

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ КЛАСТЕРОВ ЗАРЯЖЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ НА ПОВЕРХНОСТИ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ПОЛИМЕРАМИ

© 2022 г. С.М. Панкова*, **, Ф.А. Сакибаев**, М.Г. Холявка**, ***, В.Г. Артюхов**

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

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

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

E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.05.2021 г.

После доработки 17.06.2021 г.

Принята к публикации 23.11.2021 г.

Исследованы состав и расположение заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекул бромелина, фицина и папаина, определено процентное соотношение аминокислот разных типов. Установлено, что заряженные и гидрофобные аминокислотные остатки распределены по поверхности молекул неравномерно, образуя участки локального скопления (кластеры). Обосновано предположение о том, что наиболее перспективными носителями для иммобилизации цистеиновых протеаз являются положительно заряженные полимерные материалы, которые, вероятно, будут взаимодействовать с одним из участков на поверхности молекул фермента, удаленных от его активного центра. Выявлено, что высокомолекулярный (350 кДа) и среднемолекулярный (200 кДа) хитозаны являются более перспективными носителями для иммобилизации бромелина, фицина и папаина, чем ионообменные волокна ВИОН КН-1 и ВИОН АН-1. Сорбция на хитозанах позволила сохранить от 30% (для папаина) до 70% (для фицина) активности ферментов по сравнению с их исходной активностью в растворе.

Ключевые слова: бромелин, фицин, папаин, катионообменное волокно ВИОН КН-1, анионообменное волокно ВИОН АН-1, хитозан, кластеры аминокислотных остатков.

DOI: 10.31857/S0006302922010021

Протеазы осуществляют высокоспецифичные и селективные модификации белков, такие как активация зимогенных форм ферментов путем ограниченного протеолиза, участвуют в процессах свертывания крови и лизиса фибриновых сгустков. Их разнообразие и высокая специфичность используются в медицине и фармакологии для разработки эффективных терапевтических средств.

Бромелин (КФ 3.4.22.4) — это растительная протеаза, получаемая из стебля, сока, листьев и кожуры ананаса *Ananas comosus*. Молекулярная масса бромелина составляет 23–36 кДа. Оптимальные значения pH и температуры для проявления активности бромелина расположены в диапазоне pH 6.5–8.0 и 55–60°C. Изоэлектрическая точка его молекул находится при pH 9.5. Активный центр фермента включает Cys26 и His158 [1–4]. Бромелин ингибирует агрегацию тромбоцитов, рост раковых клеток, обладает противовос-

палительным, фибринолитическим, иммуномодулирующим действием [5–8].

Фицин (КФ 3.4.22.3) является основным белковым компонентом в латексе *Ficus sp.* Этот фермент содержит одну полипептидную цепь с молекулярной массой 25 кДа, которая свернута с образованием глобулярного белка с двумя доменами. Активный центр фицина состоит из Cys25 и His162. Фермент имеет довольно широкую субстратную специфичность и проявляет высокую активность в диапазоне pH 6.5–8.5. Изоэлектрическая точка находится при pH 9.0 [9]. Фицин обладает антимикробной активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий [10, 11].

Папаин (КФ 3.4.22.2) представляет собой растительный фермент, который выделяют из латекса папайи *Carica papaya*. Папаин относится к цистеиновым протеазам и предпочтительно расщепляет пептидные связи с участием основных аминокислот, в частности аргинина, лизина и

остатков, следующих за фенилаланином. Он представляет собой одноцепочечный белок с молекулярной массой 23 кДа и состоит из 212 аминокислот [12]. Молекула папаина содержит семь остатков цистеина, шесть из которых образуют три дисульфидные связи. Активный центр фермента состоит из Cys25 и His159 [13, 14]. Оптимум pH для папаина варьирует в диапазоне 6.0–7.0 в зависимости от используемого субстрата. Изоэлектрическая точка находится при pH 8.7. Папаин широко применяется в медицине и фармации, так как обладает противогрибковыми, антибактериальными и противовоспалительными свойствами. Например, он используется для борьбы с расстройствами пищеварения и желудочно-кишечного тракта, также папаин обладает 85%-й цитотоксичностью в отношении линии клеток рака печени HepG2 [4].

Волокнистые иониты ВИОН обладают развитой поверхностью и малым сопротивлением фильтрующего слоя, что делает их перспективными хемосорбентами [15]. Данные свойства способствуют их использованию в качестве матриц для разработки гетерогенных катализаторов на основе иммобилизованных ферментов. Благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам хитозан хорошо связывается со многими химическими соединениями и биологическими системами, в том числе с холестерином, жирами, белками, ионами металлов и даже опухолевыми клетками. В медицине изготовленные из хитозана волокна применяют в качестве рассасывающихся шовных материалов и средств для перевязки ран [16].

Ограничением для использования растворимых ферментов является их относительная неустойчивость. Одним из основных средств повышения стабильности ферментов является их иммобилизация на полимерных носителях. Иммобилизованные биокатализаторы имеют преимущества по сравнению с нативными протеазами, в частности, большую стабильность ферментного комплекса при воздействии экстремальных значений температуры, давления, pH среды. Детальное изучение процессов иммобилизации ферментов на различных носителях позволяет создавать новые непрерывные промышленные технологии производства целевых продуктов путем гетерогенного катализа. Для проведения успешной иммобилизации необходимо соблюдать определенные условия: фермент должен быть стабилен в условиях протекания реакции, активный центр фермента должен быть защищен путем его связывания с субстратом, необходимо учитывать механическую прочность и физическую форму носителя. По этим причинам целью нашей работы явилось изучение возможной роли кластеров заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности цистеиновых про-

теаз для сохранения их активности при связывании с полимерами: *in silico* поиск потенциальных сайтов связывания с полимерами-носителями, *in vitro* верификация проведенных расчетов на примере хитозана и ионообменных волокон ВИОН КН-1 и ВИОН АН-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были выбраны бромелин, фицин и папаин (Sigma, США), носителями для иммобилизации — высокомолекулярный (350 кДа) и средномолекулярный (200 кДа) хитозаны (ЗАО «Биопрогресс», Россия), ионообменные волокна ВИОН КН-1 и ВИОН АН-1 (ООО «ЛИРСОТ», Россия).

Подготовку ионообменных волокон к иммобилизации осуществляли следующим методом. При кондиционировании их помещали в дистиллированную воду. После набухания волокна обрабатывали растворами HCl переменной концентрации (0.5, 1.0, 1.5, 1.0, 0.5 моль/л) для удаления ионов железа. Процесс проводили в статических условиях. После отмывки дистиллированной водой осуществляли попеременную четырехкратную обработку ионитов растворами 1 М NaOH и 1 М HCl с промежуточной промывкой дистиллированной водой [17].

Иммобилизацию ферментов проводили адсорбционным методом. Для этого 1 г носителя выдерживали на 1 ч при комнатной температуре в 10 мл буфера. Оптимальные буферы для сорбции цистеиновых протеаз были выявлены нами ранее [18]. В частности, при иммобилизации бромелина на высокомолекулярном и средномолекулярном хитозанах мы использовали 0.05 М трис-глициновый буфер с pH 8.5 и 9.0 соответственно, на ионообменных волокнах ВИОН КН-1 — 0.05 М глициновый буфер (pH 9.0), на ВИОН АН-1 — 0.2 М ацетатный буфер (pH 5.0) [19, 20]. Для адсорбции фицина на высокомолекулярном и средномолекулярном хитозанах применяли 0.05 М глициновый буфер с pH 8.6 и 10.0 соответственно, на ВИОН КН-1 — 0.05 М трис-HCl-буфер (pH 7.0), на ВИОН АН-1 — 0.2 М ацетатный буфер (pH 5.0) [21, 22]. Для иммобилизации папаина на обоих типах хитозана использовали 0.05 М глициновый буфер (pH 9.0), на ионообменных волокнах ВИОН КН-1 — 0.05 М боратный буфер с добавлением 0.1 М KCl (pH 9.0), на ВИОН АН-1 — 0.05 М глициновый буфер (pH 10.0) [23, 24]. 20 мл раствора энзима в концентрации 2 мг/мл добавляли к 1 г суспензии носителя и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 2 ч при температуре 25°C. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 мин при 1500 g, осадок промывали буфером до отсутствия белка в промывных водах, контроль за содержанием белка осуществляли на спектрофо-

тометре СФ-2000 (ЛОМО, Россия) при 280 нм [25].

Измерение протеолитической активности ферментов осуществляли на субстрате азоказеине (Sigma, США). К 50 мг иммобилизованного образца энзима добавляли 200 мкл трис-НСl-буфера (рН 7.5), 800 мкл азоказеина (0.5% в 50 мМ трис-НСl-буфере, рН 7.5) и инкубировали 2 ч при 37°C. Далее добавляли 800 мкл трихлоруксусной кислоты в концентрации 5%, инкубировали 10 мин при 4°C, затем центрифугировали в течение 3 мин при 11700 g для удаления негидролизованного азоказеина. К 1200 мкл супернатанта добавляли 240 мкл 3% NaOH для нейтрализации кислоты, после чего измеряли оптическую плотность опытной пробы при 410 нм в односантиметровой кювете. Контрольная проба содержала 800 мкл азоказеина, 800 мкл трихлоруксусной кислоты, 50 мг образца и 200 мкл трис-НСl-буфера. За единицу каталитической активности принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкМ субстрата за 1 мин. Удельную протеолитическую активность цистеиновых протеаз рассчитывали по формуле:

$$A = D \cdot 1000 / 120 / 200 / C,$$

где A — протеолитическая активность, мкМ/мин на 1 мг белка, D — оптическая плотность пробы при 410 нм, C — концентрация белка в пробе, мг/мл, измеренная по методу Лоури, 120 — время инкубации в минутах, 200 — объем пробы, 1000 — коэффициент для пересчета в мкМ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5% с использованием t -критерия Стьюдента.

Выявление аминокислотных остатков на поверхности молекул ферментов с доступностью для растворителя не менее 20% проводили с использованием программы Swiss-Pdb Viewer 4.1.0. Локализацию гидрофобных и заряженных аминокислотных остатков визуализировали с помощью программы Maestro 10.3.

Расстояние (r) между ближайшими атомами аминокислотных остатков вычисляли на основе их координат (x , y , z) по формуле

$$r = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2}.$$

Аналогичным способом были рассчитаны расстояния от активного центра цистеиновых протеаз до заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекул.

Критерием группировки аминокислотных остатков в локальное скопление (кластер) служила степень их удаленности друг от друга. Остатки были отнесены нами к одному кластеру в случае, если среднее расстояние от каждого из них до трех ближайших аминокислот из определяемого скопления не превышало 10 Å. За начальное положение локального скопления принимали три аминокислотных остатка, среднее расстояние между которыми также не превышало 10 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На поверхности молекулы бромелина обнаруживается 87 аминокислотных остатков, доступных для растворителя менее чем на 20%, у фицина их 78, у папаина — 80. Среди них преобладают гидрофобные аминокислотные остатки. Количество положительно заряженных превышает число отрицательно заряженных аминокислот на поверхности глобул папаина и бромелина. Для молекулы фицина количество отрицательно заряженных остатков превосходит величину положительных. Сведения об абсолютном и относительном числе остатков аминокислот представлены в табл. 1.

В результате анализа моделей молекул бромелина, фицина и папаина было установлено, что аминокислотные остатки на их поверхности распределены неравномерно с образованием кластеров. Обнаружено по четыре скопления заряженных аминокислотных остатка для молекул бромелина и фицина и три скопления для папаина.

Таблица 1. Абсолютное и относительное количество аминокислотных остатков на поверхности молекул цистеиновых протеаз

Тип остатков	Абсолютное количество			Относительное количество		
	Бромелин	Фицин	Папаин	Бромелин	Фицин	Папаин
Гидрофобные	36	24	35	41%	30%	44%
Положительно заряженные	18	16	14	21%	21%	17%
Отрицательно заряженные	7	17	6	8%	22%	8%
Незаряженные	26	21	25	30%	27%	31%

Таблица 2. Состав кластеров заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекул бромелина, фицина и папаина

Фермент	Скопления заряженных остатков	Скопления гидрофобных остатков
Бромелин	1) Lys59, Lys64, Arg70, Glu73, Lys79, Lys93 2) Lys42, Lys43, Lys127, Glu211 3) Arg9, Lys18, Glu47, Lys90; 4) Lys144, Lys174, Lys175, Lys179	1) Val2, Pro3, Ile6, Tyr11, Tyr123 2) Val17, Pro22, Gly44, Ile45, Leu46, Pro48, Tyr61, Ala85, Ile86, Pro88, Tyr89, Ala92, Gly100, Val101, Pro102, Tyr106, Ile107 3) Tyr142, Val147, Pro151, Ile171, Pro173, Trp176, Gly177, Ala178, Trp180, Ala183
Фицин	1) Arg8, Lys10, Glu172, Glu191 2) Asp18, Lys21, Lys61, Asp62, Lys66, Asp71, Lys72, Arg94, Lys95, Lys145, Glu146, Asp161, Lys187 3) Asp75, Lys79, Arg81, Glu114, Asp115, Asp119, Glu212 4) Asp122, Lys126, Asp199, His202	1) Pro58, Tyr60, Leu63, Trp69 2) Pro117, Ala118, Val158, Ala159, Ala201, Pro203
Папаин	1) Arg58, Arg59, Glu89, Arg93, Arg98, Glu99, Lys100 2) Arg41, Lys106, Asp108, Arg111 3) Lys139, Arg145, Lys156, Asp158	1) Ile1, Pro2, Tyr4, Pro115, Tyr116, Gly119, Tyr123, Ala137, Leu143, Ile148, Val150, Pro152, Val157, Pro168, Gly192, Gly194, Tyr197 2) Tyr6, Pro87, Val91, Tyr94

Число скоплений гидрофобных аминокислот составляет три у бромелина и по два — у фицина и папаина. Аминокислотный состав кластеров приведен в табл. 2.

Для молекул всех исследуемых в работе ферментов выявлено наличие в области активного центра скоплений заряженных аминокислотных остатков, в составе которых преобладают положительно заряженные аминокислоты (рис. 1). Для бромелина и папаина таковыми являются скопления 1 и 3, для фицина — скопление 2. Это может указывать на вероятное связывание с данными участками отрицательно заряженного носителя при иммобилизации и, как следствие, экранирование субстрата от активного центра цистеиновых протеаз и значительную потерю активности. В то же время на удаленном от активного центра участке молекулы фицина имеется скопление 1, в котором преобладают отрицательно заряженные аминокислоты. В связи с этим

можно сделать вывод о вероятном связывании с ними положительно заряженного носителя без экранирования субстрата от активного центра и, как следствие, большей перспективности для фицина положительно заряженных носителей для иммобилизации. Для бромелина и папаина, вероятно, также наиболее предпочтительными можно считать данный тип носителей, поскольку в непосредственной близости к активному центру не наблюдается скоплений сайтов связывания с ними.

Поскольку кластеры гидрофобных аминокислот, содержащие большое количество остатков, находятся в непосредственной близости к активному центру для всех исследуемых ферментов и высока вероятность их связывания с носителем с перекрытием последнего, мы можем предположить, что гидрофобные матрицы наименее перспективны для иммобилизации бромелина, фицина и папаина (рис. 2).

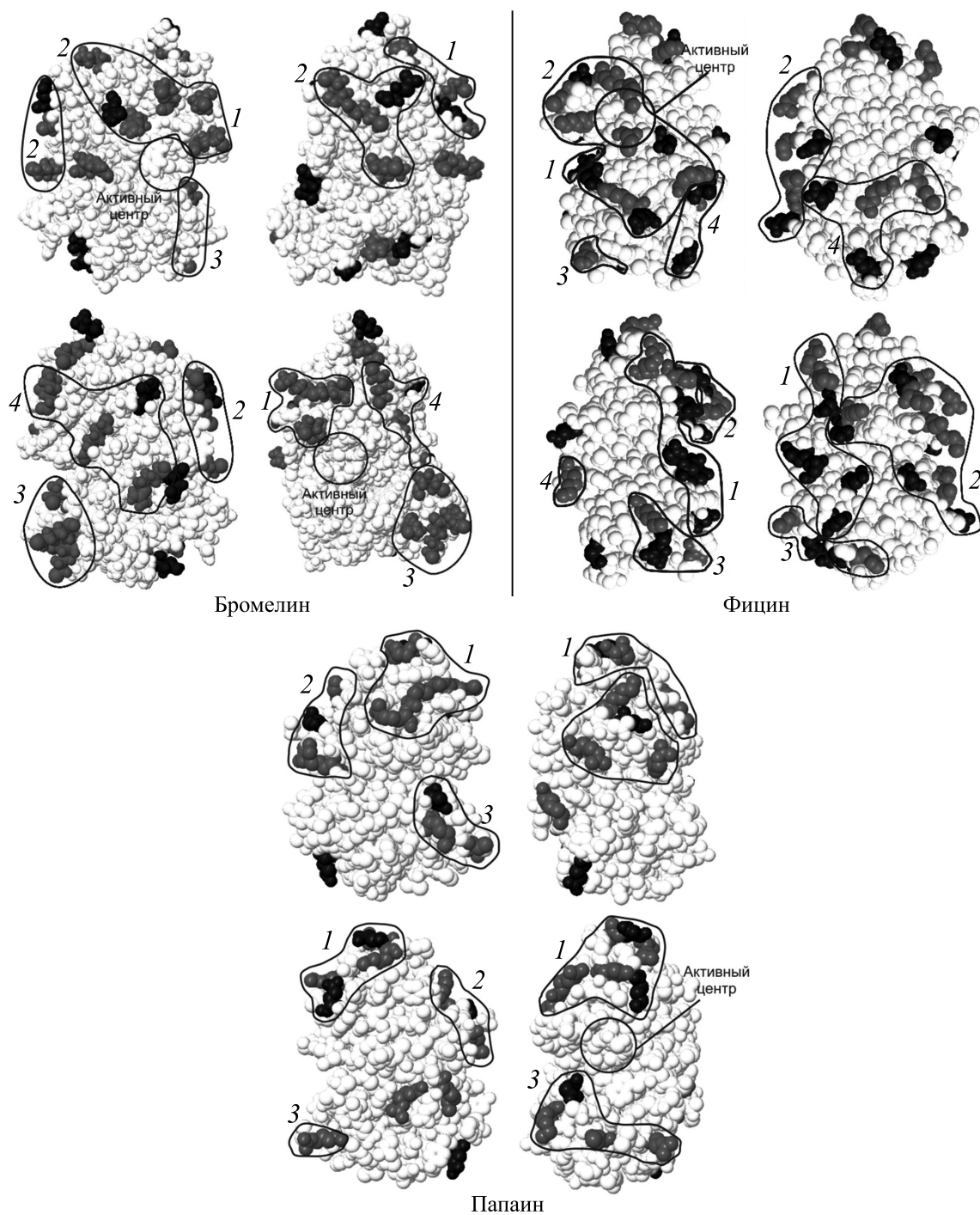


Рис. 1. Кластеры заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекул бромелина, фицина и папаина (1, 2, 3, 4 — номера кластеров; кругом обозначен активный центр фермента; каждое следующее изображение представляет собой молекулу, повернутую на 90° относительно предыдущего изображения). Серым цветом обозначены положительно заряженные скопления, черным цветом — отрицательно заряженные.

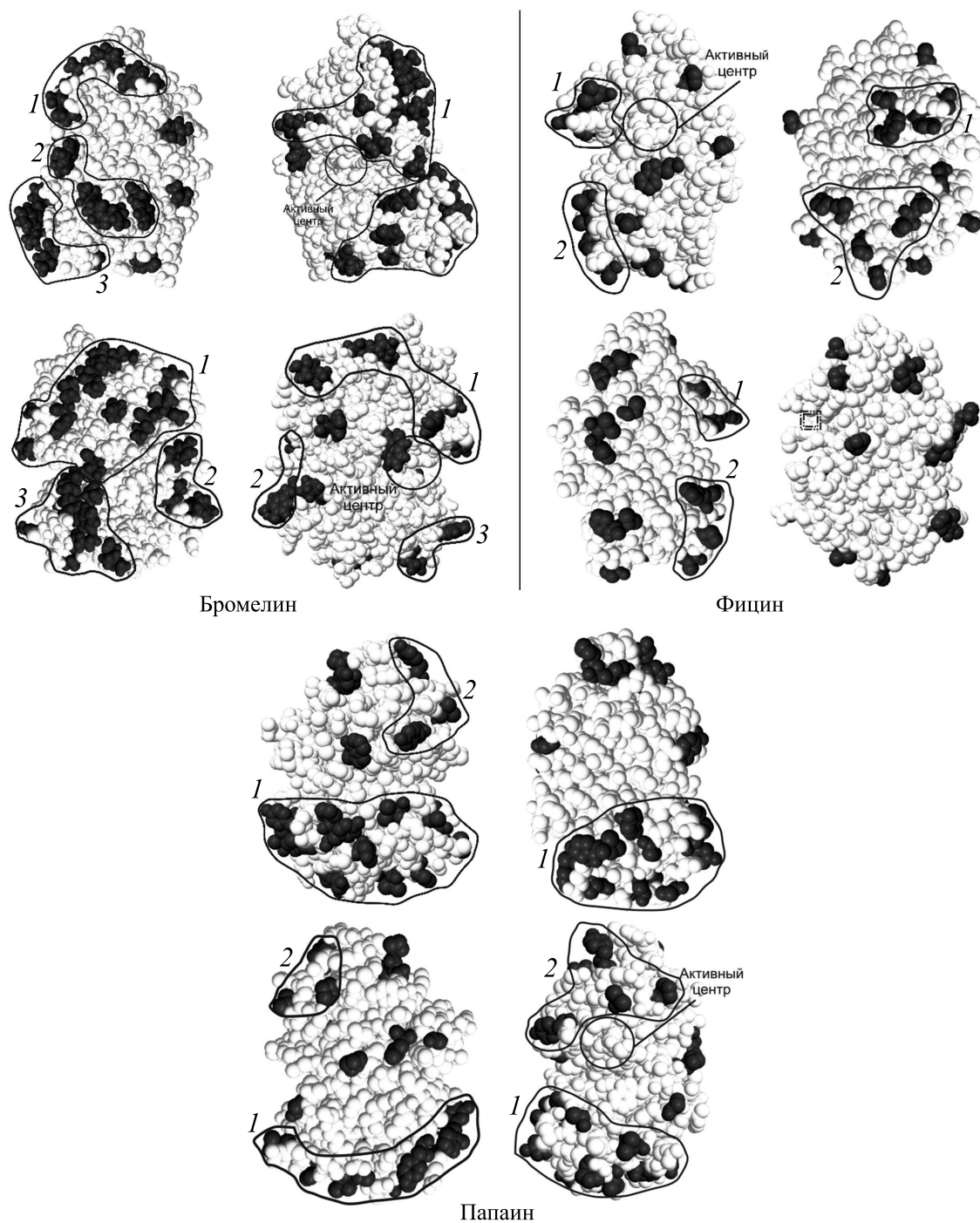


Рис. 2. Кластеры гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности молекул бромелина, фицина и папаина (1, 2, 3 — номера кластеров; кругом обозначен активный центр фермента; каждое следующее изображение представляет собой молекулу, повернутую на 90° относительно предыдущего изображения).

В ходе проведения эксперимента установлено, что наибольшее содержание белка регистрируется в препаратах бромелина, иммобилизованного на высокомолекулярном и средномолекулярном хитозанах (~50% от количества фермента в иммобилизационной среде), фицина, адсорбирован-

ного на матрице ионообменных волокон ВИОН КН-1 (~95%) и папаина, иммобилизованного на ВИОН АН-1 (~40%) (рис. 3).

Высокая удельная активность наблюдается у гетерогенных биокатализаторов на основе цистеиновых протеаз, адсорбированных на высокомо-

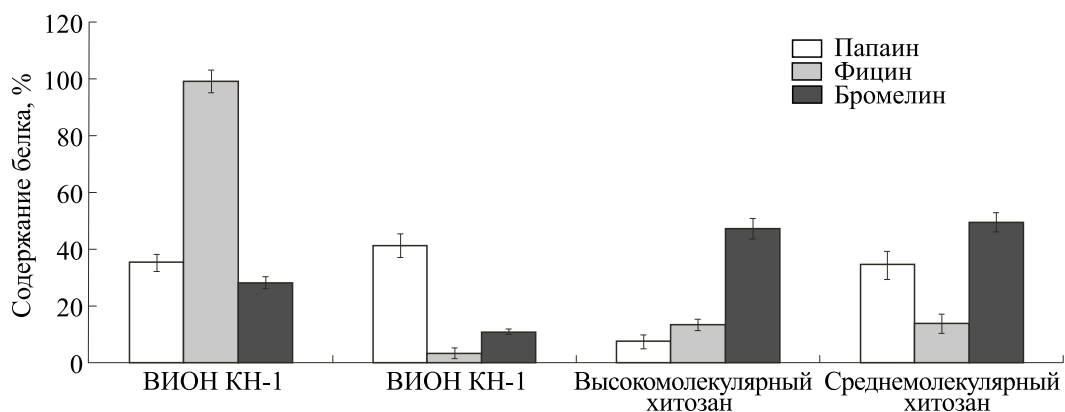


Рис. 3. Содержание белка (в %) в препаратах иммобилизованных цистеиновых протеаз. За 100% принималось первоначальное содержание фермента в иммобилизационной среде (40 мг).

лекулярном и среднемолекулярном хитозанах: для бромелина — 65% от активности фермента в растворе до его иммобилизации, для фицина — 70%, для папаина — 30% (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для иммобилизации цистеиновых протеаз наиболее перспективны положительно заряженные носители. В качестве такого материала могут выступать хитозаны с молекулярными массами 200–350 кДа, сорбция на которых позволяет сохранить для бромелина 65% от его первоначальной активности в растворе, для фицина — 70%, для папаина — 30%.

Положительно заряженные носители, вероятно, будут связываться с молекулами цистеиновых протеаз без экранирования субстрата от активного центра фермента, поскольку в непосредственной близости к их активному центру не наблюдается кластеров отрицательно заряженных аминокислотных остатков. При адсорбционной

иммобилизации бромелина, фицина и папаина на положительно заряженных полимерах будут преимущественно образовываться водородные связи, а также электростатические взаимодействия.

Приведенные в статье материалы могут быть использованы для решения некоторых задач в медицине: 1) получение препаратов пролонгированного действия, благодаря стабилизации и увеличению времени полужизни фермента, 2) уменьшение диффузии вещества в организме, 3) направленное регулирование оптимумов функционирования препарата (температурный оптимум, оптимум pH).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №21-74-20053).

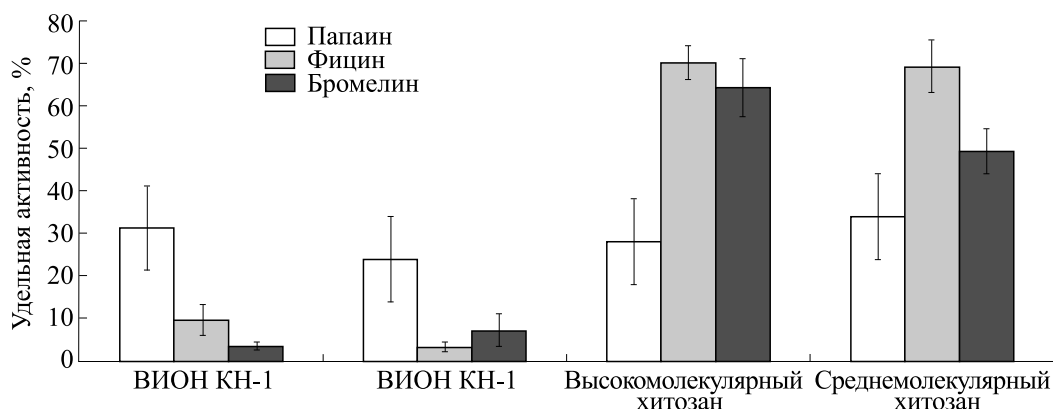


Рис. 4. Удельная активность (в %) цистеиновых протеаз при их иммобилизации на различных типах носителей. За 100% принята удельная активность фермента до его адсорбции, наблюдаемая при оптимальных условиях гидролиза азоказеина.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Z. I. M. Arshad, A. Amid, F. Yusof, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. J. **98**, 7283 (2014).
2. J. A. Ataide, E. F. Gérios, P. G. Mazzola, and E. B. Souto, Adv. Colloid Interface Sci. **254**, 48 (2018).
3. L. C. L. Novaes, A. F. Jozala, A. M. Lopes, et al., American Institute of Chemical Engineers Biotechnol. Prog. Received, (2017), pp. 5-13.
4. M. E. Errasti, C. L. Natalucci, and N. O. Caffini, Appl. Biochem. Biotechnol. **186**, 186 (2018).
5. K. Bhui, S. Tyagi, B. Prakash, and Y. Shukla, BioFactors **36**, 474 (2010).
6. T. C. Chang, P. L. Wei, P. T. Makondi, et al., PLoS One **14** (1), 1 (2019).
7. N. Amini, S. Setiasih, S. Handayani, et al., AIP Conf. Proc., **2018**, 020071 (2018).
8. R. Debnatha, N. Chatterjeeb, S. Das, et al., Toxicol. in Vitro **55**, 24 (2019).
9. K. B. Devaraj, P. R. Kumar, and V. Prakash, Agric. Food Chem. **56**, 11417 (2008).
10. L. Feijoo-Siota and T. G. Villa, Food Bioprocess Technol. **4**, 1066 (2011).
11. A. Homaei, R. Stevanato, R. Etemadipour, and R. Hemmati, Biocatal. Agricultural Biotech. **10**, 360, (2017).
12. E. Amri and F. Mamboya, Am. J. Biochem. Biotech. **8** (2), 99 (2012).
13. G. Lowe, Tetrahedron **32** (3), 291 (1976).
14. H. A. Sathish, P. R. Kumar, and V. Prakash, Int. J. Biol. Macromol. **41**, 383 (2007).
15. M. Akila, A. Sushama, and R. Kumaresan, Int. J. Pharm. Sci. **6** (9), 160 (2014).
16. Д. Р. Байдамшина, Е. Ю. Тризна, М. Г. Холявка и др., Вестн. ВГУ. Сер. Хим. Биол. Фарм. **3**, 53 (2016).
17. М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов, С. М. Сазыкина и М. А. Наквасина, Хим.-фарм. журн. **51** (8), 39 (2017).
18. M. Holyavka, D. Faizullin, V. Koroleva, et al., Int. J. Biol. Macromol. **180**, 161 (2021).
19. М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов и С. М. Сазыкина, патент на изобретение № 2677343, заявка № 2017123459 (2019).
20. S. Olshannikova, V. Koroleva, M. Holyavka, et al., J. Biotech. **280**, 68 (2018).
21. М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов и В. А. Королева, патент на изобретение № 2677858, заявка № 2017123462 (2017).
22. D. R. Baidamshina, V. A. Koroleva, E. Yu. Trizna, et al., Int. J. Biol. Macromol. **164**, 4205 (2020).
23. М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов и В. А. Королева, патент на изобретение № 2677873, заявка № 2017123457, (2017).
24. V. Koroleva, M. Holyavka, S. Olshannikova, et al., in *Abstr. Book 43rd FEBS Congr.* (Prague, Czech Republic, 2018), p. 228.
25. О. О. Логинова, М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов и А. С. Беленова, Фундаментальные исследования **11** (3), 484 (2013).

Possible Role of Charged Amino Acids Clusters on the Surface of Cysteine Proteases for Preserving Activity when Binding with Polymers

S.M. Pankova*, **, F.A. Sakibaev**, M.G. Holyavka**, ***, V.G. Artyukhov**

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

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

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

The composition and arrangement of charged and hydrophobic amino acid residues on the surface of bromelain, ficin, and papain molecules have been investigated, the percentage ratio of different types of amino acids has been determined. It was found that charged and hydrophobic amino acid residues are unevenly distributed over the surface of molecules, forming areas of local accumulation (clusters). The assumption that the most promising carriers for the immobilization of cysteine proteases are positively charged polymeric materials, which are likely to interact with one of the sites on the enzyme molecules surface located far from its active center, is substantiated. It was revealed that the chitosans of high molecular weight (350 kDa) and medium molecular weight (200 kDa) are more promising carriers for the immobilization of bromelain, ficin, and papain than ion-exchange fibers VION KN-1 and VION AN-1. Sorption on chitosans made it possible to preserve from 30% (for papain) to 70% (for ficin) of the enzyme activity in comparison with their initial activity in solution.

Keywords: bromelain, ficin, papain, cation-exchange fiber VION KN-1, anion-exchange fiber VION AN-1, chitosan, clusters of amino acids