может привести к увеличению жесткости структуры фермента и, таким образом, к повышению его стабильности в присутствии денатурирующих агентов или при длительном хранении [11], что позволяет увеличить количество повторных использований биокатализатора, а также расширяет диапазон условий, при которых он является функционально активным [12].

При этом иммобилизация протеаз внутри пористых носителей может создавать ограничения для диффузии субстрата [13], а также стерические препятствия для контакта между активным центром фермента и белковым субстратом [10]. Оба явления могут снизить производительность биокатализатора. Кроме того, взаимодействия между ферментом и носителем модифицируют структуру фермента, что может повлиять на его специфичность и селективность действия [14].

Разработка гибридных микро- и нанобиокаталитических систем путем прикрепления молекул протеаз к различным микро- иnanoструктурированным материалам позволяет существенно повысить производительность и стабильность ферментов. Протеазы, иммобилизованные на микро- и наноносителях, могут быть гораздо более устойчивы к денатурации, вызванной экстремальными температурами или значениями pH, детергентами, органическими растворителями и другими денатурирующими агентами, чем свободные ферменты. Использование в качестве носителей материалов микро- и наноразмера устраняет диффузационные и стерические ограничения во время связывания белковых субстратов с активными центрами молекул протеаз по сравнению с их иммобилизацией на пористых материалах [15]. Нано- и микроматериалы на основе полисахаридов обладают рядом преимуществ по сравнению с их макроскопическими формами. Прежде всего, они имеют более высокую площадь поверхности, что позволяет им эффективнее взаимодействовать с различными биологически активными соединениями, включая белки и ферменты, и служить платформами для их адресной доставки [16].

Хитозан – природный биополимер, является производным хитина, основного компонента панцирей ракообразных. Хитозан обладает широким спектром биологической активности, в том числе антимикробными свойствами, и при этом он нетоксичен. В связи с этим микро- и наночастицы хитозана являются перспективными для использования в самых разных областях: очистка сточных вод, биосенсорика, диагностика, фармацевтика, тканевая инженерия, иммобилизация ферментов и упаковка пищевых продуктов [17, 18]. Однако известно, что

хитозан растворим только в кислых средах при значении pH < 6.5 [19].

Карбоксиметилхитозан – карбоксилированное водорастворимое производное хитозана, обладающее высокой сорбционной активностью по отношению к ионам металлов и органическим красителям [20]. В отличие от немодифицированного хитозана, карбоксиметилхитозан обладает амфолитной природой, обусловленной наличием как положительно заряженных аминогрупп, так и отрицательно заряженных карбоксильных групп. Таким образом, карбоксиметилхитозан может взаимодействовать как с катионами, так и с анионами, а также с другими типами соединений, способными образовывать водородные связи с гидроксильными группами глюкопиранозных колец. Названный полисахарид неиммуногенен и биосовместим, что делает его перспективным кандидатом для применения в биомедицине [21]. Описаны различные системы транспорта лекарств на основе карбоксиметилхитозана для адресной доставки антибиотиков, цитостатиков и других терапевтических веществ [22]. Кроме того, он очень востребован в производстве раневых повязок благодаря своим гелеобразующим свойствам и способности поддерживать влажную среду при удалении экссудата [23].

Папаин является представителем тиоловых протеаз, так как в состав его активного центра входит SH-группа остатка цистеина. Помимо нуклеофильной природы, тиольная группа является сильным восстановителем, что обуславливает ее способность взаимодействовать с кислородом воздуха, приводя к потере активности фермента. Известно, что папаин можно активировать путем введения различных восстановителей, например цистеина и других SH-содержащих соединений [24]. Мы же для этих целей применили аскорбиновую кислоту в составе комплексов папаина с полисахаридами. Аскорбиновая кислота является природным водорастворимым антиоксидантом. Механизм ее действия связан, в основном, с прекращением цепных радикальных процессов за счет переноса электронов [25], однако молекулы аскорбиновой кислоты могут также действовать как поглотители молекулярного кислорода [26]. Кроме того, аскорбиновая кислота известна своими антимикробными, бактерицидными и противовирусными свойствами, ее также используют как «укупоривающий» агент для предотвращения агрегации наночастиц [27]. Учитывая низкую токсичность соединения, его широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности, включение аскорбиновой кислоты в состав иммобилизованных препаратов папаина может позволить создавать стабильные и высоко активные биокатализаторы микро- и наноразмера широкого спектра действия.

Попытки получить папаин, иммобилизованный на хитозане или его производных, осуществлялись неоднократно [28], однако до сих пор остается ряд нерешенных проблем в данной области. В частности, большинство работ было осуществлено с макрочастицами хитозана [29, 30], о недостатках которых было упомянуто выше. Кроме того, при иммобилизации на макрочастицах хитозана активность папаина в большинстве случаев существенно снижалась [31–33], а препарат был растворим только в кислых средах с $\text{pH} < 6.5$. Описаны попытки ковалентной иммобилизации папаина на хитозане с применением таких сшивящих агентов, как глутаровый альдегид, полиэтиленмин, триполифосфат [19], однако в подобных случаях всегда остается открытым вопрос о токсичности полученных биокатализаторов, что существенно сужает сферы их практического применения.

Для расширения диапазонов растворимости образцов иммобилизованного папаина в качестве его носителей стали применять химически модифицированные производные хитозана [34], в том числе *N*-сукцинилхитозан, *N*-малеоилхитозан [35], карбоксиметилхитозан, *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан [36], ацетат хитозана [37] были предложены нами ранее в качестве матриц для иммобилизации папаина. Однако для всех названных образцов при их использовании была необходима защита активного центра папаина от окисления какими-либо дополнительными агентами (например, путем добавления цистеина).

Новым направлением было получение хитозановых мембран, содержащих 2.5 и 5.0% папаина, которые повысили его ферментативную активность (0.87 ± 0.12 ед./мг и 1.59 ± 0.10 ед./мг соответственно) по сравнению со свободным образцом (0.0042 ± 0.001 ед./мг), но при этом увеличение концентрации папаина до 10% и более приводило к разделению фаз на мемbrane, а присутствие папаина снижало гидрофобность на поверхности мембранны и нарушило способность мембранны к набуханию [38].

Для улучшения функциональных свойств папаина, иммобилизованного на производных хитозана, было предложено использовать обработку образцов глубокими эвтектическими растворителями (deep eutectic solvents, DESs), которые могут синергетически работать с биополимерными материалами для формирования надлежащей микросреды с остатками аминокислот, тем самым способствуя термостабильности фермента [18]. В качестве носителей для иммобилизации папаина и улучшения его микроокружения по сравнению с ферментом в буферном растворе мы уже ранее рассматривали частицы хитозана микро- и нанометрового размера, полученные в присут-

ствии аскорбиновой кислоты и без нее [39, 40], однако на тот момент нам не удалось повысить протеолитическую активность образцов более чем на 20%.

В связи с этим целью работы было сравнить особенности процессов комплексообразования папаина с частицами хитозана и карбоксиметилхитозана, определить каталитическую активность полученных комплексов и оценить их стабильность при оптимальных условиях функционирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран папаин (Sigma-Aldrich, США), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma-Aldrich, США). Частицы получали из среднемолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) хитозанов (ООО «Биопрогресс», Россия) и карбоксиметилхитозанов.

Синтез карбоксиметилхитозана осуществляли по следующей методике: навеску хитозана массой 3.00 г дисперсировали в 65 мл изопропилового спирта, затем при помощи капельной воронки в течение 15 мин вводили водный раствор NaOH из расчета 13 моль NaOH на 1 моль хитозана. После этого по каплям в реакционную смесь добавляли спиртовой растворmonoхлоруксусной кислоты из расчета 7 моль кислоты на 1 моль хитозана и перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Полученный твердый продукт отфильтровывали, суспендировали в метиловом спирте, нейтрализовали раствором уксусной кислоты, промывали этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы [41]. Выход продуктов был равен 79–92%; степень замещения, рассчитанная из данных ИК-спектроскопии, составила для хитозана с молекулярной массой 350 кДа – 0.54, для хитозана с молекулярной массой 200 кДа – 0.78. Значительное увеличение степени замещения для хитозана с молекулярной массой 200 кДа может быть объяснено не только влиянием стерического фактора, но и тем, что изначально этот товарный хитозан находился в форме порошка, в то время как другой – в форме «чешуек». Карбоксиметилирование проводили в гетерогенной среде, поэтому форма и размер частиц модифицируемого полимера оказывают значительное влияние на протекание химического процесса.

Получение частиц хитозана и карбоксиметилхитозана. 300 мг хитозана/карбоксиметилхитозана растворяли в 100 мл 0.3% уксусной кислоты при механическом перемешивании (при получении частиц в присутствии аскорбиновой кислоты добавляли 50 мг аскорбиновой кислоты), далее добавляли 3%-й раствор NaOH со скоростью 5 мл/мин при посто-

Таблица 1. Средний размер частиц хитозана и карбоксиметилхитозана

Тип частиц	Средний размер, нм
Частицы I типа, полученные из среднемолекулярного хитозана (200 кДа) при воздействии ультразвуком 20 кГц	220 ± 111
Частицы I типа, полученные из среднемолекулярного хитозана (200 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 20 кГц	190 ± 109
Частицы II типа, полученные из высокомолекулярного хитозана (350 кДа) при воздействии ультразвуком 20 кГц	220 ± 123
Частицы II типа, полученные из высокомолекулярного хитозана (350 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 20 кГц	2670 ± 1579
Частицы III типа, полученные из среднемолекулярного хитозана (200 кДа) при воздействии ультразвуком 40 кГц	12 ± 6
Частицы III типа, полученные из среднемолекулярного хитозана (200 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 40 кГц	21 ± 13
Частицы IV типа, полученные из высокомолекулярного хитозана (350 кДа) при воздействии ультразвуком 40 кГц	33 ± 17
Частицы IV типа, полученные из высокомолекулярного хитозана (350 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 40 кГц	38 ± 19
Частицы I типа, полученные из среднемолекулярного карбоксиметилхитозана (200 кДа) при воздействии ультразвуком 20 кГц	220 ± 108
Частицы I типа, полученные из среднемолекулярного карбоксиметилхитозана (200 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 20 кГц	164 ± 103
Частицы II типа, полученные из высокомолекулярного карбоксиметилхитозана (350 кДа) при воздействии ультразвуком 20 кГц	190 ± 115
Частицы II типа, полученные из высокомолекулярного карбоксиметилхитозана (350 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 20 кГц	220 ± 125
Частицы III типа, полученные из среднемолекулярного карбоксиметилхитозана (200 кДа) при воздействии ультразвуком 40 кГц	106 ± 93
Частицы III типа, полученные из среднемолекулярного карбоксиметилхитозана (200 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 40 кГц	255 ± 101
Частицы IV типа, полученные из высокомолекулярного карбоксиметилхитозана (350 кДа) при воздействии ультразвуком 40 кГц	122 ± 97
Частицы IV типа, полученные из высокомолекулярного карбоксиметилхитозана (350 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 40 кГц	91 ± 54

янном перемешивании до образования осадка белого цвета и значения pH выше 11. Раствор пропускали через фильтр (размер пор 0.45 мкм), фильтрат промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH, далее воздействовали ультразвуком на дезинтеграторе Qsonica Sonicators (Япония) в течение 5 мин (20 кГц) для получения частиц I типа из полимера с молекулярной массой 200 кДа и частиц II типа из полимера с массой 350 кДа, а также 10 мин (40 кГц) для получения частиц III типа из полимера с молекулярной массой 200 кДа и частиц IV типа из полимера с массой 350 кДа. Размеры частиц измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, США). Обратный рассеянный свет от Не/Не-лазера мощностью 4 мВт (632.8 нм) собирали под углом 173°. Значение среднего размера частиц представлено в табл. 1

Получение комплексов папаина с частицами хитозана и карбоксиметилхитозана. Раствор папаина в концентрации 2 мг/мл в 50 мМ глициновом буфере с pH 9.0 смешивали в равных объемах с раствором частиц хитозана/карбоксиметилхитозана и выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч.

Стабильность комплексов цистеиновых протеаз с частицами оценивали при 37°C в течение 7 суток с последующим измерением каталитической активности через определенные промежутки времени (0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 и 168 ч) [42].

Определение протеолитической активности папаина в свободной форме и в составе комплексов с частицами полисахарида проводили на субстра-

те азоказеине (Sigma-Aldrich, США) [43]. К 200 мкл образца добавляли 800 мкл азоказеина (0.5% в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 7.5) и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее добавляли 800 мкл трихлоруксусной кислоты (5%), инкубировали 10 мин при -4°C, затем центрифугировали в течение 3 мин при 11700 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 пробы содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл трихлоруксусной кислоты, 200 мкл образца (фермент в контрольную пробу вносили последним, остальные операции для нее делали аналогично опытным пробам).

Единицей каталитической активности папаина служило количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин.

Молекулярный докинг. Докинг проводили для изучения взаимодействий «фермент–лиганд». Подготовку структуры папаина (PDB ID: 9PAP) к докингу осуществляли по стандартной схеме для Autodock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit/>): из входного PDB-файла были удалены атомы и координаты атомов растворителя, буфера и лигандов. Центр молекулы и параметры бокса задавали вручную, гарантируя, что молекула протеазы полностью находится внутри домена вычислительного пространства.

Модели структур полимеров были созданы в молекулярном конструкторе HyperChem (<https://hyperchem.software.informer.com>) и последовательно оптимизированы сначала в силовом поле AMBER, а затем квантово-химически в PM3 (параметрический метод 3). Лиганд при докинге обладал максимальной конформационной свободой: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановку зарядов на полимерах и их протонирование/депротонирование выполняли автоматически в пакете MGLTools1.5.6 (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/downloads/>).

Для анализа типов взаимодействий, имеющихся между составными частями комплексов, использовали пакеты программ LIGPLOT+ [44] и PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler) [45].

Статистическая обработка результатов. Все экспериментальные исследования осуществляли минимум в восьмикратной повторности. Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по *t*-критерию Стьюдента (при *p* < 0.05), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В наших предыдущих работах было показано, что при создании комплексов папаина с микро- и наночастицами средне- и высокомолекулярного хитозанов, полученными без добавления аскорбиновой кислоты, активность биокатализаторов по сравнению со свободным ферментом оставалась на уровне 93–99%. При добавлении в комплексы молекул аскорбиновой кислоты активность папаина возрастала максимум на 20% (табл. 2).

При создании комплексов папаина с частицами карбоксиметилхитозана, полученными как без добавления аскорбиновой кислоты, так и в ее присутствии, активность биокатализаторов по сравнению со свободным ферментом стала выше минимум в 1.7 раза, а для комплекса «папайн–частицы карбоксиметилхитозана I типа–аскорбиновая кислота» – практически в 2 раза. Интересно отметить, что добавление в комплексы аскорбиновой кислоты в случае карбоксиметилхитозана оказывало менее выраженный эффект на активность папаина, чем при формировании комплексов фермента с молекулами хитозана (табл. 2).

Далее мы сравнили остаточную активность папаина при 37°C в 0.05 М трис-HCl-буфере (pH 7.5), свободного и ассоциированного с частицами средне- и высокомолекулярного хитозанов и карбоксиметилхитозанов, полученными без и с добавлением аскорбиновой кислоты. Из сведений, приведенных в табл. 3, отчетливо видно, что связывание папаина с частицами карбоксиметилхитозана I и II типов, сформированными как в присутствии аскорбиновой кислоты, так и в ее отсутствие, стабилизирует молекулу фермента в большей степени, чем комплексообразование с подобными частицами хитозана. В частности, процент сохранения активности комплексов папаина с частицами карбоксиметилхитозана I и II типов был выше такового у свободного фермента начиная с 4 или 8 ч инкубации при 37°C в зависимости от типа частиц. При этом эффекты стабилизации активности папаина в случае частиц хитозана проявлялись не ранее чем после 96 ч инкубации.

Для частиц III и IV типов как хитозана, так и карбоксиметилхитозана присутствие или отсутствие аскорбиновой кислоты в составе комплексов с папаином оказывало менее выраженный эффект на стабилизацию фермента, чем в случае с частицами I и II типов: протеолитическая активность комплексов всех типов была выше, чем активность свободного папаина, начиная с 4–8 ч инкубации при 37°C (табл. 3).

Таким образом, взаимодействие папаина с частицами хитозана и карбоксиметилхитозана приводит к изменению каталитической активности

Таблица 2. Протеолитическая активность папаина

Комплекс	В комплексе с частицами хитозана, %	В комплексе с частицами карбоксиметилхитозана, %
с частицами I типа, полученными из среднемолекулярного полимера (200 кДа) при воздействии ультразвуком 20 кГц	93* ± 4	187* ± 4
с частицами I типа, полученными из среднемолекулярного полимера (200 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 20 кГц	119* ± 9	196* ± 3
с частицами II типа, полученными из высокомолекулярного полимера (350 кДа) при воздействии ультразвуком 20 кГц	99 ± 4	172* ± 2
с частицами II типа, полученными из высокомолекулярного полимера (350 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 20 кГц	111* ± 3	173* ± 3
с частицами III типа, полученными из среднемолекулярного полимера (200 кДа) при воздействии ультразвуком 40 кГц	95* ± 3	183* ± 5
с частицами IV типа, полученными из среднемолекулярного полимера (200 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 40 кГц	103 ± 2	186* ± 1
с частицами IV типа, полученными из высокомолекулярного полимера (350 кДа) при воздействии ультразвуком 40 кГц	97 ± 3	170* ± 4
с частицами IV типа, полученными из высокомолекулярного полимера (350 кДа) в присутствии аскорбиновой кислоты при воздействии ультразвуком 40 кГц	116* ± 2	176* ± 7

Примечание. За 100% принята активность свободного папаина при оптимальных условиях гидролиза (100 ед./мл). Жирным шрифтом отмечены значения активности, превышающие таковые для свободного папаина в растворе; * – отличия от контрольных значений (активности свободного папаина) статистически достоверны при $p < 0.05$.

фермента. В свою очередь, хитозан и продукты его модификации являются биоразлагаемыми, и скорость этого процесса увеличивается при получении раствора полимеров [46, 47]. Более того, папаин является неспецифичной протеазой, гидролизующей, в том числе, молекулы хитозана и некоторых других полисахаридов [48, 49]. В связи с этим логично предположить, что образование микро- и наноразмерных комплексов «папаин–хитозан» и «папаин–карбоксиметилхитозан» приводит к ускоренному разрушению полисахаридных частиц и высвобождению фермента. Благодаря этому предложенные препараты папаина можно рассматривать как основу для «умной» системы адресной доставки фермента.

Для того чтобы объяснить отличия в активности комплексов папаина с частицами хитозана и карбоксиметилхитозана с аскорбиновой кисло-

той и без нее, мы применили метод молекулярного докинга. Из рис. 1 отчетливо видно, что молекула аскорбиновой кислоты активно взаимодействует с молекулой папаина, в том числе с аминокислотными остатками из его активного центра – Cys25 и His159, поэтому с высокой долей вероятности можно предположить, что она препятствует окислению тиольной группы папаина, ответственной за акт катализа.

Методом молекулярного докинга установлено, что при образовании комплекса «папаин–хитозан» на первом этапе связывания формируется 6 водородных связей, а при адсорбции фермента на карбоксиметилхитозане их 5, аминокислотные остатки Gly20 и Asn64 участвуют в образовании водородных связей с обоими типами полисахаридов (табл. 4).

Таблица 3. Степень сохранения (в %) каталитической активности папаина в комплексе с частицами полисахаридов I и II типов после инкубации образцов при 37°C

Время инкубации, ч	В растворе	В комплексе с частицами							
		I типа				II типа			
		средне-молекулярного полимера	среднемолекулярного полимера, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты			высоко-молекулярного полимера	высокомолекулярного полимера, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты		
		ХТЗ	KMX	ХТЗ	KMX	ХТЗ	KMX	ХТЗ	KMX
0	100 ± 1	100 ± 4	100 ± 1	100 ± 9	100 ± 3	100 ± 4	100 ± 2	100 ± 3	100 ± 3
1	99 ± 8	76* ± 4	99 ± 1	84* ± 3	100 ± 2	82* ± 3	99 ± 1	95 ± 4	99 ± 2
4	89 ± 7	71* ± 4	99 ± 3	76* ± 4	99 ± 3	73* ± 4	98* ± 1	86 ± 4	98 ± 3
8	87 ± 7	59* ± 3	97* ± 2	69* ± 3	98* ± 2	70* ± 4	97* ± 2	79 ± 5	98* ± 1
24	80 ± 9	57* ± 5	92* ± 2	65* ± 2	96* ± 2	63* ± 4	95* ± 2	73 ± 3	97* ± 2
48	70 ± 5	52* ± 2	91* ± 5	59* ± 4	91* ± 3	61* ± 3	88* ± 3	70 ± 4	94* ± 4
72	59 ± 7	47* ± 4	84* ± 2	53 ± 3	88* ± 2	59 ± 2	84* ± 3	66 ± 2	88* ± 2
96	47 ± 8	43 ± 4	80* ± 4	49 ± 2	84* ± 2	55 ± 3	76* ± 3	63* ± 3	86* ± 3
120	35 ± 10	37 ± 3	74* ± 2	40 ± 3	78* ± 1	51* ± 3	66* ± 2	58* ± 3	71* ± 3
144	22 ± 10	31 ± 4	65* ± 2	34 ± 3	70* ± 1	49* ± 3	61* ± 3	51* ± 7	65* ± 2
168	15 ± 8	28* ± 2	56* ± 2	30* ± 3	59* ± 1	33* ± 4	47* ± 3	46* ± 3	53* ± 3

Примечание. За 100% принята ферментативная активность образцов, наблюдаемая без их предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза (100 ед./мл). Жирным шрифтом отмечены значения активности, превышающие таковые для свободного папаина в растворе; * — отличия от значений активности свободного папаина статистически достоверны при $p < 0.05$.

При образовании комплекса «папаин–хитозан–аскорбиновая кислота» формируется 5 водородных связей, а в комплексе «папаин–карбоксиметилхитозан–аскорбиновая кислота» их 17, и только остаток Gly20 участвует в образовании водородных связей с обоими типами полисахаридов (табл. 4).

Все аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии молекул папаина как с хитозаном, так и с аскорбиновой кислотой, формируют связи и взаимодействия внутри комплекса «папаин–хитозан–аскорбиновая кислота». Отличительной особенностью образования тройного комплекса является водородная связь, образуемая между аскорбиновой кислотой и хитозаном (рис. 1).

Взаимодействия между папаином и карбоксиметилхитозаном, а также между папаином и аскорбиновой кислотой ответственны и за формирование комплекса «папаин–карбоксиметилхитозан–аскорбиновая кислота» (рис. 1). Исключение составляют взаимодействия между Pro65, Val133,

Ala160 и аскорбиновой кислотой, которые не наблюдаются в составе тройного комплекса. Кроме того, интересно отметить, что в комплексе «папаин–карбоксиметилхитозан–аскорбиновая кислота» остатки Asn18, Cys25 и Asp158 осуществляют с полисахаридом только ван-дер-ваальсовы взаимодействия, тогда как в составе тройного комплекса они формируют уже водородные связи (табл. 4).

В комплексах «папаин–аскорбиновая кислота», «папаин–хитозан» и «папаин–карбоксиметилхитозан–аскорбиновая кислота» одна или две водородные связи образуются с участием аминокислотного остатка Cys25, только карбоксиметилхитозан формирует с Cys25 относительно слабые ван-дер-ваальсовы взаимодействия. При этом His159 формирует ван-дер-ваальсовы взаимодействия с носителем внутри комплекса «папаин–хитозан–аскорбиновая кислота» и электростатические взаимодействия внутри всех остальных изучаемых нами комплексов. Ранее нами было показано, что хитозан и ряд его производных [31–35, 37, 39], в том числе карбоксиметилхитозан

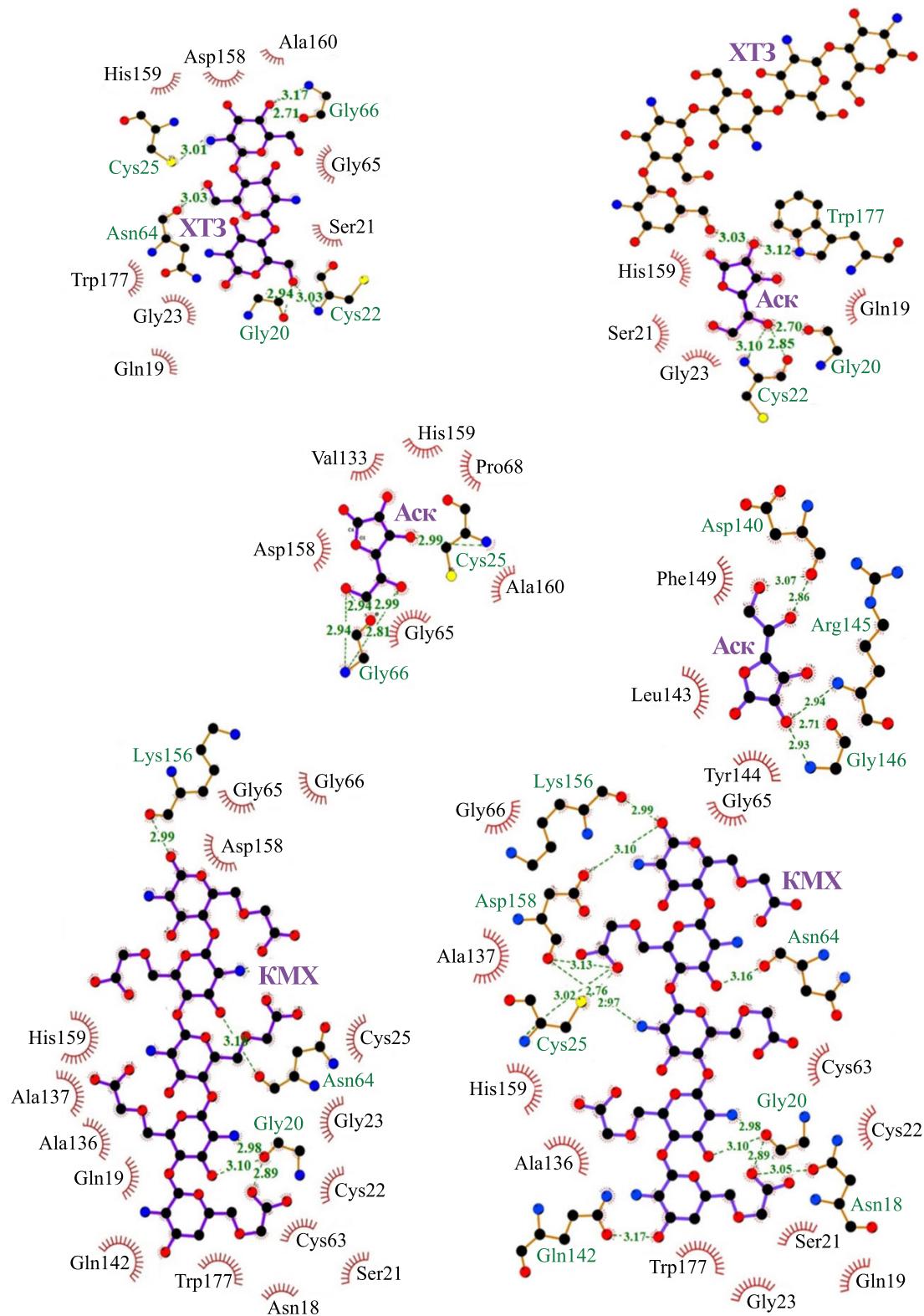


Рис. 1. Связи и взаимодействия в комплексах папаина с хитозаном (ХТЗ) и кабоксиметилхитозаном (КМХ) в присутствии и в отсутствие аскорбиновой кислоты (Аск): пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в ангстремах.

Таблица 4. Степень сохранения (в %) каталитической активности папаина в комплексе с частицами полисахаридов III и IV типов после инкубации образцов при 37°C

Время инкубации, ч	В растворе	В комплексе с частицами							
		III типа				IV типа			
		средне-молекулярного полимера		среднемолекулярного полимера, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты		высоко-молекулярного полимера		высокомолекулярного полимера, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты	
		ХТЗ	KMX	ХТЗ	KMX	ХТЗ	KMX	ХТЗ	KMX
0	100 ± 1	100 ± 3	100 ± 4	100 ± 2	100 ± 1	100 ± 3	100 ± 4	100 ± 2	100 ± 5
1	99 ± 8	99 ± 14	99 ± 2	97 ± 2	100 ± 2	99 ± 1	99 ± 1	97 ± 3	99 ± 3
4	89 ± 7	99* ± 1	99* ± 1	99* ± 2	99* ± 1	99* ± 2	98 ± 3	99* ± 2	99 ± 3
8	87 ± 7	98* ± 3	99* ± 2	97* ± 1	98* ± 2	98* ± 3	98* ± 2	98* ± 1	98* ± 2
24	80 ± 9	91* ± 1	96* ± 1	91* ± 1	97* ± 2	91* ± 1	94* ± 1	91* ± 1	96* ± 2
48	70 ± 5	83* ± 1	94* ± 1	81* ± 4	94* ± 1	78* ± 2	91* ± 3	77* ± 1	93* ± 3
72	59 ± 7	72* ± 4	90* ± 2	73* ± 1	91* ± 2	70* ± 3	83* ± 2	68* ± 1	86* ± 2
96	47 ± 8	64* ± 3	88* ± 4	66* ± 8	90* ± 3	59* ± 3	80* ± 3	63* ± 6	85* ± 2
120	35 ± 10	51* ± 2	85* ± 2	59* ± 2	86* ± 2	48* ± 2	67* ± 2	53* ± 2	80* ± 1
144	22 ± 10	36* ± 1	79* ± 4	53* ± 1	80* ± 2	40* ± 1	60* ± 2	49* ± 2	72* ± 3
168	15 ± 8	29* ± 1	68* ± 3	40* ± 3	72* ± 3	34* ± 1	52* ± 2	43* ± 1	64* ± 3

Примечание. За 100% принята ферментативная активность образцов, наблюдаемая без их предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза (100 ед./мл). Жирным шрифтом отмечены значения активности, превышающие таковые для свободного папаина в растворе; * — отличия от значений активности свободного папаина статистически достоверны при $p < 0.05$.

[36], могут взаимодействовать с остатками Cys25 и His159, которые входят в состав активного центра папаина, поэтому следует ожидать, что комплексообразование с названными полисахаридами позволит модулировать протеолитическую активность фермента. Однако из табл. 4 отчетливо видно, что молекула аскорбиновой кислоты также активно взаимодействует с молекулой папаина, в том числе с остатками Cys25 и His159, поэтому можно предположить, что она будет с высокой степенью эффективности препятствовать окислению тиольной группы папаина, ответственной за акт катализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание комплексов папаина с частицами хитозана и карбоксиметилхитозана, полученными без и с добавлением аскорбиновой кислоты, способствует стабилизации фермента, а также повышает протеолитическую активность биокатализатора по сравнению со свободным энзимом.

При этом активность комплексов папаина с частицами карбоксиметилхитозана оказалась выше по сравнению с комплексами фермента с частицами хитозана от 1.7 до 2 раз в зависимости от способа получения частиц. Комpleксы с частицами хитозана и карбоксиметилхитозана, полученными с добавлением аскорбиновой кислоты, показали более высокие значения протеолитической активности, чем комплексы с частицами полисахаридов, полученными без ее добавления, что, вероятно, обусловлено способностью аскорбиновой кислоты предотвращать окисление тиольной группы цистеина в активном центре папаина.

Для детализации механизмов взаимодействия хитозана и карбоксиметилхитозана с молекулами папаина мы применили метод молекулярного докинга, благодаря которому были выявлены аминокислотные остатки, участвующие в образовании комплексов с названными полисахаридами. Установлено, что в формировании белок–полисахаридных комплексов активное участие при-

Таблица 5. Сайты связывания в различных комплексах

Образуемые комплексы	Аминокислотные остатки, формирующие	
	водородные связи и длина связи, Å	иные типы взаимодействий
Папаин–аскорбиновая кислота	Cys25, 2.99; Gly66, 2.94, 2.94, 2.81 и 2.99	Gly65; Pro68; Val133; Asp158; His159; Ala160
Папаин–хитозан	Gly20, 2.94; Cys22, 3.03; Cys25, 3.01; Asn64, 3.03; Gly66, 2.71 и 3.17	Gln19; Ser21; Gly23; Gly65; Asp158; His159**; Ala160; Trp177
Папаин–хитозан–аскорбиновая кислота	Gly20, 2.70; Cys22, 2.85 и 3.10; Trp177, 3.12; связь между аскорбиновой кислотой и хитозаном, 3.03	Gln19; Ser21; Gly23; His159
Папаин–карбоксиметилхитозан	Gly20, 2.89, 2.98 и 3.10; Asn64, 3.18; Lys156, 2.99	Asn18; Gln19; Ser21; Cys22; Gly23; Cys25; Cys63; Gly65; Gly66; Ala136; Ala137*; Gln142; Asp158; His159**; Trp177
Папаин–карбоксиметилхитозан–аскорбиновая кислота	Asn18, 3.05; Gly20, 2.89, 2.98 и 3.10; Cys25, 2.97 и 3.02; Asn64, 3.16; Asp140, 2.86 и 3.07; Gln142, 3.17; Arg145, 2.94; Gly146, 2.71 и 2.93; Lys156, 2.99; Asp158, 2.97, 3.10 и 3.13	Gln19; Ser21; Cys22; Gly23; Cys63; Gly65; Gly66; Ala136; Ala137*; Leu143; Tyr144; Phe149; His159**; Trp177

Примечание. * – Аминокислотные остатки, формирующие гидрофобные взаимодействия; ** – аминокислотные остатки, формирующие электростатические взаимодействия.

нимают остатки в составе активного центра папаина – Cys25 и His159, поэтому комплексообразование с названными полисахаридами модулирует протеолитическую активность фермента. В частности, в комплексах «папаин–аскорбиновая кислота», «папаин–хитозан» и «папаин–карбоксиметилхитозан–аскорбиновая кислота» одна или две водородные связи образуются с участием аминокислотного остатка Cys25. His159 формирует ван-дер-ваальсовы взаимодействия внутри всех изучаемых нами комплексов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тризна Е. Ю., Байдамшина Д. Р., Холявка М. Г., Шарапутдинов И. С., Хайрутдинова А. Р., Хафизова Ф. А., Закирова Е. Ю., Хафизов Р. Г., Богачев М. И. и Каюмов А. Р. Растворимые и иммобилизованные папаин и трипсин-деструкторы бактериальных биопленок. *Гены и клетки*, **10** (3), 106 (2015).
2. Yaakobi T., Cohen-Hadar N., Yaron H., Hirszowicz E., Simantov Y., Bass A., and Freeman A. Wound debridement by continuous streaming of proteolytic enzyme solutions: Effects on experimental wound model in porcine. *Wounds*, **19**, 192–200 (2007).
3. Weiss J., Gibis M., Schuh V., and Salminen H. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Sci.*, **86** (1), 196 (2010). DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.05.008
4. Lopes M. C., Mascarini R. C., da Silva B. M., Flório F. M., and Basting R. T. Effect of a papain-based gel for chemomechanical caries removal on dentin shear bond strength. *J. Dent. Child.*, **74** (2), 93–97 (2007).
5. Flanagan R. J. and Jones A. L. Fab antibody fragments: some applications in clinical toxicology. *Drug safety*,

- 27** (14), 1115–1133 (2004).
DOI: 10.2165/000002018-200427140-00004
6. Kaiser O., Aliuos P., Wissel K., Lenarz T., Werner D., Reuter G., Kral A., and Warnecke A. Dissociated neurons and glial cells derived from rat inferior colliculi after digestion with papain. *PloS One*, **8** (12), e80490 (2013).
DOI: 10.1371/journal.pone.0080490
7. Holyavka M. G., Artyukhov V. G., Sazykina S. M., and Nakvasina M. A. Physical, chemical, and kinetic properties of trypsin-based heterogeneous biocatalysts immobilized on ion-exchange fiber matrices. *Pharmaceut. Chem. J.*, **51** (8), 702–706 (2017).
DOI: 10.1007/s11094-017-1678-0
8. Olshannikova S. S., Malykhina N. V., Lavlinskaya M. S., Sorokin A. V., Yudin N. E., Vyshkovskaya Y. M., Lukin A. N., Holyavka M. G., and Artyukhov V. G. Novel immobilized biocatalysts based on cysteine proteases bound to 2-(4-acetamido-2-sulfanilamide) chitosan and research on their structural features. *Polymers*, **14** (15), 3223 (2022). DOI: 10.3390/polym14153223
9. Ouyang X., Reihill J. A., Douglas L. E. J., and Martin S. L. Airborne indoor allergen serine proteases and their contribution to sensitisation and activation of innate immunity in allergic airway disease. *Eur. Respir. Rev.*, **33** (172), 230126 (2024).
DOI: 10.1183/16000617.0126-2023
10. Tacias-Pascacio V. G., Castañeda-Valbuena D., Tavano O., Abellanas-Perez P., de Andrade D., Santiz-Gómez J. A., Berenguer-Murcia Á., and Fernandez-Lafuente R. A review on the immobilization of bromelain. *Int. J. Biol. Macromol.*, **273**, 133089 (2024).
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.133089
11. Rodrigues R. C., Ortiz C., Berenguer-Murcia Á., Torres R., and Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.*, **42** (15), 6290–6307 (2013).
DOI: 10.1039/c2cs35231a
12. Rodrigues R. C., Berenguer-Murcia Á., Carballares D., Morellon-Sterling R., and Fernandez-Lafuente R. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. *Biotechnol. Adv.*, **52**, 107821 (2021).
DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107821
13. Pronk S., Lindahl E., and Kasson P. M. Dynamic heterogeneity controls diffusion and viscosity near biological interfaces. *Nature Commun.*, **5** (1), 3034 (2014).
DOI: 10.1038/ncomms4034
14. Arsalan A. and Younus H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.*, **118**, 1833–1847 (2018).
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.030
15. Bilal M., Qamar S. A., Carballares D., Berenguer-Murcia Á., and Fernandez-Lafuente R. Proteases immobilized on nanomaterials for biocatalytic, environmental and biomedical applications: Advantages and drawbacks. *Biotechnol. Adv.*, **70**, 108304 (2024).
DOI: 10.1016/j.biotechadv.2023.108304
16. Gao P., Xia G., Bao Z., Feng C., Cheng X., Kong M., Liu Y., and Chen X. Chitosan based nanoparticles as protein carriers for efficient oral antigen delivery. *Int. J. Biol. Macromol.*, **91**, 716–723 (2016).
DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.06.015
17. Ngasotter S., Xavier K. A. M., Meitei M. M., Waikhom D., Pathak J., and Singh S. K. Crustacean shell waste derived chitin and chitin nanomaterials for application in agriculture, food, and health – A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, **6** (10), 100349 (2023). DOI: 10.1016/j.carpta.2023.100349
18. Lin K.-P., Feng G.-J., Pu F.-L., Hou X.-D., and Cao S.-L. Enhancing the thermostability of papain by immobilizing on deep eutectic solvents-treated chitosan with optimal microporous structure and catalytic microenvironment. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **8**, 576266 (2020).
DOI: 10.3389/fbioe.2020.576266
19. Silva D. F., Rosa H., Carvalho A. F. A., and Oliva-Neto P. Immobilization of papain on chitin and chitosan and recycling of soluble enzyme for deflocculation of *Saccharomyces cerevisiae* from bioethanol distilleries. *Enzyme Res.*, **2015**, 573721 (2015). DOI: 10.1155/2015/573721
20. Zhang Z., Abidi N., and Lucia L. Smart superabsorbent alginate/carboxymethyl chitosan composite hydrogel beads as efficient biosorbents for methylene blue dye removal. *J. Mater. Sci. Technol.*, **159**, 81–90 (2023).
DOI: 10.1016/j.jmst.2023.02.045
21. Geng Y., Xue H., Zhang Z., Panayi A. C., Knoedler S., Zhou W., Mi B., and Liu G. Recent advances in carboxymethyl chitosan-based materials for biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, **305**, 120555 (2023). DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.120555
22. Zhang H., Gu Z., Li W., Guo L., Wang L., Guo L., Ma S., Han B., and Chang J. pH-sensitive O-carboxymethyl chitosan/sodium alginate nanohydrogel for enhanced oral delivery of insulin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **223**, 433–445 (2022). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.274
23. Tan W., Long T., Wan Y., Li B., Xu Z., Zhao L., Mu C., Ge L., and Li D. Dual-drug loaded polysaccharide-based self-healing hydrogels with multifunctionality for promoting diabetic wound healing. *Carbohydrate Polymers*, **312**, 120824 (2023). DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.120824
24. Homaei A. A., Sajedi R. H., Sariri R., Seyfzadeh S., and Stevanato R. Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino Acids*, **38** (3), 937–942 (2010). DOI: 10.1007/s00726-009-0302-3
25. Gülgün İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.*, **86** (3), 345–391 (2012). DOI: 10.1007/s00204-011-0774-2
26. Klaui H. and Pongracz G. Ascorbic acid and derivatives as antioxidants in oils and fats. In: *Vitamin C (ascorbic acid)*, Ed. by J. N. Counsell and D. H. Hornig (Applied Science Publishers, Englewood NJ, 1981), pp. 139–166.
27. Ramos A. R., Tapia A. K. G., Pinol C. M. N., Lantican N. B., del Mundo Ma. L. F., Manalo R. D., and Herrera M. U. Effects of reaction temperatures and reactant concentrations on the antimicrobial characteristics of copper precipitates synthesized using L-ascorbic acid as reducing agent. *J. Sci.: Adv. Mater. Devices*, **4**, 66–71 (2019). DOI: 10.1016/j.jsamrd.2018.12.009
28. Verma M. L., Kumar S., Das A., Randhawa J. S., and Chamundeeswari M. Enzyme immobilization on chitin and chitosan-based supports for biotechnological applications. *Sustainable Agricult. Rev.*, **35**, 147–173 (2019). DOI: 10.1007/978-3-030-16538-3_4
29. Liu Y., Wang K., Zheng H., Ma M., Li S., and Ma L. Papain immobilization on interconnected-porous chitosan macroparticles: Application in controllable hydrolysis of

- egg white for foamability improvement. *Food Hydrocolloids*, **139** (2), 108551 (2023).
DOI: 10.1016/j.foodhyd.2023.108551
30. Liu Y., Cai Z., Ma M., Sheng L., and Huang X. Effect of eggshell membrane as porogen on the physicochemical structure and protease immobilization of chitosan-based macroparticles. *Carbohydrate Polymers*, **242**, 116387 (2020). DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116387
31. Sorokin A. V., Olshannikova S. S., Lavlinskaya M. S., Holyavka M. G., Faizullin D. A., Zuev Y. F., and Artukhov V. G. Chitosan graft copolymers with *n*-vinylimidazole as promising matrices for immobilization of bromelain, ficin, and papain. *Polymers*, **14** (11), 2279 (2022). DOI: 10.3390/polym14112279
32. Holyavka M., Faizullin D., Koroleva V., Olshannikova S., Zakhartchenko N., Zuev Y., Kondratyev M., Zakharova E., and Artukhov V. Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity. *Int. J. Biol. Macromolecules*, **180**, 161–176 (2021). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.016
33. Baidamshina D. R., Koroleva V. A., Olshannikova S. S., Trizna E. Yu., Bogachev M. I., Artukhov V. G., Holyavka M. G., and Kayumov A. R. Biochemical Properties and Anti-Biofilm Activity of Chitosan-Immobilized Papain. *Mar. Drug*, **19** (4), 197 (2021). DOI: 10.3390/md19040197
34. Lavlinskaya M. S., Sorokin A. V., Mikhaylova A. A., Kuznetsov E. I., Baidamshina D. R., Saranov I. A., Grechkina M. V., Holyavka M. G., Zuev Y. F., Kayumov A. R., and Artukhov V. G. The low-waste grafting copolymerization modification of chitosan is a promising approach to obtaining materials for food applications. *Polymers*, **16** (11), 1596 (2024). DOI: 10.3390/polym16111596
35. Сорокин А. В., Ольшаникова С. С., Малыхина Н. В., Сакибаев Ф. А., Холявка М. Г., Лавлинская М. С. и Артиухов В. Г. Ацильномодифицированные водорастворимые производные хитозана – носители для адсорбционной иммобилизации папаина. *Биоорган. химия*, **48** (3), 340–351 (2022). DOI: 10.31857/S013234232202021X
36. Ольшаникова С. С., Малыхина Н. В., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Холявка М. Г. и Артиухов В. Г. Разработка биокатализатора на основе папаина, стабилизированного в комплексах с хитозаном и его производными: карбоксиметилхитозаном и *N*-(2-гидрокси)пропил-3- trimетиламмоний хитозаном. *Биотехнология*, **38** (1), 39–46 (2022). DOI: 10.56304/S0234275822010057
37. Гончарова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Кондратьев М. С., Юдин Н. Е., Путинцева О. В., Наквасина М. А., Холявка М. Г. и Артиухов В. Г. Разработка биокатализатора на основе папаина, иммобилизованного на ацетате хитозана. *Вестн. ВГУ. Сер. «Химия. Биология. Фармация»*, № 1, 82–88 (2023).
38. da Silva Melo A. E. C., de Sousa F. S. R., dos Santos-Silva A. M., do Nascimento E. G., Fernandes-Pedrosa M. F., de Medeiros C. A. C. X., and da Silva-Junior A. A. Immobilization of papain in chitosan membranes as a potential alternative for skin wounds. *Pharmaceutics*, **15** (12), 2649 (2023). DOI: 10.3390/pharmaceutics15122649
39. Ol'shannikova S. S., Red'ko Y. A., Lavlinskaya M. S., Sorokin, A. V., Holyavka M. G., and Artyukhov V. G. Preparation of papain complexes with chitosan microparticles and evaluation of their stability using the enzyme activity level. *Pharm. Chem. J.*, **55**, 1240–1244 (2022). DOI: 10.1007/s11094-022-02564-8
40. Гончарова С. С., Редько Ю. А., Лавлинская М. С., Сорокин А. В., Холявка М. Г., Кондратьев М. С. и Артиухов В. Г. Биокатализаторы на основе ассоциатов папаина с наночастицами хитозана. *Конденсированные среды и межфазные границы*, **25** (2), 173–181 (2023). DOI: 10.17308/kcmf.2023.25/11098
41. Chen S.-C., Wu Y.-C., Mi F.-L., Lin Y.-H., Yu L.-C., and Sung H.-W. A novel pH-sensitive hydrogel composed of *N*, *O*-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *J. Control. Release*, **96** (2), 285–300 (2004). DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.02.002
42. Королева В. А., Холявка М. Г., Ольшаникова С. С. и Артиухов В. Г. Разработка методики получения комплексов фицина с наночастицами хитозана с высоким уровнем протеолитической активности. *Биофармацевтич. журн.*, **10** (4), 36–40 (2018).
43. Sabirova A. R., Rudakova N. L., Balaban N. P., Ilyinskaya O. N., Demidyuk I. V., Kostrov S. V., Rudenskaya G. N., and Sharipova M. R. A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius*. *FEBS Lett.*, **584** (21), 4419–4425 (2010). DOI: 10.1016/j.febslet.2010.09.049
44. Laskowski R. A. and Swindells M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.*, **51** (10), 2778–2786 (2011). DOI: 10.1021/ci200227u
45. Salentin S., Schreiber S., Haupt V. J., Adasme M. F., and Schroeder M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucl. Acids Res.*, **43** (W1), W443–W447 (2015). DOI: 10.1093/nar/gkv315
46. Sikorski D., Gzyra-Jagieła K., and Draczynski Z. The kinetics of chitosan degradation in organic acid solutions. *Marine Drugs*, **19** (5), 236 (2021). DOI: 10.3390/ma19050236
47. Nguyen T. T. B., Hein S., Ng C.-H., and Stevens W. F. Molecular stability of chitosan in acid solutions stored at various conditions. *J. Appl. Polymer Sci.*, **107** (4), 2588–2593 (2007). DOI: 10.1002/app.27376
48. Poshina D. N., Raik S. V., Poshin A. N. and Skorik Y. A. Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review. *Polymer Degradation and Stability*, **156**, 269–278 (2018). DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.09.005
49. Матиев О. В. и Белов А. А. Иммобилизация папаина на хитозан. *Успехи в химии и химической технологии*, **35** (12), 117–119 (2021).

Complexation of Papain with Particles of Chitosan and Carboxymethylchitosan, Obtained in the Presence and in the Absence of Ascorbic Acid

Holyavka M.G.*, **, Redko Yu.A.*, Goncharova S.S.*¹, Lavlinskaya M.S.*¹, Sorokin A.V.*¹,
Kondratyev M.S.*¹, ***, and Artyukhov V.G.*¹

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

**Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

***Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Particles of medium and high molecular weight chitosans and carboxymethylchitosans were obtained without and with the addition of ascorbic acid. Methods were developed to obtain complexes of these particles with the plant protease papain. It was found that the activity of papain complexes with particles of carboxymethyl chitosan is significantly higher compared to its complexes with particles of chitosan. At the same time, complexes with particles of chitosan and carboxymethyl chitosan obtained with the addition of ascorbic acid showed higher values of proteolytic activity than complexes with polysaccharide particles obtained without its addition. Using molecular docking, it was found that amino acid residues of papain interact with both chitosan and carboxymethyl chitosan mainly by forming hydrogen bonds and van der Waals interactions. In addition, ascorbic acid molecules and both types of polysaccharides interact with amino acid residues from the active site of papain – Cys25 and His159, which probably contributes to an increase in the activity and stability of the enzyme in complexes with particles of chitosan and carboxymethyl chitosan, including due to the fact that ascorbic acid prevents the oxidation of the thiol group of papain, which is responsible for the act of catalysis.

Keywords: papain, chitosan, carboxymethylchitosan, complexation