

УДК 577.325:602.1

## РАЗРАБОТКА БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ОСНОВЕ ПАПАИНА, СТАБИЛИЗИРОВАННОГО В КОМПЛЕКСАХ С ХИТОЗАНОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ: КАРБОКСИМЕТИЛХИТОЗАНОМ И *N*-(2-ГИДРОКСИ)ПРОПИЛ-3-ТРИМЕТИЛАММОНИЙ ХИТОЗАНОМ

© 2022 г. С. С. Ольшанникова<sup>1</sup>, Н. В. Малыгина<sup>1</sup>, М. С. Лавлинская<sup>1, 2</sup>, А. В. Сорокин<sup>1, 2</sup>, М. Г. Холявка<sup>1, 3, \*</sup>, В. Г. Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, 394018 Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, 394036 Россия

<sup>3</sup>ФГАУ ВО Севастопольский государственный университет, Севастополь, 299053 Россия

\*e-mail: [holyavka@rambler.ru](mailto:holyavka@rambler.ru)

Поступила в редакцию 30.06.2021 г.

После доработки 14.10.2021 г.

Принята к публикации 21.11.2021 г.

Проведена стабилизация папаина в комплексах с хитозаном и его производными: карбоксиметилхитозаном и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозаном с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа. Оптимальное соотношение белка с полимером (мг на г полисахарида), общей активности (в ед на мл раствора или суспензии) и удельной активности (в ед на г полисахарида) получено при образовании комплекса папаина с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозаном с молекулярной массой 600 кДа. Эффективность связывания папаина в комплекс в расчете на белок при этом составила 45%, а на удельную активность – 84%. Во всех изученных нами вариантах полисахаридов остаточная каталитическая активность стабилизированного папаина после его инкубации при 37°C в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7.5 в течение 21–28 сут была выше, чем у свободного фермента в ~4 раза. С понижением молекулярной массы производных хитозана в ряду 600 → 350 → 200 кДа стабильность папаина в составе комплекса возрастала. Полученные биокатализаторы перспективны для применения в биотехнологических процессах и биомедицинских целях и могут внести свой вклад в проблему импортозамещения ферментных препаратов на российском рынке.

*Ключевые слова:* папаин, стабилизация, хитозан, карбоксиметилхитозан, *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан

DOI: 10.56304/S0234275822010057

Использование стабилизированных (в том числе иммобилизованных) форм ферментных препаратов позволяет значительно расширить возможности их применения как в биотехнологических процессах, так и в биомедицинских целях [1]. В зависимости от решаемой задачи матрица-полимер выбирается так, чтобы получить или катализатор с возможностью его последующей регенерации для многократного использования [2–4] или же систему, обладающую большей площадью соприкосновения энзима с субстратом [5].

Перспективными матрицами для стабилизации ферментов являются полисахариды [6]. Эти природные полимеры доступны, возобновляемы и характеризуются биосовместимостью и низкой ток-

сичностью [7]. Благодаря наличию большого числа функциональных гидроксильных групп эти материалы способны образовывать комплексы с белками.

В нашем предыдущем исследовании было показано, что хитозан представляет собой перспективную матрицу для адсорбционной иммобилизации цистеиновых протеаз – фицина, бромелина и папаина [8]. Иммобилизованные таким образом ферменты не только сохраняют до 64% своей активности, но и обладают повышенной стабильностью – до 7.6 раза больше по сравнению с нативными протеазами, при неизменном рН-оптimumе каталитической активности. Обнаружено, что основными факторами, обуславливающими образование конъюгата белок-хитозан, выступают водородные связи и электростатические взаимодействия. В условиях рН-оптimumа активности цистеиновых протеаз (рН 7.5) хитозан не растворим в воде [9], что ограничивает доступность

*Список сокращений:* ХТЗ – хитозан, ГПХ – *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан, КМХ – карбоксиметилхитозан, ММ – молекулярная масса.

центров его макромолекул для взаимодействий с белком. Поэтому представляет интерес рассмотреть в качестве полимеров для стабилизации промышленно значимых ферментов растворимые при этом значении рН производные хитозана.

Полимерами, водорастворимыми в широком диапазоне значений рН среды, являются карбоксиметилхитозан и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан. В структурах этих полисахаридов присутствуют дополнительные ионогенные группы, как с положительными, так и с отрицательными зарядами. Более того, карбоксиметилхитозан может существовать в форме цвиттер-иона [10]. Как и хитозан, эти его производные полисахариды сохраняют присущую ему биосовместимость и низкую токсичность, что делает их пригодными для использования в биомедицинских целях [11–13] и пищевой промышленности [14]. Кроме того, можно предположить, что за счет наличия большего числа и разнообразия функциональных групп емкость модифицированных полисахаридов по отношению к белкам окажется выше по сравнению с хитозаном [15]. Приведенные преимущества делают указанные полимеры перспективными стабилизаторами для сохранения активности ферментов.

Папаин (КФ 3.4.22.2) – это цистеиновая протеаза, которую получают из кожуры незрелой папайи (*Carica papaya*). Энзим специфически расщепляет пептидную связь, образованную положительно заряженными аминокислотами – остатками лизина, аргинина и фенилаланина. Папаин имеет молекулярную массу 23 кДа, в состав его активного центра входят гистидин и цистеин. Фермент стабилен при высоких температурах и активен в широком диапазоне рН 3.0–9.0 [16–18]. Папаин широко используется в различных отраслях промышленности, таких как пищевая, фармацевтическая, пивоваренная, в производстве кожи, моющих средств, для обработки рыбы и мяса [19].

Учитывая вышеизложенное, целью нашей работы была разработка методики стабилизации папаина с использованием водорастворимых производных хитозана: карбоксиметилхитозана и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозана.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования был выбран папаин (Sigma, США), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma), полимерами для стабилизации – хитозаны (ХТЗ) с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа (ЗАО “Биопрогресс”, Россия) и их производные: карбоксиметилхитозан (КМХ), *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан (ГПХ).

Синтез карбоксиметилхитозана (КМХ) осуществляли по следующей методике: навеску хи-

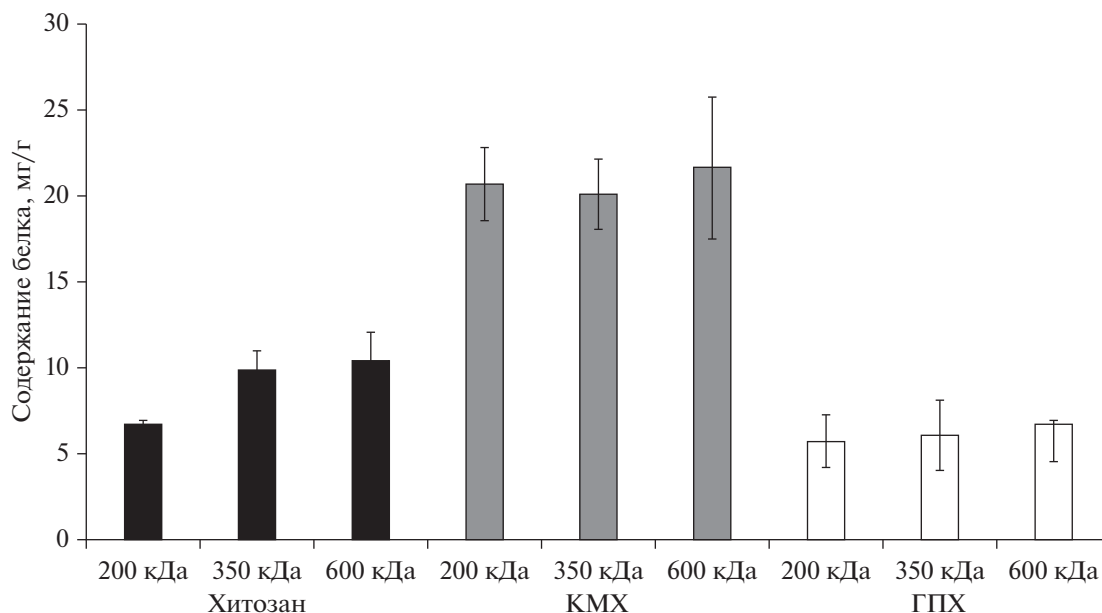
тозана массой 3.00 г диспергировали в 65 мл изопропилового спирта, затем при помощи капельной воронки в течение 15 мин вводили водный раствор гидроксида натрия из расчета 13 моль NaOH на 1 моль хитозана. После этого по каплям в реакционную смесь добавляли спиртовой раствор монохлоруксусной кислоты из 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.

Выход продуктов был равен 79–92%; степень замещения, рассчитанная из данных ИК-спектроскопии, составила: для хитозана с молекулярной массой (ММ) 600 кДа – 0.46; для ММ 350 кДа – 0.54; для ММ 200 кДа – 0.78. Значительное увеличение степени замещения для хитозана с ММ 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 два других – в форме “чешуек”. Карбоксиметилирование проводилось в гетерогенной среде, поэтому форма и размер частиц модифицируемого полимера оказывают значительное влияние на протекание химического процесса.

*N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан (ГПХ) получали по следующей методике: навеску хитозана массой 3.00 г суспендировали в 30 мл дистиллированной воды в течение 30 мин при 85°C. Затем по каплям вводили глицидилтриметиламмоний хлорид (ГТМАХ) из расчета на 1 моль хитозана 3 моль ГТМАХ и выдерживали при 85°C в течение 10 ч. Продукт из реакционной смеси выделяли осаждением в ацетон, после чего трижды промывали этиловым спиртом и сушили в вакуумном сушильном шкафу до постоянной массы. Выход продуктов был равен 62–74%; степень замещения, рассчитанная из данных ИК-спектроскопии, составила: для хитозана с ММ 600 кДа – 0.24; для ММ 350 кДа – 0.19; для ММ 200 кДа – 0.57.

Иммобилизацию и одновременно стабилизацию папаина на матрице хитозана осуществляли следующим методом: к 1 г хитозана добавляли 20 мл раствора фермента (с концентрацией 2 мг/мл в 50 мМ глициновом буфере, рН 9.0), инкубировали в течение 2 ч, образовавшийся осадок (в виде геля) промывали 50 мМ трис-НСl буфером (рН 7.5).

Стабилизацию папаина в комплексах с водорастворимыми производными хитозана осуществляли в аналогичных условиях, несвязанный белок удаляли диализом против 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7.5) через целлофановую мембрану с размером пор 25 кДа. Полноту отделения несвязанного фермента контролировали спектрофотометри-



**Рис. 1.** Содержание белка (мг/г полисахарида) в препаратах папаина, стабилизированного в комплексах с хитозаном и его производными.

**Fig. 1.** Protein content (mg/g of polysaccharide) in papain preparations stabilized in complexes with chitosan and its derivatives.

чески с помощью СФ-2000 до исчезновения сигнала при  $\lambda = 280$  нм в диализате.

Содержание белка в препаратах папаина определяли методом Лоури [20]. Измерение протеолитической активности фермента проводили с использованием азоказеина в качестве субстрата [21]. К 50 мг образца добавляли 200 мкл 50 мМ трис-НСl буфера, рН 7.5, 800 мкл 0.5%-ного азоказеина в том же буфере и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее добавляли 800 мкл 5%-ной ТХУ, инкубировали 10 мин при 4°C, затем центрифугировали в течение 3 мин при 11 700 g для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3%-ного NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в 1 см кювете. Контрольная проба содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл ТХУ, 50 мг образца и 200 мкл трис-НСl буфера. За единицу каталитической активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Удельную протеолитическую активность папаина рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{D \times 1000}{120 \times 200 \times C},$$

где  $A$  – протеолитическая активность, мкмоль/мин на 1 мг белка,  $D$  – оптическая плотность при 410 нм,  $C$  – концентрация белка в пробе, мг/мл, измеренная по методу Лоури, 120 – время инкубации в минутах, 200 – объем пробы, мкл, 1000 – пересчет в мкмоль.

Далее, учитывая содержание белка в мг/г полимера, удельная активность препаратов была пересчитана в ед/г полисахарида.

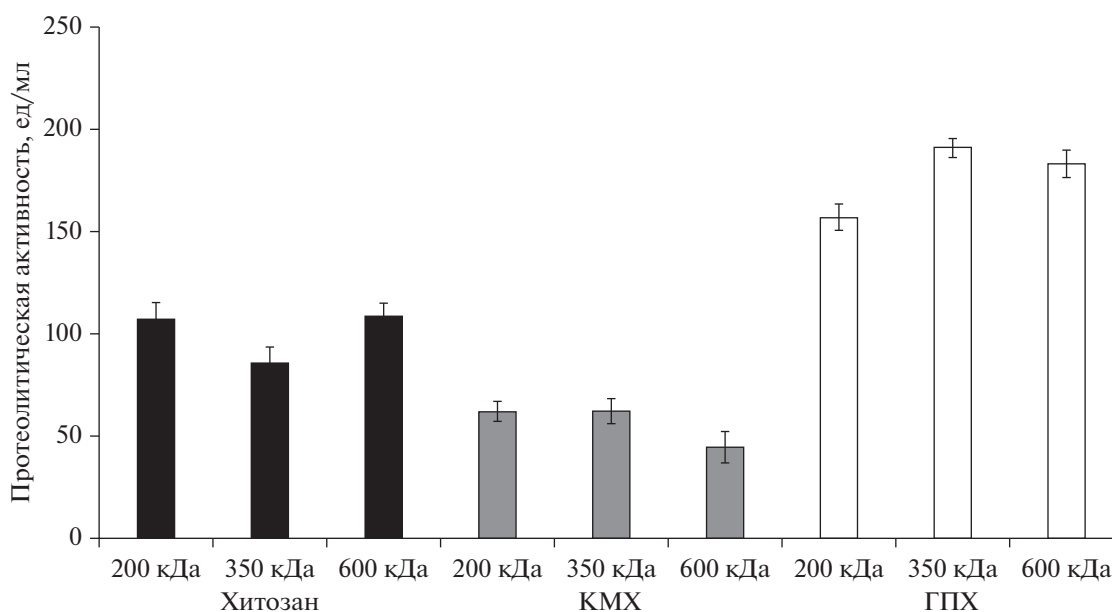
Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных значений определяли по  $t$ -критерию Стьюдента (при  $p < 0.05$ ), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным по анализу содержания белка в препаратах наибольшее количество папаина (в мг на г полисахарида) связывается со всеми образцами КМХ (ММ 200, 350 и 600 кДа) (рис. 1).

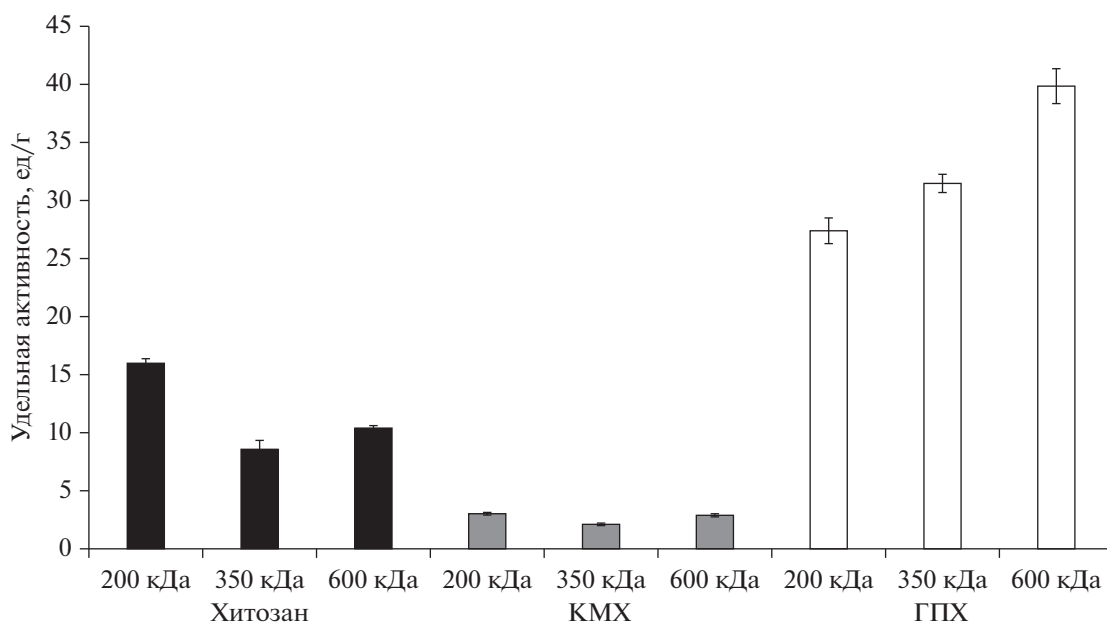
Общая активность папаина (в ед на мл раствора) оказалась выше при его стабилизации в комплексе с образцами ГПХ (рис. 2). Наибольшая удельная активность (в ед на г полисахарида) обнаружена у образцов, полученных при использовании ГПХ с молекулярной массой 600 кДа (рис. 3).

Разницу в эффективности стабилизации папаина в комплексе с изучаемыми полисахаридами можно объяснить, если рассмотреть строение хитозана и его модифицированных производных и особенности их поведения при значении рН 7.5, при котором осуществлялся эксперимент. Функциональными группами хитозана являются аминогруппы с рК 6.5, поэтому в условиях эксперимента он был преимущественно не заряжен. Карбоксиметилхитозан представляет собой амфолит, содержащий карбоксиметильную группу в соле-



**Рис. 2.** Общая каталитическая активность (ед/мл раствора или суспензии) в препаратах папаина, стабилизированного в комплексах с хитозаном и его производными.

**Fig. 2.** Total catalytic activity (unit/ml of solution or suspension) in papain preparations stabilized in complexes with chitosan and its derivatives.



**Рис. 3.** Удельная каталитическая активность (ед/г полисахарида) в препаратах папаина, стабилизированного в комплексах с хитозаном и его производными.

**Fig. 3.** Specific catalytic activity (units/g of polysaccharide) in papain preparations stabilized in complexes with chitosan and its derivatives.

вой форме, способную к диссоциации в широком диапазоне рН, а также аминогруппу, которая при рН 7.5 не протонирована, поэтому макромолекулы КМХ характеризуются отрицательным зарядом. Кроме того, при значении рН среды ниже

рК аминогруппы возможно образование цвиттер-иона, способного существовать в довольно широком интервале значений рН. *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозан, находящийся в форме гидрохлорида, диссоциирует в ши-

**Таблица 1.** Процент сохранения каталитической активности папаина после его стабилизации в комплексах с матрицами различной природы**Table 1.** Percentage of the catalytic activity retention for papain after its stabilization in complexes with matrices of various nature

Образец	Удельная активность, ед/мг белка	Сохранение удельной активности, %
Свободный папаин	948 ± 36	100
Папаин + ХТЗ	600 кДа	208 ± 24
	350 кДа	171 ± 16
	200 кДа	320 ± 17
	600 кДа	87 ± 13
Папаин + КМХ	350 кДа	42 ± 10
	200 кДа	57 ± 12
	600 кДа	797 ± 29
Папаин + ГПХ	350 кДа	629 ± 15
	200 кДа	548 ± 22
Папаин + мезопористый кремнезем, функционализированный как упорядоченная карбоновая кислота [22]	LP-FTC-0	1.04
	LP-FTC-10	0.95
	LP-FTC-30	0.73
Папаин + нанопластины карбида титана [23]	1.70	43
Папаин + частицы терполимера стирола, глицидилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата, инпрегнированного магнетитом [24]	55.26	76
Папаин на мембране из бактериальной окисленной целлюлозы [25]	35.25	53
Папаин на альгинатной мембране [26]	79.58	70
Папаин + наночастицы композита фиброин-магнетит [27]	123.5	70
Папаин + мультипористые сферы хитозана, модифицированные иминодиуксусной кислотой и ионами меди [28]	7.98	78
Папаин + пористый композит карбоксиметилцеллюлоза-поливиниловый спирт-силикагель [29]	1087	56
Папаин + композит из полиэтиленimina, кристаллической наноцеллюлозы и магнетита [30]	2.27	73

роком интервале рН с образованием поликатиона. Таким образом, при рН 7.5 макромолекулы КМХ преимущественно пребывают в состоянии полианиона, макромолекулы ГПХ – в форме поликатиона, а матрица ХТЗ не имеет зарядов.

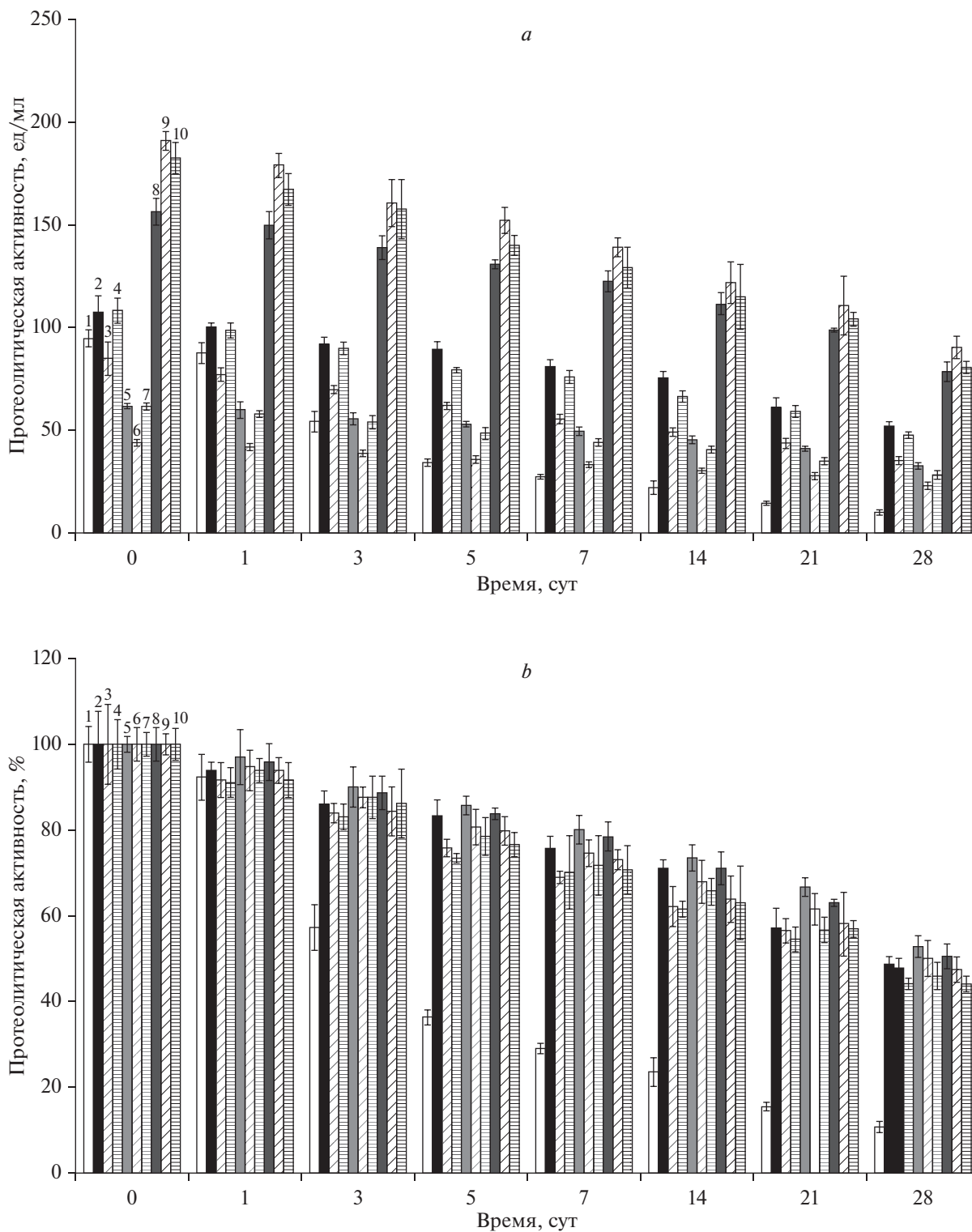
Далее мы сравнили полученные результаты по активности папаина, стабилизированного в комплексах с производными хитозана, с данными других авторов, применявших для иммобилизации фермента различные носители. Удельная активность использованного нами свободного папаина составила  $948 \pm 36$  ед/мг белка, это значение было принято за 100% при расчете процента сохранения активности фермента после его стабилизации (табл. 1).

Таким образом, нам удалось достичь 84%-ной эффективности связывания папаина (в расчете на удельную активность) в комплексе с *N*-(2-гидрок-

си)пропил-3-триметиламмоний хитозаном с ММ 600 кДа. Этот показатель превышает данные других авторов минимум на 6%.

В следующей серии экспериментов мы оценивали стабильность полученных препаратов путем измерения остаточной каталитической активности папаина (ед/мл раствора или суспензии) после инкубации образцов при 37°C в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7.5 (рис. 4).

После первых суток как свободный, так и стабилизированный папаин сохраняли более 90% своей каталитической активности. После 3 сут и при дальнейшем увеличении времени инкубации различия в потере каталитической активности папаина в растворе и в комплексах с полисахаридами стали более выражены (рис. 4а). Кроме того, для одноименных полимеров стабильность препарата была выше при более низкой ММ полисахарида,



**Рис. 4.** Остаточная каталитическая активность папаина после инкубации образцов при 37°C в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7.5 (*a* – в ед/мл раствора или суспензии, *b* – в % от первоначального уровня): 1 – свободный папаин; 2 – папаин, стабилизированный в комплексе с хитозаном 200 кДа; 3 – папаин с хитозаном 350 кДа; 4 – папаин с хитозаном 600 кДа; 5 – папаин, стабилизированный с КМХ 200 кДа; 6 – папаин с КМХ 350 кДа; 7 – папаин с КМХ 600 кДа; 8 – папаин с ГПХ 200 кДа; 9 – папаин с ГПХ 350 кДа; 10 – папаин с ГПХ 600 кДа.

**Fig. 4.** Residual catalytic activity of papain after incubation of samples at 37°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 (*a* – in unit/mL of solution or suspension, *b* – in % of the initial level): 1 – free papain; 2 – papain, stabilized in complexes with chitosan 200 kDa; 3 – papain with chitosan 350 kDa; 4 – papain with chitosan 600 kDa; 5 – papain, stabilized in complexes with carboxymethyl-chitosan 200 kDa; 6 – papain with CMCh 350 kDa; 7 – papain with CMCh 600 kDa; 8 – papain with N-(2-hydroxy) propyl-3-trimethylammonium chitosan 200 kDa; 9 – papain with HPCh kDa; 10 – papain with HPCh 600 kDa.

т.е. в ряду 600 → 350 → 200 кДа стабильность папаина увеличивалась (рис. 4b).

Согласно полученным результатам, оптимальное соотношение содержания белка (мг на г полисахарида), общей активности (в ед на мл раствора) и удельной активности (в ед на г полисахарида) наблюдается при стабилизации папаина в комплексе с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозаном с ММ 600 кДа. Эффективность связывания белка при этом составила 45%, а в расчете на его удельную активность — 84%, что выше, чем у других групп исследователей (см. табл. 1). Стабильность папаина в комплексе после его инкубации при 37°C в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7.5 в течение 21–28 сут была выше, чем у свободного фермента в ~4 раза.

Таким образом, использование производных хитозана (особенно *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмоний хитозана) в качестве матриц для иммобилизации папаина, позволяет сохранить его активность (до 84%) и значительно (в ~4 раза) повысить стабильность по сравнению со свободным ферментом. При этом стабильность папаина в составе комплекса возрастает с понижением ММ производных хитозана в ряду 600 → 350 → 200 кДа. Полученные нами биокатализаторы перспективны для применения в пищевой, пивоваренной и кожевенной промышленности, а также в биомедицине и могут внести свой вклад в проблему импортозамещения ферментных препаратов на российском рынке.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 21-74-20053.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaur N., Bhardwaj P., Singh G., Arya S.K. Applicative Insights on Nascent Role of Biochar Production, Tailoring and Immobilization in Enzyme Industry -A Review. *Process Biochem.*, 2021, 107, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.017>
2. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Lukin A.N., et al. Immobilization of inulinase on KU-2 ion-exchange resin matrix. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, 138, 681–692. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.132>
3. Holyavka M.G., Kayumov A.R., Baydamshina D.R., et al. Efficient fructose production from plant extracts by immobilized inulinases from *Kluyveromyces marxianus* and *Helianthus tuberosus*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 115, 829–834. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.107>
4. Holyavka M.G., Evstigneev M.P., Artyukhov V.G., Savin V.V. Development of heterogeneous preparation with inulinase for tubular reactor systems. *J. Mol. Catal., B: Enzym.*, 2016, 129, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.006>
5. Das R., Dwevedi A., Kayastha A.M. Chapter 1 – Current and future trends on polymer-based enzyme immobilization. In *Polymeric Supports for Enzyme Immobilization* ed. by A. Dwevedi. London, Academic Press, 2021, 1–25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819206-1.00004-1>
6. Holyavka M., Pankova S., Koroleva V., et al. Influence of UV radiation on molecular structure and catalytic activity of free and immobilized bromelain, ficin and papain. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, 2019, 201, 111681. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111681>
7. Khalid A.K., Alamry A. Recent advances of emerging green chitosan-based biomaterials with potential biomedical applications: A review. *Carbohydr. Res.*, 2021, 506, 108368. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108368>
8. Holyavka M., Faizullin D., Koroleva V., et al. Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, 180, 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.016>
9. Sorokin A., Lavlinskaya M. Synthesis of the superabsorbents enriched in chitosan derivatives with excellent water absorption properties. *Polym. Bull.*, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03521-9>
10. Jayakumar R., Prabakaran M., Nair S.V., et al. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Prog. Mater. Sci.*, 2010, 55, 675–709. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2010.03.001>
11. Shariatinia Z. Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 120, 1406–1419. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.131>
12. Chi W., Qin C., Zeng L., et al. Microbiocidal activity of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride. *Appl. Polym. Sci.*, 2007, 103, 3851–3856. <https://doi.org/10.1002/app.25476>
13. Yang Yu., Xing R., Liu S., et al. Hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan activates RAW 264.7 macrophages through the MAPK and JAK-STAT signaling pathways. *Carbohydr. Polym.*, 2019, 205, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.101>
14. Akbari-Alavijeh S., Shaddel R., Jafari S.M. Encapsulation of food bioactives and nutraceuticals by various chitosan-based nanocarriers. *Food Hydrocoll.*, 2020, 105, 105774. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105774>
15. Musarurwa H., Tavengwa N.T. Application of carboxymethyl polysaccharides as bio-sorbents for the sequestration of heavy metals in aquatic environments. *Carbohydr. Polym.*, 2020, 237, 116142. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116142>
16. Холявка М.Г., Наквасина М.А., Артюхов В.Г. Практикум по биотехнологии: иммобилизованные биологические объекты в системе лабораторных работ. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017, 161.
17. Kong Y.R., Jong Y.X., Balakrishnan M., et al. Beneficial Role of Carica papaya Extracts and Phytochemicals on Oxidative Stress and Related Diseases: A Mini Review. *Biology*, 2021, 10, 20. <https://doi.org/10.3390/biology10040287>

18. *Shouket H.A., Ameen I., Tursunov O., et al.* Study on industrial applications of papain: A succinct review. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 2020, 614, 7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/614/1/012171>
19. *Мосолов В.В.* Протеолитические ферменты. М.: Наука, 1971, 404
20. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J.* Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265–275.
21. *Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., et al.* A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius*. *FEBS Lett.*, 2010, 584 (21), 4419–4425. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.049>
22. *Yang Y.C., Deka J.R., Wu C.E., et al.* Cage like ordered carboxylic acid functionalized mesoporous silica with enlarged pores for enzyme adsorption. *J. Mater. Sci.*, 2017, 52, 6322–6340. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0864-5>
23. *Li C., Feng X., Sun L., Zhou L., et al.* Non-covalent and covalent immobilization of papain onto Ti3C2 MXene nanosheets. *Enzyme Microb. Technol.*, 2021, 148, 109817. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109817>
24. *Yu D., Chen K., Liu J., et al.* Application of magnetic immobilized papain on passivated rice bran lipase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 157, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.132>
25. *Vasconcelos N.F., Cunha A.P., Ricardo N., et al.* Papain immobilization on heterofunctional membrane bacterial cellulose as a potential strategy for the debridement of skin wounds. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, 165, 3065–3077. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.200>
26. *Filho R., Vasconcelos N.F., Andrade F.K., et al.* Papain immobilized on alginate membrane for wound dressing application. *Colloids Surf. B*, 2020, 194, 111222. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111222>
27. *Sheng W., Xi Y., Zhang L., et al.* Enhanced activity and stability of papain by covalent immobilization on porous magnetic nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 114, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.088>
28. *Gu Y.-J., Zhu M.-L., Li Y.-L., Xiong C.-H.* Research of a new metal chelating carrier preparation and papain immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 112, 1175–1182. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.079>
29. *Dai H., Ou S., Liu Z., Huang H.* Pineapple peel carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol/mesoporous silica SBA-15 hydrogel composites for papain immobilization. *Carbohydr. Polym.*, 2017, 169, 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.057>
30. *Zhang F., Wang R., Zhen C., Li B.* Magnetic cellulose nanocrystals: Synthesis by electrostatic self-assembly approach and efficient use for immobilization of papain. *J. Mol. Catal., B: Enzym.*, 2016, 134, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.11.017>

## Development of a Papain-Based Biocatalyst Stabilized by Complexation with Chitosan and its Derivatives, Carboxymethylchitosan and *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium Chitosan

S. S. Olshannikova<sup>a</sup>, N. V. Malykhina<sup>a</sup>, M. S. Lavlinskaya<sup>a, b</sup>,  
A. V. Sorokin<sup>a, b</sup>, M. G. Holyavka<sup>a, c, \*</sup>, and V. G. Artyukhov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia

<sup>b</sup>Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, 394036 Russia

<sup>c</sup>Sevastopol State University, Sevastopol, 299053 Russia

\*e-mail: holyavka@rambler.ru

**Abstract**—Papain has been stabilized by complexation with chitosan, carboxymethylchitosan and *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan with molecular weights of 200, 350 and 600 kDa. The optimal protein–polymer ratio (mg/g of polysaccharide), total biocatalyst activity (units/ml of solution or suspension) and specific activity (units/g of polysaccharide) were achieved as a result of complexation of papain with *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan with a molecular weight of 600 kDa. The efficiency of papain bound in the complex in terms of protein content and specific activity was 45 and 84%, respectively. In all polysaccharide options studied, the residual catalytic activity of stabilized papain after its incubation at 37°C in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, for 21–28 days was about 4 times higher than that of the free enzyme. The stability of papain as part of the complex increased with decreasing molecular weight of the chitosan derivatives in the range of 600 → 350 → 200 kDa. The obtained biocatalysts are promising for use in biotechnological processes and for biomedical purposes and can contribute to solving the problem of import substitution of enzyme preparations on the Russian market.

**Keywords:** papain, stabilization, chitosan, carboxymethylchitosan, *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan