

ОСОБЕННОСТИ БИОДЕГРАДАЦИИ ХИТИНА И ХИТОЗАНА
ПОЧВЕННЫМ МИКРОМИЦЕТОМ *PENICILLIUM GLABRUM* IB-37-2

Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Сафина В.Р.

Уфимский Институт биологии РАН, г. Уфа, gleakt@anrb.ru

Обнаружено, что штамм почвенного гриба *P. glabrum* IB-37-2, предварительно выделенный на среде с хитозаном (СД~85%), проявляет способность к интенсивному росту и быстрой деградации данного аминополисахарида при глубинном культивировании с активным перемешиванием. В аналогичных условиях гриб слабо гидролизует крабовый хитин, однако при этом он показывает сходный уровень продукции хитозан-деградирующих ферментов (1-1,5 ед/мл), как и в среде с хитозаном. Различная степень биodeградации хитина и хитозана штаммом *P. glabrum* IB-37-2 коррелирует с уровнем синтеза им хитиназ и хитозаназ. Гриб обнаруживает также способность к конститутивной продукции N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы. Данный фермент, вероятно, участвует в деградации обоих субстратов, поскольку его синтез существенно возрастает в присутствии коллоидного хитина. Выделенный гриб рассматривается как перспективный продуцент для биотехнологического получения хитозан-деградирующих ферментов и переработки хитин-содержащих отходов.

Хитин – один из наиболее распространенных биополимеров в природе, чья ежегодная мировая продукция составляет около 10^{10} - 10^{11} т [2]. Микробная деградация хитина, активно протекающая в водных и почвенных экосистемах, является важнейшим звеном глобального круговорота углерода и азота. Хитозан, представляющий собой частично или полностью деацетилированный сополимер хитина, состоящий преимущественно из остатков D-глюкозамина, в естественных условиях встречается значительно реже, однако, считается, что биodeградация этого полисахарида составляет один из путей в едином процессе природной трансформации хитина, включающем участие хитиназ, хитиндеацетилаз, хитозаназ и других ферментов [2, 7, 9]. Хитозан и его олигомеры могут образовываться как промежуточные продукты расщепления хитина, а также встречается в виде естественного субстрата в остатках мицелия мукоровых грибов, биомассы некоторых одноклеточных водорослей и покровных тканей насекомых [9]. Это обуславливает довольно широкую распространенность хитозаназ у почвенных микроорганизмов [7]. Одними из наиболее активных деструкторов хитина и хитозана являются микромицеты, в особенности, представители родов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* и др. [4, 7]. Некоторые виды характеризуются способностью к одновременной продукции хитиназ и хитозаназ, при этом синтез ферментов может носить как конститутивный, так и индуцибельный характер [4]. Хитин- и хитозан-деградирующие грибы, наряду с бактериями, могут найти широкое

применение в биоконверсии хитин-содержащих отходов переработки морепродуктов, в т.ч. для получения ферментных препаратов, биофунгицидов, хитоолигосахаридов и других биоактивных соединений [8]. В то же время, хитозаназы грибов изучены существенно меньше по сравнению с аналогичными ферментами бактерий. Целью настоящей работы была сравнительная оценка способности почвенного гриба *Penicillium glabrum* IB-37-2, а также его ферментного комплекса, осуществлять деградацию хитина и хитозана.

Объекты и методы исследований. Штамм *P. glabrum* IB-37-2 первоначально был выделен при 37°C и pH 4,0 из образца выщелоченного чернозема как активный деструктор хитозана. В дальнейшем гриб поддерживали при 28°C и pH 6,0 на картофельно-глюкозном агаре (КГА) или среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 , 1; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,5; NaNO_3 , 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2; CaCl_2 , 0,1; пептон, 3; дрожжевой экстракт, 1; кукурузный экстракт, 1; хитозан, 5; агар, 16. Хитозан стерилизовали отдельно от других компонентов среды. В работе использовали хитозан со степенью деацетилирования ~85% (“Sigma-Aldrich”). Динамику накопления биомассы гриба, синтеза ферментов и деградации хитина и хитозана изучали при его глубинном культивировании в жидких средах аналогичного состава с 0,5% коллоидного хитина и 0,5% хитозана, соответственно. Коллоидный хитин получали из очищенного крабового хитина («Биопрогресс») по модифицированному методу [6]. Культивирование осуществляли в течение 10 сут при 28°C и 220 об/мин на шейкере-инкубаторе Innova 40R. Степень деградации субстратов оценивали по убыли их сухого веса в % от исходного содержания. Хитиназную и хитозаназную активность гриба определяли методом, описанным в [3]. N-ацетил- β -D-глюкозаминидазную активность по скорости гидролиза 5 мМ п-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминида (“Sigma”) [1]. Эксперименты проводили в трехкратной повторности, статистическую обработку осуществляли с помощью программы ORIGIN SRO 7.0.

Результаты и обсуждение. Штамм *P. glabrum* IB-37-2, селективно выделенный из выщелоченного чернозема, характеризовался как преимущественный деструктор хитозана, осуществляющий быструю деградацию этого субстрата. Убыль хитозана уже в первые двое суток культивирования *P. glabrum* IB-37-2 достигала 50%, и к 4-м суткам субстрат исчерпывался почти полностью, тогда как эффективность конверсии хитина составляла менее половины в конце 10-суточного цикла культивирования (рисунок 1). В присутствии хитозана наблюдалось более быстрое и повышенное накопление грибной биомассы по сравнению с хитин-содержащей средой (рисунок 2, А, Б). Тем не менее, уровень продукции хитозан-деградирующих ферментов *P. glabrum* IB-37-2 был примерно одинаков в средах с обоими субстратами (рисунок 2, В). Замена хитозана коллоидным хитином не влияла на характер синтеза ферментов, - хитиназная

активность в культуральной среде оставалась на том же низком уровне при высокой хитозаназной активности (рисунок 2, В).

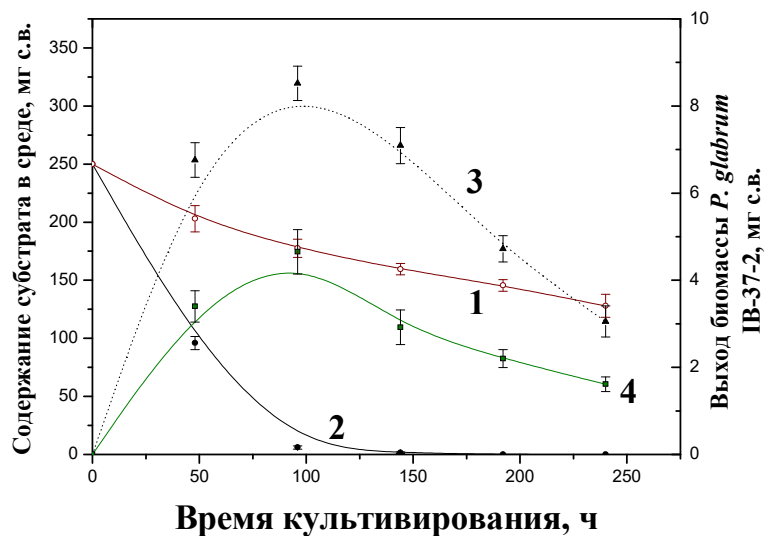


Рисунок 1 – Динамика деградации коллоидного хитина (1) и хитозана (2) штаммом *P. glabrum* IB-37-2, и накопление биомассы гриба при его глубинном культивировании в среде с хитином (3) и хитозаном (4)

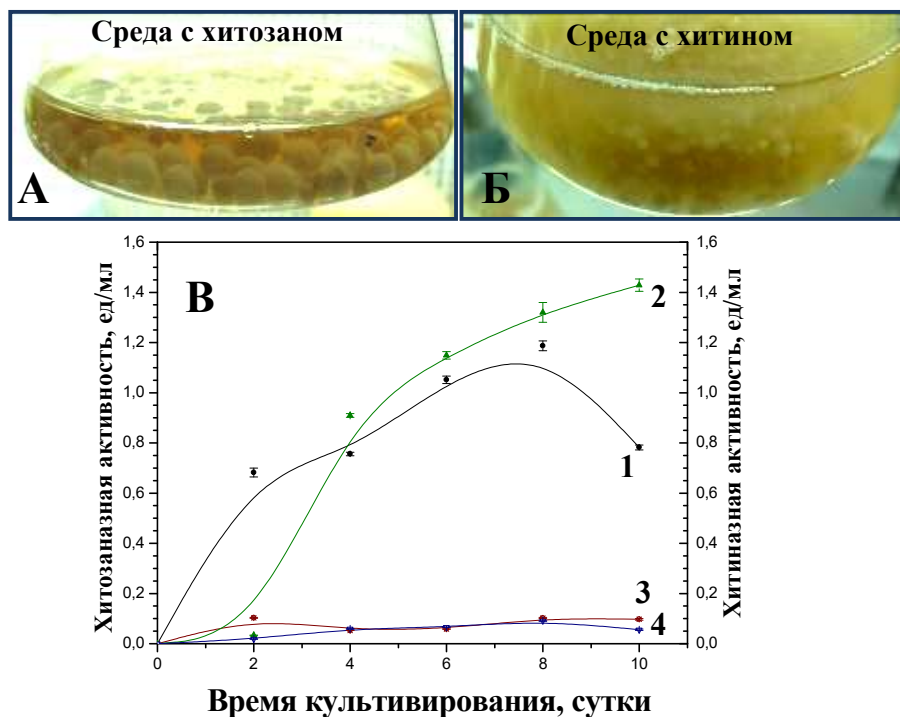


Рисунок 2 – Характер роста (А, Б) и динамика (В) хитозаназной (1, 2) и хитиназной (3, 4) активности (В) штамма *P. glabrum* IB-37-2 при глубинном культивировании в среде с хитозаном (1, 3) и коллоидным хитином (2, 4)

Таким образом, главной особенностью штамма *P. glabrum* IB-37-2 можно назвать его высокую хитозан-деградирующую активность при низком уровне деградации хитина. Эта специфика проявлялась и в интенсивности секреции грибом соответствующих ферментов, в том числе на среде с хитином. В этих условиях у гриба обнаруживалась также высокая N-ацетил- β -D-глюкозаминидазная активность (рисунок 3).

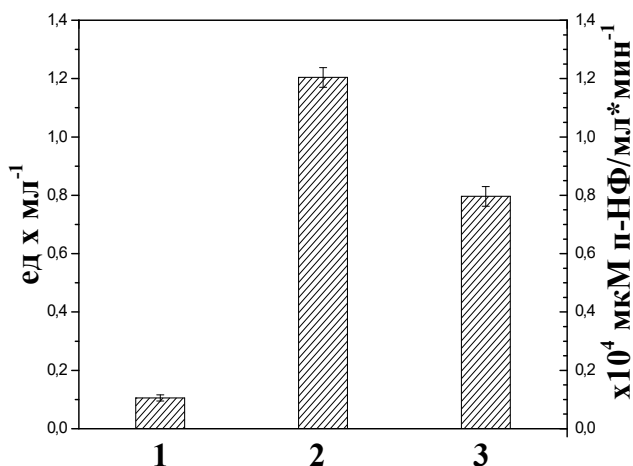


Рисунок 3 – Уровень продукции хитиназы (1), хитозаназы (2) и N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы (3) штаммом *P. glabrum* IB-37-2 в среде с коллоидным хитином (5-е сут)

Различие в хитозан- и хитин-деградирующей активности *P. glabrum* IB-37-2 подтверждалось действием его внеклеточного ферментного комплекса. Динамика расщепления хитозана ферментами гриба была значительно быстрее скорости ферментативной конверсии коллоидного хитина, при этом картина сравнительной деполимеризации обоих полисахаридов была одинаковой как при анализе скорости продуктов реакции, так и по оценке степени убыли субстрата (рисунок 4).

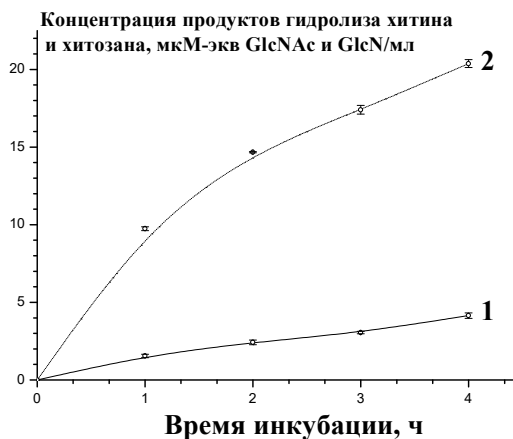


Рисунок 4 – Динамика деполимеризации коллоидного хитина (1) и хитозана (2) (5 мг/мл) ферментным комплексом *P. glabrum* IB-37-2, оцениваемая по накоплению продуктов расщепления

Полученные результаты показывают, что внеклеточный ферментный комплекс *P. glabrum* IB-37-2 представлен индуцибельными гидролазами, расщепляющими преимущественно хитозан, тогда как хитинолитическая активность гриба составляет не более 5-10% его хитозаназной активности. Незначительная деградация хитина грибом, по всей видимости, обусловлена его частичным гидролизом под действием хитозаназ и N-ацетил- β -D-глюкозаминидаз. Последний фермент синтезируется *P. glabrum* IB-37-2 конститутивно (данные не представлены), однако его продукция значительно возрастает в присутствии коллоидного хитина. Как известно, N-ацетил- β -D-глюкозаминидазы расщепляют хитиновые димеры до мономера, однако, некоторые из них могут действовать по экзо-механизму на более длинные олигомеры хитина, а также на сам хитин [5]. Способность *P. glabrum* IB-37-2 к активной продукции хитозаназ в присутствии хитина показывает перспективность применения этого штамма в биоконверсии хитин-содержащего сырья и получения ферментов для направленной деструкции хитозана.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ №16-14-00046.

Список литературы:

1. Актуганов, Г.Э. Хитинолитическая активность бактерий *Bacillus* Cohn – антагонистов фитопатогенных грибов / Г.Э. Актуганов, А.И. Мелентьев, Л.Ю. Кузьмина [и др.] // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 356-360.
2. Beyer S., Bertilsson S. Bacterial chitin degradation – mechanisms and ecophysiological strategies. Review // *Frontiers in Microbiology*. 2013. V. 4. P. 1-12: doi 10.3389/fmicb.2013.00149.
3. Helisto P., Aktuganov G., Galimzianova N., Melentjev A., Korpela T. Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: Isolation and purification of components // *J. Chrom. B Biomed Sci. Appl.* 2001. V. 758, No. 2. P. 197-205.
4. Jung W.-J., Park R.-D. Bioproduction of chitooligosaccharides. Review // *Mur. Drugs*. 2014. V. 12. P. 5328-5356.
5. Patil R.S., Ghormade V., Deshpande M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration // *Enzyme Microb. Technol.* 2000. V. 26. P. 473-483;
6. Rodriguez-Kabana R., Godoy G., Morgan-Jones G., Shelby R. The determination of soil chitinase activity: conditions for assay and ecological studies // *Plant and Soil*. 1983. V. 75. P. 95-106.
7. Thadathil N., Velappan S.P. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review // *Food Chem.* 2014. V. 150. P. 392-399.
8. Wang S.-L., Liang T.-W., Yen Y.-H.. Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. Review // *Carbohydr. Pol.* 2011. V. 84, No. 2. P. 732-742.

9. Zhao Y., Park R.-D., Muzzarelli R.A.A. Chitin Deacetylases: properties and applications. Review // Mur. Drugs. 2010. V. 8. P. 24-46.

**СОРБЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ХИТОЗАН-ГЛЮКАНОВЫМ
КОМПЛЕКСОМ ИЗ *ASPERGILLUS NIGER***

Буткевич Т.В., Сушинская Н.В., Курченко В.П.

Белорусский государственный университет, г. Минск, kurchenko@tut.by

*Предложена технология переработки мицелиальных отходов *Aspergillus niger*, получаемых при производстве лимонной кислоты. Исследованы сорбционные свойства выделенных хитина и хитозан-глюканового комплекса по отношению к тяжелым металлам: Cd, Co, Mn, Pb. Показана высокая эффективность использования полученных органических сорбентов.*

Введение. Техногенные нагрузки на окружающую среду привели к ее значительному загрязнению тяжелыми металлами, радионуклидами, нефтепродуктами и другими вредными для живой природы и человека веществами.

Особую опасность представляют тяжелые металлы, так как они не разлагаются и имеют тенденцию к накоплению. Они включаются в биологический круговорот веществ на длительные периоды времени. Природоохранные мероприятия не могут в полной мере защитить от губительного загрязнения тяжелыми металлами. Для их удаления необходимы активные действия на путях попадания их в организм человека. Особую опасность представляют такие металлы, как ртуть и кадмий, поскольку из биологических объектов они практически не выводятся. Не менее опасны и другие металлы: медь, никель, хром и цинк. Извлечение малых количеств этих металлов, концентрирование и дальнейшее безопасное хранение является сложной технологической задачей. Для ее реализации возможно использование сорбционных методов с использованием минеральных, синтетических и органических сорбентов [1].

Органические сорбенты обеспечивают эффективное компактирование металлов. Среди этих сорбентов особое место занимают природные полимеры, хитин и его производное - хитозан. Этот биополимер входит в состав экзоскелета членистоногих, клеточной стенки грибов, водорослей и др. Хитин представляет собой линейный полисахарид, состоящий из N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-Д-глюкопиранозы, связанной 1-4- гликозидными связями [2, 3].

Хитин нерастворим в воде, щелочах, разбавленных кислотах, спиртах, других органических растворителях, и растворим в концентрированных соляной, серной и муравьиной кислотах, а также в некоторых солевых