

БИОТЕХНОЛОГИЯ/BIOTECHNOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2025.29.3>ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ КОЛЛАГЕНАЗЫ *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДИФИЦИРОВАННОГО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА НА ОСНОВЕ ЖЕЛАТИНА

Научная статья

Полякова А.О.^{1,*}¹ ORCID : 0009-0004-3553-5926;¹ Ленинградский государственный университет имени А. С. Пушкина, Пушкин, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (anapolyakovaa[at]gmail.com)

Аннотация

Коллагеназа — ключевой фермент деградации коллагена, играющий важную роль в физиологических и патологических процессах. Существующие методы оценки ее активности часто отличаются высокой стоимостью, сложностью или недостаточной селективностью. В данной работе представлен разработанный экономичный и воспроизводимый спектрофотометрический метод определения коллагеназной активности, основанный на гидролизе желатина и колориметрическом детектировании продуктов реакции с Кумасси Бриллиантовым Синим G-250 (CBBG). Ключевым научным достижением и новизной представленной работы является разработка и внедрение этапа селективного осаждения после инкубации коллагеназы с желатином. Метод валидирован на коммерческой коллагеназе *Clostridium histolyticum*. Показаны высокая чувствительность (предел обнаружения менее 0,1 УЕ/мл), линейность в широком диапазоне концентраций фермента и времени инкубации, хорошая воспроизводимость (коэффициенты вариации < 8%) и специфичность (полное ингибирование ЭДТА, оптимум активности в нейтрально-щелочной области). Метод предлагает эффективную альтернативу дорогостоящим подходам для рутинного скрининга и контроля активности коллагеназ.

Ключевые слова: коллагеназа, ферментативная активность, желатин, спектрофотометрия, Кумасси Бриллиантовый Синий G-250, метод Брэдфорда, оптимизация метода, валидация метода.

EVALUATION OF COLLAGENASE ACTIVITY *IN VITRO* USING A MODIFIED GELATIN-BASED SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

Research article

Polyakova A.O.^{1,*}¹ ORCID : 0009-0004-3553-5926;¹ Pushkin Leningrad State University, Pushkin, Russian Federation

* Corresponding author (anapolyakovaa[at]gmail.com)

Abstract

Collagenase is a key enzyme of collagen degradation that plays an important role in physiological and pathological processes. Existing methods for estimating its activity are often characterized by high cost, complexity or insufficient selectivity. This work presents a developed cost-effective and reproducible spectrophotometric method for the determination of collagenase activity based on gelatin hydrolysis and colorimetric detection of reaction products with Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG). The key scientific achievement and novelty of the presented work is the development and implementation of a selective precipitation step after incubation of collagenase with gelatin. The method has been validated on commercial *Clostridium histolyticum* collagenase. High sensitivity (detection limit less than 0,1 UU/mL), linearity over a wide range of enzyme concentrations and incubation times, good reproducibility (coefficients of variation < 8%) and specificity (complete inhibition by EDTA, activity optimum in the neutral-alkaline region) were demonstrated. The method offers an effective alternative to expensive approaches for routine screening and monitoring of collagenase activity.

Keywords: collagenase, enzymatic activity, gelatin, spectrophotometry, Coomassie Brilliant Blue G-250, Bradford's technique, method optimization, method validation.

Введение

Коллагеназы (ММП-1, -8, -13, бактериальные) представляют семейство Zn^{2+} -зависимых металлопротеиназ, специфически гидролизующих коллаген [1]. Мониторинг их активности критически важен для фундаментальных и прикладных исследований в биохимии, медицине и биотехнологии [2].

Существующие методы имеют ограничения:

1. Нингидриновый метод: трудоемок, недостаточно специфичен, чувствителен к мешающим факторам [3], [4].
2. Метод с окрашенным коллагеном: требует специализированного субстрата, при этом введение красителя может влиять на свойства субстрата или активность фермента, потенциально искажая результаты [5].
3. Метод Мандла: крайне длителен, малоприменим для кинетических исследований [6], [7].
4. Методы с синтетическими субстратами: обеспечивают высокую чувствительность и скорость, но используют дорогостоящие пептиды, не всегда корректно отражающие гидролиз нативного коллагена [8], [9].

Цель данной работы — разработка простого, экономичного и селективного спектрофотометрического метода оценки коллагеназной активности на основе гидролиза желатина. Научная новизна заключается в разработке и внедрении этапа селективного осаждения после инкубации коллагеназы с желатином. Эта процедура эффективно

решает проблему недостаточной селективности многих существующих методов, направленно удаляя негидролизированный субстрат и высокомолекулярные фрагменты (>10 кДа). В результате последующая колориметрическая детекция с использованием стандартного и доступного реагента Брэдфорда (CBBG) [10] специфично отражает количество образовавшихся низкомолекулярных пептидов — прямых продуктов коллагеназного гидролиза.

Материалы и принципы исследования

2.1. Реактивы и оборудование

Использовали коммерческую коллагеназу типа I (*Clostridium histolyticum*), высокоочищенный желатин, Кумасси Бриллиантовый Синий G-250 (CBBG), бычий сывороточный альбумин (БСА), ЭДТА, 1,10-фенантролин, трипсин. Приготовление растворов: стандартный раствор БСА (1 мг/мл), буферные системы (Трис-HCl, 50 мМ, pH 7,5, с CaCl_2 и NaCl).

Оборудование: спектрофотометр с детекцией при 595 нм, охлаждаемая центрифуга, термостатируемый шейкер, pH-метр, дозаторы.

2.2. Протокол определения коллагеназной активности

Принцип метода: основан на колориметрическом определении (CBBG, 595 нм) низкомолекулярных пептидов, образующихся при гидролизе желатина коллагеназой. После инкубации фермента с субстратом проводится селективное осаждение негидролизованного желатина и высокомолекулярных фракций (>10 кДа) с помощью кислоты и охлаждения. Супернатант, содержащий целевые продукты гидролиза, подвергается колориметрии.

Процедура анализа ($n \geq 3$):

1. **Реакционная смесь:** в пробирки вносят стандартный объем раствора желатина (оптимальная концентрация установлена) в буфере (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, с ионами Ca^{2+} и Na^+), предварительно прогретый до 37°C .

2. **Запуск реакции:** добавляют раствор коллагеназы. Контроль — буфер.

3. **Инкубация:** строго контролируемое время при 37°C с перемешиванием.

4. **Остановка и осаждение:** добавляют охлажденный кислотный стоп-реагент. Тщательно перемешивают. Инкубируют на льду для завершения осаждения.

5. **Центрифугирование:** проводят при охлаждаемых условиях для осаждения нерастворимой фракции.

6. **Отбор супернатанта:** аккуратно переносят аликвоту прозрачного супернатанта.

7. **Колориметрия:** добавляют коммерческий реагент Брэдфорда (CBBG). Инкубируют. Измеряют ОП при 595 нм против контроля.

2.3. Построение калибровочной кривой и единицы активности

Строили калибровочную кривую по разведениям БСА (0–100 мкг/мл). Активность выражали в Условных Единицах (УЕ): 1 УЕ соответствовала активности, высвобождающей эквивалент 1 мкг БСА низкомолекулярных пептидов за время инкубации в стандартных условиях.

2.4. Валидационные испытания

Линейность по ферменту и времени: измеряли активность при варьировании концентрации фермента и времени инкубации.

Воспроизводимость: оценивали внутрисерийную и межсерийную вариабельность.

Предел обнаружения (LoD): рассчитывали на основе стандартного отклонения сигнала холостой пробы и наклона калибровочной кривой.

Влияние pH: измеряли активность в Трис буфере pH 4,0–10,0.

Специфичность/Ингибирование: испытывали ингибиторы металлопротеиназ (ЭДТА, 1,10-фенантролин) и влияние предварительного гидролиза субстрата трипсином.

Кинетика Михаэлиса-Ментен: определяли начальные скорости при разных концентрациях желатина.

Основные результаты

3.1. Валидация и оптимизация метода

Калибровочная кривая по БСА показала высокую линейность ($R^2 > 0,99$) в диапазоне 0–100 мкг БСА/мл.

Установлены оптимальные концентрации субстрата и компонентов буфера.

Установлена линейная зависимость активности коллагеназы (мкг БСА-экв.) от её концентрации в диапазоне 0,1–5,0 УЕ/мл с коэффициентом детерминации $R^2 > 0,99$. Линейный характер зависимости также подтвержден для времени инкубации до 90 минут (рис. 1).

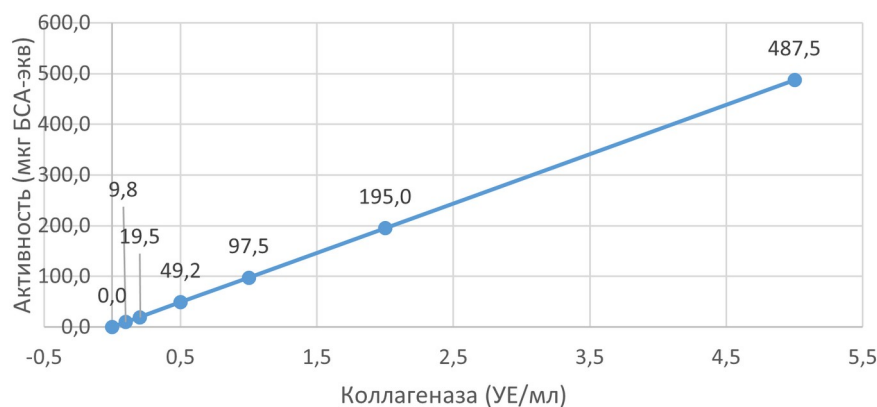


Рисунок 1 - Зависимость активности от концентрации коллагеназы

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2025.29.3.1>

Метод показал высокую воспроизводимость: внутрисерийный CV < 5%, межсерийный CV < 8% (табл. 1). Предел обнаружения (LoD) составил менее 0,1 УЕ/мл.

Таблица 1 - Воспроизводимость внутрисерийная и межсерийная

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2025.29.3.2>

Концентрация (УЕ/мл)	Внутрисерийная (n=6)		Межсерийная (n=3)	
	Среднее ± SD	CV%	Среднее ± SD	CV%
0,5	48,3 ± 1,9	3,9	47,5 ± 3,2	6,7
1,0	97,1 ± 3,7	3,8	95,8 ± 6,5	6,8
2,0	194,2 ± 7,8	4,0	190,5 ± 14,2	7,5

3.2. Влияние pH на активность

Коллагеназа проявляла выраженный оптимум активности в нейтрально-щелочной области (pH 7,0–8,0). Активность снижалась на >80% при pH < 6,0 и > 9,0 (рис. 2).

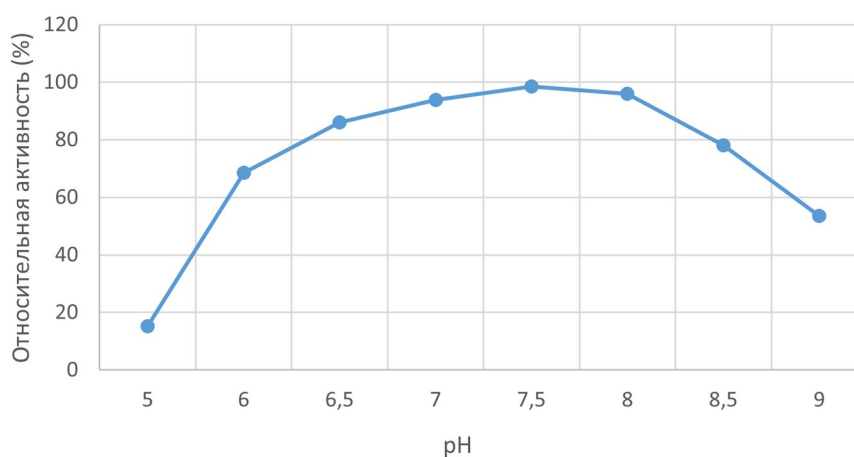


Рисунок 2 - Профиль зависимости pH

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2025.29.3.3>

3.3. Специфичность и ингибирование

Активность полностью подавлялась ЭДТА (5 мМ) и значительно ингибировалась 1,10-фенантролином (1 мМ), подтверждая Zn^{2+} -зависимость (рис. 3).

Предварительная обработка желатина трипсином не влияла на последующую детекцию продуктов коллагеназного гидролиза ($p > 0,05$).

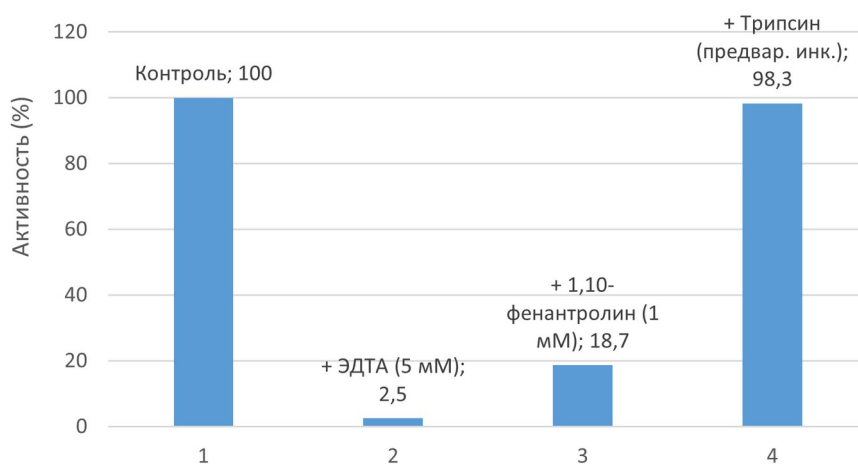


Рисунок 3 - Специфичность метода
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2025.29.3.4>

3.4. Кинетические параметры

- Определены параметры кинетики Михаэлиса-Ментен для гидролиза желатина. Значения K_m и V_{max} соответствовали литературным данным для данного типа фермента и субстрата (рис. 4).
- Высокое значение константы специфичности подтвердило высокую каталитическую эффективность исследуемой коллагеназы в гидролизе желатина в рамках разработанного метода.

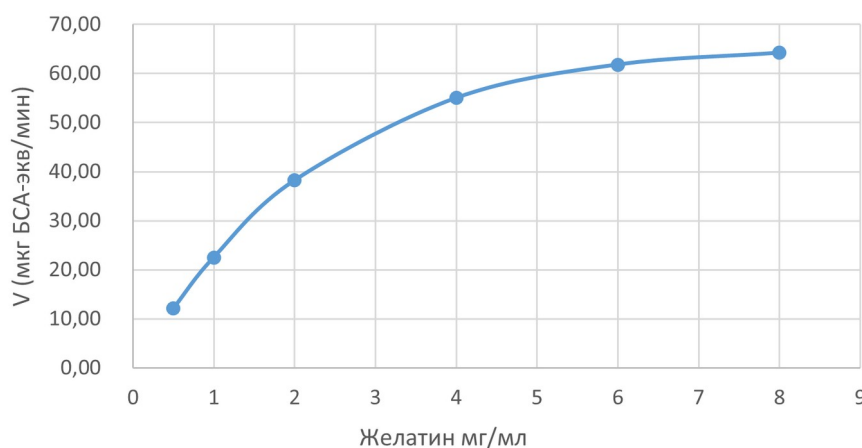


Рисунок 4 - Кинетика фермента
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2025.29.3.5>

Обсуждение

Разработанный метод сочетает простоту, экономичность и высокую аналитическую эффективность.

Основные преимущества:

1. Селективность: оптимизированная процедура осаждения является ключевым элементом, обеспечивающим детекцию преимущественно низкомолекулярных продуктов гидролиза, специфичных для действия коллагеназы на желатин. Это принципиальное отличие от методов, детектирующих общую растворимую фракцию [5].
 2. Экономичность: использование доступного желатина и стандартного реагента Брэдфорда существенно снижает стоимость анализа по сравнению с методами на синтетических субстратах.
 3. Простота и скорость: протокол не требует сложных манипуляций и может быть выполнен в стандартной лаборатории.
 4. Валидированность: метод продемонстрировал отличные аналитические характеристики (чувствительность, линейность, воспроизводимость), соответствующие требованиям количественного анализа. Полученный LoD сопоставим или лучше многих альтернативных спектрофотометрических подходов [3], [5], [8].
 5. Специфичность: полное ингибирование хелаторами металлов и корректный pH-профиль подтверждают регистрацию именно металлопротеиназной (коллагеназной) активности.
- Сравнительная оценка (табл. 2): метод выгодно отличается от аналогов по совокупности критериев: стоимости, селективности к низкомолекулярным продуктам, времени анализа и применимости для рутинного использования.

Таблица 2 - Сравнительная характеристика методов определения коллагеназной активности

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2025.29.3.6>

Параметр	Разработанный метод	Нингидриновый	Метод Мандла	Синтетические субстраты
Время анализа	120 мин	>180 мин	24-48 ч	30 мин
Стоимость	Низкая	Средняя	Низкая	Очень высокая
LoD (УЕ/мл)	0,1	1,0	–	0,05
Селективность	Высокая	Низкая	Умеренная	Высокая

Ограничения: как и в других методах, использующих белковые субстраты, сигнал может регистрировать вклад неспецифических протеаз в сложных образцах. Для таких случаев рекомендована предварительная очистка или использование специфических ингибиторов.

Области применения:

- Контроля активности препаратов коллагеназы.
- Скрининга ингибиторов/активаторов металлопротеиназ.
- Кинетических исследований фермента.
- Стандартизации методик в биотехнологии.

Заключение

Разработан и валидирован новый спектрофотометрический метод оценки активности коллагеназы на основе гидролиза желатина. Основное научное достижение — внедрение оптимизированной процедуры селективного осаждения после ферментативной реакции, обеспечивающей высокую специфичность детекции низкомолекулярных продуктов гидролиза с помощью красителя СВВГ.

Метод характеризуется:

- Простотой исполнения и доступностью реагентов.
- Высокой чувствительностью (LoD < 0,1 УЕ/мл) и воспроизводимостью (CV < 8%).
- Адекватной специфичностью к коллагеназной активности.
- Линейностью по концентрации фермента и времени.

Полученные кинетические параметры соответствуют природе фермента и субстрата. Преимущества метода перед аналогами — сочетание экономичности, селективности к целевым продуктам гидролиза и пригодности для рутинного использования — делают его ценным инструментом для научных и прикладных задач в области биохимии и биотехнологии.

Конфликт интересов

Не указан.

Conflict of Interest

None declared.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Laronha H. Challenges in Matrix Metalloproteinases Inhibition / H. Laronha, I. Carpinteiro, J. Portugal // *Biomolecules*. — 2020. — Vol. 10. — № 5. — 717 p. — DOI: 10.3390/BIOM10050717
2. Sahloli A.A. Production and Application of Microbial Collagenase / A.A. Sahloli, M.O. Alkattan, A.M. Baghdadi // *Current Science International*. — 2021. — Vol. 13. — № 2. — P. 30–42. — DOI: 10.36632/csi/2024.13.1.4.
3. Zhang Y. A straightforward ninhydrin-based method for collagenase activity and inhibitor screening of collagenase using spectrophotometry / Y. Zhang, Y. Fu, S. Zhou [et al.] // *Analytical Biochemistry*. — 2013. — Vol. 437. — № 1. — P. 46–48. — DOI: 10.1016/j.ab.2013.02.030.
4. Haeger G. A convenient ninhydrin assay in 96-well format for amino acid-releasing enzymes using an air-stable reagent / G. Haeger, J. Bongaerts, P. Siegert // *Analytical Biochemistry*. — 2022. — Vol. 654. — 114819 p. — DOI: 10.1016/j.ab.2022.114819. — EDN RYLZAD.
5. Трухин В.П. Способ получения окрашенного коллагена и определения активности коллагеназы : пат. 2709513 РФ, МПК51 C12N 9/50, C12N 9/00 / В.П. Трухин, Б.В. Москвичев, Е.Н. Жиренкина [и др.]; заявитель и патентообладатель СПбНИИВС ФМБА. — № 2019128081; заявл. 2019-09-05; опубл. 2019-12-18. — 13 с.
6. Voytsekhivska L. Quality Parameters of Collagen Containing Raw Materials and Courses of Their Use / L. Voytsekhivska, O. Franko, Y. Okhrimenko // *Food Engineering Food Technologies and Food Processes*. — 2020. — Vol. 27. — № 4. — P. 183–190. — DOI: 10.5281/ZENODO.4288320.
7. Mandl I. Peptides isolated from collagenase-collagen digests / I. Mandl, J. Manahan // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1961. — Vol. 4. — P. 368–372. — DOI: 10.1016/0006-291x(61)90220-0.

8. Сухих С.А. Изучение коллагеназной активности ферментов микробного, растительного и животного происхождения / С.А. Сухих, О.О. Бабиц, Е.В. Ульрих // *АгроЭкоИнженерия*. — 2021. — № 2 (107). — С. 142–148. — EDN PAUWDC.

9. Королева В.А. Оценка субстратной специфичности коллагеназы, свободной и иммобилизованной на матрице хитозана / В.А. Королева, Т.Н. Беляева, М.Г. Холявка [и др.] // *Вестник Воронежского государственного университета*. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2021. — № 1. — С. 108–113. — EDN ZEUYRQ.

10. Silvério S.C. Interference of Some Aqueous Two-Phase System Phase-Forming Components in Protein Determination by the Bradford Method / S.C. Silvério, S. Moreira, A.M. Milagres [et al.] // *Analytical Biochemistry*. — 2012. — Vol. 421. — № 2. — DOI: 10.1016/J.AB.2011.12.020.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Laronha H. Challenges in Matrix Metalloproteinases Inhibition / H. Laronha, I. Carpinteiro, J. Portugal // *Biomolecules*. — 2020. — Vol. 10. — № 5. — 717 p. — DOI: 10.3390/BIOM10050717

2. Sahloli A.A. Production and Application of Microbial Collagenase / A.A. Sahloli, M.O. Alkattan, A.M. Baghdadi // *Current Science International*. — 2021. — Vol. 13. — № 2. — P. 30–42. — DOI: 10.36632/csi/2024.13.1.4.

3. Zhang Y. A straightforward ninhydrin-based method for collagenase activity and inhibitor screening of collagenase using spectrophotometry / Y. Zhang, Y. Fu, S. Zhou [et al.] // *Analytical Biochemistry*. — 2013. — Vol. 437. — № 1. — P. 46–48. — DOI: 10.1016/j.ab.2013.02.030.

4. Haeger G. A convenient ninhydrin assay in 96-well format for amino acid-releasing enzymes using an air-stable reagent / G. Haeger, J. Bongaerts, P. Siegert // *Analytical Biochemistry*. — 2022. — Vol. 654. — 114819 p. — DOI: 10.1016/j.ab.2022.114819. — EDN RYLZAD.

5. Trukhin V.P. Sposob polucheniya okrashennogo kollagena i opredeleniya aktivnosti kollagenazi [Method for producing colored collagen and determining activity of collagenase] : pat. 2709513 Russian Federation, IPC51 C12N 9/50, C12N 9/00 / V.P. Trukhin, B.V. Moskvichev, E.N. Zhirenkina [et al.]; the applicant and the patentee SPbSRIVS FMBA. — № 2019128081; appl. 2019-09-05; publ. 2019-12-18. — 13 p. [in Russian]

6. Voytsekhivska L. Quality Parameters of Collagen Containing Raw Materials and Courses of Their Use / L. Voytsekhivska, O. Franko, Y. Okhrimenko // *Food Engineering Food Technologies and Food Processes*. — 2020. — Vol. 27. — № 4. — P. 183–190. — DOI: 10.5281/ZENODO.4288320.

7. Mandl I. Peptides isolated from collagenase-collagen digests / I. Mandl, J. Manahan // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1961. — Vol. 4. — P. 368–372. — DOI: 10.1016/0006-291x(61)90220-0.

8. Sukhikh S.A. Izuchenie kollagenaznoj aktivnosti fermentov mikrobnogo, rastitel'nogo i zhivotnogo proiskhozhdeniya [Study of collagenase activity of the microbial, plant, and animal enzymes – substantiation of the choice of enzymes for collagen-containing waste hydrolysis] / S.A. Sukhikh, O.O. Babich, E.V. Ulrikh // *AgroEkoInzheneriya [AgroEconomyEngineering]*. — 2021. — № 2 (107). — P. 142–148. — EDN PAUWDC. [in Russian]

9. Koroleva V.A. Ocenka substratnoj specifichnosti kollagenazy, svobodnoj i immobilizovannoj na matrice hitozana [Estimation of substrate specificity of free and immobilized on a chitosan matrix collagenase] / V.A. Koroleva, T.N. Belyaeva, M.G. Holyavka [et al.] // *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya [Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy]*. — 2021. — № 1. — P. 108–113. — EDN ZEUYRQ. [in Russian]

10. Silvério S.C. Interference of Some Aqueous Two-Phase System Phase-Forming Components in Protein Determination by the Bradford Method / S.C. Silvério, S. Moreira, A.M. Milagres [et al.] // *Analytical Biochemistry*. — 2012. — Vol. 421. — № 2. — DOI: 10.1016/J.AB.2011.12.020.