

МЕТОДЫ ЭКСТРАКЦИИ И ОЧИСТКИ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ. МИНИ-ОБЗОР

С. М. Панкова^{1,2}, М. Г. Холявка^{1,3*}, И. А. Журавлев¹, В. Г. Артюхов¹

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

² ФГБОУ ВО Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

³ ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет

Поступила в редакцию 6.05.2025 г.

Аннотация. Систематизация научных данных о протеолитической активности цистеиновых протеаз растительного происхождения, особенностях их экстракции, стабильности и функциональных характеристиках в косметических средствах позволит определить реальный потенциал названных ферментов для создания эффективных средств ухода за кожей. Растительные протеазы сводят к минимуму риск раздражения, они подходят для разных типов кожи: чувствительной, сухой, жирной, проблемной или комбинированной, а также для людей с кожей, склонной к акне, розацеа или воспалительным заболеваниям. В настоящем обзоре представлен анализ методов экстракции цистеиновых протеаз растительного происхождения: бромелина, фицина и папаина. Приведен сравнительный обзор традиционных и современных подходов к экстракции данных ферментов, подробно рассмотрены химические характеристики и функциональные свойства каждого из них, определены факторы, оказывающие влияние на эффективность выделения и сохранения активности. Рассмотрены классические методы, такие как осаждение сульфатом аммония и органическими растворителями, а также современные методы, основанные на применении водно-двухфазных систем, мембранный фильтрации и аффинной хроматографии. Отмечено, что правильное управление значениями pH, температурой и временем воздействия играет решающую роль в поддержании функциональной активности ферментов. Кроме того, выделены преимущества и недостатки каждой технологии экстракции, предложены пути повышения эффективности процессов очистки и минимизации потерь ферментативной активности. Показано, что использование комбинации нескольких методов позволяет достигать наилучших результатов в плане чистоты и функциональной активности ферментов. Исследования подтверждают важность изучения физических и химических свойств используемых ферментов для выбора оптимального способа экстракции. Подчеркнута значимость принципа рационального природопользования, согласно которому возможно вовлечение вторичных ресурсов (таких как кожура и семена растений) в производственные циклы, что делает возможным экономичное и экологичное производство ценных биологически активных препаратов. Выдвинуто предположение, что дальнейшая оптимизация методов стабилизации цистеиновых протеаз, а также разработка новых технологий их доставки (например, липосомальных или полимерных систем), вероятно, откроет перспективы для расширения спектра применения ферментативных эксфолиантов в дерматологической практике.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, бромелин, фицин, папаин, способы экстракции.

Протеазы играют ключевую роль в регуляции различных биологических процессов у растений, включая распознавание патогенов, а также запуск эффективных механизмов защиты от них. Помимо этого, данные ферменты способны активировать протеазоактивируемые рецепторы, что добавляет энзимам фармакологические и токсикологические свойства. Известно более 110 типов латексов разных семейств растений, содержащих хотя бы один протеолитический фермент, который чаще

всего относится к семействам цистеиновых и сериновых эндопептидаз [1].

У растений протеолитические ферменты вовлечены практически во все аспекты роста и развития — от прорастания семян до циркадных ритмов, старения клеток и программируемой клеточной гибели. Важную роль играют протеолитические ферменты и в организмах животных, где они необходимы для пищеварения, иммунной системы и передачи сигналов. Латекс является важным источником растительных протеаз и имеет множество способов применения в традиционной медицине и промышленности [2,3].

* Панкова С. М., Холявка М. Г., Журавлев И. А., Артюхов В. Г., 2025

Семейство цистеиновых протеаз включает шесть основных групп, большинство из которых относится к группе папаинов (семейство C1). Папаин (КФ 3.4.22.2) представляет собой активный компонент латекса тропического фрукта папайи (*Carica papaya*), обладающий протеолитической активностью. Будучи наиболее изученным представителем семейства цистеиновых протеаз, папаин проявляет эндопептидазную, амидазную и эстеразную активности. Фермент синтезируется в виде неактивного предшественника [4,5] и локализуется внутри латексной системы растения [6]. Традиционно латекс *Carica papaya* применяется для лечения бородавок, мозолей, корни используются против геморроя и сифилиса, листья помогают при болях, плоды применяются для инфицированных ран и злокачественных опухолей [7]. С начала XIX века коренное население тропиков использовало экстракты папайи для борьбы с паразитическими инфекциями и желудочно-кишечными нематодами, такими как аскариды, цепни, анкилостомы и острицы [8]. Кроме того, мази, содержащие папаин, применяются для очищения хронических ран и ожогов путем удаления некротизированных тканей [9,10].

Фицин (КФ 3.4.22.3) — основной протеолитический фермент, обнаруженный в латексе деревьев рода *Ficus*. По субстратной специфичности фицин сходен с папаином, его аминокислотная последовательность вокруг активного центра почти идентична с данным энзимом. Экстракты латекса фибрового дерева используют в серологии для выявления антигенов [11]. Практически все части растения *Ficus*, содержащие латекс, широко применяют в индийской народной медицине для лечения множества заболеваний, включая язвы, нарушения секреции желчи, псориаз, анемию, геморрой, желтуху, кровотечения из носа и рта, болезни крови, антидиарейные средства, слабительные и рвотные препараты [12]. Фицин привлекал внимание благодаря способности переваривать желудочно-кишечных паразитов, однако, широкого медицинского применения в лечении инфекций гельминтов не получил [6]. Фермент эффективен против биопленок бактерий *Staphylococcus aureus* [13] и *Staphylococcus epidermidis* [14], против патогенных микроорганизмов полости рта, а также участвует в процессах заживления ран [15].

Бромелин (КФ 3.4.22.4) — эндопептидаза, выделенная из ананаса (*Ananas comosus*). Она рекомендуется для обработки ожоговых ран и входит в состав препарата NexoBrid® (продаваемого в США под названием Debrase) [16–18]. Благодаря низкой

токсичности бромелин эффективно используется для профилактики и лечения хронических воспалительных заболеваний. Обладает иммуномодулирующими свойствами и ускоряет восстановление тканей путем деполимеризации межклеточных структур и изменения сосудистой проницаемости [19,20]. Бромелин применяется в косметологии для лечения акне [21,22] и обладает антибиоплёночными свойствами [23]. Подобно папаину и фицину, бромелин является мономерным белком, состоящим из одной полипептидной цепи [24].

Важно отметить, что современные тенденции в фармации и косметологии направлены на поиск не только эффективных, но также доступных и дешевых источников активных ингредиентов. В этом контексте побочные продукты сельскохозяйственного производства, такие как кожура ананаса, незрелые плоды инжира и папайи, представляют собой ценный ресурс для получения высокоактивных ферментных комплексов. Их использование способствует реализации принципов циркулярной экономики и снижению нагрузки на окружающую среду.

Систематизация научных данных о протеолитической активности бромелина, фицина и папаина, особенностях их экстракции, стабильности и функциональных характеристиках в косметических средствах позволит определить их реальный потенциал для создания эффективных продуктов для ухода за кожей, поскольку они сводят к минимуму риск раздражения, подходят для разных типов кожи: чувствительной, сухой, жирной, проблемной или комбинированной, а также для людей с кожей, склонной к акне, розацеа или воспалительным заболеваниям [25–27].

Дальнейшая оптимизация методов стабилизации ферментов, а также разработка новых технологий их доставки (например, липосомальных или полимерных систем), вероятно, откроет перспективы для расширения спектра применения ферментативных эксфолиантов в дерматологической практике.

Целью настоящего мини-обзора является сравнительный анализ способов экстракции бромелина, фицина и папаина из побочных продуктов переработки фруктов.

МЕТОДЫ ЭКСТРАКЦИИ И ОЧИСТКИ БРОМЕЛИНА

Бромелин (КФ 3.4.22.32) представляет собой комплекс протеолитических ферментов, получаемых из различных частей растения *Ananas comosus* (ананас). Несмотря на традиционное использова-

ние стебля в качестве основного источника энзима, современные исследования показывают высокую ферментативную активность и в других органах растения, включая кожуру, сердцевину и корону, что открывает возможности для более экономически выгодного производства фермента. Включение других частей растения *Ananas comosus* в процесс экстракции бромелина соответствует принципам циркулярной экономики и способствует снижению количества отходов пищевой промышленности [28, 29].

Экстракция и очистка бромелина включают множество методов, которые направлены на выделение энзима с сохраненной ферментативной активностью и высокой чистотой. Традиционные методы часто включают гомогенизацию и измельчение растительного материала с последующей ультрафильтрацией и центрифугированием для создания сырого экстракта и определения концентрации бромелина. Например, осаждение сульфатом аммония или этанолом позволяет отделить фракцию фермента, а затем следует диализ для удаления солей, и лиофилизация с целью получения стабильного порошка [30, 31]. Процесс получения бромелина включает несколько стадий: механическую обработку растительного сырья, выделение экстракта фермента, его концентрирование и очистку.

С целью повышения эффективности очистки, устойчивости фермента, выхода экстракции и чистоты экстрактов применяют водные двухфазные системы, которые используют две несмешивающиеся водные фазы для разделения бромелина [31, 32]. Популярность приобретают экологически чистые методы, такие как мембранные фильтрации [31-36].

Применение мембранных технологий (ультрафильтрация), водно-двухфазных систем и аффинной хроматографии позволяет получать фермент с высокой степенью чистоты и сохранением высокой биологической активности. Важно отметить, что условия экстракции (температура, pH среды, скорость обработки) критически влияют на выход и активность бромелина, что требует тщательной оптимизации технологических параметров.

МЕТОДЫ ЭКСТРАКЦИИ И ОЧИСТКИ ФИЦИНА

Фицин (КФ 3.4.22.3) представляет собой протеолитический фермент растительного происхождения, выделяемый из латекса различных видов рода *Ficus*, в первую очередь *Ficus carica* (инжир). Биологическая функция латекса заключается в защите растения от фитопатогенов, что обуславливает наличие высокоактивных ферментных ком-

плексов. Фицин, являясь цистеиновой протеазой, отличается высоким сродством к белковым субстратам, содержащим основные аминокислоты в позициях, подверженных гидролизу. При этом источником фермента могут служить не только латекс, но и побочные продукты переработки плодов, такие как кожура и незрелые плоды, что позволяет оптимизировать процесс получения фермента в рамках принципов устойчивого производства [37-39].

Эффективная экстракция фицина требует быстрой стабилизации ферментного комплекса сразу после сбора латекса для предотвращения его инактивации. Применение методов трёхфазного разделения и водно-двухфазных систем обеспечивает высокую степень очистки при сохранении ферментативной активности. Получение и очистка фицина обычно начинаются со сбора латекса, включающего сложную смесь энзима и других метаболитов [40], который обычно собирают из незрелых зеленых плодов или через надрезы на растении [41, 42]. Метод выделения и очистки фицина включает различные этапы, подобные этапам получения бромелина, в том числе предварительную обработку (очистку, шелушение), разрушение клеток и удаление детрита, фильтрацию. Обычная экстракция фицина начинается со сбора латекса, как уже упоминалось, а затем латекс разбавляют в буферном растворе, чтобы предотвратить инактивацию ферментов. Механическая гомогенизация, обработка ультразвуком или экстракция с помощью других ферментов могут использоваться для повышения выхода и сохранения ферментативной активности. Сырой экстракт подвергается ультрафильтрации и центрифугированию для удаления нерастворимого детрита и определения концентрации фицина. С помощью методов осаждения с использованием сульфата аммония и бутанола отделяют фицин от других белков, а затем проводится диализ для удаления солей и лиофилизация для получения стабильного порошка [41, 43-45].

Ключевыми параметрами успешной экстракции являются оптимальный pH раствора (около 6,5–7,0) и температурный режим, предотвращающий денатурацию фермента. Фицин имеет молекулярную массу в диапазоне 23–27 кДа и характеризуется наличием каталитической диады, включающей остатки цистеина и гистидина. Его активность проявляется в оптимальных условиях при pH 6,5–7,0 и температуре около 60 °C [37, 46, 47].

Особенностью фицина является относительно высокая термостабильность среди растительных протеаз, что позволяет использовать его в

составе косметических средств, подвергающихся термическому воздействию в процессе производства. Анализ литературных данных позволяет предположить, что перспективным направлением является микрокапсулирование фицина с целью пролонгированного высвобождения и повышения стабильности в готовых формулках [48, 49].

МЕТОДЫ ЭКСТРАКЦИИ И ОЧИСТКИ ПАПАИНА

Папаин (КФ 3.4.22.2) — это высокоспецифичный протеолитический фермент, относящийся к цистеиновым эндопептидазам, получаемый из плодов *Carica papaya*. Фермент распространен в различных частях растения папайи, таких как латекс [50], фрукты, кожура, семена и листья, также его концентрация сильно различается в экстрактах спелых и незрелых плодов [51]. Биологическая роль папаина в растении связана с защитой от микроорганизмов и насекомых, что объясняет его высокую каталитическую активность.

Традиционным источником фермента является латекс незрелых плодов, однако, в последние годы отмечается интерес к экстракции папаина из альтернативных частей растения, включая кожуру и семена, что позволяет повысить устойчивость производственных процессов. После сбора латекс разбавляют в буферном растворе, чтобы предотвратить инактивацию фермента, затем его обрабатывают путем сушки, за которой следует гомогенизация (в буферном растворе), обработка ультразвуком для высвобождения папаина и повышения выхода продукта [40]. Полученные неочищенные экстракты часто требуют дальнейшего этапа очистки ультрафильтрацией и центрифугированием для удаления ненужных остатков. Позже проводится диализ для выделения солей и лиофилизация для получения стабильного порошка папаина [40,42].

Оптимизация процесса получения папаина предполагает использование мягких условий экстракции с контролем значений температуры и pH среды, что минимизирует инактивацию фермента. В качестве методов очистки широко применяются водно-двухфазные системы, аффинная хроматография и трёхфазное разделение, позволяющие достичь высокой степени очистки при сохранении каталитической активности. Иммобилизация папаина на полимерных носителях и использование методов микрокапсулирования рассматриваются как перспективные подходы для повышения стабильности фермента в косметических формулках [31,53].

На основании анализа литературных данных можно заключить, что дальнейшее совершенствование технологий стабилизации папаина позволит значительно расширить спектр его применения в дерматокосметологии [54-60].

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АЛГОРИТМОВ ЭКСТРАКЦИИ И ОЧИСТКИ БРОМЕЛИНА, ФИЦИНА, ПАПАИНА

Схематическое изображение алгоритмов экстракции и очистки бромеллина, фицина, папаина, а также их детальное сравнение приведены ниже (рис. 1). В таблице представлены три основных метода экстракции протеолитических ферментов: с использованием сульфата аммония, этанола или ацетона; с использованием сульфата аммония, этанола/бутанола; с использованием этанола и сульфата аммония. Данные подходы необходимы для дополнительной очистки, удаления липидов и других примесей, что повышает чистоту конечного продукта. Бромелин экстрагируют из частей растения *Ananas comosus* — для этого используются методы, такие как хроматография и ультрафильтрация. Фицин и папаин также выделяют при помощи в основном хроматографии и ультрафильтрации. В некоторых случаях, для экстракции фицина применяются специфические лиганда, которые позволяют достичь высокой степени очистки. Иногда используется микроволновая экстракция, которая позволяет сократить время процесса очистки. Ультразвуковая экстракция применяется для разрушения клеточных стенок растений и позволяет повысить выход продукта. Электроэкстракция фицина и папаина способствует достижению их более высокой степени очистки.

Таким образом, нами проведен подробный анализ современных методов экстракции и очистки цистеиновых протеаз растительного происхождения — бромеллина, фицина и папаина. Установлено, что успешность каждого подхода определяется особенностями химического состава исходного сырья, требованиями к качеству конечного продукта и условиями технологического процесса.

В данном обзоре продемонстрировано разнообразие стратегий экстракции, включая традиционные методы осаждения солями и органическими растворителями, современные подходы с применением водно-двухфазных систем и мембранный фильтрации, а также передовые технологии типа аффинной хроматографии и микрокапсулирования. Показано, что ключевыми факторами, определяющими успех процесса, являются строгий контроль факторов среды (pH, температура) и подбор соответствующих методов очистки, гарантирующих максимальное сохранение каталитической активности ферментов.

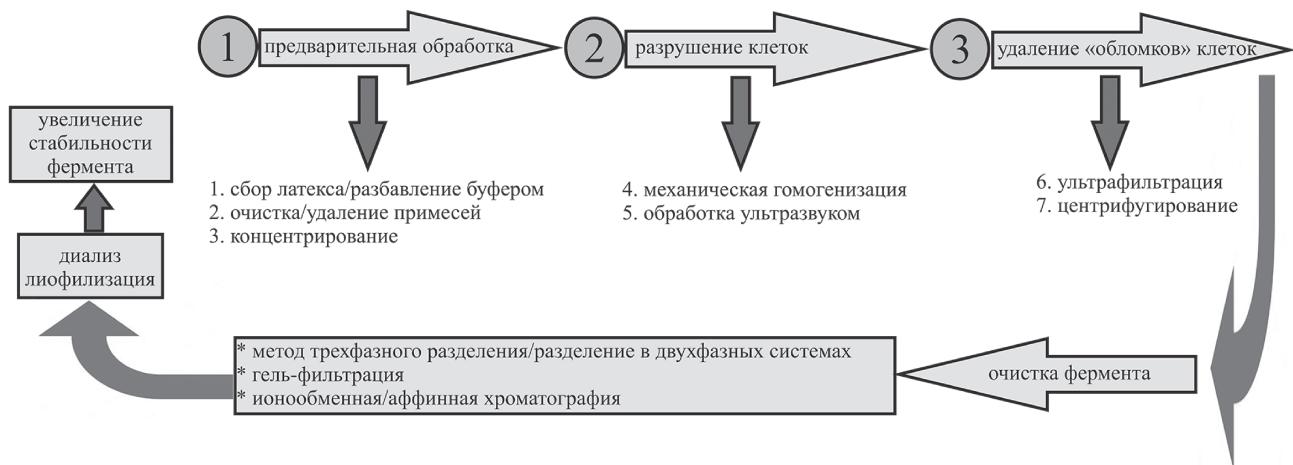


Рис. 1. Схематическое изображение алгоритмов экстракции и очистки бромелина, фицина, папаина

Таблица 1

Детальное сравнение профилей экстракции и очистки бромелина, фицина и папаина [31, 32, 40, 41, 53, 61-67]

Протеолитические ферменты		
Бромелин	Фицин	Папаин
Осаждение с использованием сульфата аммония, этанола или ацетона	Осаждение с использованием сульфата аммония, этанола/бутанола	Осаждение с использованием этанола и сульфата аммония
Разделение в двухфазных системах	Разделение в двухфазных системах	Разделение в двухфазных системах
-	Метод трехфазного разделения	Метод трехфазного разделения
Ультрафильтрация	Ультрафильтрация	-
-	Метод сверхкритической флюидной экстракции	Метод сверхкритической флюидной экстракции
Хроматография, включая ионный обмен, гель-фильтрацию и высокоскоростную противоточную хроматографию	Хроматография, включая ионный обмен с сепарозой, аффинную хроматографию и гель-фильтрацию	Хроматография, включая ионный обмен, аффинную хроматографию и гель-фильтрацию
Микроволновая экстракция и ультразвуковая экстракция	Микроволновая экстракция и ультразвуковая экстракция	Микроволновая экстракция и ультразвуковая экстракция
-	Электроэкстракция	Электроэкстракция

Выделение и стабилизация цистeinовых протеаз имеют важное практическое значение для многих отраслей промышленности, таких как медицина, пищевая промышленность и косметология. Дальнейшие исследования и внедрение усовершенствованных технологий позволят минимизировать потери активности, увеличить выход целевого продукта и сделать производство данных ферментов экономически эффективным и экологически безопасным процессом.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Domsalla A. Occurrence and properties of proteases in plant latices / A. Domsalla, M. F. Melzig //

Planta Medica. – 2008. – Vol. 74. – № 7. – P. 699–711.

2. Golovkin B. N. Latex and proteolytic enzymes in plants / B. N. Golovkin // Byulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada. – 2006. – Vol. 191. – P. 157–160.

3. Radauer C. Evolutionary biology of plant food allergens / C. Radauer, H. Breiteneder // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2007. – Vol. 120. – №3. – P. 518–525.

4. Cohen L. W. Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA / L. W. Cohen, V. M. Coghlan, L. C. Dihel // Gene. – 1986. – Vol. 48. – № 2-3. – P. 219–227.

5. Vernet T. Secretion of functional Papain precursor from insect cells. Requirement for N-glycosylation of the pro-region / T. Vernet, D. C. Tessier, C. Richardson, F. Laliberté, H. E. Khouri, A. W. Bell, A. C. Storer, D. Y. Thomas // Journal of Biological Chemistry. – 1990. – Vol. 265. – № 27. – P. 16661–16666.

6. Barrett A.J. Handbook of Proteolytic Enzymes / A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner // Academic Press. – New York, 1998.
7. Starley I. F. The treatment of paediatric burns using topical papaya / I. F. Starley, P. Mohammed, G. Schneider, S.W. Bickler // Burns. – 1999. – Vol. 25. – № 7. – P. 636–639.
8. Berger J. Anthelmintic activity of crystalline Papain / J. Berger, C. F. Asenjo // Science. – 1940. – Vol. 91. – Article No 2364. – P. 387–388.
9. Yaakobi T. Wound debridement by continuous streaming of proteolytic enzyme solution: Effects on experimental chronic wound model in porcine / T. Yaakobi, N. Cohen-Hadar, H. Yaron, E. Hirszowicz, Y. Simantov, A. Bass, A. Freeman // Wounds – A Compendium of Clinical Research and Practice. – 2007. – Vol. 19. – № 7. – P. 192–200.
10. Baidamshina D. R. Biochemical Properties and Anti-Biofilm Activity of Chitosan-Immobilized Papain / D. R. Baidamshina, V. A. Koroleva, S. S. Olshannikova, E. Y. Trizna, M. I. Bogachev, V. G. Artyukhov, M. G. Holyavka, A.R. Kayumov // Marine Drugs. – 2021. – Vol. 19. – № 197.
11. Buttle D. J. Affinity chromatography of cysteine peptidases / D. J. Buttle // Methods in Enzymology. – 1994. – Vol. 244. – P. 639–648.
12. Chetia D. Extraction, purification and physicochemical properties of a proteolytic enzyme from the latex of *Ficus hispida* Linn. / D. Chetia, L. K. Nath, S. K. Dutta // Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1999. – Vol. 61. – № 1. – P. 29–33.
13. Baidamshina D. R. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease / D. R. Baidamshina, E. Y. Trizna, M. G. Holyavka, M. I. Bogachev, V. G. Artyukhov, F. S. Akhatova, E. V. Rozhina, R. F. Fakhrullin, A. R. Kayumov // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – Article No 46068.
14. Baidamshina D. R. The effect of ficin immobilized on carboxymethyl chitosan on biofilms of oral pathogens / D. R. Baidamshina, E. Y. Trizna, S. S. Goncharova, A. V. Sorokin, M. S. Lavlinskaya, A. P. Melnik, L. F. Gafarova, M. A. Kharitonova, O. V. Ostolopovskaya, V. G. Artyukhov, E. A. Sokolova, M. G. Holyavka, M. I. Bogachev, A. R. Kayumov, P. V. Zelenikhin // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – Article No 16090.
15. Baidamshina D. R. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin / D.R. Baidamshina, V. A. Koroleva, E. Y. Trizna, S. M. Pankova, M. N. Agafonova, M. N. Chirkova, O. S. Vasileva, N. Akhmetov, V. V. Shubina, A. G. Porfiryev // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 164. – P. 4205–4217.
16. Rosenberg L. A novel rapid and selective enzymatic debridement agent for burn wound management: a multi-center RCT / L. Rosenberg, Y. Krieger, A. Bogdanov-Berezovski, E. Silberstein, Y. Shoham, A. J. Singer // Burns. – 2014. – Vol. 40. – № 3. – P. 466–474.
17. Rowan A. D. Stem Bromelain. Handbook of Proteolytic Enzymes / A. D. Rowan // Academic Press. – 2013. – Vol. 2. – P. 1871–1873.
18. Sharaf A. Microbial profile of burn wounds managed with enzymatic debridement using bromelain-based agent, NexoBrid / A. Sharaf, P. Muthayya // Burns. – 2021. – Vol. 48. – № 7. – P. 1618–1625.
19. Feijoo-Siota L. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications / L. Feijoo-Siota, T. G. Villa // Food and Bioprocess Technology. – 2011. – Vol. 4. – P. 1066–1088.
20. Alpay P. Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins /P. Alpay, D. A. Uygun // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2015. – Vol. 111. – P. 56–63.
21. Abbas S. Applications of bromelain from pineapple waste towards acne / S. Abbas, T. Shanbhag, A. Kothare // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2020. – Vol. 28. – P. 1001–1009.
22. Sampietro J. M. de Luis Experience with NexoBrid® in enzymatic debridement of facial burns / J. M. Sampietro de Luis // Burns. – 2018. – Vol. 44. – P. 1013–1014.
23. Holyavka M.G. Novel Biocatalysts Based on Bromelain Immobilized on Functionalized Chitosans and Research on Their Structural Features / M. G. Holyavka, S. S. Goncharova, A. V. Sorokin, M. S. Lavlinskaya, Y. A. Redko, D. A. Faizullin, D. R. Baidamshina, Y. F. Zuev, M. S. Kondratyev, A. R. Kayumov // Polymers. – 2022. – Vol. 14. – № 5110.
24. Holyavka M. Influence of UV radiation on molecular structure and catalytic activity of free and immobilized bromelain, ficin and papain / M. Holyavka, S. Pankova, V. Koroleva, Y. Vyshkovskina, A. Lukin, M. Kondratyev, V. Artyukhov // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2019. – Vol. 201. – Article No 111681.
25. Королева В.А. Разработка методики получения комплексов фицина с наночастицами хитозана с высоким уровнем протеолитической активности / В.А. Королева, М.Г. Холявка, С.С. Ольшанникова, В.Г. Артиухов // Биофармацевтический журнал. – 2018. – Т. 10. – № 4. – С. 36-40. // Королева В.А. Razrabotka metodiki poluchenija

- ya kompleksov ficina s nanochasticami hitozana s vysokim urovнем proteoliticheskoy aktivnosti / V.A. Koroleva, M.G. Holyavka, S.S. Ol'shannikova, V.G. Artyuhov // Biofarmacevticheskij zhurnal. – 2018. – T. 10. – № 4. – S. 36-40.
26. Sołdacka D. Evaluation of safety and efficacy of chemical peels with and without sonophoresis on selected skin parameters—a prospective comparative study / D. Sołdacka, W. Barańska-Rybak // Cosmetics. – 2024. – Vol. 11. – № 185.
27. Kuo C. H. Enzymes in biomedical, cosmetic and food application / C. H. Kuo, H.M.D. Wang, C. J. Shieh // Catalysts. – 2024. – Vol. 14. – № 162.
28. Varilla C. Bromelain, a group of pineapple proteolytic complex enzymes (*Ananas comosus*) and their possible therapeutic and clinical effects. A summary / C. Varilla, M. Marcone, L. Paiva, J. Baptista // Foods. – 2021. – Vol. 10. – Article No 2249.
29. Morea D. Circular economy and corporate social responsibility: towards an integrated strategic approach in the multinational cosmetics industry / D. Morea, S. Fortunati, L. Martiniello // J. Clean. Prod. – 2021. – Vol. 315. – P. 128232.
30. Masbagusdanta K. Partial purification and evaluation of bromelain from pineapple stem (*Ananas comosus*) in cream based preparation and it's in vitro anti-inflammatory activity / K. Masbagusdanta, S. Setiasih, S. Handayani, S. Hudiyono // AIP Conf. Proc. – 2020. – Vol. 2243. – P. 030012.
31. Arshad Z. I. M. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies / Z. I. M. Arshad, A. Amid, F. Yusof, I. Jaswir, K. Ahmad, S.P. Loke // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol. 98. – P. 7283–7297.
32. Chakraborty A. J. Bromelain a potential bioactive compound: a comprehensive overview from a pharmacological perspective / A. J. Chakraborty, S. Mitra, T. E. Tallei, A. M. Tareq, F. Nainu, D. Ciccia, K. Dhama, T. B. Emran, J. Simal-Gandara, R. Capasso // Life. – 2021. – Vol. 11. – P. 317.
33. Campos D.A. Optimization of bromelain isolation from pineapple byproducts by polysaccharide complex formation / D. A. Campos, E. R. Coscueta, N. W. Valetti, L. M. Pastrana-Castro, J. A. Teixeira, G. A. Picó, M. M. Pintado // Food Hydrocoll. – 2019. – Vol. 87. – P. 792–804.
34. Ataide J. A. Freeze-dried chitosan nanoparticles to stabilize and deliver bromelain / J. A. Ataide, D. C. Geraldes, E. F. Gérios, F. M. Bissaco, L. C. Cefali, L. Oliveira-Nascimento, P. G. Mazzola, // J. Drug Deliv. Sci. Technol. – 2021. – Vol. 61. – Article No 102225.
35. Zhou W. Purification and characterization of bromelain from pineapple (*Ananas comosus* L.) peel waste / W. Zhou, C. Ye, L. Geng, G. Chen, X. Wang, W. Chen, R. Sa, J. Zhang, X. Zhang // J. Food Sci. – 2021. – Vol. 86. – P. 385–393.
36. Hidayani W.A. Determination of the effect of EDTA and PCMB on purified bromelain activity from pineapple core and in vitro antiplatelet activity / W. A. Hidayani, S. Setiasih, Hudiyono // IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. – 2020. – Vol. 763. – Article No 012054.
37. Ayuso M. Fig "*Ficus carica* L." and its by-products: a decade evidence of their health-promoting benefits towards the development of novel food formulations / M. Ayuso, M. Carpene, O. Taofiq, T. G. Albuquerque, J. Simal-Gandara, M. B. P. P. Oliveira, M. A. Prieto, I. C. F. R. Ferreira, L. Barros // Trends Food Sci. Technol. – 2022. – Vol. 127. – P. 1–13.
38. Morellon-Sterling R. Ficin: a protease extract with relevance in biotechnology and biocatalysis / R. Morellon-Sterling, H. El-Siar, O.L. Tavano, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernández-Lafuente, // Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 162. – P. 394–404.
39. Milošević J. Isolation, identification, and stability of ficin 1c isoform from fig latex / J. Milošević, L. Vrhovac, F. Đurković, B. Janković, S. Malkov, J. Lah, N.Đ. Polović // New J. Chem. – 2020. – Vol. 44. – P. 15716–15723.
40. Babalola A. Therapeutic benefits of *Carica papaya*: a review on its pharmacological activities and characterization of papain / A. Babalola, B. Ifeolu, A. Akinwande, A.A. Otunba, G. Ebenezer Adebami, O. Babalola, C. Nwufo // Arab. J. Chem. – 2024. – Vol. 17. – Article No 105369.
41. Gagaoua M. Three-phase partitioning as an efficient method for the purification and recovery of ficin from Mediterranean fig (*Ficus carica* L.) latex / M. Gagaoua, N. Boucherba, A. Bouanane-Darenfed, F. Ziane, S. Nait-Rabah, K. Hafid, H. R. Boudechicha // Sep. Purif. Technol. – 2014. – Vol. 132. – P. 461–467.
42. Raskovic B. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. brown turkey) latex / B. Raskovic, O. Bozovic, R. Prodanovic, V. Niketic, N. Polovic, // J. Biosci. Bioeng. – 2014. – Vol. 118. – P. 622–627.
43. Colletti A. Recent advances and insights into bromelain processing, pharmacokinetics and therapeutic uses / A. Colletti, S. Li, M. Marengo, S. Adinolfi, G. Cravotto, // Appl. Sci. – 2021. – Vol. 11. – Article No 8428.
44. Homaei A. Purification, catalytic, kinetic and thermodynamic characteristics of a novel ficin

from *Ficus johannis* / A. Homaei, R. Stevanato, R. Etemadipour, R. Hemmati // Biocatal. Agric. Biotechnol. – 2017. – Vol. 10. – P. 360–366.

45. Qurashi A. A. F. Isolation, purification and partial characterization of ficin from *Ficus carica* latex / A. A. F. Qurashi, A. D. Jabbar // J. Wasit Sci. Med. – 2009. – Vol. 2. – P. 55–66.

46. Baeyens-Volant D. A novel form of ficin from *Ficus carica* latex: purification and characterization / D. Baeyens-Volant, A. Matagne, R. El Mahyaoui, R. Wattiez, M. Azarkan, // Phytochemistry. – 2015. – Vol. 117. – P. 154–167.

47. Devaraj K.B. Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica* / K. B. Devaraj, P. R. Kumar, V. Prakash // J. Agric. Food Chem. – 2008. – Vol. 56. – P. 11417–11423.

48. Nascimento N.S. Enzymes for dermatological use / N. S. Nascimento, K. M. Torres-Obreque, C. A. Oliveira, J. Rabelo, A. R. Baby, P. F. Long, A. R. Young, C. d. O. Rangel-Yagui // Exp. Dermatol. – 2024. – Vol. 33. – Article No e15008.

49. El Enshasy H.A. Fig enzymes: characterization, biological roles, and applications / H. A. El Enshasy, B. Abomoelak, R. A. Rahman, O. M. Leng, D. Sukmawati, Z. I. Rasid // In Fig (*Ficus carica*): production, processing, and properties. – Ed. Ramadan, M.F. – Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2023. – P. 523–537.

50. Manosroi A. Antioxidant and gelatinolytic activities of papain from papaya latex and bromelain from pineapple fruits / A. Manosroi, C. Chankhampan, K. Pattamapun, W. Manosroi, J. Manosroi // Chiang Mai J. Sci. – 2014. – Vol. 41. – P. 635–648.

51. Iordănescu O.A. DPPH• kinetic approach on the antioxidant activity of various parts and ripening levels of papaya (*Carica papaya* L.) ethanolic extracts / O. A. Iordănescu, M. Băla, D. Gligor, S. E. Zippenfening, M. I. Cugerean, M. I. Petroman, D. I. Hădărugă, N. G. Hădărugă, M. A. Riviş // Plants. – 2021. – Vol. 10. – Article No 1679.

52. Hafid K. One-step recovery of latex papain from *Carica papaya* using three phase partitioning and its use as milk-clotting and meat-tenderizing agent / K. Hafid, J. John, T. M. Sayah, R. Domínguez, S. Becila, M. Lamri, A. L. Dib, J. M. Lorenzo, M. Gagaoua // Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 146. – P. 798–810.

53. Di Giacomo M. Cloud point extraction based on non-ionic surfactants: an ecofriendly tool for recovering papain from papaya latex / M. Di Giacomo, F. A. Bertoni, M. V. Rocha, B. B. Nerli, F.

Rodríguez // J. Environ. Chem. Eng. – 2022. – Vol. 10. – Article No 108762.

54. Sorokin A.V. Chitosan graft copolymers with *N*-vinylimidazole as promising matrices for immobilization of bromelain, ficin, and papain / A.V. Sorokin, S.S. Olshannikova, M. S. Lavlinskaya, M. G. Holyavka, D. A. Faizullin, Y. F. Zuev, V.G. Artukhov // Polymers. – 2022. – Vol. 14. – Article No 2279.

55. Tikhonov S.L. Efficiency of microencapsulation of proteolytic enzymes / S. L. Tikhonov, N. V. Tikhonova, L. S. Kudryashov, O. A. Kudryashova, N. V. Moskovenko, I. N. Tretyakova // Catalysts. – 2021. – Vol. 11. – Article No 1270.

56. Vasconcelos N.F. Papain immobilization on heterofunctional membrane bacterial cellulose as a potential strategy for the debridement of skin wounds / N. F. Vasconcelos, A. P. Cunha, N. M. P. S. Ricardo, R. S. Freire, L. d. A. P. Vieira, A. I. S. Brígida, M. d. F. Borges, M. d. F. Rosa, R. S. Vieira, F. K. Andrade // Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 165. – P. 3065–3077.

57. Trevisol T.C. Starch- and carboxymethyl cellulose-based films as active beauty masks with papain incorporation / T. C. Trevisol, R. O. Henriques, A. J. A. Souza, K. Cesca, A. Furigo, Starch- and carboxymethyl cellulose-based films as active beauty masks with papain incorporation // Int. J. Biol. Macromol. – 2023. – Vol. 231. – Article No 123258.

58. Boonkerd S. Antisolvent crystallization of papain / S. Boonkerd, L. Wantha, // ChemEngineering. – 2024. – Vol. 8. – № 4.

59. Mesquita M. d. S. Encapsulation of Formosa papaya (*Carica papaya* L.) seed extract: physicochemical characteristics of particles, and study of stability and release of encapsulated phenolic compounds / M. d. S. Mesquita, P. D. d. F. Santos, A. T. Holkem, M. Thomazini, C. S. Favaro-Trindade // Processes. – 2023. – Vol. 11. – № 27.

60. Lima C. S. A. d. Semi-solid pharmaceutical formulations for the delivery of papain nanoparticles / C. S. A. d. Lima, J. P. R. O. Varca, K. M. Nogueira, G. N. Fazolin, L. F. d. Freitas, E. W. d. Souza, A. B. Lugão, G. H. C. Varca // Pharmaceutics. – 2020. – Vol. 12. – Article No 1170.

61. Krishna S. H. Reverse Micellar Extraction for Downstream Processing of Proteins/Enzymes / S. H. Krishna, N. D. Srinivas, K. S. M. S. Raghavarao, N. G. Karanth // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2002. – Vol. 75. – P. 119–183.

62. Ketnawa S. Aqueous Two-Phase Extraction of Bromelain from Pineapple Peels ('Phu Lae' Cultv.) and Its Biochemical Properties / S. Ketnawa, P.

Chaiwut, S. Rawdkuen // Food Sci. Biotechnol. – 2011. – Vol. 20. – P. 1219.

63. Łubek-Nguyen A. Application of Enzyme-Assisted Extraction for the Recovery of Natural Bioactive Compounds for Nutraceutical and Pharmaceutical Applications / A. Łubek-Nguyen, W. Ziemichód, M. Olech // Appl. Sci. – 2022. – Vol. 12. – P. 3232.

64. Lin Y. Enzyme and Microwave Co-Assisted Extraction, Structural Characterization and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Purple-heart Radish / Y. Lin, J. Pi, P. Jin, Y. Liu, X. Mai, P. Li, H. Fan // Food Chem. – 2022. – Vol. 372. – P. 131274.

65. Yang C. Ultrasound-Assisted Enzymatic Digestion for Efficient Extraction of Proteins from

Quinoa / C. Yang, W. Liu, X. Zhu, X. Zhang, Y. Wei, J. Huang, F. Yang, F. Yang // LWT. – 2024. – Vol. 194. – P. 115784.

66. Chen C. Influence of Different Parameters on Reverse Micelle Extraction Combined with Acetone Precipitation to Purify Sn-1,3 Extracellular Lipase from Aspergillus Niger GZUF36 / C. Chen, H. Tian, S. Xing, C. Li, X. Zeng, L. He // J. Food Sci. Technol. – 2019. – Vol. 56. – P. 2899–2908.

67. Babalola B. A. Extraction, Purification and Characterization of Papain Cysteine-Proteases from the Leaves of Carica papaya / B. A. Babalola, A. I. Akinwande, A. E. Gboyega, A. A. Otunba // Sci. Afr. – 2023. – Vol. 19. – P. e01538.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Панкова С. М., младший научный сотрудник кафедры биофизики и биотехнологии, ассистент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

Холявка Марина Геннадьевна, д.б.н., профессор медико-биологического факультета кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Физика», ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет, Orcid ID 0000-0002-1390-4119

E-mail: holyavka@rambler.ru

Журавлев Иван Андреевич – студент и лаборант-исследователь кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии; лаборант-исследователь кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета

E-mail: ivan.geranos@yandex.ru

Артюхов Валерий Григорьевич, проф., д.б.н., заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии медико-биологического факультета

Voronezh State University

Pankova S. M., Junior Researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Assistant of the Department of Normal Physiology, Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

Holyavka Marina G., DSci. (Biology), Professor of the Faculty of Medicine and Biology, Department of Biophysics and Biotechnology, Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Physics, Sevastopol State University, Orcid ID 0000-0002-1390-4119

E-mail: holyavka@rambler.ru

Zhuravlev Ivan A., Student and Laboratory Assistant of Polymer Science and Colloid Chemistry Department; Laboratory Assistant of Biophysics and Biotechnology Department of Voronezh State University;

E-mail: ivan.geranos@yandex.ru

Artyukhov Valeriy. G., DSci. (Biology), Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology

METHODS OF EXTRACTION AND PURIFICATION OF CYSTEINE PROTEASES FROM PLANT RAW MATERIALS. MINI-REVIEW

S. M. Pankova^{1,2}, M. G. Holyavka^{1,3*}, I. A. Zhuravlev¹, V. G. Artyukhov¹

¹ Voronezh State University

² N.N. Burdenko Voronezh State Medical University

³ Sevastopol State University

Abstract. Systematization of scientific data on the proteolytic activity of plant-based cysteine proteases, their extraction features, stability, and functional characteristics in cosmetics will help determine the real potential of these enzymes for creating effective skin care products. Plant proteases minimize the risk of irritation, they are suitable for different skin types: sensitive, dry, oily, problematic or combination, as well as for people with skin prone to acne, rosacea or inflammatory diseases. This review presents an analysis of the methods for extracting plant-based cysteine proteases: bromelain, ficin and papain. A comparative overview of traditional and modern approaches to the extraction of these enzymes is provided, the chemical characteristics and functional properties of each of them are considered in detail, and the factors influencing the efficiency of extraction and preservation of activity are determined. Classical methods, such as precipitation with ammonium sulfate and organic solvents, as well as modern methods based on the use of aqueous two-phase systems, membrane filtration and affinity chromatography are considered. It is noted that proper management of pH values, temperature and exposure time plays a decisive role in maintaining the functional activity of enzymes. In addition, the advantages and disadvantages of each extraction technology are highlighted, and ways to improve the efficiency of purification processes and minimize losses of enzymatic activity are proposed. It is shown that the use of a combination of several methods allows achieving the best results in terms of purity and functional activity of enzymes. The studies confirm the importance of studying the physical and chemical properties of the enzymes used to select the optimal extraction method. The importance of the principle of rational nature management is emphasized, according to which it is possible to involve secondary resources (such as plant peels and seeds) in production cycles, which makes it possible to economically and environmentally friendly produce valuable biologically active drugs. It is suggested that further optimization of cysteine protease stabilization methods, as well as the development of new technologies for their delivery (for example, liposomal or polymer systems), will likely open up prospects for expanding the range of application of enzymatic exfoliants in dermatological practice.

Keywords: proteolytic enzymes, bromelain, ficin, papain, extraction methods.