



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.723.2:577.325

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12025

### Физико-химические и кинетические свойства коллагеназы, нативной и адсорбированной на хитозане

Виктория Александровна Королева<sup>1,2</sup>, Анастасия Николаевна Дубовицкая<sup>1</sup>,  
Татьяна Николаевна Беляева<sup>1</sup>, Марина Геннадьевна Холявка<sup>1,3</sup>✉,  
Валерий Григорьевич Артюхов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, holyavka@rambler.ru✉

<sup>2</sup>Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

<sup>3</sup>Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия

**Аннотация.** Одним из актуальных направлений биотехнологии и медицины является разработка высокостабильных биопрепаратов на основе иммобилизованных ферментов. Методом сорбционной иммобилизации были получены гетерогенные биокатализаторы на основе коллагеназы (КФ 3.4.24.3) из *Clostridium histolyticum* и среднемолекулярного (200 кДа) и высокомолекулярного (350 кДа) хитозанов. Целью работы являлось изучение физико-химических и кинетических свойств свободной и иммобилизованной на матрице хитозана коллагеназы из *Clostridium histolyticum*.

Классическими биофизическими и биохимическими методами были изучены физико-химические и кинетические свойства энзима в растворимом и иммобилизованном состояниях. Показано, что у нативной коллагеназы максимальная активность наблюдается при 37°C, а у иммобилизованного на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах фермента – при 40°C. Сорбционная иммобилизация биокатализатора на матрице хитозанов способствовала повышению его стабильности при инкубации в диапазоне температур 40-70°C. После инкубации при 80 и 90 °C не были выявлены существенные различия в активности растворимой и иммобилизованной коллагеназы. При исследовании зависимости протеазной активности фермента от кислотности среды в диапазоне pH от 5.0 до 9.0 было установлено, что максимум каталитической способности растворимой коллагеназы наблюдается при значении pH, равном 7.5. Иммобилизованный на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах биокатализатор оказался высокоактивным при pH 6.0-7.5. Каталитическая способность фермента в свободном и адсорбированном состояниях заметно снизилась при pH 8.0, а при pH 9.0 растворимая и иммобилизованная на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах коллагеназа была полностью инактивирована. Максимальная скорость ферментативной реакции нативного и иммобилизованного на хитозане биокатализаторов наблюдалась при концентрации субстрата, равной 0.04 mM. Был произведен расчет кажущихся значений  $V'_{max}$  и  $K'_m$ . Иммобилизация коллагеназы на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах не привела к снижению максимальной скорости реакции и изменению степени сродства фермента к субстрату.

Используя метод динамического светорассеяния, мы подтвердили, что структура коллагеназы в растворе наиболее устойчива при pH 7.0-8.0, так как именно в данном диапазоне значений  $[H^+]$  выявлено наибольшее содержание частиц, соответствующих размеру нативной коллагеназы, и наименьшее содержание ее агрегатов. Оптимальной температурой, при которой коллагеназа была наиболее стабильна (отсутствовали процессы автолиза, а агрегация частиц была минимальна), можно считать 46°C.

**Ключевые слова:** коллагеназа, хитозан, иммобилизация, физико-химические свойства, кинетические свойства.

**Благодарности:** исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009



Для цитирования: Королева В.А., Дубовицкая А.Н., Беляева Т.Н., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Физико-химические и кинетические свойства коллагеназы, нативной и адсорбированной на хитозане // Сорбционные и хроматографические процессы. 2024. Т. 24, № 1. С. 128-138. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12025>

Original article

## Physicochemical and kinetic properties of collagenase, native and adsorbed on chitosan

Victoria A. Koroleva<sup>1,2</sup>, Anastasia N. Dubovitskaya<sup>1</sup>, Tatyana N. Belyaeva<sup>1</sup>,  
Marina G. Holyavka<sup>1,3</sup>✉, Valery G. Artyukhov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University, Voronezh, Russia, holyavka@rambler.ru ✉

<sup>2</sup>Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia

<sup>3</sup>Sevastopol State University, Sevastopol, Russia

**Abstract.** One of the modern research areas in biotechnology and medicine is the development of highly stable biopreparations based on immobilized enzymes. Using the method of sorption immobilization, heterogeneous biocatalysts were obtained based on collagenase (EC 3.4.24.3) from *Clostridium histolyticum* and from medium molecular weight (200 kDa) and high molecular weight (350 kDa) chitosans. The goal of the work was to study the physicochemical and kinetic properties of free and immobilized collagenase from *Clostridium histolyticum* on a chitosan matrix.

The physicochemical and kinetic properties of the enzyme were studied in soluble and immobilized states using classical biophysical and biochemical methods. It was shown that the maximum activity of native collagenase was observed at 37°C, while in case of the enzyme immobilized on medium and high molecular weight chitosan it was observed at 40°C. Sorption immobilization of the biocatalyst on a chitosan matrix allowed increasing its stability during incubation within the temperature range of 40-70°C. After incubation at 80 and 90°C, no significant differences in the activity of soluble and immobilized collagenase were found. When studying the dependence of the protease activity of the enzyme on the medium acidity in the pH range from 5.0 to 9.0, it was established that the maximum catalytic ability of soluble collagenase was observed at a pH value of 7.5. The biocatalyst immobilized on medium and high molecular weight chitosans was highly active at pH 6.0-7.5. The catalytic ability of the enzyme in free and in adsorbed states noticeably decreased at pH 8.0, while at pH 9.0 soluble collagenase immobilized on medium and high molecular weight chitosans was completely inactive. The maximum rate of the enzymatic reaction of native and chitosan-immobilized biocatalysts was observed at a substrate concentration of 0.04 mM. Apparent values of  $V'_{max}$  and  $K'_m$  were calculated. The immobilization of collagenase on medium and high molecular weight chitosans did not result in a decrease of the maximum reaction rate or a change in the degree of affinity of the enzyme to the substrate.

Using dynamic light scattering, we confirmed that the structure of collagenase in solution was most stable at pH 7.0-8.0, as exactly in this range of  $[H^+]$  values we discovered the highest content of particles corresponding to the size of native collagenase and the lowest content of its aggregates. The optimal temperature for the best stability value of collagenase (no autolysis processes and minimal particle aggregation) can be considered as being 46°C.

**Keywords:** collagenase, chitosan, immobilization, physicochemical properties, kinetic properties.

**Acknowledgments:** the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state order to higher education institutions in the sphere of scientific research for 2023-2025, project No. FZGU-2023-0009.

**For citation:** Koroleva V.A., Dubovitskaya A.N., Belyaeva T.N., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. Physicochemical and kinetic properties of collagenase, native and adsorbed on chitosan. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2024. 24(1): 128-138. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12025>

### Введение

Коллагены являются основными структурными белками в тканях человека, включая сухожилия и кожу [1].

Кроме того, коллагены обычно используются в качестве основного белка в напитках, пищевых продуктах, лекарствах и косметических средствах. Некоторые

важные пептиды, имеющие большое значение в фармацевтике и промышленности, были получены в результате гидролиза коллагена под действием коллагеназ [2, 3].

Коллагеназы (КФ 3.4.24.3) из *Clostridium histolyticum* являются наиболее детально изученными. Культуральный фильтрат *C. histolyticum* содержит смесь коллагеназ и других протеиназ, обладающих мощной гидролитической активностью в отношении соединительной ткани [4].

И. Мандл и его коллеги [5, 6] впервые попытались выделить коллагеназу из *C. histolyticum*. Впоследствии этот препарат был назван клостридиопептидазой А. Более поздние исследования показали, что культуральный фильтрат содержал несколько типов коллагеназ [7-14]. Семь типов коллагеназ с молекулярными массами от 68 до 130 кДа были очищены до гомогенного состояния [14] и охарактеризованы [13, 15]. Они были обозначены как коллагеназы класса I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\eta$ ) и класса II ( $\delta$ ,  $\epsilon$  и  $\zeta$ ) на основании различных критериев, включая их каталитическую активность в отношении коллагена по сравнению с синтетическими пептидными субстратами.

Известно, что микробная коллагеназа проявляет оптимальные значения активности при температуре 37°C и pH 7.5. При крайних значениях кислотности среды (5.0 и 11.0) фермент сохраняет 35 % от максимальной каталитической способности [8, 16-18].

Одним из актуальных направлений промышленности, биотехнологии и медицины является получение высокостабильных гетерогенных биопрепаратов на основе иммобилизованных ферментов. Было разработано множество методов иммобилизации: от физической адсорбции и ковалентного связывания до улавливания в полимерах и золь-гелях. Известно, что из-за образования связей с носителем претерпевают изменения фи-

зико-химические и кинетические характеристики биокатализатора. Количество инактивирующих механизмов для иммобилизованных ферментов существенно меньше, чем для интактных ферментов [19, 20]. Наиболее значимыми модификациями являются стабильность фермента, стерические и конформационные эффекты, кинетические особенности, диффузионные эффекты и эффекты переноса [21]. Иммобилизация позволяет проводить целевые процессы при повышенной концентрации субстрата [22]. Молекулы носителя создают микроокружение, в котором фермент может выполнять свою функцию [23, 24].

Среди различных полимеров для иммобилизации ферментов часто используют следующие полисахариды: целлюлозу, хитозан, альгинат и их производные [25-28]. С использованием технологии Nanospider были получены электропряденные нановолокна хитозана, биофункционализированные микробной коллагеназой. Характеристика нановолокон хитозана с коллагеназой с точки зрения кажущихся констант Михаэлиса-Ментен показала более высокое сродство фермента к субстрату по сравнению с растворимой формой коллагеназы. Полученные в результате новые коллагеназные нановолокна хитозана обладали высокой стабильностью и длительным сроком хранения в течение не менее 6 недель. Путем ковалентной иммобилизации были получены высокостабильные комплексы коллагеназы из *Clostridium histolyticum* с биосовместимыми нановолокнами хитозана и наночастицами хитозана/триполифосфата [29]. Были синтезированы магнитно-сшитые гибридные наноматериалы коллагеназа-металл. Полученный нанобиокатализатор продемонстрировал значительное улучшение своих характеристик, включая возможность повторного использования, низкую степень выщелачивания белка, термическую стабильность и стабильность при хранении,



каталитическую эффективность и устойчивость к ингибиторам и органическим растворителям [30].

Целью работы являлось изучение физико-химических и кинетических свойств свободной и адсорбированной на матрице хитозана коллагеназы из *Clostridium histolyticum*.

### Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования была выбрана коллагеназа из *Clostridium histolyticum* фирмы «Sigma» (США). В качестве носителей использовали среднемолекулярный ( $M_r=200$  кДа, степень деацетилирования – 82%) и высокомолекулярный ( $M_r=350$  кДа, СД=95%) хитозаны, синтезированные ЗАО «Биопрогресс» (Россия).

Иммобилизацию коллагеназы на матрице хитозана осуществляли адсорбционным методом с использованием 0.05 М глицинового буфера со значением pH 9.5. Для определения каталитической способности в качестве субстрата использовали азоказеин [31].

Размеры молекул коллагеназы измеряли на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (632.8 нм) собирали под углом  $173^\circ$  [32].

Все экспериментальные исследования осуществляли в 8-кратной повторности. Статистическая обработка полученных результатов проводилась традиционным способом при уровне значимости 5 % с использованием t-критерия Стьюдента.

### Обсуждение результатов

Важными характеристиками энзимов, определяющими их каталитическую активность, являются оптимальные для их функционирования диапазоны температуры, pH и концентрации субстрата.

Значения каталитической активности свободной и иммобилизованной на матрице хитозана коллагеназы в зависимости от температуры (в диапазоне от 25 до

$90^\circ\text{C}$ ) представлены на рис. 1. В ходе экспериментов было установлено, что для растворимой коллагеназы максимальная активность наблюдается при  $37^\circ\text{C}$ , а для иммобилизованной на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах – при  $40^\circ\text{C}$ . При проведении реакции гидролиза азоказеина при  $70^\circ\text{C}$  фермент, сорбированный на высокомолекулярном и среднемолекулярном хитозанах, оказался стабильнее нативного – сохранялось соответственно 65, 58 и 53% от каталитической способности при оптимальных условиях функционирования биокатализатора.

Результаты исследований показали, что максимум активности нативного фермента наблюдается при значении pH, равном 7.5. Иммобилизованная на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах коллагеназа оказалась высокоактивной в диапазоне pH от 6.0 до 7.5. Каталитическая способность фермента в свободном и иммобилизованном состоянии заметно снизилась при pH 8.0. При pH 9.0 растворимая и иммобилизованная на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах коллагеназа была полностью инактивирована (рис. 2).

Исследования по определению оптимальной концентрации субстрата проводились в диапазоне концентраций азоказеина от 0.0001 до 1 мМ. Зависимость каталитической активности свободной и сорбированной на матрицах среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов коллагеназы представлена на рис. 3. Максимальная скорость реакции у нативного и иммобилизованного на хитозане препаратов наблюдалась при концентрации субстрата, равной 0.04 мМ, при дальнейшем увеличении концентрации азоказеина до 1 мМ не было выявлено статистически достоверных изменений в скорости ферментативного катализа.

Одной из главных характеристик фермента является степень его сродства к субстрату. Иммобилизация энзима на нерастворимых носителях, как правило,

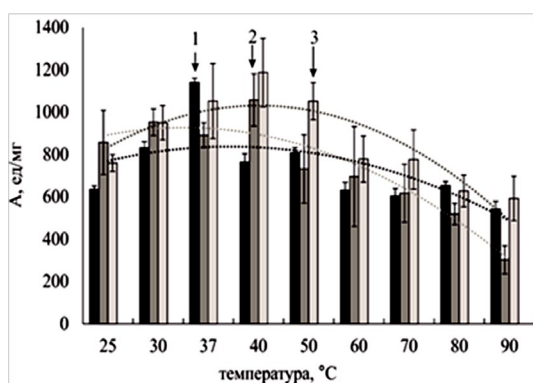


Рис. 1. Зависимость удельной каталитической активности коллагеназы (ед/мг белка) от температуры инкубации: 1 – свободная коллагеназа, 2 – коллагеназа, адсорбированная на среднемoleкулярном хитозане, 3 – коллагеназа, адсорбированная на высокомолекулярном хитозане

Fig. 1. Dependence of specific catalytic activity of collagenase (units/mg of protein) on the temperature of incubation, where 1 is free collagenase, 2 is collagenase adsorbed on medium molecular weight chitosan, and 3 is collagenase adsorbed on high molecular weight chitosan

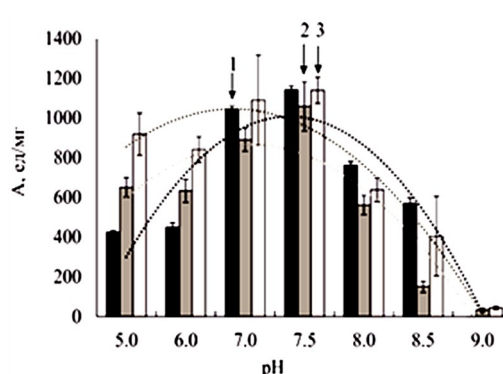


Рис. 2. Зависимость удельной каталитической активности коллагеназы (ед/мг белка) от pH среды: 1 – свободная коллагеназа, 2 – коллагеназа, адсорбированная на среднемoleкулярном хитозане, 3 – коллагеназа, адсорбированная на высокомолекулярном хитозане

Fig. 2. Dependence of specific catalytic activity of collagenase (units/mg of protein) on the medium pH, where 1 is free collagenase, 2 is collagenase adsorbed on medium molecular weight chitosan, and 3 is collagenase adsorbed on high molecular weight chitosan

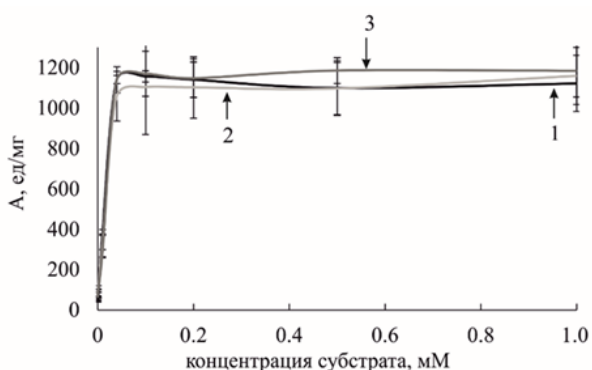


Рис. 3. Зависимость удельной каталитической активности коллагеназы (ед/мг белка) от концентрации субстрата, где 1 – свободная коллагеназа, 2 – коллагеназа, адсорбированная на среднемoleкулярном хитозане, 3 – коллагеназа, адсорбированная на высокомолекулярном хитозане

Fig. 3. Dependence of specific catalytic activity of collagenase (units/mg of protein) on the substrate concentration, where 1 is free collagenase, 2 is collagenase adsorbed on medium molecular weight chitosan, and 3 is collagenase adsorbed on high molecular weight chitosan

способствует изменению кинетических параметров ферментативного катализа. Основываясь на результатах предыдущих экспериментов, нами были определены кажущиеся значения константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции гидролиза азоказеина свободной и адсор-

бированной коллагеназой, которые представлены в табл. 1. Иммунизация коллагеназы на среднемoleкулярном и высокомолекулярном хитозанах не привела к снижению значений  $V'_{max}$  и изменению степени сродства фермента к субстрату.

Влияние кислотности среды на процессы агрегации молекул коллагеназы

Таблица 1. Кинетические свойства нативной и иммобилизованной коллагеназы  
 Table 1. Kinetic properties of native and immobilized collagenase

Препарат	$V'_{max}$ , мкМ/(мг·мин)	$K'_m$ , мкММ
Свободная коллагеназа	1400±80	14.0±0.2
Коллагеназа + среднемолекулярный хитозан	1250±90	11.0±0.3
Коллагеназа + высокомолекулярный хитозан	1400±70	14.0±0.2

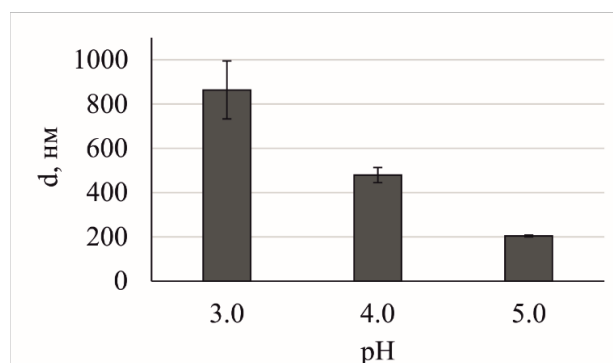


Рис. 4. Средний размер частиц крупных агрегатов коллагеназы при pH 3.0-5.0  
 Fig. 4. Average particle size of large aggregates of collagenase at pH 3.0-5.0

было исследовано в диапазоне значений pH 3.0-13.0 методом динамического светорассеяния. Нами было выделено 4 размерных группы (кластера) частиц, присутствующих в исследуемой системе. Частицы первой группы с радиусом менее 5 нм, вероятно, соответствуют продуктам автолиза коллагеназы, второй группы с радиусом 5-10 нм – нативной коллагеназе, третьей группы с радиусом 10-40 нм – мелким агрегатам, четвертой группы с радиусом 80 нм – крупным агрегатам молекул энзима. Частицы с радиусом 40-80 нм не были нами детектированы в условиях эксперимента, поэтому мы не стали выделять их в отдельную группу.

Значения размеров частиц коллагеназы в зависимости от кислотности среды отображены на рис. 4-6. За диаметр нативной коллагеназы принимали диапазон между 5 и 10 нм, выбранный на основе модели пространственной структуры фермента [33].

При pH 3.0-5.0 наблюдалось присутствие исключительно крупных агрегатов коллагеназы (рис. 4). Так, при значении водородного показателя, равного 3.0, средний диаметр наблюдаемых частиц

составил 863.9±130.7 нм, при pH 4.0 – 478.9±34.2 нм, при 5.0 – 204.3±4.3 нм.

Мелкие агрегаты наблюдались при значениях pH от 6.0 до 13.0 (рис. 5). Максимальное их содержание было выявлено при pH 6.0 (58%) со средним размером 11.2±0.4 нм, затем, при pH 7.0 и 8.0, их количество снизилось до 20 и 23% (соответствующий средний размер – 11.8±1.5 и 12.9±1.5 нм). При pH 9.0 содержание мелких агрегатов вновь возросло до 40% (размер частиц составил 13.2±0.6 нм), а затем снизилось до 33% при pH 10.0 и 11.0 (средний размер частиц – 12.3±0.7 и 13.3±2.5 нм). При pH 12.0 средний размер частиц данной группы был максимален и составил 13.3±2.5 нм, а всего частиц данной группы при названном значении pH среды зарегистрировано 53%. При pH 13.0 количество частиц, соответствующих по размеру мелким агрегатам, также было равно 53%, и их средний размер составил 13.3±1.4 нм. Обобщая полученные результаты, можно сказать, что процесс образования мелких агрегатов (10-40 нм) протекает наиболее интенсивно при pH 6.0, далее количество таких агрегатов

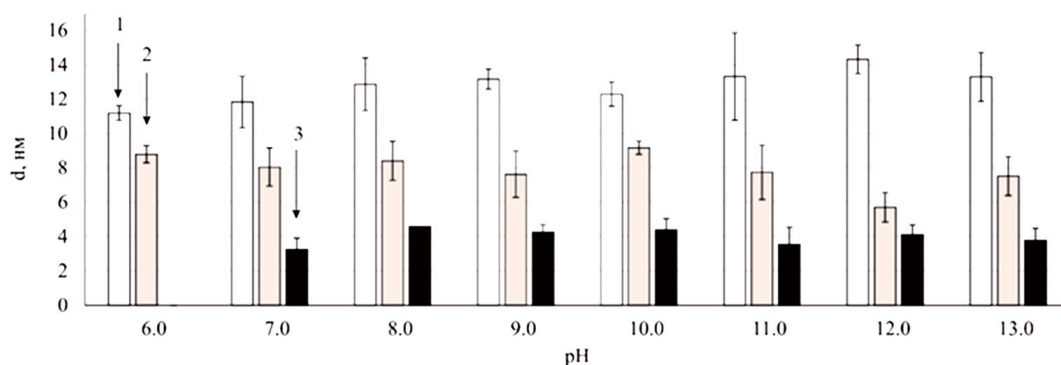


Рис. 5. Средний размер частиц мелких агрегатов (1), нативной коллагеназы (2) и продуктов автолиза (3) при pH 6.0-13.0

Fig. 5. Average particle size of small aggregates (1) of native collagenase (2) and autolysis products (3) at pH 6.0-13.0

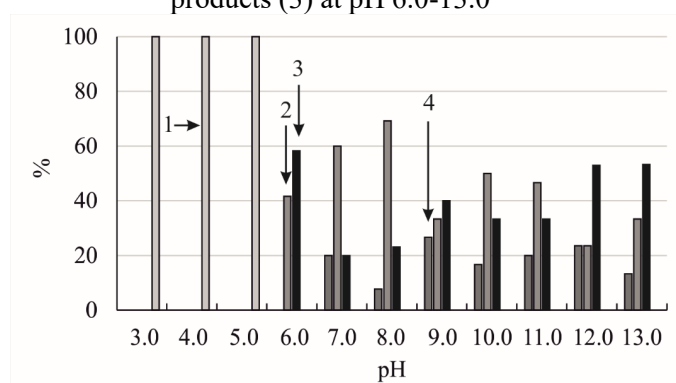


Рис. 6. Процентное содержание частиц коллагеназы, принадлежащих разным кластерам в зависимости от значений pH среды, где 1 – крупные агрегаты, 2 – нативная коллагеназа, 3 – мелкие агрегаты, 4 – продукты автолиза

Fig. 6. Percentage of collagenase particles that belong to different clusters depending on pH medium values, where 1 is large aggregates, 2 is native collagenase, 3 is small aggregates, and 4 is autolysis products

снижается при pH 7.0-8.0, а затем вновь возрастает при подщелачивании среды.

Содержание частиц, соответствующих размеру нативной коллагеназы, возрастало при pH 6.0-8.0 (с 42%, размер  $8.8 \pm 0.5$  нм, до 69%, размер  $8.4 \pm 1.1$  нм), затем в целом снижалось, достигая минимума при значении pH 12.0-24% со средним размером частиц  $5.7 \pm 0.9$  нм. Наибольшее содержание частиц данной группы выявлено при значениях pH 7.0-8.0.

Продукты автолиза не были детектированы при значении pH 6.0. При pH 8.0 их было зарегистрировано 8% от общего количества частиц в системе, а размер составил  $4.19 \pm 0.89$  нм. При значении pH 9.0 наблюдался наибольший процент продуктов автолиза (27%, средний размер частиц –  $4.26 \pm 0.43$  нм).

В диапазоне значений pH 3.0-5.0 были зарегистрированы частицы, соответствующие по размеру крупным агрегатам молекул коллагеназы, тогда как при pH 7.0-13.0 наблюдались как процессы агрегации, так и процессы автолиза (рис. 6).

Таким образом, результаты, полученные методом динамического светорассеяния, показывают, что структура коллагеназы в растворе наиболее устойчива при pH 7.0-8.0, так как именно в данном диапазоне значений выявлено наибольшее содержание частиц, соответствующих по размеру молекулам нативной коллагеназы, и наименьшее содержание ее мелких агрегатов. Кроме того, при pH 8.0 наблюдалась крайне малая интенсивность процессов автолиза.

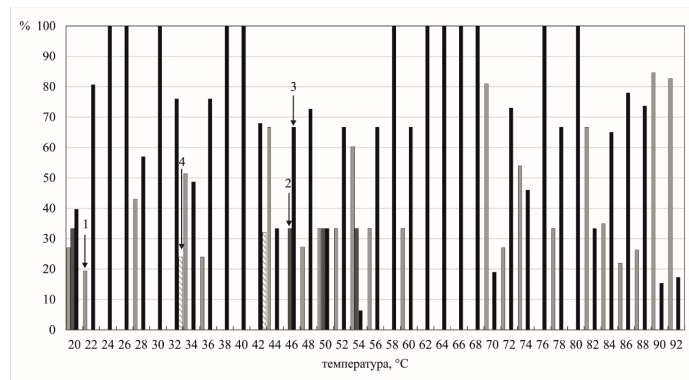


Рис. 7. Процентное содержание частиц коллагеназы, принадлежащих разным кластерам в зависимости от температуры инкубации, где 1 – продукты автолиза, 2 – нативный фермент, 3 – мелкие агрегаты, 4 – крупные агрегаты

Fig. 7. Percentage of collagenase particles that belong to different clusters depending on the temperature of incubation where 1 is large aggregates, 2 is native enzyme, 3 is small aggregates, and 4 is large aggregates

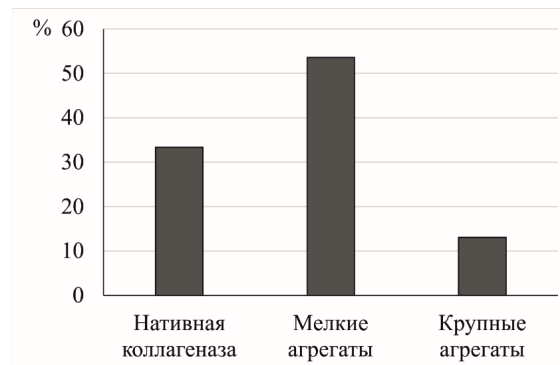


Рис. 8. Процентное содержание частиц разных кластеров при температуре 90°C

Fig. 8. Percentage of particles of different clusters at the temperature of 90°C

Следующая серия экспериментов была посвящена изучению термостабильности коллагеназы. Проводились исследования размеров частиц путем нагревания раствора коллагеназы от 20 до 92°C с шагом 2°C. Согласно полученным данным, процессы автолиза наблюдались в широком диапазоне температур, однако, его интенсивность возросла при температурах 70, 90-92°C, при этом наличие частиц нативного фермента не было зарегистрировано. Кроме того, в области данных температур снизилось количество мелких агрегатов. Частицы нативной коллагеназы были зарегистрированы при температурах 20, 46, 50, 54°C. Процессов автолиза не наблюдалось только при 46°C (рис. 7).

Таким образом, согласно полученным нами результатам, оптимальной температурой, при которой коллагеназа наиболее

стабильна (отсутствуют процессы автолиза, а агрегация частиц минимальна) можно считать 46°C.

При инкубации коллагеназы при температуре 90 °C (рис. 8) преобладали процессы образования мелких агрегатов со средним размером 33.8±10.6 нм (54%). Нативный фермент со средним размером частиц 9.0±0.6 нм был зафиксирован только в первые 10 минут инкубации. Количество крупных агрегатов составило 13% (средний размер частиц 294.7±15.8 нм).

Согласно вышеизложенным данным, можно предположить, что снижение активности коллагеназы при температуре 90°C вызвано процессами образования мелких агрегатов.



### Заключение

Было показано, что для растворимой коллагеназы максимальная активность наблюдается при 37°C, для иммобилизованной коллагеназы на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах – при 40°C. Сорбционная иммобилизация биокатализатора на матрице хитозанов с молекулярными массами 200 и 350 кДа способствовала повышению стабильности фермента в диапазоне температур 40-70°C. При 80 и 90°C не были выявлены существенные различия в активности растворимой и иммобилизованной коллагеназы. При исследовании зависимости протеазной активности фермента от кислотности среды в диапазоне pH от 5.0 до 9.0 было установлено, что максимум каталитической способности растворимой коллагеназы наблюдается при значении pH, равном 7.5. Адсорбированный на

матрице хитозанов энзим оказался высокоактивным в диапазоне pH от 6.0 до 7.5. Иммобилизация коллагеназы на среднемолекулярном и высокомолекулярном хитозанах не привела к снижению кажущихся значений  $V'_{max}$  и изменению степени сродства фермента к субстрату.

В ходе изучения размеров частиц коллагеназы методом динамического светорассеяния установлено, что фермент в растворе наиболее устойчив при pH 7.0-8.0. Оптимальной температурой, при которой структура биокатализатора наиболее стабильна, можно назвать 46°C.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

### Список литературы/References

1. Bhagwat P.K., Dandge P.B., Collagen and collagenolytic proteases: a review, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2018; 15: 43-55. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.005>
2. Duarte A.S., Correia A., Esteves A.C., Bacterial collagenases – a review, *Crit. Rev. Microbiol.*, 2016; 42: 106-126. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.904270>
3. Alipour H., Raz A., Zakeri S., Djadid N.D., Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): a review, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2016; 6: 975-981. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.07.017>
4. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 1976; 13: 29-83. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61797-5](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61797-5)
5. Mandl I., MacLennon J.D., Howes E.L., Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. Histolyticum*, *J. Clin. Invest.*, 1953; 32: 1323-1329. <https://doi.org/10.1172/JCI102861>
6. Mandl I., Zipper H., Ferguson L.T., *Clostridium histolyticum* collagenase: its purification and properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958; 74: 465-475. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90017-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90017-1)
7. Grant N.H., Alburn H.E., Studies on the collagenases of *Clostridium histolyticum*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959; 82: 245-255. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90120-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90120-1)
8. Mandl I., Keller S., Manahan J., Multiplicity of *Clostridium histolyticum* collagenases, *Biochemistry*, 1964; 3: 1737-1741. <https://doi.org/10.1021/bi00899a026>
9. Yoshida E., Noda H., Isolation and characterization of collagenases I and II from *Clostridium histolyticum*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1965; 105: 562-574. [https://doi.org/10.1016/s0926-6593\(65\)80239-9](https://doi.org/10.1016/s0926-6593(65)80239-9)
10. Kono T., Purification and partial characterization of collagenolytic enzymes from *Clostridium histolyticum*, *Biochemistry*, 1968; 7: 1106-1114. <https://doi.org/10.1021/bi00843a031>
11. Harper E., Kang A.H., Studies on the specificity of bacterial collagenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1970; 41:



- 482-487. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(70\)90531-0](https://doi.org/10.1016/0006-291x(70)90531-0)
12. Lwebuga-Mukasa J.S., Harper E., Taylor P., Collagenase enzymes from *Clostridium*: characterization of individual enzymes, *Biochemistry*, 1976; 15: 4736-4741. <https://doi.org/10.1021/bi00666a031>
13. Bond M.D., Van Wart H.E., Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*, *Biochemistry*, 1984; 23: 3085-3091. <https://doi.org/10.1021/bi00308a036>
14. Bond M.D., Van Wart, H.E., Purification and separation of individual collagenases of *Clostridium histolyticum* using red dye ligand chromatography, *Biochemistry*, 1984; 23: 3077-3085. doi: 10.1021/bi00308a035
15. Bond M.D., Van Wart H.E., Relationship between the individual collagenases of *Clostridium histolyticum*: evidence for evolution by gene duplication, *Biochemistry*, 1984; 23: 3092-3099. <https://doi.org/10.1021/bi00308a037>
16. Toledano M., Osorio R., Osorio E., Aguilera F.S., Yamauti M., Pashley D.H., Tay F., Effect of bacterial collagenase on resin-dentin bonds degradation, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2007; 18: 2355-2361. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3161-z>
17. Metzmacher I., Ruth P., Abel M., Friess W., In vitro binding of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, and bacterial collagenase on collagenous wound dressings, *Wound Repair Regen.*, 2007; 15: 549-555. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00263.x>
18. Velmurugan P., Jonnalagadda R.R., Nair B.U., Engineering D-amino acid containing collagen like peptide at the cleavage site of *Clostridium histolyticum* collagenase for its inhibition, *PLoS ONE*, 2015; 10: e0124398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124398>
19. Holyavka M., Artyukhov V., Kovaleva T., Structural and functional properties of inulinases: A review, *Biocatalysis and Biotransformation*, 2016; 34(1): 1-17.
20. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechikina M.V., Thermal inactivation of free and immobilized inulinase, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010; 46(4): 385-389.
21. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Lukin A.N., Agapov B.L., Artyukhov V.G., Immobilization of inulinase on KU-2 ion-exchange resin matrix, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019; 138: 681-692. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.132>
22. Ahmad A., Javed M.R., Ibrahim M., Sajid A., Hussain K., Kaleem M., Fatima H.M., Nadeem H., Methods of enzyme immobilization on various supports, *Materials Research Foundations*, 2019; 44: 1-28. <https://doi.org/10.21741/9781644900079-1>
23. Secundo F., Conformational changes of enzymes upon immobilization, *Chem.Soc. Rev.*, 2013; 42: 6250-6261. <https://doi.org/10.1039/c3cs35495d>
24. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M., Artyukhov V.G., In silico design of high-affinity ligands for the immobilization of inulinase, *Computers in Biology and Medicine*, 2016; 71: 198-204. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2016.02.015>
25. Lyu X., Gonzalez R., Horton A., Li T., Immobilization of enzymes by polymeric materials, *Catalysts*, 2021; 11: 1211. <https://doi.org/10.3390/catal11101211>
26. Holyavka M., Faizullin D., Koroleva V., Olshannikova S., Zakhartchenko N., Zuev Yu., Kondratyev M., Zakharova E., Artyukhov V., Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021; 180: 161-176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.016>
27. Trizna E.Yu., Baydamshina D.R., Kholyavka M.G., Sharafutdinov I.S., Hairutdinova A.R., Khafizova F.A., Zakirova E.Yu., Hafizov R.G., Kayumov A.R., Soluble and immobilized papain and trypsin

as destroyers of bacterial biofilms, *Genes and Cells*, 2015; 10(3): 106-112.

28. Baidamshina D.R., Koroleva V.A., Olshannikova S.S., Trizna E.Yu., Bogachev M.I., Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kayumov A.R., Biochemical properties and anti-biofilm activity of chitosan-immobilized papain, *Marine Drugs*, 2021; 19(4): 197. <https://doi.org/10.3390/md19040197>

29. Slovákova M., Kratochvilová V., Palarcik J., Metelka R., Dvorakova P., Srbová J., Munzarová M., Bílková Z., Chitosan nanofibers and nanoparticles for immobilization of microbial collagenase, *XXIV International Congress IFATCC*, 2016; 193-198.

30. Badoei-dalfard A., Monemi F., Hasanshahian M., One-pot synthesis and biochemical characterization of a magnetic collagenase nanoflower and evaluation of its biotechnological applications, *Colloids and*

*Surfaces B: Biointerfaces*, 2022; 211: 112302. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112302>

31. Garcia-Carreño F.L., The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, *Decapoda*): their partial characterization, and the effect of feed on their composition, *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 1992; 103: 575-578.

32. Kharat S.J., Density, viscosity and ultrasonic velocity studies of aqueous solutions of sodium acetate at different temperatures, *Journal of Molecular Liquids*, 2008; 140: 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2007.12.006>

33. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M., Watanabe K., Yamagata Y., Murayama K., *Applied and Environmental Microbiology*, 2012; 78(16): 5839-5844.

#### Информация об авторах / Information about the authors

**В.А. Королева** – м.н.с. кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж; ассистент кафедры биологии, Воронежский государственный университет имени Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

**А.Н. Дубовицкая** – аспирант кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**Т.Н. Беляева** – аспирант кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**М.Г. Холявка** – профессор кафедры биофизики и биотехнологии, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж; профессор кафедры «Физика» Севастопольского государственного университета, Севастополь, Россия

**В.Г. Артюхов** – заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии, д.б.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**V.A. Koroleva** – junior researcher, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh; Assistant of the Department of Biology, Voronezh State University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia

**A.N. Dubovitskaya** – Postgraduate, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia

**T.N. Belyaeva** – Postgraduate Student, Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia

**M.G. Holyavka** – Professor, DSci (biology), Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh; Professor, Department of Physics, Sevastopol State University, Sevastopol, Russia

**V.G. Artyukhov** – Head of the Department of Biophysics and Biotechnology, DSci (biology), Voronezh State University, Voronezh, Russia

Статья поступила в редакцию 03.04.2023; одобрена после рецензирования 31.10.2023; принята к публикации 01.11.2023.

The article was submitted 03.04.2023; approved after reviewing 31.10.2023; accepted for publication 01.11.2023.