

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ СВОБОДНОЙ И СОРБИРОВАННОЙ НА ХИТОЗАНЕ КОЛЛАГЕНАЗЫ

В. А. Королева^{1,2}, Ф. А. Сакибаев¹, Т. Н. Беляева¹, А. Н. Дубовицкая¹,
М. Г. Холявка^{1,3}, 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 11.05.2021 г.

Аннотация. Разработка ферментных технологий требует исследования обширного спектра физико-химических характеристик биокатализаторов и подбора оптимальных условий реакции. Коллагеназа (КФ 3.4.24.7) является протеазой, относящейся к семейству матриксных металлопротеаз, обладающей протеазной и эстеразной видами активности. Нарушение нативной структуры фермента и, как следствие, потеря его каталитической способности обуславливаются его агрегацией и автолизом. Иммунизация на нерастворимом носителе позволяет повысить термостабильность коллагеназы. За счёт закрепления молекулы на матрице носителя удаётся уменьшить конформационную подвижность энзима, что ограничивает тепловую денатурацию, агрегацию и предотвращает автолиз протеазы.

В данной работе были изучены закономерности процессов термической инактивации свободной и иммобилизованной на матрице хитозана коллагеназы из *Clostridium histolyticum*. Растворимый биокатализатор инактивировался на ~50, 84 и 94 % под действием температур 50-70, 80 и 90 °С после 10 минут инкубации. После часа инкубации при 50 °С активность препаратов, сорбированных на среднемoleкулярном и высокомолекулярном хитозанах, составляла 49 и 69 % соответственно. При 60 и 70 °С кривые инактивации фермента, иммобилизованного на среднемoleкулярном хитозане, существенно не отличались друг от друга, а каталитическая способность коллагеназы, сорбированной на двух видах кислоторастворимого хитозана, сохранялась на уровне около 50 % после 60 минут нагревания. Коллагеназа, иммобилизованная на матрице среднемoleкулярного и высокомолекулярного хитозанов, была практически полностью инактивирована в условиях 80 и 90 °С после 10 минут нагревания.

С увеличением температуры от 30 до 40 °С была выявлена тенденция к увеличению числа частиц, соответствующих по размеру продуктам автолиза, что может указывать на возрастание активности коллагеназы. В диапазоне температур от 30 до 70 °С наблюдалось незначительное количество агрегатов, что, вероятно, связано с невысокой интенсивностью процессов агрегации при данных температурах. При дальнейшем росте температуры прослеживалась тенденция к увеличению числа частиц, соответствующих по размеру ди- и тетрамерам коллагеназы, с высокой дисперсией данного показателя, предположительно обусловленной чередующимися процессами формирования и распада комплексов.

Ключевые слова: коллагеназа, хитозан, иммобилизация, термическая инактивация

Применение протеолитических ферментов широко распространено в области медицины, косметологии и ветеринарии. Разработка протеазных технологий требует исследования обширного спектра физико-химических характеристик био-

катализаторов и подбора оптимальных условий реакции [1].

Коллагеназа (КФ 3.4.24.7) – протеолитический фермент, относящийся к семейству матриксных металлопротеаз, обладающий протеазной и эстеразной видами активности. Она является уникальной протеазой с высокой специфичностью к фибриллярному белку коллагену, входящему в

© Королева В. А., Сакибаев Ф. А., Беляева Т. Н., Дубовицкая А. Н., Холявка М. Г., Артюхов В. Г., 2021

состав соединительных тканей, который гидролизуется с выделением свободной аминокислоты – оксипролина [2, 3].

В медицине коллагеназа используется в терапии ожогов и гнойных ран, препятствует образованию рубцов, играет важную роль при трансплантации [4]. Экспериментальные исследования показали, что энзим в процессе заживления ран может увеличивать пролиферацию, ангиогенез и миграцию клеток дермы [5]. Фермент удаляет некротические массы в области раны, но не повреждает здоровые ткани [6]. Коллагеназа обеспечивает сокращение потребности в хирургическом вмешательстве и переливании крови при частичных ожогах, а также рассматривается как первый вариант лечения для удаления шрамов у младенцев с ожоговой раной без инфекции [7]. Применение коллагеназы показало эффективность при контрактуре Дюпюитрена – заболевании, связанным с рубцовым перерождением ладонных сухожилий [8]. Инъекции коллагеназы используются для лечения глаукомы. Фермент способствует уменьшению внутриглазных рубцов и фиброза, возникающих после операции по фильтрации глаукомы [9]. Одним из направлений в косметологии является применение коллагеназы для обеспечения равномерного изменения цвета кожи при приобретении загара [4].

Некоторые ферментативные процессы целесообразно проводить при высоких температурах, поскольку таким образом решается проблема загрязнения реакционной смеси микроорганизмами, повышается растворимость компонентов и скорость реакции [10]. Однако нативные протеазы при повышении температуры реакционной среды могут претерпевать инактивацию путём изменения конформации, агрегации молекул или автолиза [11]. Для успешного осуществления высокотемпературного ферментативного процесса необходимо повысить термическую стабильность энзима. Одним из эффективных способов регуляции чувствительности ферментов к физико-химическим свойствам среды, включая температуру, является его иммобилизация на нерастворимых полимерах [4]. За счёт закрепления белковой молекулы на матрице носителя удаётся уменьшить конформационную подвижность энзима, что препятствует тепловой денатурации, агрегации и предотвращает автолиз протеазы [10, 11].

Хитозан является линейным аминополисахаридом. Это – нетоксичный, биосовместимый и биоразлагаемый полимер, активно применяемый

в качестве носителя для иммобилизации энзимов. Он обладает антибактериальной, фунгицидной и противовирусной активностями, а также радиопротекторным действием [12-14]. Хитозан обладает свойствами полиэлектролита и образует большое количество водородных связей, что обуславливает его перспективность как носителя для различных типов иммобилизации: адсорбционной, ковалентной, включением в гель [15-17]. Как носитель для иммобилизации ферментов хитозан осуществляет регуляцию их активности и устойчивости к физико-химическим условиям, в том числе к повышенным температурам [4, 12, 14].

Цель работы – изучение закономерностей процессов термической инактивации свободной и иммобилизованной на матрице хитозана коллагеназы.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования была выбрана коллагеназа из *Clostridium histolyticum* фирмы «Sigma». В качестве носителя использовали кислоторастворимые средномолекулярный (Mг = 200 кДа, степень деацетилирования – 82 %) и высокомолекулярный (Mг = 350 кДа, СД = 94.85 %) хитозаны, синтезированные ЗАО «Биопрогресс».

Иммобилизацию коллагеназы на матрице хитозана осуществляли адсорбционным методом [18]. Количество белка в иммобилизованном препарате измеряли модифицированным методом Лоури [19]. В качестве субстрата для определения активности фермента применяли *N*-бензол-*DL*-аргинин-пара-нитроанилид (БАПНА) [20].

Процессы термической инактивации нативной и иммобилизованной коллагеназы исследовали при температурах 50, 60, 70, 80 и 90 °С спустя 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут с последующим определением каталитической активности.

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° в диапазоне температур 30-90 °С [21]. Было выделено 5 групп частиц с диаметром: 1) меньшим, чем размер нативной коллагеназы; 2) соответствующим диаметру нативной молекулы коллагеназы; 3) находящемся в диапазоне между размерами ди- и тетрамеров коллагеназы; 4) находящемся в диапазоне между размерами тетра- и октамеров коллагеназы; 5) превышающем размер октамера коллагеназы. За диаметр нативной коллагеназы принимали диапазон между 5 и 10 нм [22]. Для

каждой из размерных групп было рассчитано среднее значение количества частиц, на основе которого построены зависимости данного показателя от температуры и времени инкубации.

Все экспериментальные исследования осуществляли минимум в 8-кратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ "Stadia 8.0". Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных показателей определяли по t-критерию Стьюдента (при $p < 0.05$), поскольку все показатели характеризовались нормальным распределением.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 1 показана динамика процессов инактивации коллагеназы из *Clostridium histolyticum*.

Установлено, что коллагеназа инактивировалась на ~50 % под действием температур 50, 60 и 70 °С после 10 минут инкубации, на 84 и 94 % соответственно при 80 и 90 °С (рис. 1, 2).

Иммобилизация ферментов на нерастворимых носителях способствует повышению их термостабильности, так как при присоединении последних к матрице подложки происходит фиксация их каталитически активной конформации.

Анализ кривых термоинактивации коллагеназы, иммобилизованной на матрицах кислоторастворимых средномолекулярного и высокомолекулярного хитозанов показал, что иммобилизация фермента на хитозане существенно не повышает его термоустойчивость по сравнению с нативным энзимом. После инкубации при 50 °С активность препаратов, сорбированных на средномолекулярном и высокомолекулярном хитозанах, составила 49 и 69 % соответственно. При 60 и 70 °С кривые инактивации фермента, иммобилизованного на средномолекулярном хитозане, не отличались друг от друга, а каталитическая способность коллагеназы, сорбированной на двух видах кислоторастворимого хитозана, сохранялась на уровне около 50 %. Биокатализатор, иммобилизованный

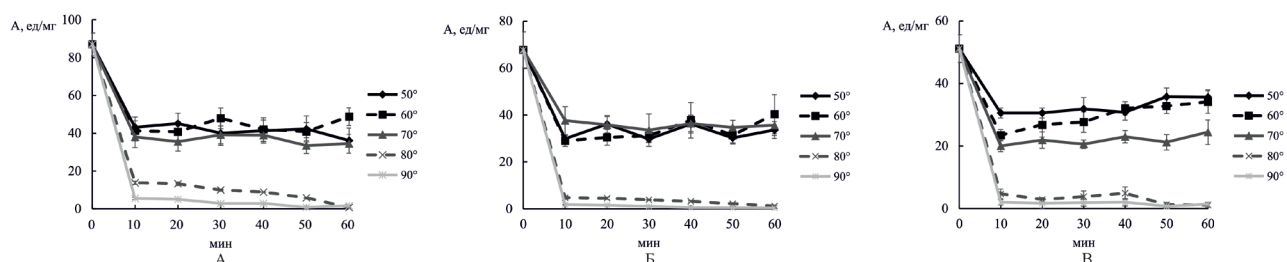


Рис. 1. Зависимость каталитической активности коллагеназы от времени термической инактивации: А – нативный фермент, Б – фермент, иммобилизованный на средномолекулярном хитозане, В – фермент, иммобилизованный на высокомолекулярном хитозане

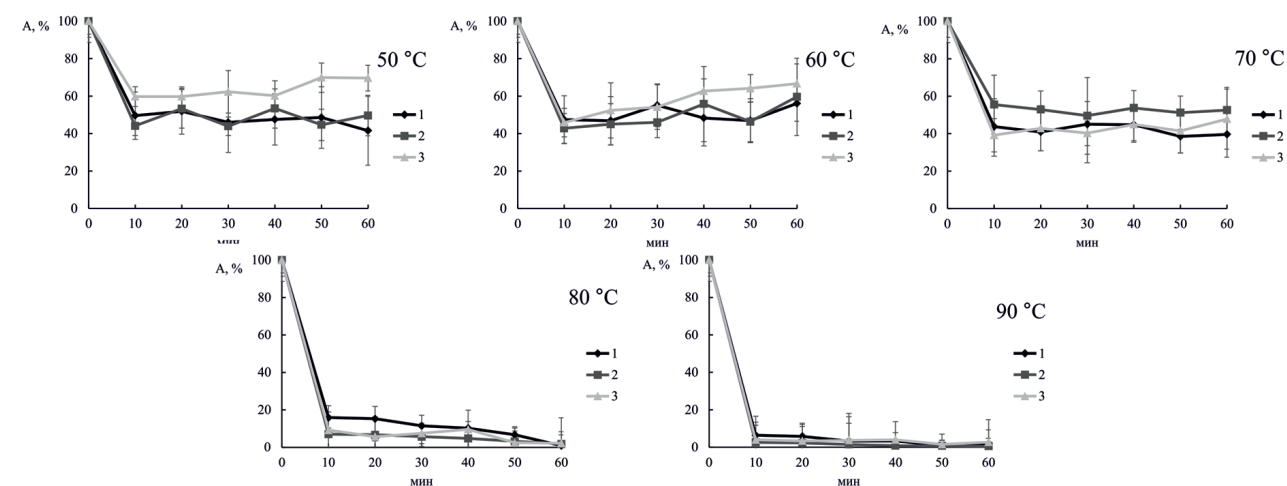


Рис. 2. Процент сохранения каталитической активности коллагеназы в различные промежутки времени в ходе инкубации при 50-90 °С. За 100 % принята максимальная ферментативная активность энзима, наблюдаемая нами без предварительной инкубации и при оптимальных условиях гидролиза. 1 – нативная коллагеназа, 2 – коллагеназа, иммобилизованная на средномолекулярном хитозане, 3 – коллагеназа, иммобилизованная на высокомолекулярном хитозане

на матрице среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов, был практически полностью инактивирован в условиях 80 и 90 °С после 10 минут инкубации (рис. 1, 2).

Далее были измерены размеры молекулы коллагеназы при воздействии различных температур в диапазоне от 30 до 90 °С.

С увеличением температуры от 30 до 40 °С наблюдалась тенденция к увеличению числа частиц, соответствующих по размеру продуктам автолиза (рис. 3). При дальнейшем увеличении температуры возрастала дисперсия количества частиц данной группы на фоне общей тенденции к снижению их числа, что может указывать на процессы агрегации продуктов автолиза.

Для нативной коллагеназы в диапазоне температур от 30 до 40 °С также наблюдалась тенденция к незначительному росту количества частиц. Снижение числа молекул нативного энзима в диапазоне от 40 до 70 °С было менее выражено, чем в случае с продуктами автолиза, что, возможно, связано с большей степенью денатурации молекулы для последних и, как следствие, более высокой степенью доступности гидрофобных групп для формирования агрегатов. Дисперсия количества частиц, соответствующих по размеру нативной форме коллагеназы, может быть обусловлена как разрушением надмолекулярных комплексов на фоне роста температуры, так и агрегацией продуктов автолиза с формированием частиц, соответствующих по размеру нативной молекуле коллагеназы (рис. 3).

В диапазоне температур от 30 до 70 °С наблюдалось незначительное количество агрегатов что, вероятно, связано с низкой интенсивностью процессов агрегации при данных температурах. При дальнейшем росте температуры выявлена тенденция к увеличению числа частиц, соответствующих по размеру ди- и тетрамерам коллагеназы, с высокой дисперсией данного показателя, предположительно обусловленной чередующимися процессами формирования и распада комплексов. Количество более крупных комплексов молекул коллагеназы в анализируемой системе незначительно, однако, необходимо учитывать, что они могут содержать высокое число отдельных молекул коллагеназы и продуктов их автолиза (рис. 3, 4).

При инкубации раствора коллагеназы при 50 °С выявлена высокая дисперсия значений количества частиц, соответствующих по размеру продуктам автолиза молекул фермента, что может указывать на постоянно сменяющие друг друга процессы ассоциации и диссоциации агрегатов (рис. 4). Явно выраженной тенденции к росту или уменьшению числа продуктов автолиза не наблюдалось.

Для частиц, размер которых соответствует нативной форме коллагеназы, дисперсия по размеру возрастала в промежутках 30-60 и 150-210 минут инкубации при 50 °С, что также может объясняться чередующимися процессами ассоциации и диссоциации агрегатов (рис. 4).

Результаты, полученные после инкубации раствора коллагеназы при 60 и 70 °С, позволили

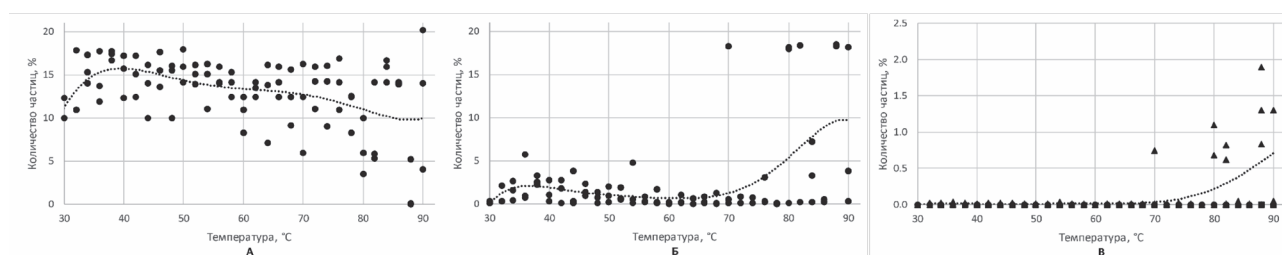


Рис. 3. Зависимость количества продуктов автолиза (А), молекул нативного фермента (Б) и агрегатов коллагеназы (В) от температуры

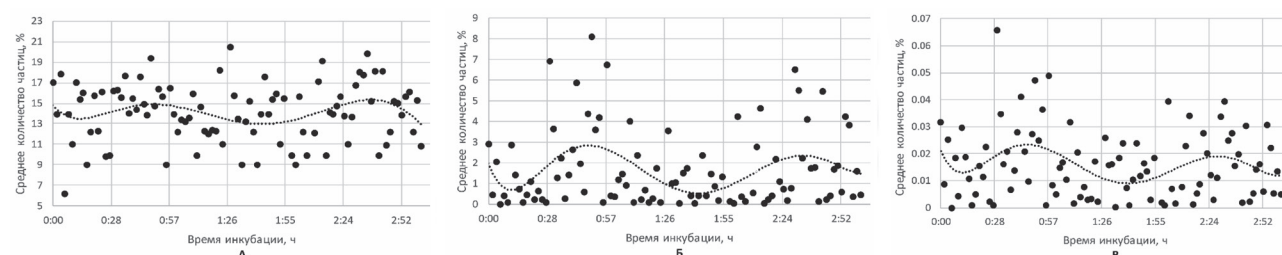


Рис. 4. Зависимость количества продуктов автолиза коллагеназы (А), молекул нативного фермента (Б) и его агрегатов (В) от времени инкубации при 50 °С

выявить сходную картину зависимости количества частиц разных размерных групп от времени. Значительная дисперсия количества частиц, соответствующих продуктам автолиза, вероятно, обусловлена процессами ассоциации и диссоциации агрегатов (рис. 5).

Для частиц, равных по размеру нативной форме коллагеназы, также наблюдалась высокая дисперсия по их количеству. Частицы, соответствующие ди- и тетрамерным формам фермента, характеризовались незначительным числом и низкой дисперсией значений данного показателя (рис. 5). Количество частиц, размер которых превышает таковой для тетрамеров коллагеназы, составляло менее 0.1 %, что может быть обусловлено как преобладанием процессов диссоциации агрегатов, так и низкой степенью агрегации в целом при данных температурах.

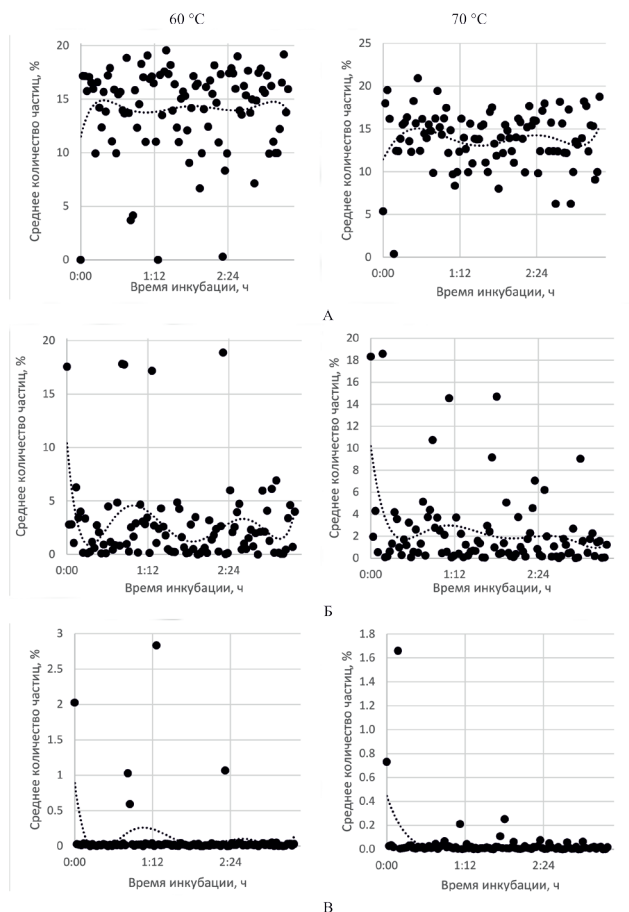


Рис. 5. Зависимость количества продуктов автолиза коллагеназы (А), молекул нативного фермента (Б) и его агрегатов от времени инкубации при 60 (слева) и 70 °С (справа)

Инкубация раствора коллагеназы при 80 и 90 °С привела к полному отсутствию частиц, равных по размеру продуктам автолиза и нативной форме фермента, после 31 и 9 минут соответ-

ственно, что может свидетельствовать о полной необратимой агрегации молекул энзима (рис. 6).

При 80 °С вначале преобладали частицы, размер которых находится между таковым для тетра- и октамеров коллагеназы. Однако в дальнейшем наблюдался рост количества частиц, соответствующих ди- и тетрамерам и превышающих по размеру октамеры коллагеназы. Это может указывать на протекающие одновременно процессы образования и частичного разрушения комплексов агрегатов (рис. 6).

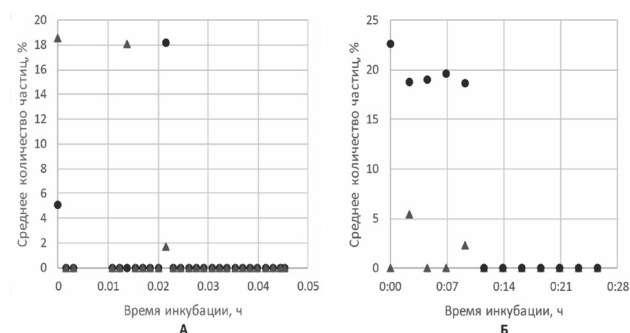


Рис. 6. Зависимость количества продуктов автолиза (круглый маркер) и нативной формы коллагеназы (треугольный маркер) от времени инкубации при 80 (А) и 90 °С (Б)

При 90 °С процессы агрегации протекали более интенсивно, при этом дисперсия в значениях размеров частиц была значительно меньше, что вероятно, обусловлено низкой скоростью распада агрегатов. При данной температуре преобладали частицы, соответствующие по размерам ди- и тетрамерам коллагеназы. Вероятно, такие комплексы являются наиболее стабильными и не разрушаются при высоких температурах (рис. 7).

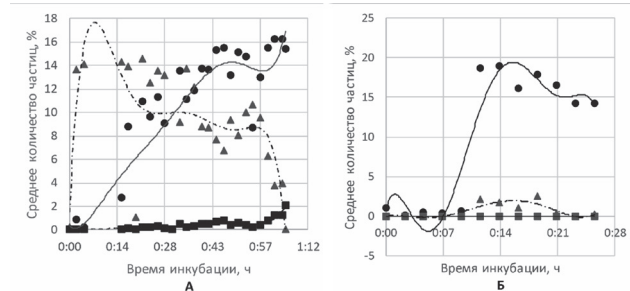


Рис. 7. Зависимость количества агрегатов коллагеназы от времени инкубации при 80 (А) и 90 °С (Б) (черным круглым маркером обозначены частицы, соответствующие ди- и тетрамерам; серым треугольным – соответствующие частицам, размер которых превышает димеры коллагеназы, но меньше ее октамеров; черным квадратным – с размером, превышающим размеры октамеров фермента)

Отсутствие нативного фермента и продуктов автолиза в обоих случаях можно объяснить значительной степенью денатурации белковых глобул и, как следствие, формированием агрегатов с высокой стабильностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена динамика изменения размеров молекул коллагеназы в процессе термической инактивации её растворов. Выявлена высокая дисперсия количества частиц различных размерных групп, вероятно, указывающая на параллельное протекание процессов ассоциации и диссоциации надмолекулярных комплексов. Установлено, что интенсивность процессов агрегации возрастает при 70 °С и выше в ходе постепенного увеличения температуры инкубации. В процессе инкубации при 50, 60 и 70 °С не выявлено явной тенденции к увеличению или уменьшению количества частиц ни для одной из размерных групп. Отмечено отсутствие продуктов автолиза и нативного фермента после 31 и 9 минут инкубации при 80 и 90 °С соответственно, что, вероятно, указывает на полную и необратимую агрегацию белковых макромолекул при названных условиях.

Установлено, что иммобилизация коллагеназы на кислоторастворимых хитозанах не приводит к повышению термостабильности биокатализатора при 80 и 90 °С.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук МД-1982.2020.4. Соглашение 075-15-2020-325.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Холявка М.Г., Панкова С.М., Вышкворкина Ю.М., Лукин А.Н., Артюхов В.Г. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 1. С. 63-67.
2. Балабан Н.П. // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2007. Т. 149. №2. С. 6-23.
3. Демина Н.С., Лысенко С.В., Кудряшов В.В., Семенов М.П., Блатун Л.А. Патент РФ, № RU 2166950 С1, 2001.
4. Холявка М.Г., Ольшанникова С.С., Артюхов В.Г. Патент РФ, № RU 2712528 С1, 2020.
5. Clark R., Peter H. The molecular and cellular biology of wound repair. Boston, MA, Springer, 1988, p. 21.
6. Alipour H., Raz A., Zakeri S., Djadid N.D. // Asian Pac J Trop Biomed. 2016. Vol. 6. No. 11, pp. 975-981.
7. Rashaan Z.M., Krijnen P., Klamer R.R., Schipper I.B., Dekkers O.M., Breederveld R.S. // Wound Repair Regen. 2014. Vol. 22. No. 4, pp. 473-482.
8. Масгутов Р.Ф., Филиппов В.Л., Богов А.А. // Практическая медицина. 2015. Т. 1. № 4. С. 112-116.
9. Honkanen R. Patent USA, No. US 20150273028 A1, 2015.
10. Королева В.А., Сакибаев Ф.А., Шеломенцева Т.Н., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. № 3. С. 58-63.
11. Klibanov A.M. // Advances in Applied Microbiology. 1983. Vol. 29, pp. 1-28.
12. Камская В.Е. // Научное обозрение. Биологические науки. 2016. № 6. С. 36-42.
13. Строкова Н.Г., Подкорытова А.В. // Труды ВНИРО. 2018. Т. 170. С. 124-152.
14. Холявка М.Г., Ольшанникова С.С., Артюхов В.Г. Патент РФ, № RU 2711786 С1, 2020.
15. Фомина В.И., Малинкина О.Н., Шиповская А.Б., Гегель Н.О., Зудина И.В., Токмакова Е.В. Патент РФ, № RU 2617501 С1, 2017.
16. Гришин А.А., Зорина Н.В., Луцкий В.И. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2014. №1. С. 29-34.
17. Погорелов М.В., Калинин О.В., Ивахнюк Т.В., Москаленко Р.А., Бончев С.Д. // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2012. №4. С. 34-45.
18. Королева В.А., Ольшанникова С.С., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Биофизика. 2021. Т. 66. № 3. С. 429-439.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, pp. 265-275.
20. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. // Arch. Biochem. Biophys. 1961. Vol. 95. pp. 271-278.
21. Kharat S.J. // Journal of Molecular Liquids. 2008. Vol. 140. № 1-3, pp. 10-14.
22. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M., Watanabe K., Yamagata Y., Murayama K. // Applied and Environmental Microbiology. 2012. Vol. 78. No. 16, pp. 5839-5844.

Королева В. А., Сакибаев Ф. А., Беляева Т. Н., Дубовицкая А. Н., Холявка М. Г., Артюхов В. Г.

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

*Королева В. А., ассистент кафедры биологии, м.н.с. кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета
E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Voronezh State Medical University N.N. Burdenko
*Koroleva V. A., Assistant Professor, junior researcher Department of Biophysics and Biotechnology

E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Воронежский государственный университет Сакибаев Ф. А., аспирант кафедры биофизики и биотехнологии

E-mail: farkhatlukum@gmail.com

Voronezh State University Sakibaev F. A., post-graduate student, Department of Biophysics and Biotechnology

E-mail: farkhatlukum@gmail.com

Дубовицкая А. Н., студент кафедры биофизики и биотехнологии

E-mail: a.n.dubovitskaya@mail.ru

Dubovitskaya A. N., student of the Department of Biophysics and Biotechnology

E-mail: a.n.dubovitskaya@mail.ru

Беляева Т. Н. магистрант 2 года обучения кафедры биофизики и биотехнологии

Belyaeva T. N., student of the Department of Biophysics and Biotechnology

Холявка М. Г., д.б.н., доцент кафедры биофизики и биотехнологии; профессор кафедры «Физика», Севастопольский государственный университет

E-mail: holyavka@rambler.ru

Holyavka M. G., PhD., DSci., Associate Professor, Biophysics and Biotechnology Department; Full Professor of Physics Department, Sevastopol State University

E-mail: holyavka@rambler.ru

Артюхов В. Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биофизики и биотехнологии

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology,

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

REGULARITIES OF THERMAL INACTIVATION OF FREE AND SORBED ON CHITOSAN COLLAGENASE

V. A. Koroleva^{1,2}, F. A. Sakibaev¹, T. N. Belyaeva¹, A. N. Dubovitskaya¹, M. G. Holyavka^{1,3}, V. G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University

²Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

³Sevastopol State University

Abstract. The development of enzyme technologies requires the study of a wide range of physicochemical characteristics of biocatalysts and the selection of optimal reaction conditions. Collagenase (EC 3.4.24.7) is a protease belonging to the family of matrix metalloproteases with protease and esterase activities. Disruption of the native structure of the enzyme and, as a consequence, the loss of its catalytic ability is provided by its aggregation and autolysis. Immobilization on an insoluble carrier increases the thermal stability of collagenase. By fixing the molecule on the carrier matrix, it is possible to reduce the conformational mobility of the enzyme, which limits heat denaturation, aggregation, and prevents protease autolysis.

In this work, we studied the regularities of the processes of thermal inactivation of free collagenase from *Clostridium histolyticum* and immobilized on the chitosan matrix. Soluble biocatalyst was inactivated by ~50, 84 and 94% under the influence of temperatures of 50-70, 80 and 90 °C immediately after 10 minutes of incubation. After 1 hour incubation at 50 °C, the activity of the preparations sorbed on medium and high molecular weight chitosans was 49 and 69 %, respectively. At 60 and 70 °C the inactivation curves of the enzyme immobilized on medium molecular weight chitosan did not differ significantly from each other, and the catalytic ability of collagenase sorbed on two types of acid-soluble chitosan remains at a level of about 50% after 60 minutes of heating. Collagenase, immobilized on a matrix of medium and high molecular

weight chitosans, was almost completely inactivated under conditions of 80 and 90 °C after 10 minutes of incubation.

With an increase in temperature from 30 to 40 °C, there was a tendency to an increase in the number of particles corresponding in size to autolysis products, which may indicate an increase in collagenase activity. In the temperature range from 30 to 70 °C an insignificant number of aggregates was observed, which is probably due to the low intensity of aggregation processes at these temperatures. With a further increase in temperature there was a tendency to an increase in the number of particles corresponding in size to collagenase di- and tetramers, with a high dispersion of this indicator, presumably due to alternating processes of formation and decomposition of complexes.

Keywords: collagenase, chitosan, immobilization, thermal inactivation

REFERENCES

1. Holyavka M.G., Pankova S.M., Vyshkvorkina Ju.M., Lukin A.N., Artjuhov V.G., Radiation biology. Radioecology, 2019, Vol. 59, No. 1, pp. 63-67.
2. Balaban N.P., Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki, 2007, Vol. 149, No. 2, pp. 6-23.
3. Demina N.S., Lysenko S.V., Kudrjashov V.V., Semenov M.P., Blatun L.A. Patent RF, no. RU 2166950 C1, 2001.
4. Holyavka M.G., Olshannikova S.S., Artjuhov V.G. Patent RF, no. RU 2712528 C1, 2020.
5. Clark R., Peter H. The molecular and cellular biology of wound repair. Boston, MA, Springer, 1988, p. 21.
6. Alipour H., Raz A., Zakeri S., Djadid N.D., Asian Pac J Trop Biomed, 2016, Vol. 6, No. 11, pp. 975-981.
7. Rashaan Z.M., Krijnen P., Klamer R.R., Schipper I.B., Dekkers O.M., Breederveld R.S., Wound Repair Regen, 2014, Vol. 22, No. 4, pp. 473-482.
8. Masgutov R.F., Filippov V.L., Bogov A.A., Prakticheskaja medicina, 2015, Vol. 1, No. 4, pp. 112-116.
9. Honkanen R. Patent USA, no. US 20150273028 A1, 2015.
10. Koroleva V.A., Sakibaev F.A., Shelomenceva T.N., Holyavka M.G., Artyuhov V.G., Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy, 2018, Vol. 3, pp. 58-63.
11. Klivanov A.M., Advances in Applied Microbiology, 1983, Vol. 29, pp. 1-28.
12. Kamskaja V.E., Nauchnoe obozrenie. Biologicheskie nauki, 2016, Vol. 6, pp. 36-42.
13. Strokova N.G., Podkorytova A.V., Trudy VNIRO, 2018, Vol. 170, pp. 124-152.
14. Holyavka M.G., Olshannikova S.S., Artyuhov V.G. Patent RF, no. RU 2711786 C1, 2020.
15. Fomina V.I., Malinkina O.N., Shipovskaja A.B., Gegel' N.O., Zudina I.V., Tokmakova E.V. Patent RF, no. RU 2617501 C1, 2017.
16. Grishin A.A. Zorina N.V., Luckij V.I., Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya, 2014, Vol. 1, pp. 29-34.
17. Pogorelov M.V., Kalinkevich O.V., Ivahnjuk T.V., Moskalenko R.A., Bonchev S.D., I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald, 2012, №4, pp. 34-45.
18. Koroleva V.A., Olshannikova S.S., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Biophysics, 2021, Vol. 66, No. 3, pp. 364-372.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., J. Biol. Chem, 1951, Vol. 193, pp. 265-275.
20. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W., Arch. Biochem. Biophys., 1961, Vol. 95, pp. 271-278.
21. Kharat S.J., Journal of Molecular Liquids, 2008, Vol. 140, No. 1-3, pp. 10-14.
22. Ohbayashi N., Yamagata N., Goto M., Watanabe K., Yamagata Y., Murayama K., Applied and Environmental Microbiology, 2012, Vol. 78, No. 16, pp. 5839-5844.