

## ПРОЦЕССЫ ТЕРМИЧЕСКОЙ АГРЕГАЦИИ И АВТОЛИЗА МОЛЕКУЛ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ – БРОМЕЛИНА, ФИЦИНА И ПАПАИНА

© 2025 г. М.Г. Холявка\*, \*\*, #, В.А. Королева\*, \*\*\*, В.Г. Артюхов\*

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

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

\*\*\*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Студенческая ул., 10, Воронеж, 394036, Россия

#E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 06.11.2024 г.

После доработки 28.12.2024 г.

Принята к публикации 15.01.2025 г.

Среди протеаз растительного происхождения цистеиновые папаиноподобные эндопептидазы, такие как фицин, бромелин и папаин, занимают важное место благодаря их высокой протеолитической активности в физиологическом диапазоне значений pH среды. Процессы термической агрегации и автолиза молекул протеаз могут оказывать существенное влияние на их активность и соответственно перспективы практического применения. К настоящему времени механизмы агрегации молекул белков еще недостаточно изучены, однозначно предсказать их агрегационную устойчивость на основании аминокислотной последовательности пока не удастся. В связи с этим целью работы было изучение процессов термической агрегации и автолиза молекул некоторых цистеиновых протеаз. Установлено, что несмотря на схожие структурные и функциональные свойства фицина, бромелина и папаина процессы их термической агрегации протекают с различной интенсивностью. В частности, фицин и бромелин примерно сопоставимы по показателям их агрегационной устойчивости, тогда как папаин существенно менее подвержен процессам агрегации при воздействии повышенных температур. Выдвинуто предположение о том, что на устойчивость названных цистеиновых протеаз к процессам агрегации существенное влияние оказывают наличие и конфигурация внутренних структур молекулы, таких как полости, туннели и поры, а также зарядовые свойства ее поверхности.

*Ключевые слова:* бромелин, фицин, папаин, агрегация, автолиз.

DOI: 10.31857/S0006302925020027, EDN: LANVSP

Протеазы — наиболее широко распространенные в промышленных процессах ферменты, их доля составляет более 60% коммерчески доступных препаратов [1]. Протеолитические ферменты востребованы в самых разных областях: модификация пищевых продуктов [2], производство сыра [3], разделение рацемических смесей [4], текстильная промышленность [5]. Более того, в настоящее время растет интерес к косметическим и фармацевтическим препаратам на основе протеолитических ферментов [6]. Одной из наиболее важных сфер применения протеаз является гидролиз белков для получения функциональных пептидов [7–11].

Среди протеаз растительного происхождения цистеиновые папаиноподобные эндопептидазы, такие как фицин, бромелин и папаин, занимают важное место благодаря их высокой протеолитической активности в физиологическом диапазоне

значений pH среды [12]. Эти ферменты могут катализировать гидролиз широкого спектра связей, включая пептидные и эфирные.

Растительные ферменты обладают рядом преимуществ, включая их низкую стоимость, что делает их перспективными компонентами для лекарств, пищевых продуктов и косметических добавок. С другой стороны, их способность расщеплять пептидные связи делает растительные ферменты привлекательными для био- и пищевых технологий, облегчая создание инновационных или стабильных пищевых продуктов.

Фицин (КФ 3.4.22.3) выделяют из латекса растений рода *Ficus*. Он известен своей противогрибковой активностью [13], способностью разрушать биопленки *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* [14], *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* [15], а также ранозаживляющими свойствами [16].

Бромелин (КФ 3.4.22.32) получают из стеблей растений *Ananas comosus*. Фермент одобрен управлением по контролю за продуктами и лекарствами США и Европейским медицинским агентством ЕС, рекомендуется для лечения ожоговых ран и является составной частью препарата Nexobrid®, известного в США как Debrase [17, 18]. Кроме того, бромелин находит применение в косметологии для лечения акне [19] из-за своей эффективности против бактериальных пленок [20].

Папаин (КФ 3.4.22.2) получают из растений *Carica papaya*. Его используют при лечении легких стадий непроходимости пищевода [21], спортивных травм [22], угрей [23] и в различных стоматологических процедурах [24–26]. Папаин, как фицин и бромелин, также проявляет антибиопленочные свойства [27].

Все перечисленные ферменты принадлежат к папаиноподобным цистеиновым протеазам, которые являются мономерными белками и характеризуются консервативной структурой. Глобула цистеиновой протеазы состоит из двух отдельных доменов:  $\alpha$ -спиральный (L-домен) и  $\beta$ -складчатый (R-домен), активный центр образуют остатки цистеина и гистидина [28].

Воздействие повышенных температур может вызывать разворачивание белковой глобулы с последующей агрегацией развернутых молекул фермента и снижение его активности [29], поэтому изучение поведения ферментов в водных средах при нагревании способствует теоретическим представлениям о кинетике процессов его агрегации. Подобные фундаментальные исследования могут быть полезны при планировании технологических регламентов для практического применения папаиноподобных протеаз в различных отраслях промышленности, особенно в медицине, фармацевтике и производстве продуктов питания, учитывая, что названные области часто включают высокотемпературную обработку во время стерилизации конечных продуктов [30–32].

Известно, что потеря агрегационной устойчивости приводит к снижению функциональных свойств ферментных препаратов. Кроме того, белковые агрегаты повышают иммуногенность биологически активного компонента [33], снижают его эффективность и биодоступность, а также могут закупоривать капилляры [34]. С экономической точки зрения, склонность к агрегации делает невозможной транспортировку препарата в виде лиофилизата, что существенно влияет на его стоимость [35, 36]. Зачастую участки, которые склонны к неспецифическим взаимодействиям, содержат высокий процент остатков тирозина, триптофана, фенилаланина и аргинина [37–39]. Эти аминокислоты являются гидрофобными и

положительно заряженными, они участвуют в  $\pi$ – $\pi$ -,  $\pi$ -катионных или катион-анионных взаимодействиях [40, 41]. Если подобные аминокислоты объединяются в одной области, вероятность их участия в неспецифических взаимодействиях возрастает.

К настоящему времени механизмы агрегации молекул белков еще недостаточно изучены, однозначно предсказать их агрегационную устойчивость на основании аминокислотной последовательности пока не удастся. Однако в многочисленных работах предлагаются все более точные модели, связывающие третичную структуру поверхности молекулы фермента, получаемую в результате моделирования, с измеряемыми свойствами белковых растворов, например вязкостью и скоростью агрегации [42–44]. Необходимо учитывать, что для протеолитических ферментов кроме процессов ассоциации-диссоциации характерны также процессы автолиза, которые могут вносить существенный вклад в общую картину кинетики взаимодействия частиц в системе и соответственно изменять ее свойства.

В связи с этим целью работы было изучение процессов термической агрегации и автолиза в водных растворах молекул некоторых цистеиновых протеаз, а именно фицина, бромелина и папаина.

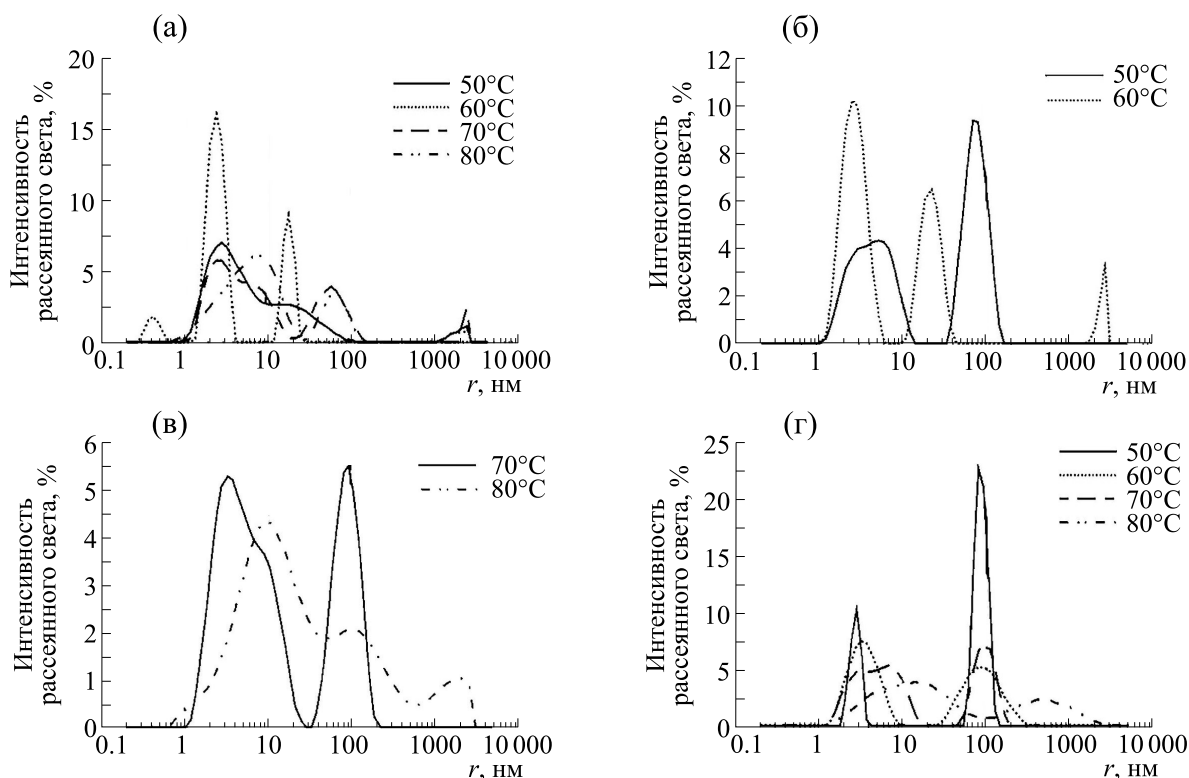
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны фицин, бромелин и папаин фирмы Sigma (США).

Размеры молекул цистеиновых протеаз, их агрегатов и возможных продуктов автолиза определяли методом динамического светорассеяния на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632.8 нм) собирали под углом  $173^\circ$  [45]. Концентрация белка в 0.1 М фосфатном буфере с pH 6.5 составляла 1, 5 и 10 мг/мл. Образец предварительно пропускали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Millipore, США) для удаления пыли и других посторонних частиц. Гидродинамический радиус частиц рассчитывали по уравнению Стокса–Эйнштейна.

Известно, что диаметр молекулы бромелина составляет 4.553 нм [46], так как фицин и папаин близки к бромелину по структуре и молекулярной массе, размеры их молекул должны быть также близки. Массы фицина составляет 24 кДа, бромелина – 23.4–35.7 кДа, папаина – 23.4 кДа [32, 47, 48].

В связи с этим в полученных массивах экспериментальных данных мы выделили 4 размерных группы частиц, присутствующих в исследуемой системе. Частицы первой группы с радиусом ме-



**Рис. 1.** Распределение интенсивности рассеянного света (в %) по размерам частиц в начальный момент инкубации раствора фицина с концентрацией 1 мг/мл (а), через 11 мин (б), 1.5 ч (в) и 3 ч (г) инкубации.

нее 2 нм, вероятно, соответствуют продуктам автолиза фицина/бромелина/папаина, второй группы с радиусом 2.0–2.5 нм – нативному ферменту, третьей группы с радиусом 2.5–4.5 нм – молекулам протеазы с измененной пространственной структурой, четвертой группы с радиусом более 4.5 нм – агрегатам молекул фермента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Исследование процессов ассоциации-диссоциации молекул фицина.** При концентрации раствора фицина 1 мг/мл средний радиус максимумов, соответствующих нативной форме фермента, практически полностью совпадает при 50, 60 и 70°C. При 80°C данный максимум отсутствует (рис. 1а). Наибольшая высота указанного максимума при наименьшей ширине наблюдается при 60°C, что, вероятно, свидетельствует о более высоком количестве молекул нативного фермента при данной температуре. Кроме того, при названной температуре регистрируется максимум, соответствующий продуктам автолиза. При 50 и 70°C максимумы, соответствующие молекулам нативного фицина и их агрегатам, сливаются в один, что может говорить об образовании ряда переходных форм фермента. Количество отдельных максимумов, соответствующих агрегатам молекул фермента,

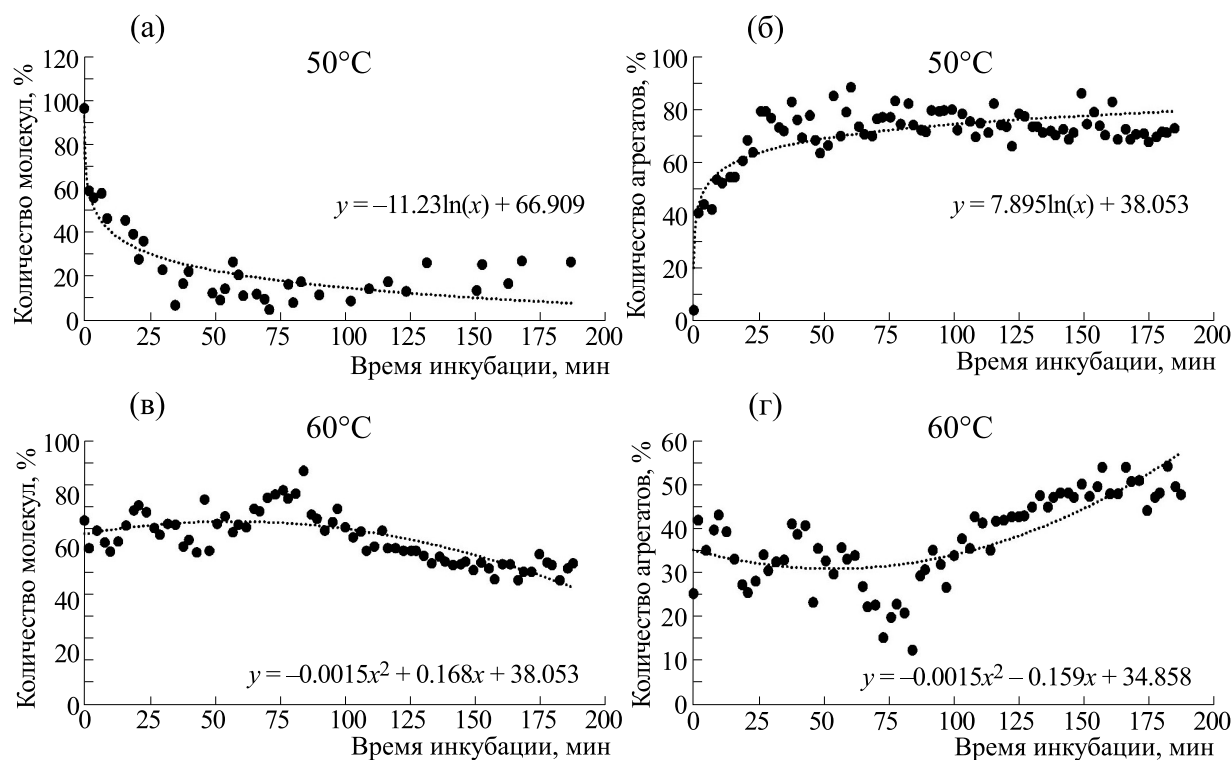
составляет 1 при 50 и 60°C, 2 при 70°C и 3 при 80°C.

В ходе инкубации раствора фицина с концентрацией 1 мг/мл при температурах 50 и 60°C наблюдается снижение количества молекул нативного фермента на фоне роста количества агрегатов (рис. 2).

После 11 мин инкубации при 50°C регистрируется имеющий значительную ширину максимум, соответствующий частицам с измененной пространственной структурой (рис. 1б), который, вероятно, обусловлен конформационными изменениями большого числа молекул фицина и образованием переходных форм между нативным ферментом и его агрегатами.

Инкубация раствора фицина при 70°C показывает изменения количества частиц различного радиуса в системе, не имеющие определенной закономерности. При 80°C уже в начале инкубации наблюдается полная агрегация частиц в растворе фицина с концентрацией 1 мг/мл.

По прошествии полутора часов инкубации при 70°C наблюдается уширение максимума, соответствующего нативному фицину, что может быть вызвано как нарушениями структуры молекул фермента, так и диссоциацией их агрегатов. При 80°C наблюдается слияние максимумов, соответствующих агрегатам молекул фермента, что, вероятно, обуславливается высокой степенью по-



**Рис. 2.** Зависимость количества молекул нативного фермента (а, в) и их агрегатов (б, г) от времени инкубации раствора фицина с концентрацией 1 мг/мл при 50 и 60°C.

лидисперсности частиц данной размерной группы (рис. 1в).

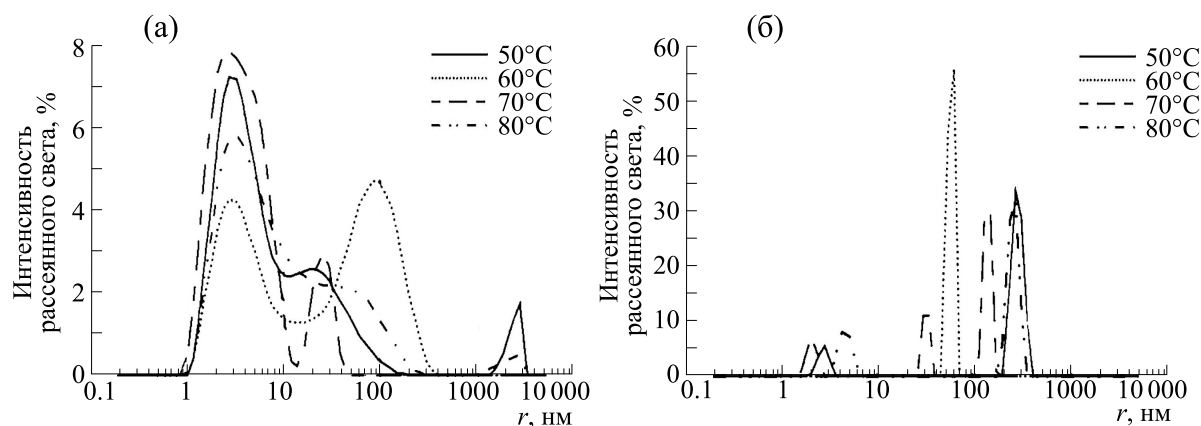
После 3 ч инкубации раствора фицина с концентрацией 1 мг/мл наименьшая степень агрегации наблюдается при 60°C: молекулы нативного фермента количественно преобладают над агрегатами (табл. 1). Инкубация при 80°C показывает полное отсутствие максимума, соответствующего нативной форме белковой глобулы (рис. 1г). Степень агрегации молекул фицина при 50 и 70°C сходна, однако в первом случае имеет место значительно больший прирост количества агрегатов в сравнении с началом инкубации. Кроме того,

при 50°C наблюдается наименьшая полидисперсность частиц в растворе.

В начале инкубации раствора фицина с концентрацией 5 мг/мл при всех исследуемых температурах наблюдается уширение максимума, соответствующего нативной форме фермента, что может свидетельствовать о нарушении пространственной структуры молекул уже в начальный момент температурного воздействия. Кроме того, при 50, 60 и 80°C максимумы, соответствующие нативным молекулам и их агрегатам, сливаются в один, что указывает на образование переходных форм между частицами данных размерных групп.

**Таблица 1.** Количество молекул нативного фицина и их агрегатов в начале и в конце времени трехчасовой инкубации при концентрации образца 1 мг/мл

Температура образцов, °C	Нативная форма фицина		Агрегаты молекул фицина	
	Количество частиц на момент начала инкубации, %	Количество частиц в конце инкубации, %	Количество частиц на момент начала инкубации, %	Количество частиц в конце инкубации, %
50	96.3	27.0	3.7	73.0
60	69.1	52.6	25.0	47.4
70	67.8	24.8	28.3	75.2
80	0	0	100	100



**Рис. 3.** Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в начальный момент (а) и через 3 ч (б) инкубации раствора фицина с концентрацией 5 мг/мл при 50, 60, 70 и 80°C.

Инкубация при 50 и 80°C характеризуется появлением вначале инкубации дополнительного максимума, соответствующего агрегатам молекул фицина (рис. 3а).

В ходе инкубации раствора фицина с концентрацией 5 мг/мл снижение количества молекул нативного фермента на фоне роста количества агрегатов наблюдается при всех исследуемых температурах (50, 60, 70 и 80°C) (рис. 4), интенсивность процессов агрегации возрастает по сравнению с таковыми при концентрации фермента 1 мг/мл (рис. 5).

В конце периода инкубации раствора фицина с концентрацией 5 мг/мл при 60°C наблюдается полная агрегация частиц в исследуемой системе (табл. 2, рис. 3б). Инкубация при 50, 70 и 80°C характеризуется наличием как нативных молекул фермента, так и их агрегатов, с преобладанием последних.

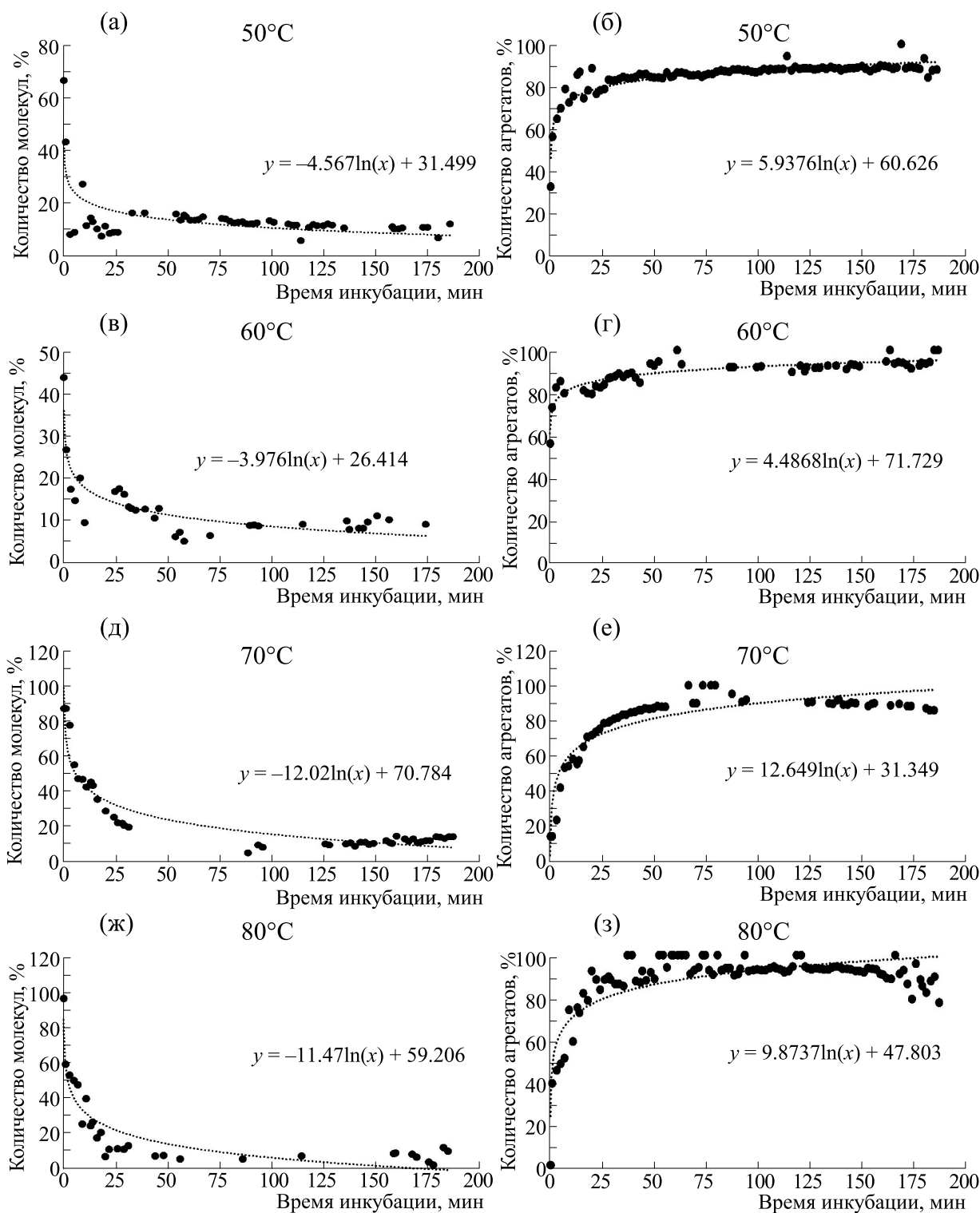
В начале инкубации раствора фицина с концентрацией 10 мг/мл при 50 и 60°C наблюдается уширение максимума, соответствующего нативным молекулам фермента. Кроме того, данный максимум при указанных температурах сливается

с максимумом, соответствующим агрегатам молекул белка. Обозначенные явления могут быть обусловлены высокой степенью полидисперсности раствора фицина, связанной, вероятно, с высокой степенью конформационной лабильности фермента и образованием множества переходных форм. При 70 и 80°C максимум, соответствующий нативной форме фермента, отсутствует, однако регистрируется максимум, соответствующий молекулам с нарушенной пространственной структурой (рис. 3а).

Инкубация раствора фицина с концентрацией 10 мг/мл показывает наибольшую интенсивность процессов агрегации: количество агрегатов в системе достигает 100% при 50 и 60°C после 18 мин, при 70°C после 7 мин, при 80°C – после 3 мин инкубации. Однако при 60, 70 и 80°C по прошествии 2, 2.5 и 1 ч после начала инкубации соответственно наблюдается выпадение осадка, за счет чего снижается число агрегатов в растворе (рис. 7). Кроме того, регистрируется дальнейшее снижение количества агрегатов, обусловленное появлением и ростом количества продуктов автолиза,

**Таблица 2.** Количество молекул нативного фицина и их агрегатов в начале и в конце времени трехчасовой инкубации при концентрации образца 5 мг/мл

Температура образцов, °C	Нативная форма фицина		Агрегаты молекул фицина	
	Количество частиц на момент начала инкубации, %	Количество частиц в конце инкубации, %	Количество частиц на момент начала инкубации, %	Количество частиц в конце инкубации, %
50	66.7	12.0	33.3	88.0
60	43.4	0	56.6	100
70	87.1	14.3	12.9	85.7
80	97.8	22.2	2.2	77.8



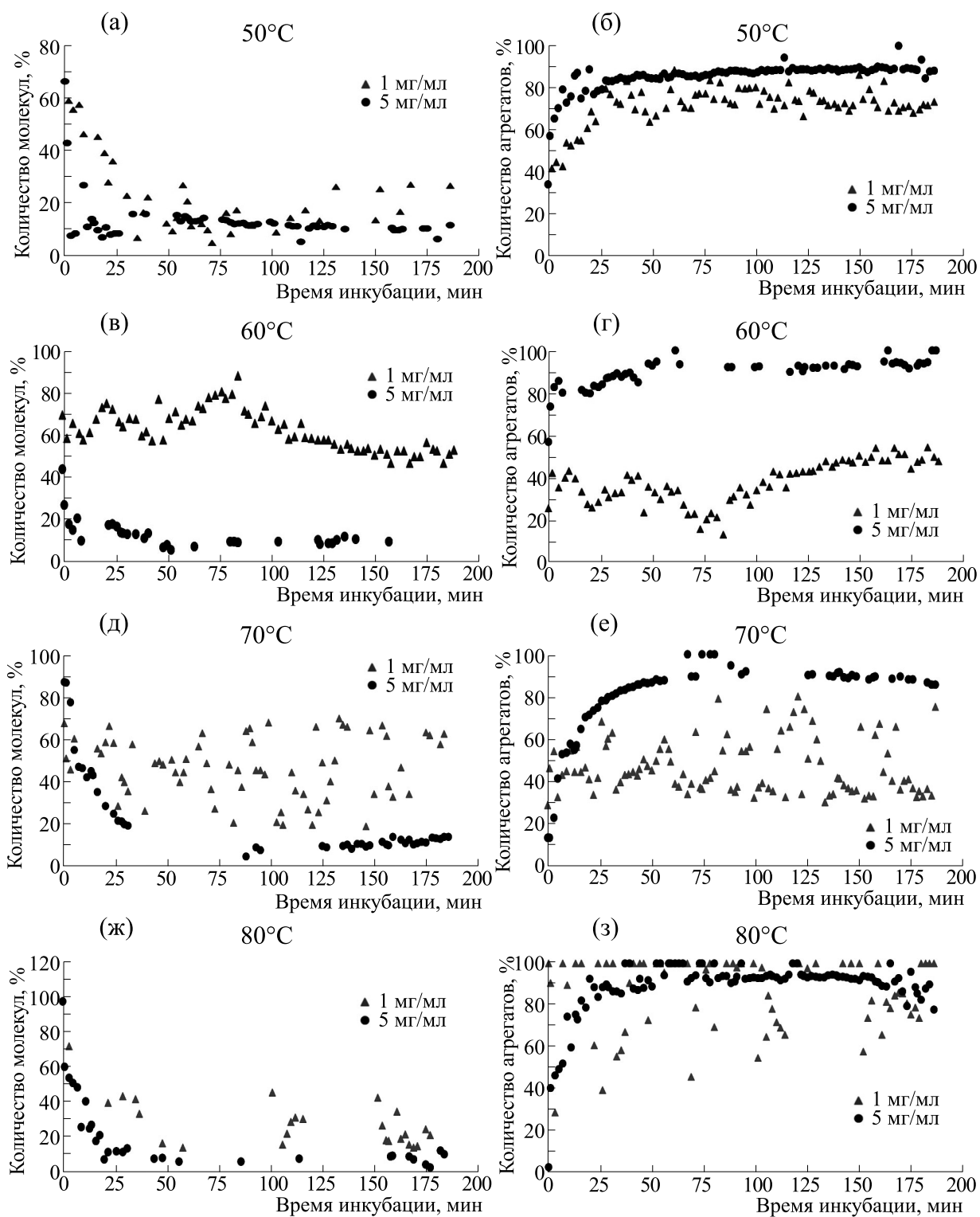
**Рис. 4.** Зависимость количества молекул нативного фермента (а, в, д, ж) и их агрегатов (б, г, е, з) от времени инкубации раствора фицина с концентрацией 5 мг/мл при 50, 60, 70 и 80°C.

нативных молекул фермента и молекул с нарушенной пространственной структурой.

При 50°C процессы образования агрегатов подчиняются логарифмической зависимости на

начальных этапах инкубации и не регистрируются после 1.5 ч инкубации (рис. 7а).

При 60, 70 и 80°C к концу времени инкубации обнаруживаются максимумы, соответствующие



**Рис. 5.** Зависимость количества молекул нативного фермента (а, в, д, ж) и их агрегатов (б, г, е, з) от времени инкубации растворов фицина с концентрациями 1 и 5 мг/мл при 50, 60, 70 и 80°C.

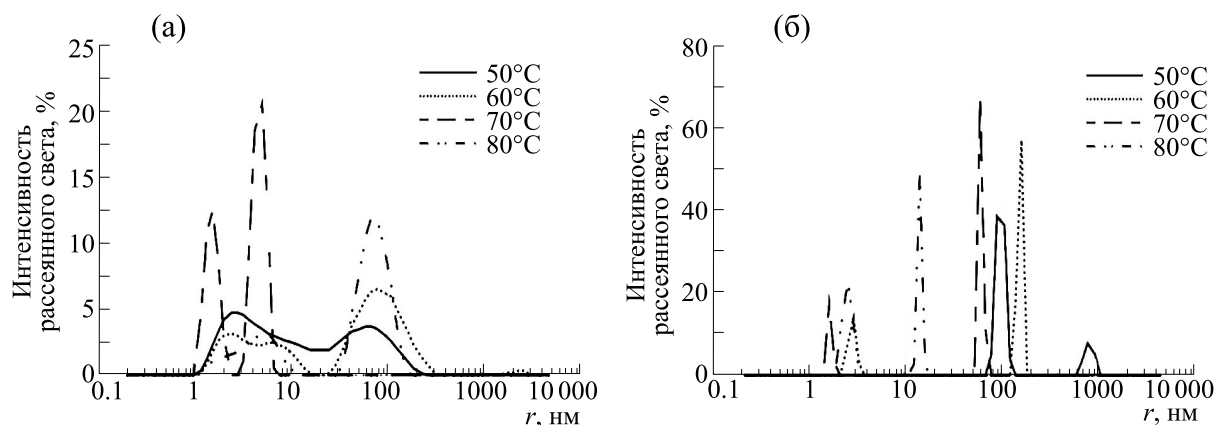


Рис. 6. Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в начальный момент (а) и через 3 ч (б) инкубации раствора фицина с концентрацией 10 мг/мл при 50, 60, 70 и 80°C.

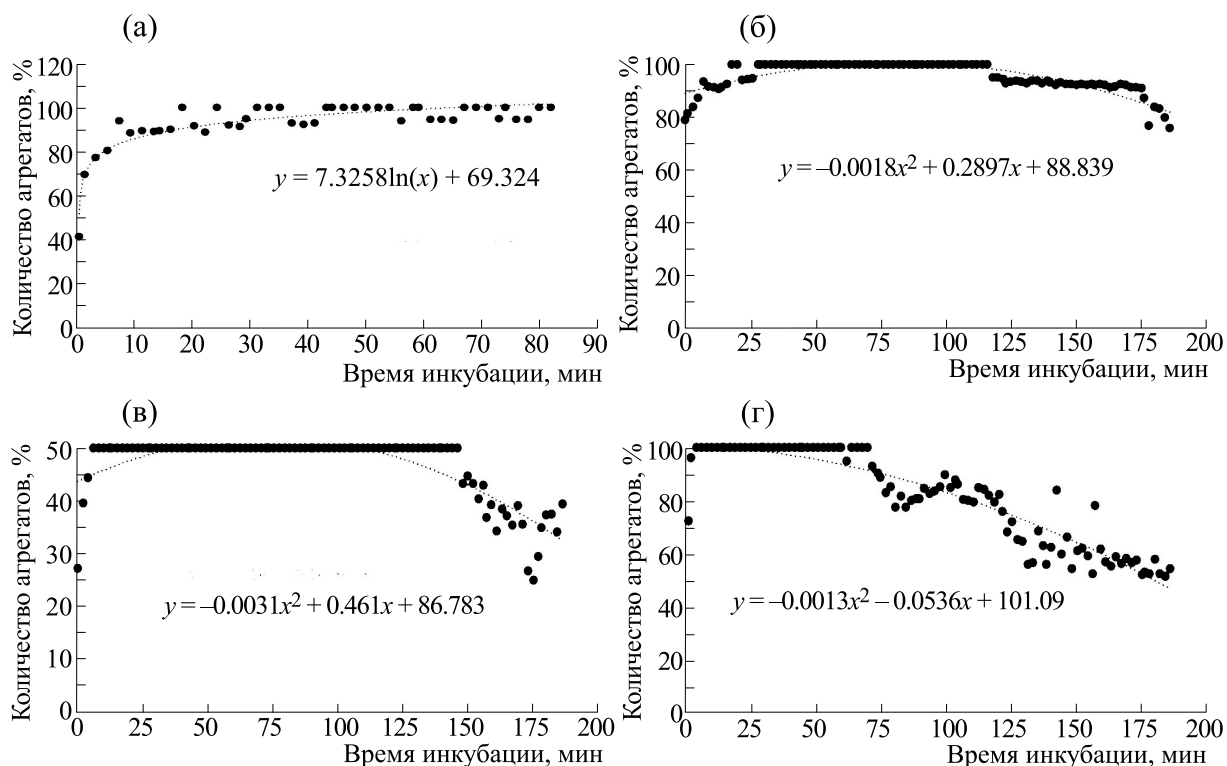


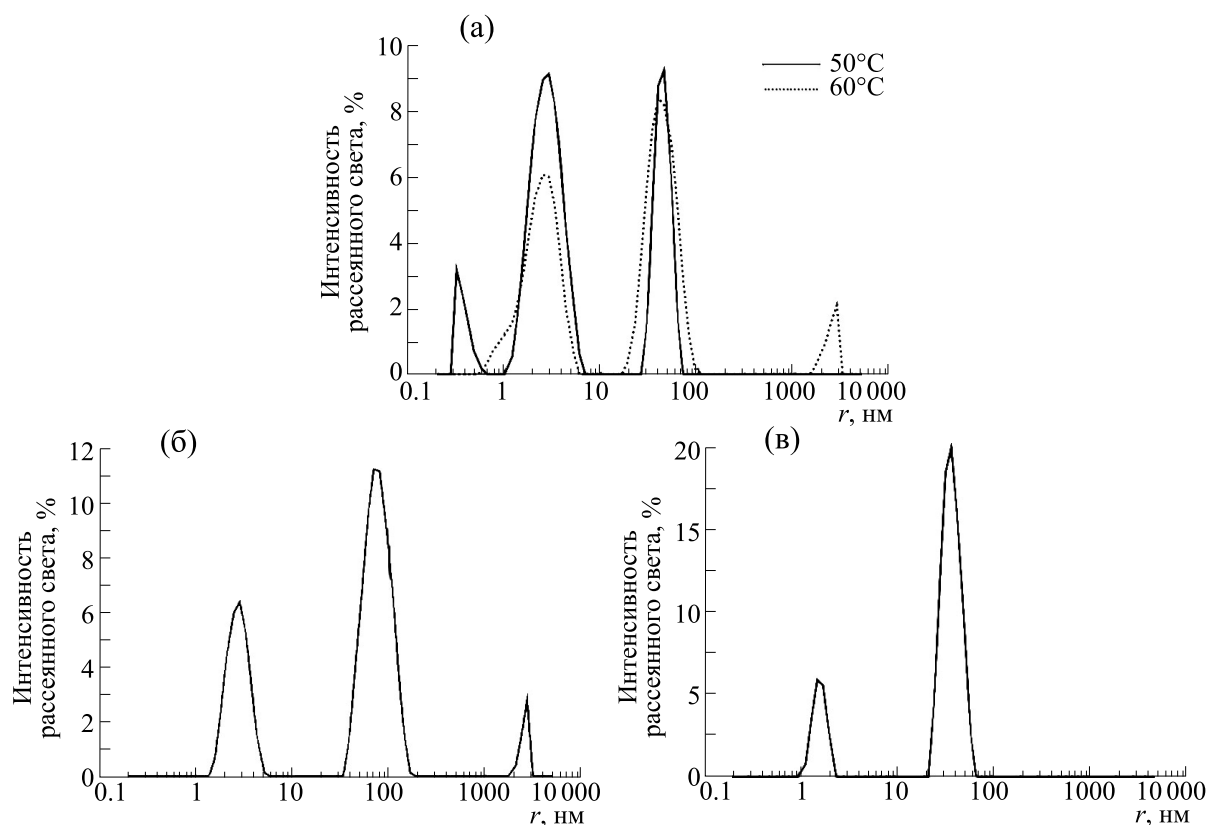
Рис. 7. Зависимость количества агрегатов от времени инкубации раствора фицина с концентрацией 10 мг/мл при 50°C (а), 60°C (б), 70°C (в) и 80°C (г).

нативной форме фицина, что может быть связано с выпадением части агрегатов в осадок и снижением их доли в растворе (рис. 6б).

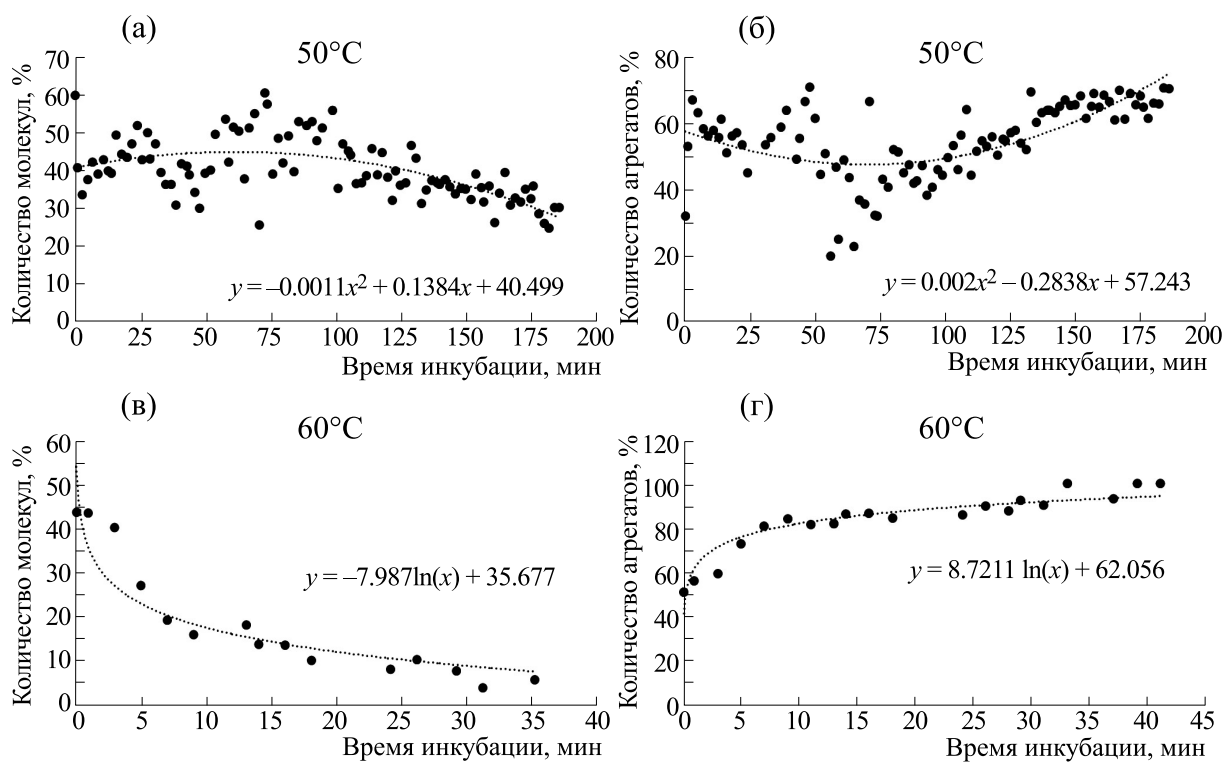
**Исследование процессов ассоциации-диссоциации молекул бромелина при различных значениях температуры методом динамического светорассеяния.** Средний радиус максимумов, соответствующих нативной форме бромелина, практически полностью совпадает при 50 и 60°C (рис. 8а). Од-

нако интенсивность и ширина полосы в них отличаются, что может свидетельствовать как о разном количестве нативных молекул протеазы в начальный момент инкубации, так и о разнице в степени конформационной лабильности и, как следствие, полидисперсности форм фермента при 50 и 60°C. При 50°C регистрируется максимум, указывающий на присутствие продуктов автолиза. Максимумы, соответствующие агрегатам

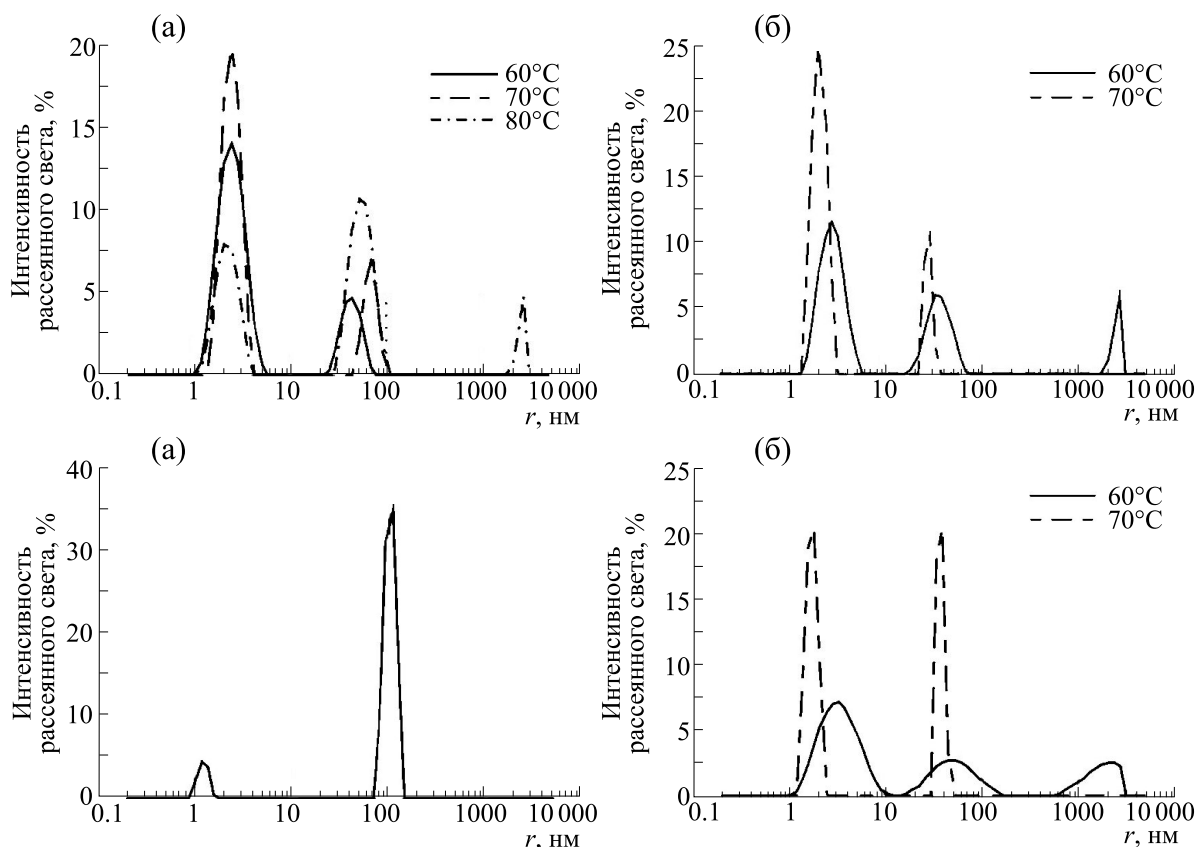




**Рис. 8.** Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в начальный момент инкубации раствора бромелина с концентрацией 1 мг/мл при 50 и 60°C (а) и в конце периода инкубации (через 3 ч) при 50°C (б) и 60°C (в).



**Рис. 9.** Зависимость количества молекул нативного фермента (а, в) и их агрегатов (б, г) от времени инкубации раствора бромелина с концентрацией 1 мг/мл при 50 и 60°C.



**Рис. 10.** Распределение интенсивности рассеянного света (%) по размерам частиц: (а) — в начальный момент инкубации раствора папаина с концентрацией 1 мг/мл при 60, 70 и 80°C; (б) — через 1.5 ч инкубации при 60 и 70°C; (в) — через 100 мин при 80°C; (г) — через 3 ч при 60 и 70°C.

молекул фермента, также практически полностью совпадают по радиусу с незначительным отличием по интенсивности. При 60°C регистрируется появление дополнительного максимума.

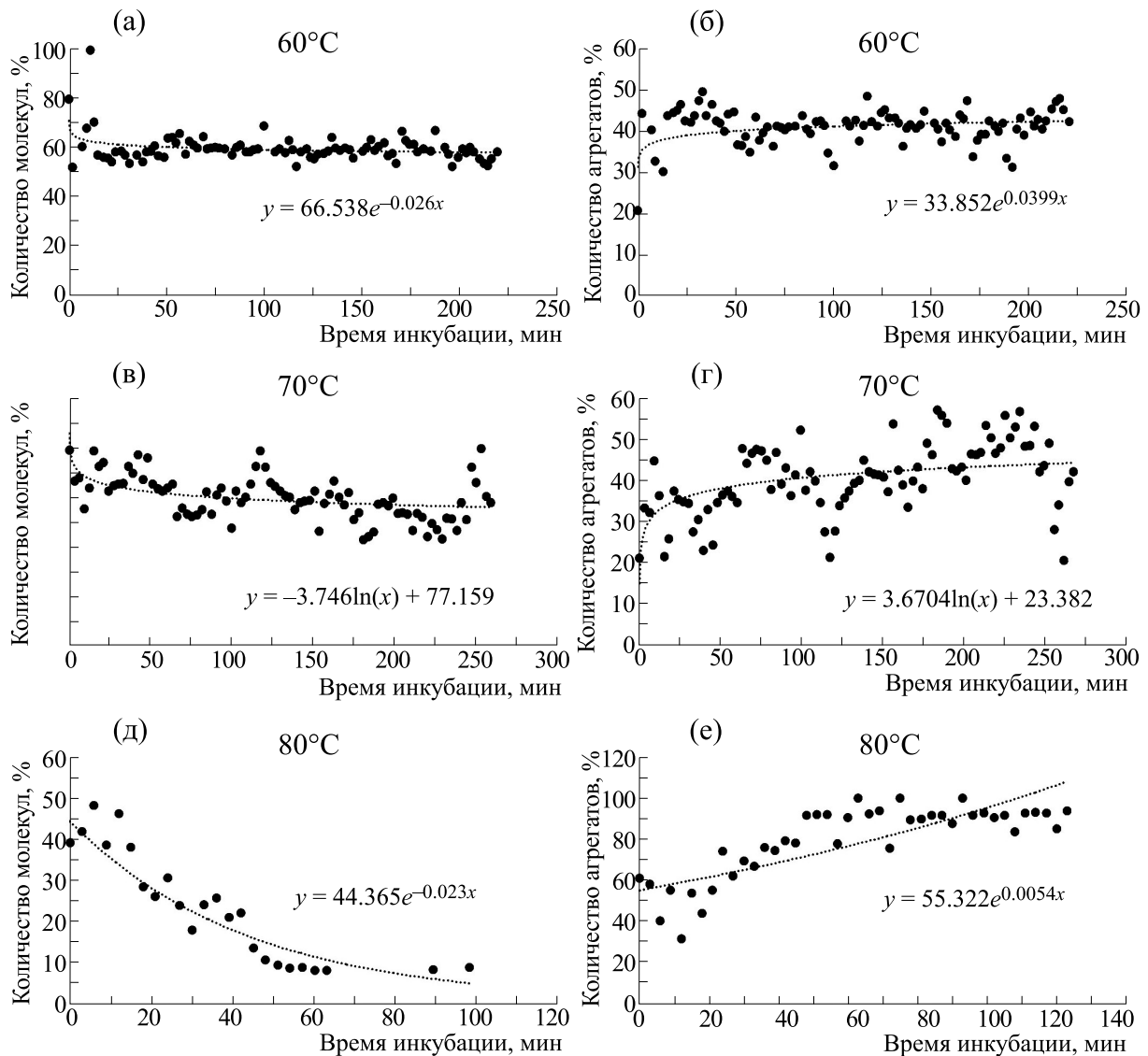
В ходе инкубации раствора бромелина при 50°C в течение первых 70 мин регистрируется рост количества молекул нативного фермента на фоне снижения количества агрегатов. Параллельно с этим возрастает количество продуктов автолиза, наличие которых регистрируется уже с начала инкубации. Однако по прошествии полутора часов количество молекул нативного фермента значительно снижается на фоне роста количества агрегатов (рис. 9а,б).

В конце периода инкубации наблюдается значительное преобладание агрегатов; регистрируется два максимума, соответствующих частицам данной размерной группы (рис. 8б).

Инкубация раствора бромелина с концентрацией 1 мг/мл при 60°C показывает снижение количества молекул нативного фермента на фоне роста количества агрегатов с полной агрегацией частиц в исследуемой системе через 40 мин (8в, 9в и 9г).

При 70°C полная агрегация частиц в исследуемой системе наблюдается уже с первой минуты инкубации.

**Исследование процессов ассоциации-диссоциации молекул папаина при различных значениях температуры методом динамического светорассеяния.** Средний радиус максимумов, соответствующих нативной форме папаина, практически полностью совпадает при всех исследуемых температурах при изучении раствора в концентрации 1 мг/мл (рис. 10а). Однако интенсивность и ширина полосы в них отличаются, что может свидетельствовать как о различном количестве нативных молекул протеазы в начальный момент инкубации, так и о разнице в степени конформационной лабильности и, как следствие, полидисперсности форм фермента при 60, 70 и 80°C. Наблюдается различная степень агрегации частиц: максимум, соответствующий агрегатам, отличается при всех исследуемых температурах по значению радиуса, интенсивности и ширине полосы. Более выраженные процессы агрегации регистрируются при 80°C, о чем также свидетельствует появление дополнительного максимума агрегатов.



**Рис. 11.** Зависимость количества молекул нативного фермента (а, в, д) и их агрегатов (б, г, е) от времени инкубации раствора папаина с концентрацией 1 мг/мл при 60, 70 и 80°C.

В ходе инкубации раствора папаина с концентрацией 1 мг/мл при температурах 60, 70 и 80°C наблюдалось снижение количества нативного фермента на фоне роста количества агрегатов (рис. 11). При всех исследуемых температурах процессы агрегации детектировались уже с начала инкубации.

После полутора часов инкубации раствора папаина интенсивность максимума, соответствующего его нативной форме, при 70°C превышает таковую при 60°C, что, вероятно, обусловлено выпадением агрегатов молекул фермента в осадок при 70°C (рис. 10а). При 60°C обнаруживается дополнительный максимум, соответствующий крупным агрегатам молекул папаина.

В конце времени инкубации раствора папаина при 60 и 70°C регистрируются близкие значения количества молекул нативного папаина и их агрегатов с незначительным преобладанием нативной формы фермента (табл. 3). Однако распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в значительной степени различается при указанных температурах. Инкубация при 60°C показывает меньшую интенсивность максимумов, соответствующих нативной форме папаина и агрегатам, при большей их ширине, что может указывать на более высокую степень полидисперсности форм фермента (рис. 10г).

При 80°C наблюдается количественное преобладание агрегатов молекул фермента в течение всего времени инкубации. Кроме того, при

**Таблица 3.** Количество молекул нативного папаина и их агрегатов в начале и в конце времени трехчасовой инкубации при концентрации образца 1 мг/мл

Температура образцов, °С	Нативная форма папаина		Агрегаты молекул папаина	
	Количество частиц на момент начала инкубации, %	Количество частиц в конце инкубации, %	Количество частиц на момент начала инкубации, %	Количество частиц в конце инкубации, %
60	79.7	58.2	20.3	41.8
70	79.1	58.3	20.9	41.7

данной температуре наличие нативной формы папаина не регистрируется после 100 мин инкубации (рис. 10в). Также при 80°C наблюдается наибольший прирост количества агрегатов (табл. 3).

**Сравнение интенсивности процессов термической агрегации и автолиза молекул бромелина, фицина, папаина.** Из полученных нами результатов отчетливо видно, что несмотря на схожие структурные и функциональные свойства фицина, бромелина и папаина процессы их термической агрегации протекают с различной интенсивностью. В частности, фицин и бромелин примерно сопоставимы по показателям их агрегационной устойчивости, тогда как папаин существенно менее подвержен процессам агрегации при воздействии температур 60, 70 и 80°C. Этот факт хорошо коррелирует с особенностями пространственных структур молекул названных цистеиновых протеаз. Известно, что внутренние структуры молекул белков — внутренние полости, туннели и поры — могут влиять на термостабильность ферментов и их устойчивость к агрегации. Ранее в наших работах было показано, что бромелин и фицин имеют сходную локализацию внутренних полостей, в отличие от папаина, молекула которого в своем составе не содержит полостей, имеющих локализацию, близкую с таковой для названных ферментов. При этом бромелин характеризуется наименьшей степенью компактизации в связи с наибольшим количеством и объемом внутренних структур [49]. Кроме того, нами было показано, что молекулы фицина, бромелина и папаина отличаются друг от друга по зарядовым свойствам. Процентное содержание положительно заряженных остатков при pH 7.4 существенно превышает таковое для отрицательно заряженных аминокислот на поверхности глобул папаина (17% положительно заряженных и 8% отрицательно заряженных остатков) и бромелина (21 и 8% остатков соответственно). Для молекулы фицина количество положительно заряженных остатков составляет 21%, а отрицательно заряженных — 22%. При этом количество незаряженных остатков на поверхности молекул сопоставимо по значению и составляет 27% для фицина, 30% для бромелина и

31% для папаина [50]. Таким образом, логично предположить, что на устойчивость к процессам агрегации существенное влияние оказывает не столько аминокислотная последовательность фермента, сколько особенности его пространственной организации (а именно, наличие и конфигурация внутренних структур молекулы, таких как полости, туннели и поры) и зарядовые свойства поверхности молекулы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из изложенного в статье материала можно сделать вывод о том, что в случае цистеиновых протеаз — бромелина, фицина, папаина — высокая степень сходства их пространственной организации и функциональных свойств не гарантирует совпадения стадий процессов их термической агрегации. Папаин при воздействии повышенных температур значительно менее подвержен процессам агрегации, чем фицин и бромелин, которые сопоставимы по параметрам их агрегационной устойчивости. При этом папаин не содержит внутренних полостей, имеющих локализацию, близкую с таковой для молекул фицина и бромелина. Логично предположить, что различия в устойчивости названных протеаз к процессам термической агрегации обусловлены отличиями в объеме и конфигурации внутренних структур их молекул, таких как полости, туннели и поры, а также в зарядовых свойствах поверхности их белковых глобул.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при 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. 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
2. Mamo J. and Assefa F. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. *J. Food Qual.*, **2018**, 1–15 (2018). DOI: 10.1155/2018/7957269
3. Morellon-Sterling R., El-Siar H., Tavano O. L., Berenguer-Murcia Á., and Fernandez-Lafuente R. Ficin: a protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis. *Int. J. Biol. Macromol.*, **162**, 394–404 (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.144
4. Tavano O. L., Berenguer-Murcia A., Secundo F., and Fernandez-Lafuente R. Biotechnological applications of proteases in food technology. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **17** (2), 412–436 (2018). DOI: 10.1111/1541-4337.12326
5. Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., and Ashraf M. Microbial proteases applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **7**, 110 (2019). DOI: 10.3389/fbioe.2019.00110
6. Manjuprasanna V. N., Rudresha G. V., Urs A. P., Milan Gowda M. D., Rajaiah R., and Vishwanath B. S. Drupin, a cysteine protease from *Ficus drupacea* latex accelerates excision wound healing in mice. *Int. J. Biol. Macromol.*, **165**, 691–700 (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.215
7. Castañeda-Valbuena D., Berenguer-Murcia Á., Fernandez-Lafuente R., Morellon-Sterling R., and Tacias-Pascacio V. G. Biological activities of peptides obtained by pepsin hydrolysis of fishery products. *Process Biochem.*, **120**, 53–63 (2022). DOI: 10.1016/j.procbio.2022.05.029
8. Gorguç A., Gençdağ E., and Yılmaz F. M. Bioactive peptides derived from plant origin by-products: biological activities and techno-functional utilizations in food developments – a review. *Food Res. Int.*, **136**, 109504 (2020). DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109504
9. Karami Z. and Akbari-Adergani B. Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *J. Food Sci. Technol.*, **56**, 535–547 (2019). DOI: 10.1007/s13197-018-3549-4
10. Nwachukwu I. D. and Aluko R. E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *J. Food Biochem.*, **43** (1), e12761 (2019). DOI: 10.1111/jfbc.12761
11. Tacias-Pascacio V. G., Morellon-Sterling R., Castañeda-Valbuena D., Berenguer-Murcia, Á., Kamli M. R., Tavano O., and Fernandez-Lafuente R. Immobilization of papain: a review. *Int. J. Biol. Macromol.*, **188**, 94–113 (2021). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.016
12. Balbinott N. and Margis R. Review: Unraveling the origin of the structural and functional diversity of plant cystatins. *Plant Sci.*, **321**, 111342, (2022). DOI: 10.1016/j.plantsci.2022.111342
13. Singleton A. and Buttle D. J. Ficin. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (3rd ed.), Ed. by N. D. Rawlings and G. Salvesen (Acad. Press, 2013), pp. 1877–1879.
14. Baidamshina D. R., Trizna E. Y., Holyavka M. G., Bogachev M. I., Artyukhov V. G., Akhatova F. S., Rozhina E. V., Fakhrullin R. F., and Kayumov A. R. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease. *Sci. Rep.*, **7** (1), 46068 (2017). DOI: 10.1038/srep46068
15. Baidamshina D. R., Trizna E. Yu., Goncharova S. S., Sorokin A. V., Lavlinskaya M. S., Melnik A. P., Gafarova L. F., Kharitonova M. A., Ostolopovskaya O. V., Artyukhov V. G., Sokolova E. A., Holyavka M. G., Bogachev M. I., Kayumov A. R., and Zelenikhin P. V. The effect of ficin immobilized on carboxymethyl chitosan on biofilms of oral pathogens. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 16090 (2023). DOI: 10.3390/ijms242216090
16. Koroleva V. A., Trizna E. Y., Pankova S. M., Agafova M. N., Chirkova M. N., Vasileva O. S., Akhmetov N., Shubina V. V., Porfiriev A. G., Semenova E. V., Sachenkova O. A., Bogachev M. I., Artyukhov V. G., Baltina T. V., Holyavka M. G., and Kayumov A. R. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 4205–4217 (2020). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.030
17. Rosenberg L., Krieger Y., Bogdanov-Berezovski A., Silberstein E., Shoham Y., and Singer A. J. A novel rapid and selective enzymatic debridement agent for burn wound management: A multi-center RCT. *Burns*, **40** (3), 466–474 (2014). DOI: 10.1016/j.burns.2013.08.013
18. Sharaf A. and Muthayya P. Microbial profile of burn wounds managed with enzymatic debridement using bromelain-based agent, NexoBrid®. *Burns*, **48**, 1618–1625 (2021). DOI: 10.1016/j.burns.2021.12.004
19. Abbas S., Shanbhag T., and Kothare A. Applications of bromelain from pineapple waste towards acne. *Saudi J. Biol. Sci.*, **28**, 1001–1009 (2020). DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.11.032
20. Holyavka M. G., Goncharova S. S., Sorokin A. V., Lavlinskaya M. S., Redko Yu. A., Faizullin D. A., Baidamshina D. R., Zuev Y. F., Kondratyev M. S., Kayumov A. R., and Artyukhov V. G. Novel biocatalysts based on bromelain immobilized on functionalized chitosans and research on their structural features. *Polymers*, **14**, 5110 (2022). DOI: 10.3390/polym14235110
21. Morse C. R., Wang H., Donahue D. M., Garrity J. M. and Allan J. S. Use of proteolytic enzymes in the treatment of proteinaceous esophageal food impaction. *J. Emergency*

- Med.*, **50**, 183–186 (2016).  
DOI: 10.1016/j.jemermed.2015.07.018
22. Dietrich R. E. Oral proteolytic enzymes in the treatment of athletic injuries: a double-blind study. *Pennsyl. Med. J.*, **68**, 35–37 (1965).
  23. Veraldi S., Barbareschi M., Guanziroli E., Bettoli V., Minghetti S., Capitanio B., Sinagra J. L., Sedona P., and Schianchi R. Treatment of mild to moderate acne with a fixed combination of hydroxypinacolone retinoate, retinol glycospheres and papain glycospheres. *G. Ital. Dermatol. Venereol.*, **150**, 143–147 (2015).
  24. Bussadori S. K., de Godoy C. H. L., Alfaya T. A., Fernandes K. P. S., Mesquita-Ferrari R. A., and Motta L. J. Chemo-mechanical caries removal with Papacarie™: case series with 84 reports and 12 months of follow-up. *J. Contemp. Dent. Pract.*, **15**, 250–253 (2014).  
DOI: 10.5005/jp-journals-10024-1523
  25. Juntavee J., Peerapattana A., Ratanathongkam N., Nualkaew N., Chatchiwiwattana S., and Treesuwan P. The antibacterial effects of apacaries gel on *Streptococcus mutans*: An *in vitro* study. *Int. J. Clin. Pediatr. Dent.*, **7**, 77–81 (2014). DOI: 10.5005/jp-journals-10005-1241
  26. Venkataraghavan K., Kush A., Lakshminarayana C. S., Diwakar L., Ravikumar P., Patil S., and Karthik S. Chemo-mechanical caries removal: A review & study of an indigenously developed agent (Carie Care (TM) Gel) in children. *J. Int. Oral Health*, **5**, 84–90 (2013).
  27. Baidamshina D. R., Koroleva V. A., Olshannikova S. S., Trizna E. Yu., Bogachev M. I., Artyukhov V. G., Holyavka M. G., and Kayumov A. R. Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain. *Marine Drugs*, **19**, 197 (2021).  
DOI: 10.3390/md19040197
  28. Cstorer A. and Ménard R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. *Methods Enzymol.*, **244**, 486–500 (1994). DOI: 10.1016/0076-6879(94)44035-2
  29. Koroleva V., Lavlinskaya M., Holyavka M., Penkov N., Zuev Y., and Artyukhov V. Thermal inactivation, denaturation and aggregation processes of papain-like proteases. *Chemistry & biodiversity*, e202401038 (2024).  
DOI: 10.1002/cbdv.202401038
  30. Bekhit A. A., Hopkins D. L., Geesink G., Bekhit A. A., and Franks P. Exogenous proteases for meat tenderization. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **54**, 1012–1031 (2014).  
DOI: 10.1080/10408398.2011.623247
  31. Ashie I. N. A., Sorensen T. L., and Nielsen P. M. Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness. *J. Food Sci.*, **67** (6), 2138–2142 (2002).  
DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09516.x
  32. Kaur S., Vasiljevic T., and Huppertz T. Milk protein hydrolysis by actinidin – kinetic and thermodynamic characterisation and comparison to bromelain and papain. *Food*, **12** (23), 4248 (2023). DOI: 10.3390/foods12234248
  33. Ratanji K. D., Derrick J. P., Dearman R. J., and Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J. Immunotoxicol.*, **11** (2), 99–109 (2014). DOI: 10.3109/1547691X.2013.821564
  34. Arvinte T., Palais C., Green-Trexler E., Gregory S., Mach H., Narasimhan C., and Shameem M. Aggregation of biopharmaceuticals in human plasma and human serum: implications for drug research and development. *mAbs.*, **5** (3), 491–500 (2013). DOI: 10.4161/mabs.24245
  35. Ausserwöger H., Schneider M. M., Herling T. W., Arosio P., Invernizzi G., Knowles T. P. J., and Lorenzen N. Non-specificity as the sticky problem in therapeutic antibody development. *Nat. Rev. Chem.*, **6** (12), 844–861 (2022). DOI: 10.1038/s41570-022-00438-x
  36. Wang X., Das T. K., Singh S. K., and Kumar S. Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: A survey of commercial monoclonal antibodies. *mAbs.*, **1** (3), 254–267 (2009).  
DOI: 10.4161/mabs.1.3.8035
  37. Tiller K. E., Li L., Kumar S., Julian M. C., Garde S., and Tessier P. M. Arginine mutations in antibody complementarity-determining regions display context-dependent affinity/specificity trade-offs. *J. Biol. Chem.*, **292** (40), 16638–16652 (2017). DOI: 10.1074/jbc.M117.783837
  38. Kelly R. L., Le D., Zhao J., and Wittrup K. D. Reduction of nonspecificity motifs in synthetic antibody libraries. *J. Mol. Biol.*, **430** (1), 119–130 (2018).  
DOI: 10.1016/j.jmb.2017.11.008
  39. Birtalan S., Zhang Y., Fellouse F. A., Shao L., Schaefer G., and Sidhu S. S. The intrinsic contributions of tyrosine, serine, glycine and arginine to the affinity and specificity of antibodies. *J. Mol. Biol.*, **377** (5), 1518–1528 (2008). DOI: 10.1016/j.jmb.2008.01.093
  40. Rupakheti C. R., Roux B., Dehez F., and Chipot C. Modeling induction phenomena in amino acid cation– $\pi$  interactions. *Theor. Chem. Acc.*, **137**, 174 (2018).  
DOI: 10.1007/s00214-018-2376-z
  41. Rose G. D., Geselowitz A. R., Lesser G. J., Lee R. H., and Zehfus M. H. Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science*, **229** (4716), 834–838 (1985).
  42. Rosace A., Bennett A., Oeller M., Mortensen M. M., Sakhnini L., Lorenzen N., Poulsen C., and Sormanni P. Automated optimisation of solubility and conformational stability of antibodies and proteins. *Nat. Commun.*, **14**, 1937 (2023). DOI: 10.1038/s41467-023-37668-6
  43. Mant C. T., Kovacs J. M., Kim H. M., Pollock D. D., and Hodges R. S. Intrinsic amino acid side-chain hydrophilicity/hydrophobicity coefficients determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography of model peptides: comparison with other hydrophilicity/hydrophobicity scales. *Biopolymers*, **92** (6), 573–595 (2009).  
DOI: 10.1002/bip.21316
  44. Hebditch M., Carballo-Amador M. A., Charonis S., Curtis R., and Warwicker J. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*, **33** (19), 3098–3100 (2017).  
DOI: 10.1093/bioinformatics/btx345
  45. Kharat S. J. Density, viscosity and ultrasonic velocity studies of aqueous solutions of sodium acetate at different

- temperatures. *J. Mol. Liquids*, **140** (1–3), 10–14 (2008). DOI: 10.1016/j.molliq.2007.12.006
46. Bisht M., Jha I., and Venkatesu P. Comprehensive Evaluation of Biomolecular Interactions between Protein and Amino Acid Based-Ionic Liquids: A Comparable Study between [Bmim][Br] and [Bmim][Gly] Ionic Liquids. *ChemistrySelect*, **1** (13), 3510–3519 (2016). DOI: 10.1002/slct.201600524
  47. Baker E. N., Boland M. J., Calder P. C., and Hardman M. J. The specificity of actinidin and its relationship to the structure of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **616**, 30–34 (1980). DOI: 10.1016/0005-2744(80)90260-0
  48. Haesaerts S., Rodriguez Buitrago J. A., Loris R., Baeyens-Volant D., and Azarkan M. Crystallization and preliminary X-ray analysis of four cysteine proteases from *Ficus carica* latex. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.*, **71**, 459–465 (2015). DOI: 10.1107/S2053230X15005014
  49. Сакибаев Ф. А., Холявка М. Г. и Артюхов В. Г. Особенности пространственных структур молекул растительных протеаз – бромелина, фицина и папаина. *Вестн. ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация»*, **3**, 57–62 (2020).
  50. Pankova S. M., Sakibaev F. A., Holyavka M. G., and Artyukhov V. G. A possible role of charged amino-acid clusters on the surface of cysteine proteases for preserving activity when binding with polymers. *Biophysics*, **67** (1), 8–14 (2022). DOI: 10.1134/S0006350922010146

## Processes of Thermal Aggregation and Autolysis of Cysteine Protease Molecules – Bromelain, Ficin, and Papain

M.G. Holyavka\*, \*\*, V.A. Koroleva\*, \*\*\*, and V.G. Artyukhov\*

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

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

\*\*\*Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Studencheskaya ul. 10, Voronezh, 394036 Russia

Among plant proteases, cysteine papain-like endopeptidases such as ficin, bromelain and papain occupy an important place due to their high proteolytic activity in the physiological pH range of the medium. The processes of thermal aggregation and autolysis of protease molecules can have a significant influence on their activity and, consequently, on the prospects of practical application. To date, the mechanisms of aggregation of protein molecules are still insufficiently studied, and it is still impossible to predict unambiguously their aggregation stability on the basis of amino acid sequence. In this connection, the aim of this work was to study the processes of thermal aggregation and autolysis of molecules of some cysteine proteases. It was found that despite similar structural and functional properties of ficin, bromelain and papain, their thermal aggregation processes proceed with different intensity. In particular, ficin and bromelain are approximately comparable in terms of their aggregation stability, whereas papain is significantly less susceptible to aggregation processes when exposed to elevated temperatures. It is suggested that the presence and configuration of internal structures of the molecule, such as cavities, tunnels, and pores, as well as the charge properties of its surface have a significant influence on the stability of these cysteine proteases to aggregation processes.

**Keywords:** bromelain, ficin, papain, aggregation, autolysis