



## ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ФИЦИНА С КАРБОКСИМЕТИЛХИТОЗАНОМ И *N*-(2-ГИДРОКСИ)ПРОПИЛ-3-ТРИМЕТИЛАММОНИЙХИТОЗАНОМ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ

© 2023 г. Н. В. Малыгина\*, С. С. Ольшаникова\*, М. Г. Холявка\*. \*\*, #, А. В. Сорокин\*, \*\*, М. С. Лавлинская\*, \*\*, В. Г. Артюхов\*, Д. А. Файзуллин\*\*\*, Ю. Ф. Зуев\*\*\*

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

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

\*\*\* Казанский институт биохимии и биофизики, Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр" РАН, Россия, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31

Поступила в редакцию 27.04.2022 г.

После доработки 30.05.2022 г.

Принята к публикации 01.06.2022 г.

Синтезированы производные хитозана – карбоксиметилхитозан и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа. Получены комплексы фицина с хитозаном и его названными производными, зарегистрированы ИК-спектры хитозана, карбоксиметилхитозана и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозана и их комплексов с фицином. Анализ спектров подтвердил образование конъюгатов между макромолекулами полисахаридов и фицина. Оптимальное соотношение содержания белка (0.7 мг/г носителя) и удельной активности (1590 ед./мг белка) выявлено при образовании комплекса фицина с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном с молекулярной массой 350 кДа. Эффективность комплексообразования фицина (по удельной каталитической активности) с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном (350 кДа) превышает таковую для хитозана (350 кДа) и карбоксиметилхитозана (350 кДа) в 2.4 и 9.8 раз соответственно. Методом молекулярного докинга изучены типы взаимодействий, энергии первого связывания, аминокислотный состав поверхностей фицина, которые в процессе комплексообразования взаимодействуют с носителем. Установлено, что связи и взаимодействия с хитозаном и его производными образуются в том числе с участием аминокислотных остатков, расположенных вблизи активного центра фицина (Cys25 и His162), что объясняет изменение протеолитической активности полученных комплексов. Комплексы фицина с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном растворимы в широком диапазоне pH среды и поэтому могут оказывать более перспективными, чем его комплексы с хитозаном, при разработке медицинских препаратов и биокатализаторов для пищевой, пивоваренной и кожевенной промышленности.

*Ключевые слова:* карбоксиметилхитозан, *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан, фицин, комплексообразование

DOI: 10.31857/S0132342322060173, EDN: FSCCFU

### ВВЕДЕНИЕ

Фицин (КФ 3.4.22.3) – протеолитический фермент класса гидролаз, обладающий противовоспалительными, ранозаживляющими и противовоспалительными свойствами, которые обуславливают его применение в биотехнологии, медицине и косметологии. Фицин выделяют из латекса растений рода *Ficus*. Молекула фицина содержит две

сульфгидрильные группы, из которых только одна находится в активном центре фермента. Молекулярная масса энзима составляет 23 кДа, pH-оптимум действия 7.0, температурный оптимум 60–65°C [1, 2].

Использование свободных форм ферментов в различных отраслях производства затруднено вследствие того, что они неустойчивы при хранении, а также подвержены действию внешних факторов. Эти проблемы можно преодолеть с помощью комплексообразования белка с полимерным носителем. Кроме того, изучение иммоби-

Сокращения: ГПХ – *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан; КМХ – карбоксиметилхитозан.

# Автор для связи: (тел.: +7 (473) 220-85-86; эл. почта: holyavka@rambler.ru).

лизованных ферментов и их систем способствует расширению теоретических знаний о путях регулирования структурно-функциональных свойств энзимов [3–6].

Попытки получить иммобилизованные формы фицина неоднократно описаны в литературе. В качестве носителей были использованы глиоксил-агароза [7, 8], поливиниловый спирт [9], композитные материалы [10]. Эффективность иммобилизации фицина на этих носителях, рассчитанная как процент сохранения удельной каталитической активности фермента, составила 60, 74 и 90% соответственно.

Известно, что перспективными носителями для иммобилизации ферментов являются хитозан и его производные. Хитозан – это статистический сополимер, состоящий из остатков D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, связанных между собой 1,4-β-гликозидными связями. Важнейшие свойства данного полимера – биodeградируемость, гипоаллергенность, антимикробная активность, противовоспалительные и противоопухолевые свойства. Хитозан характеризуется способностью образовывать растворы с высокой вязкостью и обладает высокой хелато- и комплексообразующей способностью, возможностью формировать межмолекулярные водородные связи, а также реакционноспособными группами, обеспечивающими возможность его химических модификаций. В условиях pH-оптимума цистеиновых протеаз хитозан нерастворим в воде, что ограничивает доступность центров его макромолекул для взаимодействий с белком, поэтому представляет интерес рассмотреть в качестве полимеров для комплексообразования с фицином растворимые при pH 7.5 производные хитозана [11–13]. Карбоксиметилхитозан (КМХ) применяется в производстве высокотехнологичной косметики, хелатирующих агентов тяжелых металлов, агентов замедленного высвобождения лекарств, регуляторов роста растений, а также для очистки сточных вод [14]. N-(2-Гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан (ГПХ) – одно из производных хитозана, полученных путем алкилирования. Этот носитель менее подвержен действию pH среды и хорошо растворим в воде. Он нашел широкое применение во многих отраслях производства, например, в химической, фармацевтической промышленности, а также при получении наночастиц [15].

Предсказание особенностей взаимодействия фицина с молекулами полисахаридов помогает минимизировать эмпирические эксперименты по подбору оптимальной матрицы для комплексообразования. Молекулярный докинг позволяет

предварительно оценить положение лиганда относительно поверхности молекулы фермента [16], а с помощью ИК-спектроскопии можно исследовать в молекулах белков и полисахаридов функциональные группы и другие фрагменты [17, 18]. Сочетание методов ИК-спектроскопии и гибкого молекулярного докинга позволяет выявлять функциональные группы модифицированных полисахаридов, а также аминокислотные остатки на поверхности молекулы фицина с указанием типов взаимодействий, образующих конъюгат энзим–носитель.

Целью данной работы явилось получение комплексов фицина с карбоксиметилхитозаном и N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном и изучение их структурных особенностей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Синтез производных хитозана.** На первом этапе работы по известным методикам с небольшими модификациями (см. “Эксперим. часть”) из коммерческого хитозана (ЗАО “Биопрогресс”, Россия) были синтезированы производные – карбоксиметилхитозан и N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа.

**Получение комплексов фицина с полисахаридами. ИК-спектроскопия.** Были получены комплексы протеолитического фермента фицина (Sigma, США) с полисахаридами: хитозаном и его синтезированными производными – карбоксиметилхитозаном и N-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном. Для подтверждения факта комплексообразования между молекулами фицина и полисахаридов были зарегистрированы и проанализированы ИК-спектры полученных образцов.

На рис. 1 представлены ИК-спектры хитозана и его комплекса с фицином. ИК-спектр полисахарида содержит следующие характеристические полосы. Полосы 2921 и 2875  $\text{см}^{-1}$  относятся к валентным антисимметричным и симметричным колебаниям связей C–H. Положение их типично для полисахаридов. Остаточные N-ацетильные группы проявляются полосами ~1645 (валентные C=O, амид I) и 1325 (валентные C–N, амид III)  $\text{см}^{-1}$ . Полоса амид II (деформационные N–H), обычно присутствующая при 1550  $\text{см}^{-1}$ , в данном случае скрыта сильной близко расположенной полосой деформационных N–H первичных аминов на 1589  $\text{см}^{-1}$ . Деформационные колебания групп  $\text{CH}_2$  и  $\text{CH}_3$  проявляются при 1423 и 1375  $\text{см}^{-1}$  соответственно. Узкая полоса на 1150  $\text{см}^{-1}$  соответ-

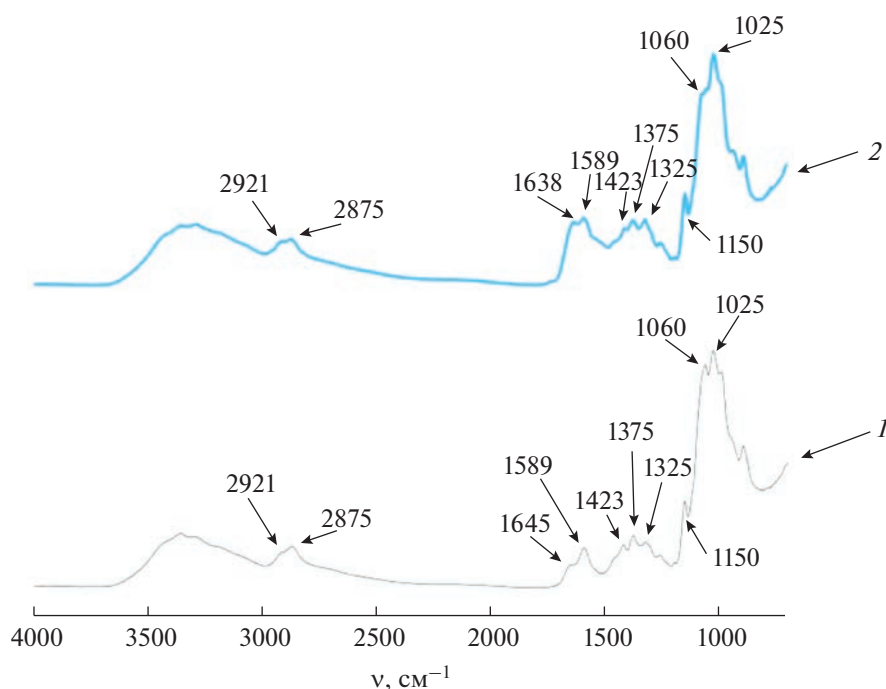


Рис. 1. ИК-спектры хитозана (1) и его комплекса с фицином (2).

ствует поглощению гликозидной связи С—О—С, а компоненты 1060 и 1025  $\text{см}^{-1}$  относятся к валентным колебаниям связи С—О в структуре пиранозных колец [19, 20]. В ИК-спектре комплекса хитозана с фицином присутствуют описанные выше полосы, однако их относительная интенсивность и положение меняются из-за наложения спектра поглощения белка. Так, видимый максимум полосы амид I смещается к 1638  $\text{см}^{-1}$ , проявляются белковые полосы амид II и амид III. Из-за наложения амидных полос хитозана и белка трудно судить о характере взаимодействия по группам N—H и C=O. Однако в области поглощения связей С—О боковых групп пиранозных колец относительное падение интенсивности компоненты 1060  $\text{см}^{-1}$  в спектре комплекса по сравнению с чистым хитозаном свидетельствует по меньшей мере о том, что взаимодействие с белком затрагивает боковые OH-группы полисахарида.

На рис. 2 представлены ИК-спектры карбоксиметилхитозана и его комплекса с фицином. По сравнению с немодифицированным хитозаном, в них проявились интенсивные полосы 1590, 1410 и 1320  $\text{см}^{-1}$ , обусловленные колебаниями карбоксильных групп  $\nu_{\text{asCOO}}^-$ ,  $\nu_{\text{sCOO}}^-$  и  $\rho_{\text{wCH}_2}$  соответственно [21]. Дополнительная связь С—О—С в боковой цепи карбоксиметилхитозана проявляется компонентой 1120  $\text{см}^{-1}$ . Присутствие белка в спектре комплекса обнаруживается по повышен-

ному поглощению при 1650  $\text{см}^{-1}$  на склоне полосы 1590  $\text{см}^{-1}$ . Как и в случае немодифицированного хитозана, комплексообразование полисахарида с белком приводит к падению интенсивности компоненты 1060  $\text{см}^{-1}$  относительно компоненты 1025  $\text{см}^{-1}$ . Указанные изменения подтверждают образование конъюгата между макромолекулами карбоксиметилхитозана и молекулами фицина.

На рис. 3 представлены ИК-спектры *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозана и его комплекса с фицином. ИК-спектр *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозана содержит следующие характеристические признаки, отличающие его от спектра немодифицированного хитозана: 2926 и 1478  $\text{см}^{-1}$  — валентное и деформационное колебания С—Н триметиламмонийных групп, отсутствие полосы при 1590–1600  $\text{см}^{-1}$  деформационного колебания первичных аминогрупп вследствие замены на вторичные амины, увеличенная интенсивность полосы валентных OH-колебаний за счет дополнительной гидроксильной группы [22, 23]. Форма полосы колебаний групп в составе пиранозных остатков в сравнении с хитозаном изменений не претерпела. При этом, как и в предыдущих двух случаях, комплексообразование с белком приводит к падению интенсивности компоненты 1060 относительно 1025  $\text{см}^{-1}$ .

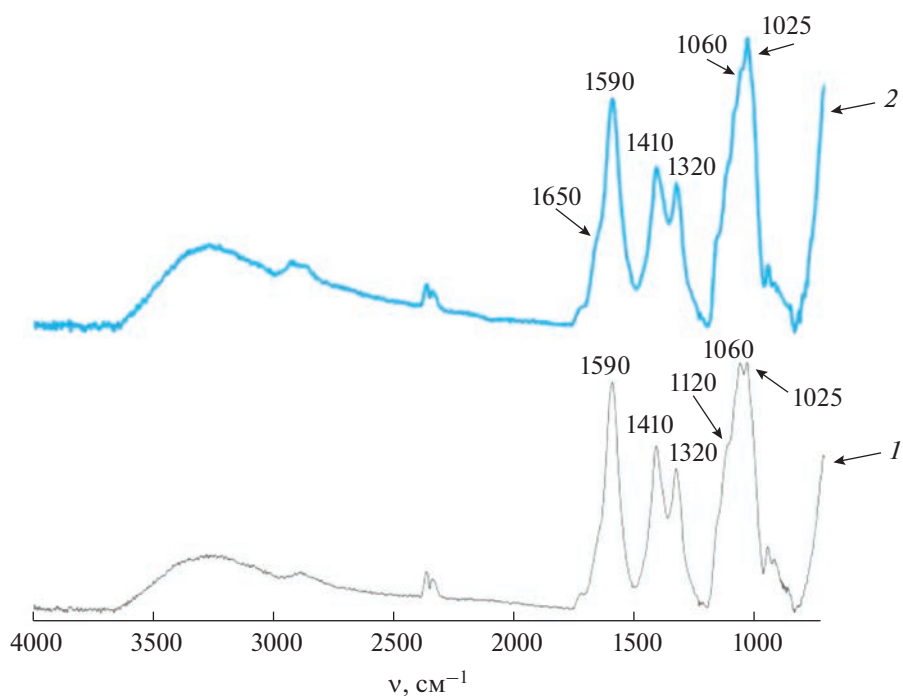


Рис. 2. ИК-спектры карбоксиметилхитозана (1) и его комплекса с фицином (2).

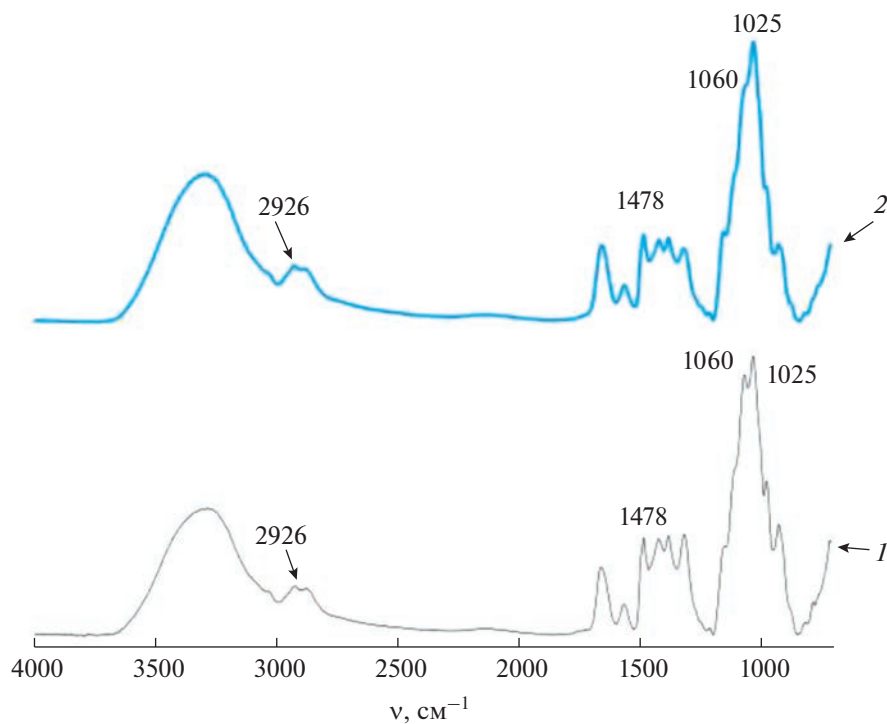
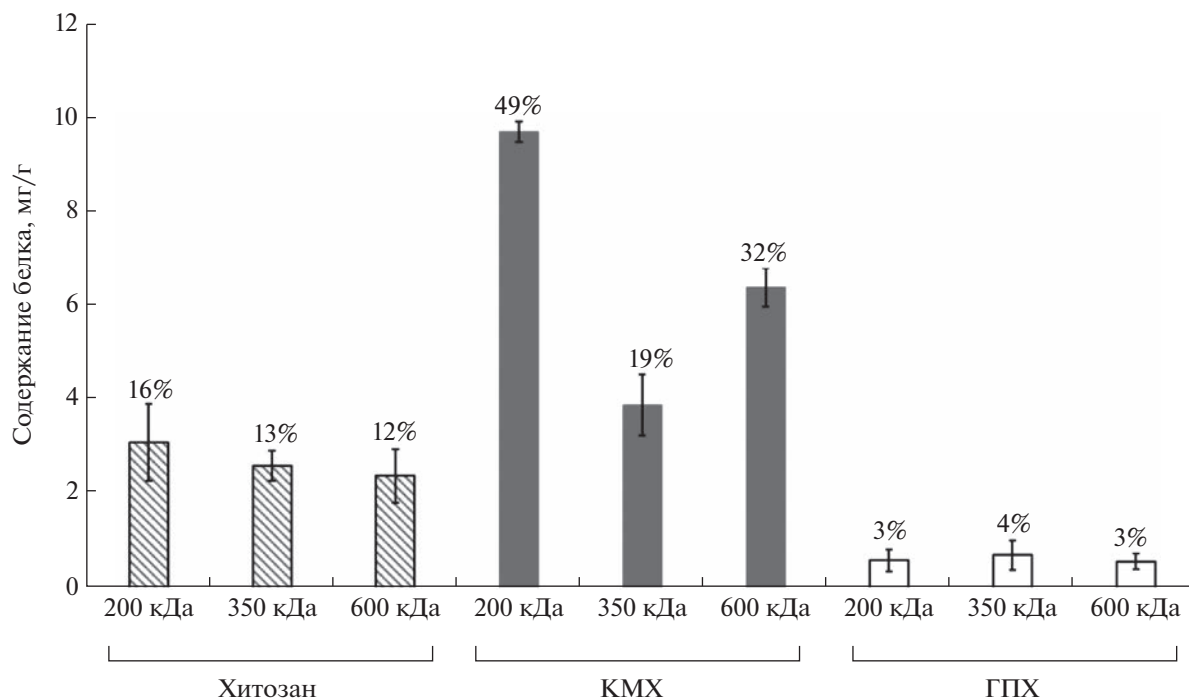


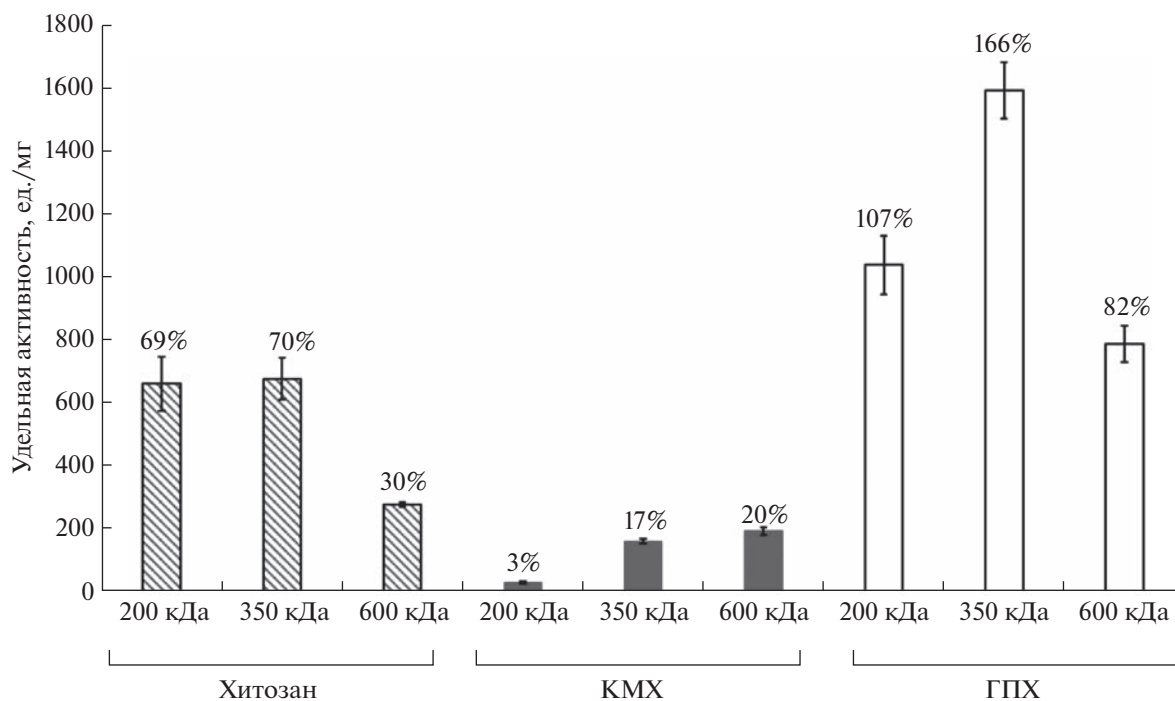
Рис. 3. ИК-спектры *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозана (1) и его комплекса с фицином (2).

**Содержание белка в комплексах фицина с полисахаридами и их удельная каталитическая активность.** Анализ содержания белка в полученных

препаратах показал, что наибольшее количество фицина образует комплекс с карбоксиметилхитозаном с молекулярной массой 200 кДа (рис. 4),



**Рис. 4.** Содержание белка (мг/г носителя) в комплексах фицина с хитозаном и его производными: карбоксиметилхитозаном (КМХ) и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном (ГПХ). Над столбцами указана эффективность комплексообразования фицина (по содержанию белка), выраженная в процентах фермента в составе комплекса от его количества в растворе в процессе комплексообразования, принятого за 100%.

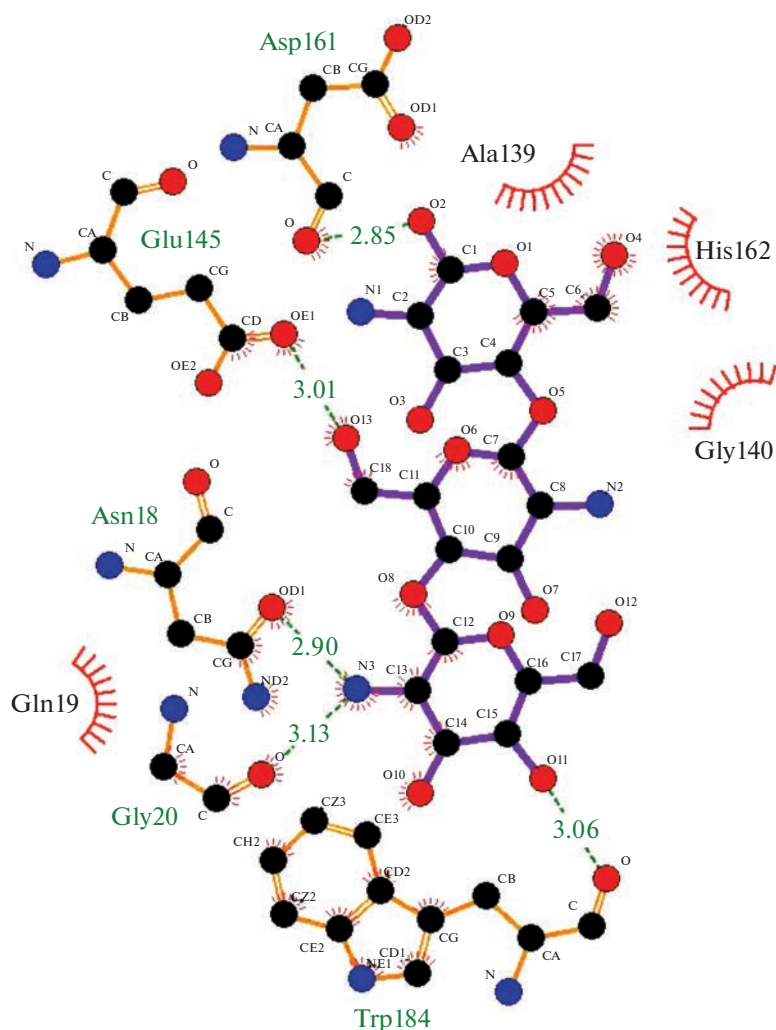


**Рис. 5.** Удельная каталитическая активность (ед./мг белка) комплексов фицина с хитозаном и его производными: карбоксиметилхитозаном (КМХ) и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном (ГПХ). Над столбцами указана эффективность комплексообразования фицина (по удельной каталитической активности), выраженная в процентах сохранения удельной протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к удельной каталитической активности фицина в растворе, принятой за 100%.

при этом эффективность комплексообразования (по содержанию белка) составляет 49%. Однако фермент, вероятно, находится в каталитически “невыгодной” конформации или происходят процессы автолиза, что отрицательно сказывается на его протеолитической активности. Наибольшую удельную активность показали комплексы фицина с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном с молекулярной массой 350 кДа (рис. 5). Именно они, на наш взгляд, могут оказаться более перспективными, чем комплексы протеазы с хитозаном, для применения в промышленности и медицине, благодаря своей высокой каталитической активности и растворимости в широком диапазоне pH среды. Вероятно, соотношение 0.6–0.7 мг фермента на 1 г носителя оптимально для предотвращения процессов автолиза и приобретения фицином наиболее катали-

тически активной конформации. При увеличении этого соотношения до 9.7 мг на 1 г полимера удельная протеолитическая активность фицина снижается в 9.8 раз по сравнению с максимально измеренной (при соотношении фермент/полисахарид, равном 0.7 мг/г).

**Механизмы комплексообразования между фицином и полисахаридами.** Для проектирования активно и стабильно функционирующих биокатализаторов на основе комплексов ферментов и полисахаридов необходимо понимать механизм взаимодействия носителя с молекулами белка. Известно, что специфические взаимодействия возникают не одновременно. Сначала образуются различные “одноточечно” и “двухточечно” связанные состояния, а за ними следует появление связей по некоторой контактной линии и, наконец, по определенной контактной плоскости,



**Рис. 6.** Связи и взаимодействия между фицином и хитозаном (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).



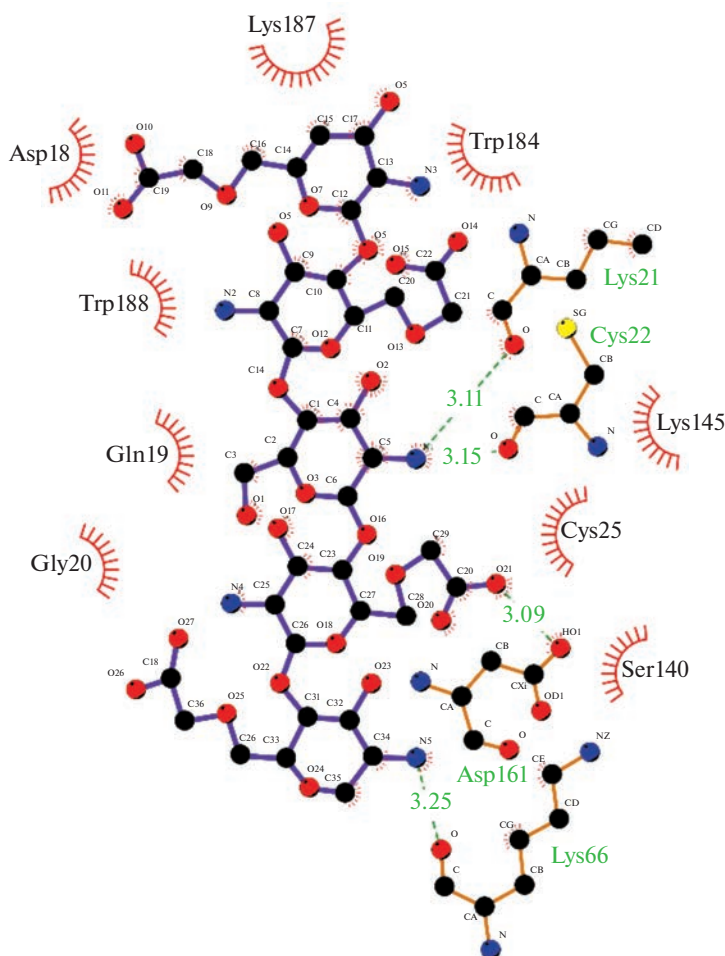
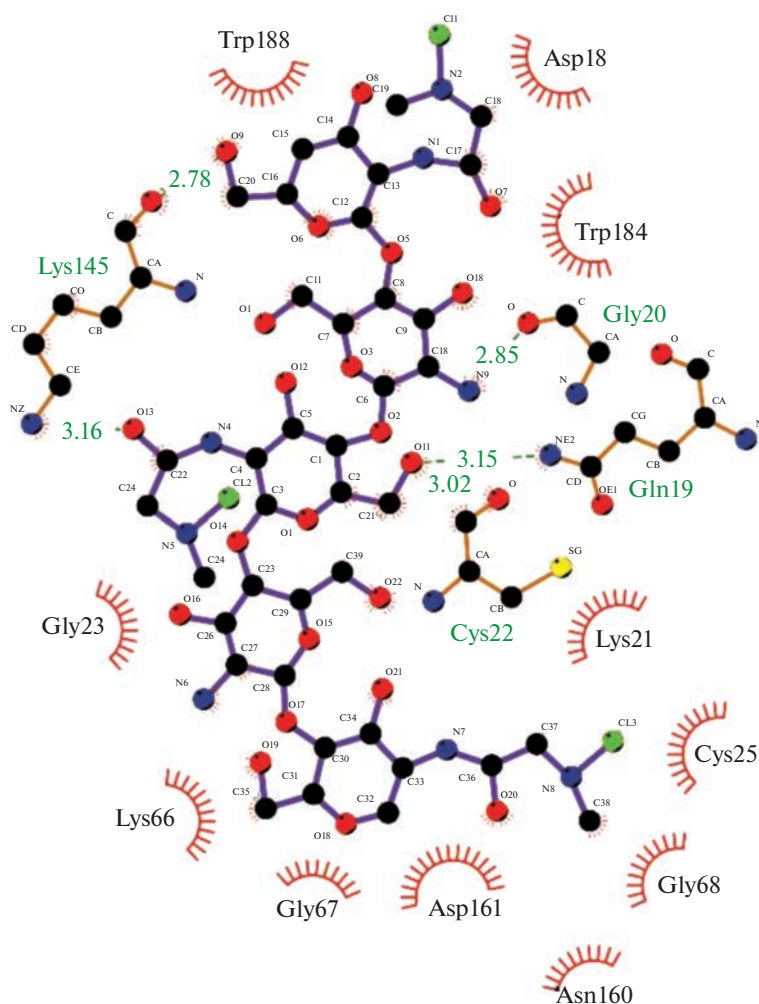


Рис. 7. Связи и взаимодействия между фицином и карбоксиметилхитозаном (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).

Таблица 1. Аминокислотные остатки фицина, формирующие связи и взаимодействия с хитозаном и его производными

Энергия первого взаимодействия, ккал/моль	Аминокислотные остатки, формирующие	
	водородные связи, и длина связи, Å	иные типы взаимодействий
1) Аминокислоты фицина, которые образуют связи и взаимодействия с хитозаном		
-6.6	Asn18, 2.90 Å	Gln19, Ala139, Gly140, His162
	Gly20, 3.13 Å	
	Glu145, 3.01 Å	
	Asp161, 2.85 Å	
	Trp184, 3.06 Å	
2) Аминокислоты фицина, которые образуют связи и взаимодействия с карбоксиметилхитозаном		
-6.5	Lys21, 3.11 Å	Asp18, Gln19, Gly20, Cys25, Ser140, Lys145, Trp184, Lys187, Trp188
	Cys22, 3.15 Å	
	Lys66, 3.25 Å	
	Asp161, 3.09 Å	
3) Аминокислоты фицина, которые образуют связи и взаимодействия с <i>N</i> -(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном		
-6.6	Gln19, 3.15 Å	Asp18, Lys21, Gly23, Cys25, Lys66, Gly67, Gly68, Asn160, Asp161, Trp184, Trp188
	Gly20, 2.85 Å	
	Cys22, 3.02 Å	
	Lys145, 2.78 и 3.16 Å	



**Рис. 8.** Связи и взаимодействия между фицином и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном (пунктирными линиями обозначены водородные связи, длина связей приведена в Å).

при этом иммобилизация становится кинетически необратимой [24, 25].

Методом молекулярного докинга мы смоделировали первую “точку” связывания фицина с хитозаном, карбоксиметилхитозаном и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном. Были изучены типы взаимодействий, энергии первого связывания, аминокислотный состав поверхностей фицина, которые в процессе комплексообразования взаимодействуют с носителем (рис. 6–8, табл. 1). Из рисунков видно, что связи и взаимодействия с хитозаном и его производными образуются в том числе с участием аминокислотных остатков, расположенных вблизи активного центра фермента (Cys25 и His162), что, естественно, отражается на активности полученных комплексов. Энергии первого взаимодействия фицина с изучаемыми нами полисахаридами практически идентичны: с хитозаном и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триме-

тиламмонийхитозаном – 6.6, с карбоксиметилхитозаном – 6.5 ккал/моль.

Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что путем введения в структуру хитозана новых функциональных групп можно модулировать механизмы комплексообразования и активность фицина, подбирая оптимальное микроокружение для аминокислот из его активного центра – Cys25 и His162.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Объект исследования и носители для его иммобилизации.** В качестве объекта исследования был выбран фицин из латекса растений рода *Ficus* (Sigma, США), субстратом для гидролиза служил азоказеин (Sigma, США), носителями для комплексообразования – хитозаны (ХТЗ) (ЗАО “Биопрогресс”, Россия) и их производные: карбоксиметилхитозан (КМХ), *N*-(2-гидрок-



си)пропил-3-триметиламмонийхитозан (ГПХ) с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа соответственно.

**Синтез производных хитозана.** Производные хитозана получали по известным методикам с небольшими модификациями. Синтез карбоксиметилхитозана (КМХ) осуществляли по следующей методике: навеску хитозана массой 3.00 г диспергировали 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 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 [26].

Выход продуктов, вычисленный как отношение массы полученного продукта к теоретически возможной, составлял 79–92%; степень замещения, рассчитанная из данных ИК-спектроскопии, составила 0.46, 0.54 и 0.78 для хитозана с молекулярной массой 600, 350 и 200 кДа соответственно. Существенное увеличение значения степени замещения для хитозана с молекулярной массой 200 кДа может быть объяснено не только влиянием стерического фактора, но и тем, что изначально этот коммерческий хитозан находился в форме порошка, в то время как два других – в форме “чешуек”. Карбоксиметилирование проводили в гетерогенных условиях, 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 [27]. Выход продуктов составлял 62–74%; степень замещения, рассчитанная из данных ИК-спектроскопии, составила 0.24, 0.19 и 0.57 для хитозана с молекулярной массой 600, 350 и 200 кДа соответственно.

**ИК-спектроскопия.** Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов в виде сухих порошков без наполнителей осуществляли на спектрометре IR-Affinity 1 (Shimadzu Instruments, Япония) в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) с призмой из ZnSe, в диапазоне частот 700–4000 см<sup>-1</sup>, разрешение 4 см<sup>-1</sup>.

**Получение комплексов фицина с полисахаридами.** Комплексообразование фицина с хитозаном и его производными осуществляли следующим образом: к 1 г хитозана добавляли 20 мл раствора фермента (в концентрации 10 мг/мл 0.05 М глицинового буфера, pH 9.0), инкубировали в течение 2 ч. После окончания инкубации образовавшийся комплекс промывали с помощью диализа против 50 мМ Tris-HCl-буфера (pH 7.5) через целлофановую мембрану с размером пор 25 кДа до отсутствия в промывных водах белка, контроль осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия) при  $\lambda = 280$  нм. Полученные препараты лиофильно высушивали до постоянной массы и использовали для дальнейших исследований.

**Определение содержания белка в комплексах фицина с полисахаридами и их удельной каталитической активности.** Содержание белка в комплексах фицина с хитозаном и его производными определяли методом Лоури [29] со следующей модификацией: на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей между полисахаридом и молекулами фермента. Для этого иммобилизованный фицин обрабатывали раствором K<sub>2</sub>Na-тартрата (в концентрации 20 мг/мл или 0.7 М), приготовленным на 1 М NaOH, при 50°C в течение 10 мин [30]. Отсутствие процессов разрушения фермента контролировали путем регистрации и анализа его спектра поглощения на спектрофотометре UV-2550PC (Shimadzu, Япония).

Определение протеолитической активности фермента проводили на субстрате азоказеине (Sigma, США) [31, 32]. К 50 мг образца добавляли 200 мкл Tris-HCl-буфера, pH 7.5, 800 мкл азоказеина (0.5% в 50 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.5) и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее добавляли 800 мкл ТХУ (5%), 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 Tris-HCl-буфера. За единицу каталитической активности принимали количество фицина (в мг белка), которое в усло-

виях эксперимента гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Удельную протеолитическую активность фицина рассчитывали по формуле [33]:

$$A = \frac{\Delta D \times V}{120 \times \varepsilon \times l \times C},$$

где  $A$  – протеолитическая активность, мкмоль субстрата в мин на 1 мг белка;  $\Delta D$  – изменение оптической плотности опытного образца по отношению к контрольному при 410 нм;  $V$  – общий объем пробы, мл;  $C$  – концентрация белка в пробе, мг/мл; 120 – время инкубации, мин;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции 0.5%-ного раствора азоказеина при 410 нм, равный  $12 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ;  $l$  – длина оптического пути, равная 1 см.

Эффективность комплексообразования фицина по содержанию белка выражали в процентах фермента в составе комплекса от его количества в растворе в процессе комплексообразования, принятого за 100%; по удельной каталитической активности – в процентах сохранения удельной протеолитической активности фермента после иммобилизации по отношению к удельной каталитической активности фицина в растворе, принятой за 100%.

Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по  $t$ -критерию Стьюдента (при  $p < 0.05$ ,  $n = 8$ ), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением. Полученные данные (рис. 4 и 5) представлены в виде средних значений  $\pm$  доверительный интервал.

**Молекулярный докинг.** Подготовку структуры фицина (PDB ID: 4YYW, <https://www.rcsb.org/structure/4YYW>) для докинга выполняли по схеме, стандартной для Autodock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit/>), описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя, буфера и лигандов. Центр молекулы и параметры бокса (“ячейки”) задавали вручную, добиваясь того, чтобы молекула протеазы полностью была внутри расчетной области пространства [28].

Модели структур хитозана и его производных были нарисованы в молекулярном конструкторе HyperChem (<https://hyperchem.software.informer.com>), последовательно оптимизированы сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически в PM3 (Parametric Method 3). Лиганд в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Расстановку зарядов на молекулах полисахаридов и их протонирование/депротонирование прово-

дили автоматически в пакете MGLTools 1.5.6 (<https://ccsb.scripps.edu/mgltools/1-5-6/>).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы производные хитозана – карбоксиметилхитозан и *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозан с молекулярными массами 200, 350 и 600 кДа. Проведено комплексообразование фицина с хитозаном и его производными. Анализ ИК-спектров подтвердил образование конъюгатов между макромолекулами названных полисахаридов и фицина. Оптимальное соотношение содержания белка (0.7 мг/г носителя) и удельной активности (1590 ед./мг белка) выявлено при образовании комплекса фицина с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном с молекулярной массой 350 кДа. По отношению к удельной каталитической активности фицина в растворе удельная протеолитическая активность полученных комплексов фермента с хитозаном (200 и 350 кДа) составила ~70%, с карбоксиметилхитозаном (350 и 600 кДа) находилась в пределах 20%, а с *N*-(2-гидрокси)пропил-3-триметиламмонийхитозаном (350 кДа) составила 166%, что делает данный комплекс перспективным для практического применения в пищевой, пивоваренной и кожевенной промышленности, а также в медицине. Методом молекулярного докинга установлено, что связи и взаимодействия с хитозаном и его производными образуются в том числе с участием аминокислотных остатков, расположенных вблизи активного центра фицина (Cys25 и His162), что объясняет изменение протеолитической активности полученных комплексов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальные исследования были проведены с использованием научно-технической базы ФИЦ “Казанский научный центр” РАН.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20053 – синтез производных хитозана, комплексообразование фицина, докинг) и государственного задания ФИЦ “Казанский научный центр” РАН (ИК-спектроскопия).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Holyavka M., Faizullin D., Koroleva V., Olshannikova S., Zakhartchenko N., Zuev Yu., Kondratyev M., Zakharova E., Artyukhov V. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 180. P. 161–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.016>
- Holyavka M.G., Kayumov A.R., Baydamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Y., Trushin M.V., Artyukhov V.G. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 115. P. 829–834.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.107>
- Wingard L.B., Berezin I.V., Klyosov A.A. // *Enzyme Engineering. Future Directions.* New York: Plenum Press, 1980. XIV, 522 p.  
<https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3719-5>
- Efremenko E.N., Lozinsky V.I., Sergeeva V.S., Plieva F.M., Makhlis T.A., Kazankov G.M., Gladilin A.K., Varfolomeyev S.D. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2002. V. 51. P. 195–201.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00135-X)
- Efremenko E., Peregudov A., Kildeeva N., Perminov P., Varfolomeyev S. // *Biocatalysis and Biotransformation.* 2005. V. 23. P. 103–108.  
<https://doi.org/10.1080/10242420500132474>
- Muronetz V.I., Zhang N.X., Bulatnikov I.G., Wang C.-C. // *FEBS Lett.* 1998. V. 426. P. 107–110.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00319-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00319-6)
- Siar E.-H., Zaak H., Kornecki J.F., Zidoune M.N., Barbosa O., Fernandez-Lafuente R. // *Process Biochem.* 2017. V. 58. P. 98–104.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.009>
- Siar E.-H., Morellon-Sterling R., Zidoune M.N., Fernandez-Lafuente R. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 144. P. 419–426.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.140>
- Hayashi T., Hyon S.-H., Cha W.-I., Ikada Y. // *Polym. J.* 1993. V. 25. P. 489–497.  
<https://doi.org/10.1295/polymj.25.489>
- Pan Y., Pang Y., Shi Y., Zheng W., Long Y., Huang Y., Zheng H. // *Microchim. Acta.* 2019. V. 186. P. 213.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-019-3331-y>
- Kulikov S.N., Tikhonov V.E., Bezrodnykh E.A., Lopatin S.A., Varlamov V.P. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 57–62.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162015010100>
- Akpan E.I., Gbenebor O.P., Adeosun S.O., Cletus O. // *In Handbook of Chitin and Chitosan.* Chapter 5 / Eds. Gopi S., Thomas S., Pius Anitha. Elsevier, 2020. P. 131–164.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817970-3.00005-5>
- Gregorio C. // *Environ. Chem. Lett.* 2019. V. 17. P. 1623–1643.  
<https://doi.org/10.1007/s10311-019-00901-0>
- Prashanth K.V.H., Tharanathan R.N. // *Trends in Food Science & Technology.* 2007. V. 18. P. 117–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
- Xu I., Du I., Huang R., Gao L. // *Biomaterials.* 2003. V. 24. P. 5015–5022.  
[https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00408-3](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00408-3)
- Trott O., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. P. 455–461.  
<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Barth A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1767. P. 1073–1101.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
- Byler D.M., Susi H. // *Biopolymers.* 1986. V. 25. P. 469–487.  
<https://doi.org/10.1002/bip.360250307>
- Wang Q.Z., Chen X.G., Liu N., Wang S.X., Liu C.S., Meng X.H., Liu C.G. // *Carbohydrate Polymers.* 2006. V. 65. P. 194–201.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.001>
- Mazancova P., Némethova V., Treľova D., Klesčíkova L., Lacík I., Razga F. // *Carbohydr. Polym.* 2018. V. 192. P. 104–110.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.030>
- Wolpert M., Hellwig P. // *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy.* 2006. V. 64. P. 987–1001.  
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.08.025>
- Yang Y., Xing R., Liu S., Qin Y., Li K., Yu H., Li P. // *Carbohydr. Polym.* 2019. V. 205. P. 194–201.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.101>
- Wang C., Fan J., Xu R., Zhang L., Zhong S., Wang W., Yu D. // *J. Mater. Sci.* 2019. V. 54. P. 12522–12532.  
<https://doi.org/10.1007/s10853-019-03824-x>
- Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Селеменев В.Ф., Меркулова Ю.Д. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2004. Т. 4. № 4. С. 422–427.
- Шкутина И.В., Стоянова О.Ф., Лунина В.В. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2009. Т. 9. № 2. С. 247–253.
- Chen S.C., Wu Y.C., Mi F.L., Lin Y.H., Yu L.C., Sung H.W. // *J. Control. Release.* 2004. V. 96. P. 285–300.
- Gorshkova M., Volkova I., Alekseeva S., Molotkova N., Skorikova E., Izumrudov V. // *Polymer Science Series A.* 2011. V. 53. P. 57–66.  
<https://doi.org/10.1134/S0965545X11010019>
- Abdullatypov A.V., Kondratyev M.S., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. // *Biophysics.* 2016. V. 61. P. 565–571.  
<https://doi.org/10.1134/S0006350916040023>
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
- Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. P. 422–427.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683810040034>
- Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Ilyinskaya O.N., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. P. 4419–4425.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.049>
- Charney J., Tomarely R.M. // *J. Biol. Chem.* 1947. V. 171. P. 501–505.
- Coelho D.F., Saturnino T.P., Fernandes F.F., Mazzola P.G., Silveira E., Tambourgi E.B. // *Biomed. Res. Int.* 2016. P. 8409183.  
<https://doi.org/10.1155/2016/8409183>

## Preparation of Ficin Complexes with Carboxymethylchitosan and *N*-(2-Hydroxy)propyl-3-Trimethyl Ammonium Chitosan and the Study of Their Structural Features

N. V. Malykhina\*, S. S. Olshannikova\*, M. G. Holyavka\*, \*\*, #, A. V. Sorokin\*, \*\*, M. S. Lavlinskaya\*, \*\*, V. G. Artyukhov\*, D. A. Faizullin\*\*\*, and Yu. F. Zuev\*\*\*

#Phone: +7 (47372) 220-85-86; e-mail: holyavka@rambler.ru

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

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

\*\*\*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia

Chitosan derivatives – carboxymethyl chitosan and *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan with molecular weights of 200, 350, and 600 kDa have been synthesized. Complexes of ficin with chitosan and its named derivatives have been obtained. IR spectra of chitosan, carboxymethylchitosan, and *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan and their complexes with ficin were recorded. The analysis of the spectra confirmed the formation of conjugates between the macromolecules of polysaccharides and ficin. The optimal ratio of protein content (0.7 mg/g of carrier) and specific activity (1590 units/mg of protein) was found during the complexation of ficin with the *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan matrix with the molecular weight 350 kDa. The efficiency of ficin complexation (in terms of specific catalytic activity) with *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan (350 kDa) exceeds that of chitosan (350 kDa) and carboxymethylchitosan (350 kDa) 2.4 and 9.8 times respectively. The types of interactions, first binding energies, amino acid composition of ficin surfaces, which interact with the carrier in the process of complexation, were studied by molecular docking. It has been established that bonds and interactions with chitosan and its derivatives are formed, among other things, with the participation of amino acid residues located near the ficin active site (Cys25 and His162), which explains the change in the proteolytic activity of the obtained complexes. Ficin complexes with *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan are soluble in a wide pH range and, therefore, may be more promising than protease-chitosan complexes in the development of medical preparations and biocatalysts for the food, brewing, and leather industries.

*Keywords: carboxymethyl chitosan, N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan, ficin, complexation*