

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

УДК 615.355:577.344

МАТРИЦА ХИТОЗАНА КАК ФОТОМОДУЛЯТОР ДЛЯ БРОМЕЛИНА

© 2021 г. С. М. Панкова^{1,2}, М. Г. Холявка^{1,3,*}, М. С. Кондратьев⁴, Ю. М. Вышкворкина⁵,
А. Н. Лукин¹, В. Г. Артюхов¹

¹ Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

² Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

³ Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

⁴ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

⁵ Московский физико-технический институт, Москва, Россия

*E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.05.2021 г.

После доработки 26.06.2021 г.

Принята к публикации 30.06.2021 г.

Показано, что при воздействии УФ-излучения в дозе 151 Дж/м² активность свободного бромелина (КФ 3.4.22.4) увеличивается на 86%, при использовании дозы 6040 Дж/м² зарегистрировано снижение каталитической способности на 15%. Изменений размера (радиуса) молекулы энзима не наблюдается в диапазоне доз 151–6040 Дж/м². После адсорбции бромелина на матрице высокомолекулярного (350 кДа) хитозана активность ферментного препарата, облученного во всем диапазоне используемых нами доз, сохранялась в пределах 97%, после иммобилизации на среднемoleкулярном (200 кДа) хитозане – до 89%. Анализ ИК-спектров иммобилизованного бромелина показал, что в характеристических полосах амид I, амид II, амид III не происходит существенных изменений, следовательно, можно констатировать, что матрица хитозана выступает в качестве фотомодулятора для адсорбированного на ней фермента.

Ключевые слова: ИК-спектроскопия, бромелин, хитозан, адсорбционная иммобилизация, УФ-облучение

DOI: 10.31857/S0869803121050088

Высокий бактерицидный эффект коротковолнового УФ-излучения (100–280 нм) открывает широкие перспективы использования его в медицине и фармакологии. Особый интерес представляет изучение механизмов фототерапии для лечения и профилактики кожных заболеваний. Бактерицидный эффект УФ-излучения обусловлен его влиянием на процессы жизнедеятельности клетки. Эритемные дозы УФ-света с длиной волны 250–320 нм стимулируют рост ангиобластов, активизируют образование соединительной ткани, ускоряют процессы эпителизации кожи, что имеет важное практическое значение при лечении медленно заживающих ран и язв. Бактерицидное воздействие ультрафиолета гарантирует создание надежного антимикробного барьера для бактериальных патогенов. Помимо воздействия УФ-облучения в качестве защитного агента в отношении патогенных микроорганизмов могут выступать протеазы [1–4].

Протеолитические ферменты – это группа молекул энзимов, основная функция которых – расщепление пептидных связей, приводящее к деградации поврежденных, неправильно свернутых и потенциально вредных протеинов и, следова-

тельно, обеспечению клетки аминокислотами, необходимыми для синтеза новых белков. Протеазы играют важную роль в качестве сигнальных молекул и участвуют во множестве ферментных каскадов для поддержания жизненно важных процессов в организме [5–7]. Энзимы растений не являются исключением, более того, они обладают уникальными свойствами, такими как высокая стабильность и субстратная специфичность, широкий диапазон рН для проявления каталитической активности. В связи с этим цистеиновые протеазы, в том числе бромелин, являются широко применяемыми в медицине и фармакологии [8–10].

Бромелин (КФ 3.4.22.4) – это сульфгидрильная растительная протеаза, обнаруженная у представителей семейства *Bromeliaceae*. Наиболее высокую каталитическую активность фермент проявляет при рН 6–8, изоэлектрическая точка составляет 9.5 единиц рН. Температурный оптимум – 62°C [11–14]. В медицинских целях бромелин применяют для подавления процессов агрегации тромбоцитов, увеличения абсорбции антибиотиков. А. Friesen и соавт. (1987) в своих исследованиях подтвердили способность энзима повышать проницаемость тканей для антибиоти-

ков группы пенициллинов и тетрациклинов [15, 16]. Бромелин также используется как противоопухолевое средство, модулятор иммунитета, помогает процессам пищеварения, способствует заживлению ран и улучшает кровообращение [17, 18].

Основным недостатком растворимой формы ферментов является их быстрая инактивация при действии различных факторов окружающей среды, одним из которых является продолжительное воздействие УФ-излучения. Современные методы модификации энзимов, например, адсорбционная иммобилизация на полимерных носителях, позволяют увеличить их стабильность к воздействию различных химических реагентов, физических факторов и предоставляют возможность многократного использования биокатализатора [19, 20]. В этой связи целью нашей работы стало выявление особенностей воздействия УФ-излучения на процессы фотомодуляции свободного и иммобилизованного на матрице хитозана бромелина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования был выбран бромелин фирмы “Sigma” (США), субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы “Sigma” (США), носителями для иммобилизации – два вида хитозана, синтезированных ЗАО “Биопрогресс” (Россия): хитозан пищевой кислоторастворимый среднемoleкулярный ($M_r = 200$ кДа), степень деацетилирования (СД) – 82%, хитозан кислоторастворимый высокомолекулярный ($M_r = 350$ кДа, СД = 94.85%). Иммобилизацию бромелина на матрице хитозанов осуществляли адсорбционным методом. К 1 г носителя добавляли 20 мл раствора фермента в концентрации 1 мг/мл в 0.05 моль/л трис-глициновом буфере (рН 8.5) для высокомолекулярного хитозана и в 0.05 моль/л трис-глициновом буфере (рН 9.0) для среднемoleкулярного хитозана, инкубировали в течение 4 ч с периодическим перемешиванием при температуре 25°C. Полученную смесь центрифугировали 10 мин при 1500 g, осадок промывали 0.05 моль/л трис-НСI буфером (рН 7.5) до отсутствия бромелина в промывных водах, контроль за содержанием белка осуществляли на спектрофотометре СФ-2000 при 280 нм [21, 22].

Определение количества белка проводили модифицированным методом Лоури. Сущность модификации заключалась в том, что на первом этапе анализа осуществляли разрушение связей и взаимодействий между матрицей носителя и молекулой фермента. Для этого обрабатывали иммобилизованный препарат раствором К,Na-тартрата, приготовленным на 1 моль/л NaOH при 50°C в течение 10 мин [23].

Для определения протеолитической активности бромелина в качестве субстрата использовали бычий сывороточный альбумин (66.4 кДа) в концен-

трации 10^{-5} моль/л, растворенный в 0.05 моль/л трис-НСI буфере (рН 7.5), гидролиз субстрата осуществляли в течение 30 мин при 37°C. Далее пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 11700 g для удаления иммобилизованного бромелина. О протеолитической активности образцов судили по разности концентрации альбумина в растворе до начала реакции гидролиза и в надосадочной жидкости после протекания реакции. За единицу активности свободного и иммобилизованного бромелина принимали количество фермента, которое в условиях эксперимента гидролизует 1 мкмоль бычьего сывороточного альбумина за 1 мин. Для определения каталитической активности образцов мы также применяли метод Лоури, но с другой модификацией – без добавления в реакционную среду сульфата меди [24]. Ранее в процессе сравнения ряда методик определения количества белка в растворе мы установили, что наименьший вклад в окрашивание реакционной среды матрица хитозана вносит при использовании модифицированного метода Лоури (без добавления сульфата меди). Кроме того, данный метод незначительно “реагирует” на отдельные аминокислоты, в частности изолейцин, а его применение позволяет минимизировать вклад в ход реакции молекул самого хитозана, а также процессов связывания бычьего сывороточного альбумина с матрицей хитозана и реакции автолиза бромелина [23].

Процесс УФ-облучения бромелина происходил при непрерывном перемешивании раствора свободного энзима или суспензии иммобилизованного фермента в объеме 4 мл (толщина слоя в середине кюветы – 7 мм) магнитной мешалкой в круглодонной термостатируемой кювете ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) с помощью ртутно-кварцевой лампы типа ДРТ-400 через светофильтр УФС-1 с полосой пропускания 240–390 нм в течение 1, 3, 5, 10, 20, 30 или 40 мин. Доза облучения составила соответственно 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530 и 6040 Дж/м².

Регистрацию ИК-спектров анализируемых образцов осуществляли в Центре коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета с помощью ИК-Фурье спектрометра Bruker Vertex-70 (Германия). Спектры снимали с неориентированных порошковых образцов. Визуализацию аминокислотных остатков – хромофоров для УФ-света – проводили в программе Maestro. Подготовку структуры фермента для докинга выполняли по стандартной для AutodockVina схеме, описанной авторами пакета на сайте: из входного файла PDB были удалены координаты атомов (и сами атомы) молекул растворителя, буфера и лигандов. Перед проведением численных расчетов была выполнена расстановка зарядов на поверхности белков с помощью MGLTools 1.5.6. Центр молекулы и параметры бокса (“ячейки”) мы задавали вручную,

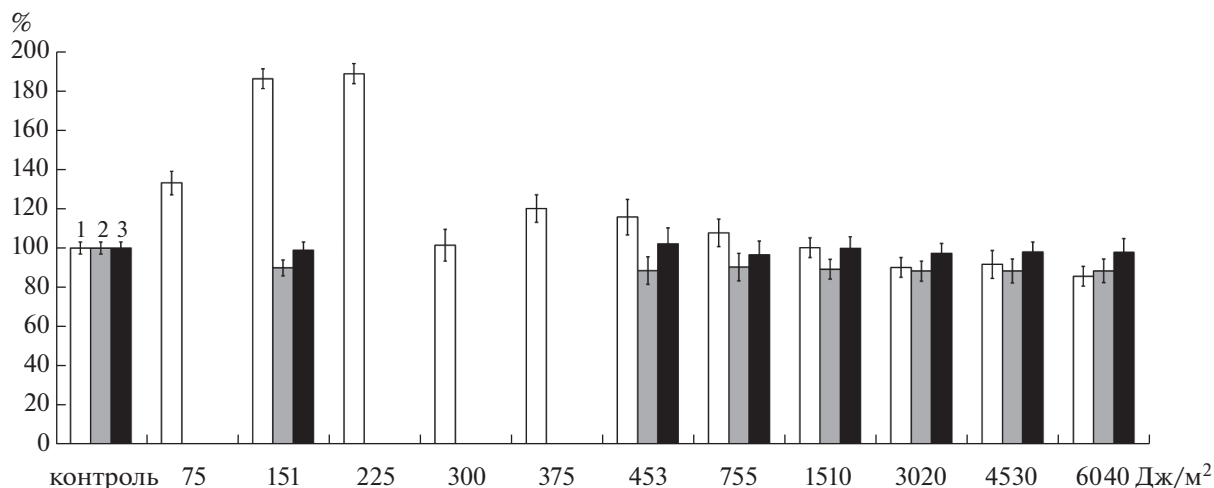


Рис. 1. Влияние УФ-света на удельную каталитическую активность (%) свободного и иммобилизованного на матрице хитозана бромелина: 1 – свободный бромелин, 2 – бромелин, иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане, 3 – бромелин, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане.

Fig. 1. Influence of UV light on the specific catalytic activity (%) of free and immobilized on the chitosan matrix bromelain: 1 – free bromelain, 2 – bromelain immobilized on medium molecular weight chitosan, 3 – bromelain immobilized on high molecular weight chitosan.

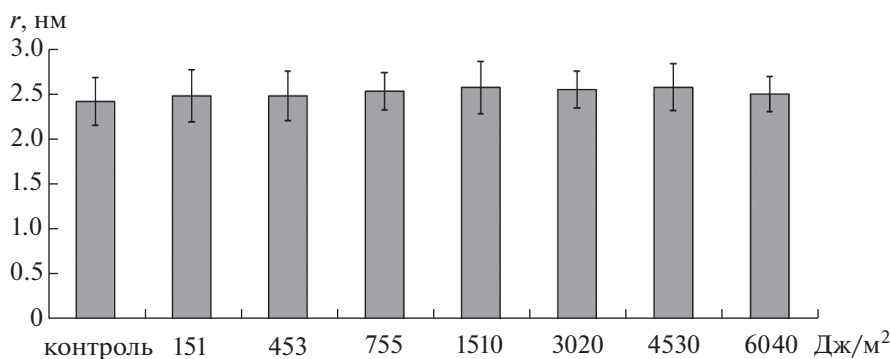


Рис. 2. Влияние УФ-света на радиус молекул бромелина.

Fig. 2. Influence of UV light on the radius of bromelain molecules.

добиваясь того, чтобы молекула протеазы полностью была внутри расчетной области пространства. Модель структуры хитозана была нарисована в молекулярном конструкторе NuserChem, последовательно оптимизирована сначала в силовом поле AMBER, а потом квантово-химически в РМЗ. Лиганд в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После УФ-облучения раствора бромелина в дозе 151 Дж/м² наблюдалось увеличение его активности на 86% по сравнению с контрольным образцом. При действии дозы 453 Дж/м² катали-

тическая способность фермента соответствовала первоначальному уровню и сохранялась в его пределах при дальнейшем УФ-облучении препарата в диапазоне доз 755–4530 Дж/м². При использовании дозы 6040 Дж/м² зарегистрировано снижение активности свободного бромелина на 15%.

После иммобилизации бромелина на матрице высокомолекулярного хитозана при УФ-облучении в дозе 151 Дж/м² зафиксировано снижение активности на 2%, при использовании дозы 6040 Дж/м² – на 3%. После иммобилизации бромелина на матрице среднемолекулярного хитозана при УФ-облучении в диапазоне доз 151–6040 Дж/м² детектировано уменьшение его каталитической способности в пределах 11% (рис. 1). Изменение размера молекулы свободного бромелина при действии УФ-света не выявлено во всем диапазоне используемых доз (рис. 2).

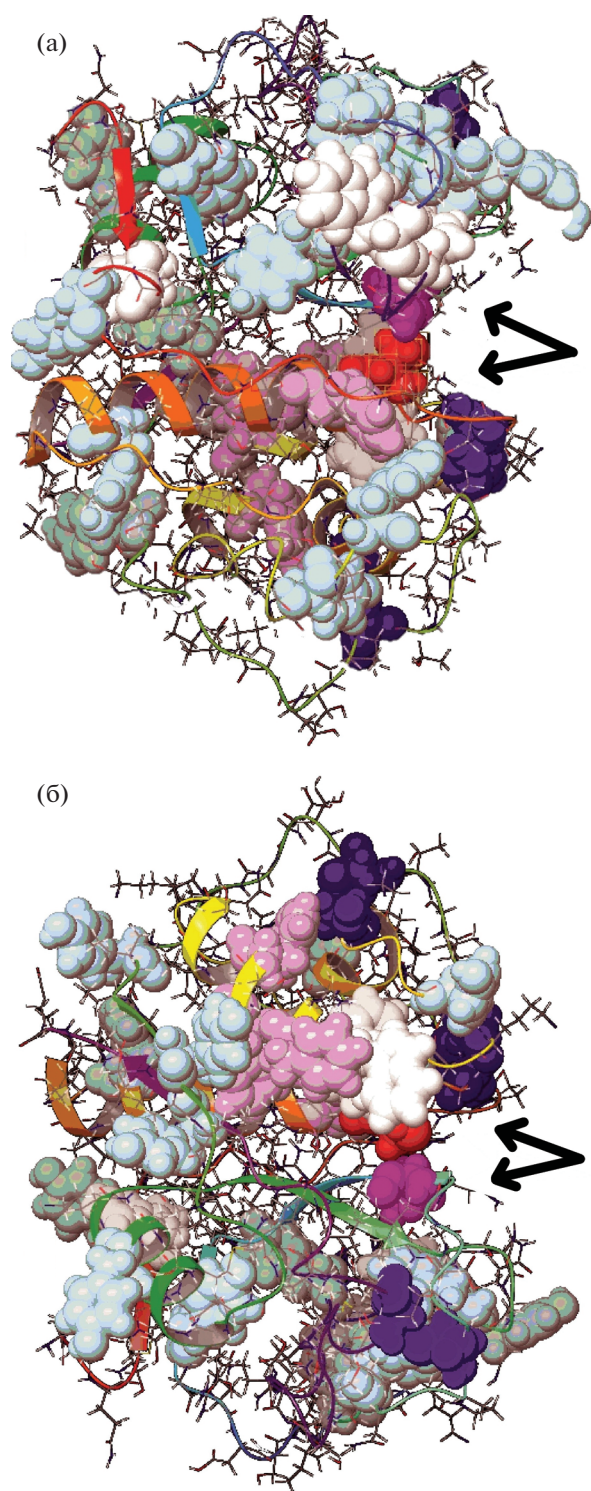


Рис. 3. Хромофоры для УФ-света в молекуле бромелина (PDB ID: 1W0Q): атомы аминокислотных остатков, входящих в их состав, обозначены шарами, активный центр фермента указан стрелками; б – повернутая на 180° вокруг горизонтальной оси форма а.

Fig. 3. Chromophores for UV light in the bromelain (PDB ID: 1W0Q): the atoms of the amino acid residues that make up their composition are indicated by balls, the active site of the enzyme is indicated by arrows; b – rotated 180° around the horizontal axis form a.

Для более детального анализа полученных данных была произведена визуализация хромофоров УФ-излучения для молекулы бромелина (PDB ID: 1W0Q) по отношению к активному центру энзима (рис. 3). В активном центре бромелина находится His 158, в непосредственной близости к нему располагается Trp 172, который, вероятно, будет принимать участие в фотохимических реакциях, приводящих к активации молекулы бромелина в дозе 151 Дж/м² и к инактивации фермента при дальнейшем облучении.

Проанализированы связи и взаимодействия между молекулой бромелина (PDB ID: 1W0Q) и матрицей хитозана, образующиеся в ходе иммобилизации фермента (рис. 4). В процессе адсорбции на носителе у бромелина задействованы Trp 180 и Phe 29. При иммобилизации фермента эти хромофоры вступают во взаимодействие с носителем и не принимают участия в фотохимических реакциях, следовательно, матрица хитозана является фотомодулятором и может экранировать УФ-свет.

Для более глубокого анализа наблюдаемых эффектов были зарегистрированы ИК-спектры бромелина, иммобилизованного на матрице среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов, до и после УФ-облучения образцов в дозах 151, 453, 755, 1510, 3020, 4530, 6040 Дж/м².

Основные изменения на ИК-спектрах бромелина, иммобилизованного на матрице высокомолекулярного хитозана, детектированы при максимальной дозе облучения 6040 Дж/м². В области 602–618 см⁻¹ пропадает максимум 602 см⁻¹ при использовании дозы 6040 Дж/м²; при облучении дозами 151–4530 Дж/м² зафиксировано смещение полосы в области 612–618 см⁻¹ в сторону уменьшения значений волновых чисел. Эти изменения соответствуют деформационным колебаниям С–С, С–О, С–N связей. При дозе облучения 1510 Дж/м² в области 858–865 см⁻¹ зафиксировано расщепление полосы на два пика – 824 и 862 см⁻¹, свидетельствующие об асимметричных валентных колебаниях связей С–С. При дозах 1510 и 4530 Дж/м² зарегистрированы пики 955 и 956 см⁻¹ соответственно, они обусловлены деформационными колебаниями NH₂-групп, следовательно, происходит образование водородных связей в иммобилизованном препарате. При облучении дозой 6040 Дж/м² детектировано смещение полосы, которая ответственна за валентные колебания С–O групп, с 1060 до 1032 см⁻¹. При увеличении дозы облучения зафиксировано смещение полосы 1321–1316 см⁻¹ в сторону уменьшения волновых чисел, что указывает на изгибание связи N–H и появление деформационного колебания С–N связи. В полосе амид II, соответствующей деформационным колебаниям N–H и С–N связей, выявле-

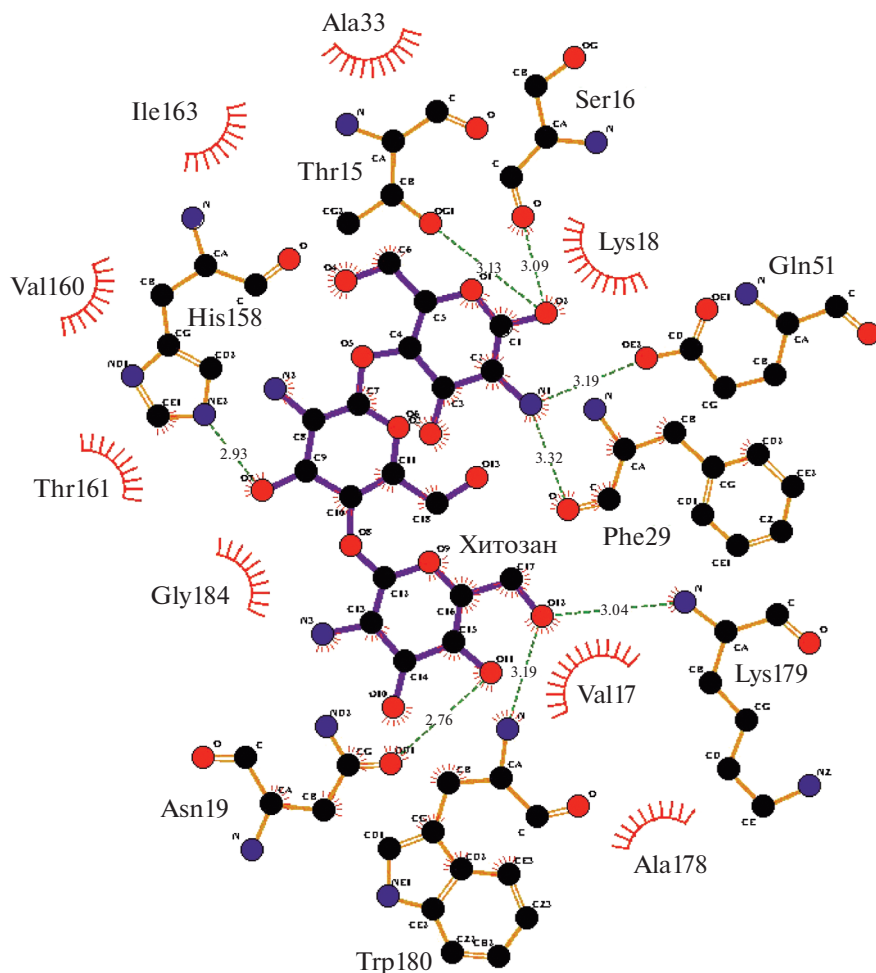


Рис. 4. Связи и взаимодействия между молекулой бромелина (PDB ID: 1W0Q) и матрицей хитозана (пунктирными линиями обозначены водородные связи).

Fig. 4. Bonds and interactions between the bromelain molecule (PDB ID: 1W0Q) and the chitosan matrix (the dotted lines indicate hydrogen bonds).

но небольшое смещение в области $1555\text{--}1549\text{ см}^{-1}$ в сторону уменьшения волнового числа при дозе облучения 6040 Дж/м^2 . В области характеристической полосы амид I изменений интенсивности пиков не наблюдалось. При дозах УФ-облучения 151 , 453 и 755 Дж/м^2 появляются пики 1983 , 1984 , 1987 см^{-1} , находящиеся в области валентных колебаний двойных связей $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{N}$. При использовании дозы 453 Дж/м^2 выявлены пики 2178 и 2223 см^{-1} , при дозе 4530 Дж/м^2 — пик 2170 см^{-1} , они обусловлены валентным колебанием $\text{C}\equiv\text{N}$. При дозе облучения 453 Дж/м^2 в полосе $2875\text{--}2878\text{ см}^{-1}$ зарегистрирован пик 2909 см^{-1} , а при использовании дозы 755 Дж/м^2 происходит его расщепление на пики 2916 и 2867 см^{-1} , это обусловлено валентными колебаниями алифатических $\text{C}\text{--}\text{H}$ связей и может указывать на изменения (деструкцию) матрицы хитозана. О присутствии валентной $=\text{NH}\text{--}\text{C}$ связи свидетельствует

полоса $2875\text{--}2878\text{ см}^{-1}$. О наличии антисимметричных валентных колебаний групп $\text{N}\text{--}\text{H}$, участвующих в образовании водородных связей, указывает появление пика 3436 см^{-1} после УФ-облучения в дозе 1510 Дж/м^2 (рис. 5).

При иммобилизации бромелина на среднемoleкулярном хитозане при использовании дозы облучения 6040 Дж/м^2 в ИК-спектре появляются пики 1064 , 1552 и 2051 см^{-1} , что соответствует колебаниям гидроксильных групп, симметричным деформационным колебаниям NH_3^+ -группы и колебаниям --COO^- соответственно. Зарегистрировано смещение полосы $1150\text{--}1147\text{ см}^{-1}$ во всем диапазоне использованных доз, что обусловлено изменениями при участии $\text{--CH}_2\text{--O--CH}_2\text{--}$ фрагментов. В полосе $1255\text{--}1261\text{ см}^{-1}$ детектировано смещение пика в сторону увеличения значений волновых чисел, что связано с деформационными колеба-

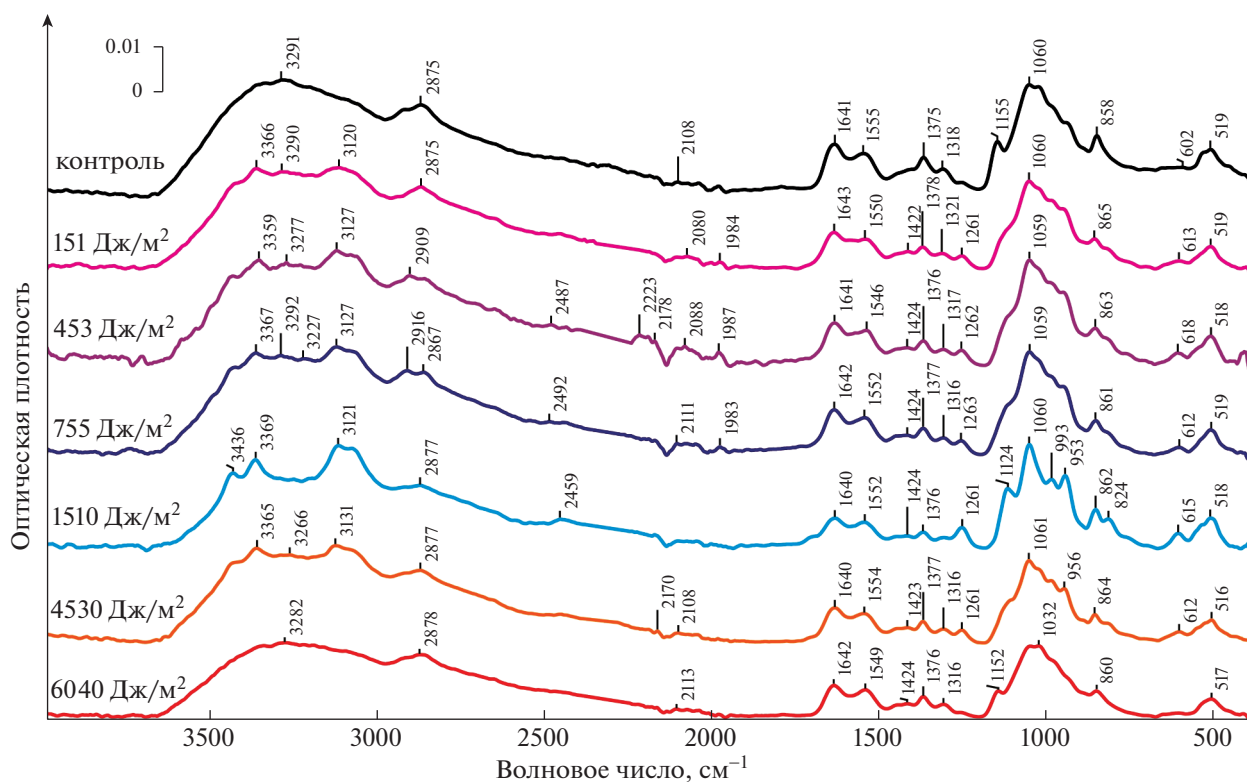


Рис. 5. ИК-спектры бромелина, иммобилизованного на матрице высокомолекулярного хитозана, до и после УФ-облучения в диапазоне доз 151–6040 Дж/м².

Fig. 5. IR spectra of bromelain immobilized on a matrix of high molecular weight chitosan before and after UV irradiation in the dose range 151–6040 J/m².

ниями С–N связи. В области характеристической полосы амид III при дозах облучения 151 и 3020 Дж/м² пропадают пики, следовательно, происходят изменения во вторичной структуре белка. В полосе 1377–1378 см⁻¹ при максимальной дозе облучения наблюдается сглаживание пика. Данную полосу характеризуют деформационные колебания N–H связей. В полосе амид II при дозе облучения 755 Дж/м² выявлено расщепление пика на 1546 и 1590 см⁻¹, указывающее на изменения в бензольном кольце. При дозе 6040 Дж/м² зарегистрировано смещение пика 1552 см⁻¹, вызванное деформационными колебаниями NH₃⁺-группы. В области характеристической полосы амид I, ответственной за валентные колебания С=О связи в пептидной группе белков, в случае использования доз облучения 453, 3020, 6040 Дж/м² пропадают пики, что может быть обусловлено реакциями образования/разрыва пептидной связи. На наличие карбонильных групп и валентных колебаний N–H связи в NH₃⁺-группе указывает присутствие полосы 2879–2875 см⁻¹ во всем диапазоне доз. При облучении дозами 151–6040 Дж/м² наблюдается смещение полос 3287–3257 и 3359–

3352 см⁻¹ в сторону уменьшения волновых чисел, данные полосы вызваны антисимметричными валентными колебаниями N–H группы, что свидетельствует об образовании водородной связи фермента с носителем. При использовании доз 1510, 3020 и 4530 Дж/м² появляются новые пики 3195, 3194 и 3199 см⁻¹, обусловленные валентными колебаниями NH₃⁺-групп в аминокислотах (рис. 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ ИК-спектров бромелина, иммобилизованного на матрице среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов, до и после УФ-облучения образцов в дозах 151–6040 Дж/м², показывает, что изменения в области характеристических полос (амид I, амид II, амид III) незначительны, поэтому можно предположить, что матрица хитозана стабилизирует структуру молекулы фермента и может выступать в качестве фотомодулятора для иммобилизованного на ней бромелина.

Наши экспериментальные данные подтверждают, что ферментативная активность свободного бромелина подвержена изменению в большей сте-

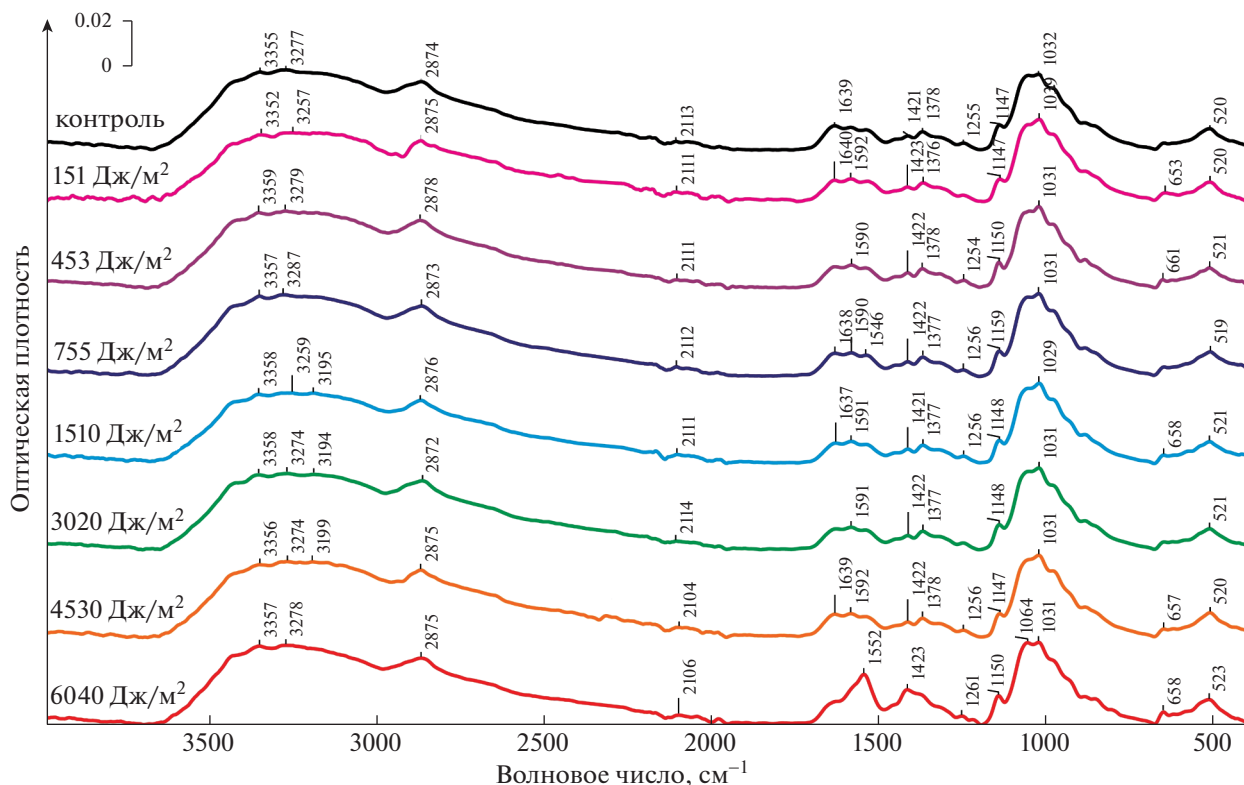


Рис. 6. ИК-спектры бромелина, иммобилизованного на матрице средномолекулярного хитозана, до и после УФ-облучения в диапазоне доз 151–6040 Дж/м².

Fig. 6. IR spectra of bromelain immobilized on a matrix of medium molecular weight chitosan, before and after UV irradiation in the dose range 151–6040 J/m².

пени, чем в иммобилизованном состоянии. Анализ модели адсорбционной иммобилизации фермента показал, что связи и взаимодействия, которые могут образовываться между энзимом и матрицей хитозана, увеличивают устойчивость ферментного комплекса к действию УФ-лучей; нами показано, что при иммобилизации гетерогенного биокатализатора его каталитическая активность сохраняется до ~90% во всем диапазоне используемых доз.

Результаты проведенного исследования могут быть использованы в медицине при комплексном применении бромелина, хитозана и УФ-излучения для ускорения заживления раневой поверхности и защите от патогенных микроорганизмов, а также при подборе условий стерилизации УФ-светом лекарственных препаратов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальные исследования были проведены с использованием научно-технической базы ЦКПНО ВГУ.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских уче-

ных — докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Рощупкин Д.И., Артюхов В.Г.* Основы фотобиофизики: Учебное пособие. Воронеж: ВГУ, 1997. 116 с. [*Roshchupkin D.I., Artyuhov V.G.* Osnovy fotobiofiziki: ucheb. posobie. Voronezh: VGU, 1997. 116 p. (In Russian)]
2. *Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Наквасина М.А. и др.* Биофизика. М.: Академический Проект, 2009. 294 с. [*Artyuhov V.G., Kovaleva T.A., Nakvasina M.A. et al.* Biofizika. M.: Akademicheskij Proekt, 2009. 294 p. (In Russian)]
3. *Фрайкин Г.Я.* Актуальные направления фотобиологических исследований // Альманах мировой науки. 2018. № 3 (23). С. 36–39. [*Frajkin G. Ya.* Aktual'nye napravleniya fotobiologicheskikh issledovanij // Al'manah mirovoj nauki. 2018. № 3 (23). P. 36–39. (In Russian)]
4. *Ahmad S.* Ultraviolet light in human health, diseases and environment // *Adv. Experim. Med. Bio.* 2017. V. 996. P. 365. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5>

5. Gurumallesh P., Alagu K., Ramakrishnan B., Muthusamy S. A systematic reconsideration on proteases // *Inte. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 128. P. 254–267. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>
6. Kumari A., Kaur B., Srivastava R., Sangwan R.S. Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties // *Biochem. Biophys. Rep.* 2015. V. 2. P. 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.05.009>
7. Ramachandran R., Noorbakhsh F., Defea K., Hollenberg M.D. Targeting proteinase-activated receptors: Therapeutic potential and challenges // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012. V. 11. P. 69–86. <https://doi.org/10.1038/nrd3615>
8. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. V. 62. P. 597–635. <https://doi.org/publication/uuid/E58ABF6D-8C97-4209-810D-A452EE30B2CD>.
9. Yadav R.P., Patel A.K., Jagannadham M.V. Purification and biochemical characterization of a chymotrypsin-like serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn // *Process Biochem.* 2011. V. 46. P. 1654–1662. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.05.013>
10. Badgujar S.B., Mahajan R.T., Proteolytic enzymes of some laticiferous plants belonging to Khandesh region of Maharashtra, India // *J. Pharm. Res.* 2009. V. 2. № 9. P. 1434–1437. Available at: <http://jpronline.info/article/view/562/482>.
11. Antão C.M., Malcata F.X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features // *Plant Physiol. Biochem.* 2005. V. 43. P. 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.05.001>
12. Arshad Z.I.M., Amid A., Yusof F. et al. Bromelain: An overview of industrial application and purification strategies // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. P. 7283–7297. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y>
13. Novaes L.C. et al. Stability, purification, and applications of bromelain: a review // *Biotechnol. Progress.* 2016. V. 32. № 1. P. 5–13. <https://doi.org/10.1002/btpr.2190>
14. Sarkar S., Ahmed M., Mozumder N.H.M.R., Saeid A. Isolation and characterization of bromelain enzyme from pineapple and its utilization as anti-browning agent // *Process Engineer. J.* 2017. V. 1. P. 52–58. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/321034752>
15. Friesen A., Schilling A., Hofstetter A., Adam D. Tetracyclin-Konzentration im Prostata-Sekret // *Z. Antimikrob. Antineoplast. Chirurgie.* 1987. V. 2. P. 61–65.
16. Maurer H. R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use CMLS // *Cell. Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. P. 1234–1245. <https://doi.org/10.1007/PL00000936>
17. Jutamongkon R., Charoenrein S. Effect of Temperature on the Stability of Fruit Bromelain from Smooth Cayenne Pineapple // *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 2010. V. 44. № 5. P. 943–948.
18. Nathania D.S., Bratadiredja M.A. Review: isolasi dan uji stabilitas enzim bromelin dari nanas (*Ananas comosus* L.) // *Источники!* 2018. V. 16. № 1. P. 374–379. <https://doi.org/10.24198/jf.v16i1.17508.g8663>
19. Березин И.В. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. Кн. 7: Иммуобилизованные ферменты. М.: Высшая школа, 1987. 159 с. [Berezin I.V. Biotekhnologiya: Ucheb. Posobie dlya vuzov. V 8 kn. / Pod red. N.S. Egorova, V.D. Samuilova. Kn. 7: Immobilizovannye fermenty. M.: Vyssh. Shkola, 1987. 159 p. (In Russian)]
20. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. М.: Изд. центр “Академия”, 2003. 208 с. [Egorova T.A., Klunova S.M., Zhivuhina E.A. Osnovy biotekhnologii. M.: Izdat. centr “Akademiya”, 2003. 208 p. (In Russian)]
21. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Физико-химические и кинетические свойства гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана // *Биофарм. журн.* 2015. № 2. С. 13–16. [Loginova O.O., Holiavka M.G., Artyuhov V.G. Fiziko-himicheskie i kineticheskie svoystva geterogennogo biokatalizatora na osnove tripsina, immobilizovannogo na matrice hitozana // *Biofarmaceuticheski zhurnal.* 2015. № 2. P. 13–16. (In Russian)]
22. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. Разработка методики получения гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана // *Фунд. исслед.* 2013. № 11 (3). С. 484–487. [Loginova O.O., Holiavka M.G., Artyuhov V.G., Belenova A.S. Razrabotka metodiki polucheniya geterogennogo biokatalizatora na osnove tripsina, immobilizovannogo na matrice hitozana // *Fundamental'nye issledovaniya.* 2013. № 11 (3). P. 484–487. (In Russian)]
23. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. Подбор методики количественного определения трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана, и его каталитической активности // *Вестн. ВГУ. Сер.: “Химия. Биология. Фармация”*. 2013. № 2. С. 116–119. [Loginova O.O., Holiavka M.G., Artyuhov V.G., Belenova A.S. Podbor metodiki kolichestvennogo opredeleniya tripsina, immobilizovannogo na matrice hitozana, i ego kataliticheskoj aktivnosti // *Vestnik VGU. Seriya: “Himiya. Biologiya. Farmaciya”*. 2013. № 2. P. 116–119. (In Russian)]
24. Folin O., Ciocalteau V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins // *J. Biol. Chem.* 1929. V. 73. P. 627–650.

Chitosan Matrix as a Photomodulator for Bromelain

S. M. Pankova^{a, b}, M. G. Holyavka^{a, c, #}, M. S. Kondrat'ev^d, Yu. M. Vyshkvorkina^e,
A. N. Lukin^a, and V. G. Artyukhov^a

^a *Voronezh State University, Voronezh, Russia*

^b *Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia*

^c *Sevastopol State University, Sevastopol, Russia*

^d *Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

^e *Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia*

[#] *E-mail: holyavka@rambler.ru*

It was shown that when exposed to UV radiation the activity of free bromelain (EC 3.4.22.4) increases by 86% at a dose of 151 J/m². The decrease in catalytic capacity by 15% is recorded when a dose of 6040 J/m² is used. The change in the size (radius) of the enzyme molecule was not established in the dose range 151–6040 J/m². After the adsorption of bromelain on the matrix of high molecular weight (350 kDa) chitosan, the activity of the enzyme irradiated in the entire range of doses used by us remained within 97%, after immobilization on medium molecular weight (200 kDa) chitosan – up to 89%. In the analysis of the infrared spectra of the immobilized bromelain it was revealed that the characteristic bands of amide I, amide II, amide III, no significant changes, consequently, it can be assumed that the chitosan matrix will act as photomodulator for the enzyme adsorbed thereon.

Keywords: IR spectroscopy, bromelain, chitosan, adsorption immobilization, UV irradiation