

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ ХИТОЗАНА ХИТИНОЛИТИЧЕСКИМИ ФЕРМЕНТАМИ АЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

*И.Р. Муллагалиев**, *Г.Э. Актуганов***, *А.И. Мелентьев***

*Институт органической химии УНЦ РАН, Уфа, E-mail: mullagal@anrb.ru

**Институт биологии УНЦ РАН, Уфа, E-mail: gleakt@anrb.ru

INVESTIGATION OF CHITOSAN DEPOLIMERIZATION BY CHITINOLYTIC ENZYMES FROM AEROBIC SPORE-FORMING BACTERIA

*I.R. Mullagaliev**, *G.E. Aktuganov***, *A.I. Melent'ev***

*Institute of Organic Chemistry of Ufa Research Center RAS, Ufa,
E-mail: mullagal@anrb.ru

**Institute of Biology of URC RAS, Ufa, E-mail: gleakt@anrb.ru

ABSTRACT

The optimal conditions were studied for enzymatic destruction of chitosan by chitinolytic complex from culture liquid of bacterial strains *Bacillus* sp. IB-522 and *B. circulans* IB-G2-P. Highest rate of chitosan degradation was observed in temperature interval between 50–60°C and pH 5,0–6,0. Maximal decline of molecular weight of chitosan occurred in initial step of reaction. Major products after 1 h of incubation at optimal conditions were oligosaccharides with Mw ~ 4–77 kDa (recovery 70–80%). Prolonged incubation (90 min) in same conditions resulted to formation of chitosan oligomers of Mw- 3.8–40 кДа and decreasing of its total recovery to 50–60%. The rate and scale of chitosan hydrolysis by enzymes considerably decreased at chitosan concentration in reaction mixture more than 5 mg/ml, what could be caused by diffusion character of the process. Comparative study of chitosan hydrolysis by these enzymes and studied earlier chitinolytic complex from *Bacillus* sp. 739 indicated similarity of conditions for optimal depolymerization of chitosan and recovery of oligomeric fractions for all three bacterial strains.

В настоящее время среди различных производных хитозана наибольший интерес представляют его низкомолекулярные водорастворимые формы, обладающие широким спектром биологической активности. Актуальной задачей современных исследований остается разработка способов получения качественных об-

разцов низкомолекулярного хитозана, сохраняющих исходную структуру функционального звена и биологическую активность. Одним из эффективных средств решения данной задачи может быть ферментативный гидролиз хитозана с помощью специфических и неспецифических ферментов [1]. В связи с этим большое значение приобретает поиск подходящих и недорогих ферментных препаратов, позволяющих целенаправленно осуществлять процесс деполимеризации хитозана.

Во многих работах, как правило, изучалась ферментативная деструкция хитозана со степенью деацетилирования (СД) 80–85%. Целью данного исследования была оценка возможности применения хитинолитических ферментов двух штаммов аэробных спорообразующих бактерий из коллекции Института биологии ИБ УНЦ РАН для получения низкомолекулярных аналогов из хитозана высокой степени деацетилирования. В работе использовали хитозан, полученный из панцирей дальневосточного краба, с молекулярной массой 240 кДа и степенью деацетилирования 95%. Количественное содержание аминокрупп определяли методами потенциометрического и кондуктометрического титрования.

Препараты хитинолитических ферментов выделяли, осаждая сульфатом аммония (65% масс.) из супернатанта культуральной жидкости исследуемых штаммов, выращенных в жидкой питательной среде, содержащей в качестве основных источников углерода коллоидные формы хитина и хитозана (0,5 и 0,25% (в/о), соответственно). Культивирование осуществляли в качалочных колбах при $36 \pm 1^\circ\text{C}$ и $160 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 72 ч. Хитозанолитическую активность внеклеточных ферментов оценивали по скорости образования свободного D-глюкозамина, $\text{мкМ} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ [2]. Деструкцию хитозана ферментами проводили в гомогенной кислой среде в присутствии уксусной кислоты при различных значениях pH и температуры, концентрации реагентов и времени инкубации. Реакцию останавливали добавлением раствора 1 M NaOH до pH 8,0–9,0 с последующим кипячением в водяной бане в течение 5 мин. Выпавшие в осадок олигомерные фракции хитозана отмывали дистиллированной водой, затем растворяли в минимальном объеме 1 M CH_3COOH и диализовали против воды в течение ночи. Пропускная способность диализных мембран не превышала 4 кДа. Молекулярную массу хитозана определяли вискозиметрически в натрийацетатном буфере (0,3 M уксусной кислоты, 0,2 M ацетата натрия, pH 4,5). Для расчета молекулярных масс использовали формулу Марка – Куна – Хаувинка: $[\eta] = K M^\alpha$ ($K = 0,082$, $\alpha = 0,76$) [3].

В настоящей работе нами были изучены особенности и условия оптимального протекания процесса деполимеризации хитозана (СД = 95%) хитинолитическими ферментами штаммов *Bacillus circulans* ИБ-С2-Р и *Bacillus* sp. ИБ-522. Оба штамма характеризовались различной способностью к синтезу комплекса внеклеточных гидролаз, участвующих в деградации кристаллического хитина и грибной биомассы. Известно, что многие микробные хитиназы активно расщепляют хитозан со степенью деацетилирования 50–85%. Ранее для получения водорастворимого хитозана с молекулярной массой 3–6 кДа был успешно применен комплекс ферментов штамма *Bacillus* sp. 739, не уступавший по эффективности хитиназам *Streptomyces kurssanovii* и *Serratia marcescens* [4]. Активность данного комплекса по отношению к хитозану была обусловлена в первую очередь присутствием в нем хитозаназ, поскольку экзохитиназы *Bacillus* sp. 739 хитозан (СД 85%) не гидролизуют [2]. В связи с перспективой применения бациллярных хитиназ в качестве альтернативы известным ферментным препаратам для получения низкомолекулярного хитозана нами были изучены хитинолитические ферменты двух новых штаммов аэробных спорообразующих бактерий, сравнимых по уровню активности с культурой *Bacillus* sp. 739. В работе сравнивали влияние основных физико-химических факторов инкубации на глубину и скорость деполимеризации хитозана ферментными препаратами штаммов *Bacillus circulans* ИБ-С2-Р и *Bacillus* sp. ИБ-522.

Как правило, бациллярные хитиназы наиболее активны при температуре $25\text{--}65^\circ\text{C}$ [4]. В связи с этим нами была рассмотрена кинетика деполимеризации хитозана в данном диапазоне значений. Концентрации субстрата (0,5 мг/мл) и фермента (4 ед/г хитозана), pH среды (5,2) были аналогичны подобранным ра-

нее при деполимеризации хитозана хитинолитическим комплексом *Bacillus* sp. 739 [5]. Скорость снижения относительной кинематической вязкости раствора хитозана возрастала с повышением температуры инкубации от 25 до 55°C. При 65°C эта величина существенно снижалась, вероятно, вследствие частичной инактивации ферментов (рис. 1). Непосредственная оценка зависимости молекулярной массы хитозана от времени инкубации показала сходные результаты. Максимальное снижение молекулярной массы хитозана происходило в первые минуты инкубации, через 30–40 мин скорость деполимеризации становилась незначительной, особенно для высоких температур. При повышении температуры реакционной среды от 25 до 55°C средневязкостная молекулярная масса основных продуктов снижалась от 77 до 4 кДа соответственно при общем выходе 70–80%. Более длительная инкубация (90 мин) в тех же условиях приводила к образованию олигомеров с молекулярными массами от 40 до 3,8 кДа и снижением их общего выхода до 50–60%. Дополнительные эксперименты показали, что при комнатной температуре хитинолитический комплекс *B. circulans* ИБ-G2-P работает сутки и более, приводя к образованию продуктов, полностью проходящих через диализные мембраны, предположительно, мономеров и димеров хитозана. В случае хитинолитического комплекса *Bacillus* sp. ИБ-522 были отмечены несколько меньшие скорость и глубина гидролиза хитозана, тогда как общая картина кинетики деполимеризации при различных температурах была сходна с полученной для *B. circulans* ИБ-G2-P. Быстрое снижение молекулярной массы хитозана указывало на то, что, вероятнее всего, происходит не ступенчатая деполимеризация полисахарида, а случайный разрыв связей в макромолекулах, характерный для действия эндо-ферментов. Активность ферментов обоих штаммов, определенная по скорости освобождения восстанавливающих сахаров, также возрастала при повышении температуры инкубации в интервале 35–55°C. Например, для штамма *B. circulans* ИБ-G2-P в аналогичных условиях, хитозаназная активность составляла 2,4, 12,8 и 16,6 мкМ·мл⁻¹·мин⁻¹ при 35, 45 и 55°C соответственно.

Скорость снижения относительной кинематической вязкости раствора хитозана существенно возрастала с увеличением содержания фермента в реакционной смеси. Например, в условиях, отраженных на рис. 2, в течение 30 мин инкубации соотношениям фермент/субстрат, равным 0,4, 2,0, 4,0 и 8,0 ед/г хитозана соответствовали величины молекулярной массы продуктов гидролиза 67, 22, 12 и 8 кДа.

Сходные данные были получены для ферментов *Bacillus* sp. ИБ-522. В обоих случаях скорость и глубина деполимеризации увеличивались в меньшей степени по сравнению с концентрацией фермента, что может быть связано с диффузионными ограничениями процесса взаимодействия ферментов с макромолекулами хитозана. В то же время повышение концентрации хитозана в реакционной среде более 5 мг/мл приводило к снижению скорости его деполимеризации и более высоким молекулярным массам продуктов реакции. Это указывает, что при данных условиях ферментолит происходит, вероятнее всего, не в кинетической, а в диффузионной области. Возможной причиной, кроме упомянутых стерических факторов, является снижение “удельной” концентрации фермента по отношению к субстрату.

Известно, что для хитинолитического комплекса штамма *Bacillus* sp. 739 наибольшая скорость гидролиза хитозана и наименьшая масса получаемых при этом олигомеров наблюдались при pH 6,0 [5]. В случае исследуемых в настоящей работе ферментов кислотность реакционной среды варьировали в интервале pH 3,0–6,0. При pH 3,0 ферменты обоих штаммов были практически неактивны, некоторое снижение относительной кинематической вязкости полисахарида было связано, в большей степени, с его кислотным гидролизом. Повышение pH до 4,0 приводило к заметному ускорению деполимеризации хитозана. Дальнейшее повышение pH уже в меньшей степени активировало фермент, хотя и происходило увеличение скорости деградации полисахарида. Повышение pH реакционной смеси выше 6,0 являлось нецелесообразным ввиду перехода хитозана в гетерогенную фазу, что снижало скорость и глубину его деполимеризации. Оценка хи-

тозаназной активности по количеству восстанавливающих сахаров, образуемых при гидролизе хитозана, показала аналогичный характер влияния рН в интервале 3,0–6,0. Сравнение с использованным ранее штаммом *Bacillus* sp. 739 указывает на близость оптимальных условий процесса деполимеризации хитозана со степенью деацетилирования 95% в присутствии ферментов всех трех штаммов бацилл (таблица).

Выход и молекулярные массы олигомеров, образуемых при деполимеризации хитозана хитинолитическими ферментами различных штаммов бацилл

Штамм	Выход олигомеров, %	M_v , кДа	$[NH_2]$, %
ИБ-739	73,3	6100	95,1
ИБ-522	76,0	8000	94,2
ИБ-G2-P	77,8	4700	94,9

Примечание. Условия: 55°C; рН = 5,2; 1 ч; $[Ф]$ = 0,02 ед/мл; $[ХТЗ]$ = 5 мг/мл.

Таким образом, хитинолитические ферменты штаммов *B. circulans* ИБ-G2-P и *Bacillus* sp. ИБ-522 достаточно эффективно гидролизуют хитозан со степенью деацетилирования ~95% и могут быть рекомендованы для получения его олигомерных фракций с интервалом молекулярных масс 4–40 кДа.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Современные* перспективы в исследовании хитина и хитозана // Материалы Седьмой Международной конференции. М.: Изд-во ВНИРО. 2003. 452 с.
2. *Актуганов Г.Э., Широков А.В., Мелентьев А.И.* Выделение и свойства хитозаназы штамма *Bacillus* sp. 739 // Прикл. биохим. и микробиол. 2003. Т. 39, № 5. С. 536–541.
3. *Desbrieres J., Rinaudo M., Chtcheglova L.* Reversible thermothickening of aqueous solutions of poly-cations from natural origin // Macromol. Symp. 1997. V. 113. P. 135–149.
4. *Ильина А.В., Варламов В.П.* Энзимология синтеза и деградации хитина и хитозана // Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наука, 2002. С. 79–90.
5. *Ильина А.В., Варламов В.П., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э.* Деполимеризация хитозана хитинолитическим комплексом бактерии рода *Bacillus* sp. 739 // Прикл. биохим. и микробиол. 2001. Т. 37, № 2. С. 160–163.