

## Очистка и характеристика внеклеточной экзо-хитозаназы почвенного гриба *Penicillium* sp. IB-37-2

Ю. Г. Богданова<sup>1</sup>, Ю. Я. Янгильдина<sup>2</sup>, Г. А. Терегулова<sup>3</sup>,  
Г. Э. Актуганов<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

<sup>2</sup>Уфимский государственный нефтяной технический университет

Россия, Республика Башкортостан, 450062 г. Уфа, улица. Космонавтов, 1.

<sup>3</sup>Уфимский институт биологии РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 69.

\*Email: gleakt@anrb.ru

Из культуральной среды хитозан-деградирующего гриба *Penicillium* sp. IB-37-2 выделена и охарактеризована новая экзо-хитозаназа с молекулярной массой 41 кДа. С помощью ультрафильтрации, аффинной адсорбции на хитозане и гидрофобной хроматографии достигнута 43-кратная очистка фермента. Изучены основные физико-химические и каталитические свойства хитозаназы.

**Ключевые слова:** хитозаназа, экзо-β-D-глюкозаминидаза, *Penicillium*, очистка.

Хитозан – линейный полисахарид, состоящий преимущественно из остатков D-глюкозамина, соединенных β-1,4-гликозидными связями, с некоторым содержанием N-ацетил-D-глюкозамина. Являясь частично или полностью деацетилированной формой хитина, природный хитозан обнаруживается только в качестве компонента клеточных стенок ограниченного ряда грибов [1]. В промышленных условиях хитозан получают щелочным деацетилированием хитина, выделяемого в основном из панцирь-содержащих отходов переработки крабов и креветок. Помимо самого хитозана, значительный интерес для медицины, сельского хозяйства и пищевой промышленности представляют водорастворимые хитоолигосахариды, обладающие множественной биологической активностью [2, 3]. Одним из эффективных способов получения хитоолигомеров с определенной молекулярной массой является ограниченная деполимеризация хитозана с помощью специфических ферментов – хитозаназ (КФ.3.2.1.132). Способность к синтезу хитозаназ достаточно широко распространена среди бактерий, при этом наиболее интенсивно исследованы, в т.ч. на структурном и молекулярном уровне, хитозаназы бацилл и стрептомицетов [1]. В значительно меньшей степени изучены грибные хитозаназы; если не принимать во внимание внутриклеточные ферменты, продуцируемые мукоровыми грибами, то среди продуцентов внеклеточных хитозаназ описаны представители грибов *Aspergillus*, *Gongronella*, *Trichoderma* и некоторые другие [1]. Большинство исследованных хитозаназ охарактеризованы как фер-

менты с эндо-механизмом действия, чья активность в высокой степени зависит от степени деацетилирования хитозана. Характеристика экзо-хитозаназ, называемых также экзо- $\beta$ -D-глюкозаминидазами (КФ 3.2.1.165), катализирующими последовательное отщепление мономерных звеньев D-глюкозамина с невосстанавливающего конца полимерной цепи молекул хитозана, до настоящего времени была проведена только у актиномицета *Nocardia orientalis* [4], а среди грибов – лишь у *Trichoderma reesei* [5].

Грибы рода *Penicillium* известны как один из наиболее перспективных источников физиологически активных метаболитов и ферментов [6]. Известны штаммы пенициллов, способные к синтезу внеклеточных хитозаназ [7]. Однако, до настоящего времени не были охарактеризованы представители этого рода, продуцирующие экзо-хитозаназы. Нами был выделен штамм гриба *Penicillium* sp. IB-37-2, показывающий необычную способность к активной деградации хитозана при слабой хитинолитической активности. Штамм активно рос и продуцировал хитозаназу в интервале pH от 3,0 до 7,0 и температуры 26-32°C, в присутствии коллоидного хитина как основного источника углерода. Было выявлено, что в жидкой среде *Penicillium* sp. IB-37-2 продуцирует комплекс хитозанолитических ферментов и N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазу, участвующие в совместной деградации хитозана и хитина. Цель настоящей работы состояла в выделении и характеристике основного фермента хитозаназного комплекса гриба *Penicillium* sp. IB-37-2.

Предварительное культивирование гриба проводили в жидкой среде следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{KNO}_3$ , 0.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.25;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.20; пептон ферментативный, 3.0; дрожжевой экстракт, 3.0; кукурузный экстракт, 3.0; хитин из панцирей краба (в коллоидной форме), 5.0, pH среды перед автоклавированием – 6.0-6.5. Культивирование проводили на шейкере-инкубаторе Innova 40R при 28°C и 200 об/мин в течение 6 суток. В конце ферментации биомассу гриба отделяли вакуумной фильтрацией на воронке Бюхнера. Осветленную культуральную среду концентрировали ультрафильтрацией на модуле VivaFlow 200 (“Sartorius”, Германия) с пределом отсечения 10 кДа. К полученному концентрату добавляли коллоидный хитозан в концентрации 5 мг/мл. Смесь инкубировали на холоду в течение 10-15 минут, после чего хитозан отделяли и дважды промывали от остатков неадсорбированных белков центрифугированием (20 мин при 5000 об/мин) в холодном фосфатно-цитратном буфере (25 мМ. pH 6.0). Далее хитозан суспендировали в том же буфере в объеме, составляющем 50% от первоначального объема концентрированного фермента, вносили в суспензию 0,01% азида натрия и инкубировали смесь в течение 24 ч при 37°C. Далее, освободившийся в результате гидролиза хитозана фермент центрифугировали для удаления остатков субстрата, к надосадочной жидкости добавляли 0.5 М сухого сульфата аммония и наносили полученный раствор на колонку (2,5×10 см) фенолсефарозы CL 4B (“Pharmacia”, Швеция), уравновешенной 50 мМ трис-HCl буфером (pH 7.50) с 0.5 М сульфата аммония. Фракции с хитозаназной активностью элюировали в

линейном градиенте снижения концентрации сульфата аммония (0.5-0 М), объединяли и использовали в дальнейших исследованиях. В результате комбинирования процедур аффинной сорбции и гидрофобной хроматографии достигалась эффективная очистка хитозаназы *Penicillium* sp. IB-37-2 (табл.1).

Таблица 1. Результаты очистки экзо-хитозаназы *Penicillium* sp. IB-37-2

Стадия очистки	Суммарная активность хитозаназы, ед	Суммарный белок, мг	Выход фермента, %	Степень очистки, раз
Фильтрат КЖ	55.648	460.6	100	1
Ультрафильтрация на VivaFlow 200	49.277	213.21	88.6	2.6
Аффинная адсорбция на коллоидном хитозане	24.86	90.8	44.7	2.3
Гидрофобная хроматография на фенил-сефарозе CL 4В	2.664	0.504	4.8	43.7

Денатурирующий электрофорез очищенного фермента в полиакриламидном геле показал присутствие преобладающего белка с молекулярной массой 41 кДа (рис. 1).

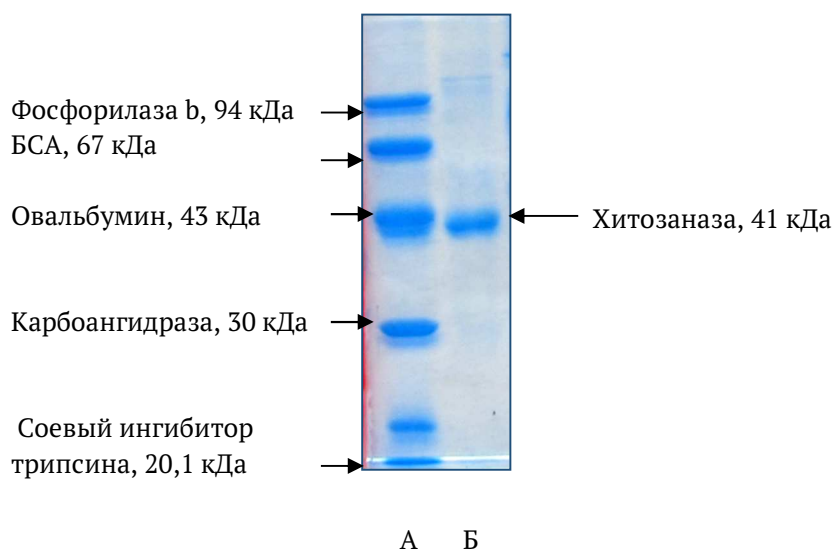


Рис. 1. Электрофорез очищенной хитозаназы *Penicillium* sp. IB-37-2 (Б) в 12.5%-ном ПААГ по Лэмли. А – маркеры молекулярной массы (“Bio-Rad”, США).

С помощью тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии установлено, что очищенная хитозаназа действовала на хитозан с образованием D-глюкозамина в качестве единственного продукта реакции в течение всего пери-

ода инкубации. Полученные данные свидетельствуют об исключительно экзо-механизме действия хитозаназы *Penicillium* sp. IB-37-2. При этом эффективность ферментативной конверсии субстрата достигала 80% после 4-часовой инкубации. Фермент демонстрировал ярко выраженный рН-оптимум в кислой области (рН 4.0), был стабильным в широком диапазоне рН, однако при рН>8.0 терял свыше 60% первоначальной активности. Температурный оптимум активности хитозаназы составлял 50-55°C, критичным рубежом для стабильности фермента являлась температура 65°C, при которой он практически полностью инактивировался в течение 60 мин инкубации.

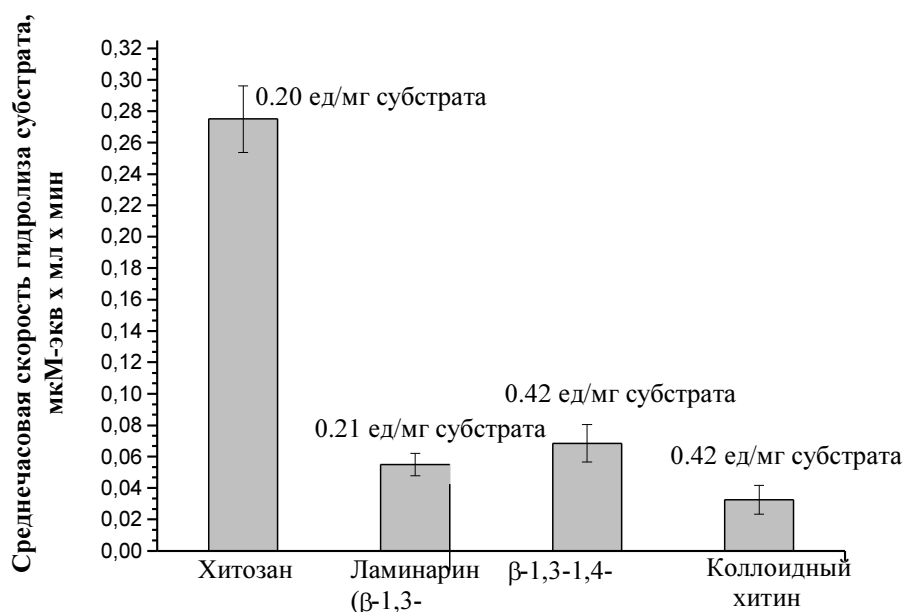


Рис. 2. Скорость гидролиза различных субстратов очищенной экзо-хитозаназой *Penicillium* sp. IB-37-2.

Экзо-хитозаназа *Penicillium* sp. IB-37-2 проявляла довольно широкую субстратную специфичность, с различной скоростью гидролизует некоторые β-глюканы и коллоидный хитин (рис. 2). Константы Микаэлиса хитозаназы *Penicillium* sp. IB-37-2 по растворимому и коллоидному хитозану составляли, соответственно, 0.83 и 3.29 мг/мл. Отмечена также способность фермента гидролизовать п-нитрофенил-N,N'-диацетил-β-D-хитобиозу, аналог хитоолигомера, состоящего из трех остатков N-ацетил-D-глюкозамина, что указывает на довольно низкую специфичность хитозаназы в отношении наличия N-ацетильных групп в гидролизуемой связи. Фермент полностью ингибировался ионами серебра ( $Ag^+$ ) и ртути ( $Hg^{2+}$ ), в присутствии 1 мМ концентраций солей этих металлов, умеренно ингибировался такими же концентрациями солей железа ( $Fe^{2+}$ ), меди ( $Cu^{2+}$ ) и цинка ( $Zn^{2+}$ ). Активация фермента отмечена в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  (10 мМ) и твина-80 (10 мМ). Фермент проявлял рост-ингибирующую активность в

отношении фитопатогенных микромицетов *Alternaria alternata*, *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium oxysporum* при концентрациях от 250 мкг/мл.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности биотехнологического использования гриба *Penicillium* sp. IB-37-2 в качестве продуцента хитозаназы для получения растворимых хитоолигомеров и D-глюкозамина.

### Литература

1. Thadathil N., Velappan S. P. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review // Food Chemistry. 2014. V. 150. Pp. 392-399.
2. Xia W., Liu P., Zhang J., Chen J. Biological activities of chitosan and chitoooligosaccharides // Food Hydrocolloids. 2011. V. 25. Pp. 170-179.
3. Aam B., Heggset E., Norberg A., Smrlie M., Vårum K., Eijsink G. Production of chitoooligosaccharides and their potential applications in medicine // Mar. Drugs. 2010. V. 8. Pp. 1482-1517.
4. Nanjo F., Katsumi R., Sakai K. Purification and characterization of exo- $\beta$ -D-glucosaminidase, a novel type of enzyme, from *Nocardia orientalis* // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. Pp. 10088-10094.
5. Nogawa M., Takahashi H., Hashiwagi A., Ohshima K., Okada H., Morikawa Y. Purification and characterization of exo- $\beta$ -D-glucosaminidase from a cellulolytic fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7 // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64, No. 3. Pp. 890-895.
6. Козловский А. Г., Желифонова В. П., Антипова Т. В. Грибы рода *Penicillium* как продуценты физиологически активных соединений. Обзор // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49, №1. С. 5-16.
7. Nguyen A. D., Huang C. -C., Liang T. -W., Nguyen V. B., Pan P. -S., Wang S. -L. Production and purification of a fungal chitosanase and chitoooligomers from *Penicillium janthinellum* D4 and discovery of the enzyme activators // Carbohydrate Polymers. 2014. V. 108. Pp. 331-337.

Статья рекомендована к печати кафедрой биохимии и биотехнологии БашГУ

## Purification and characterization of extracellular exo-chitosanase from soil fungus, *Penicillium* sp. IB-37-2

Yu. G. Bogdanova<sup>1</sup>, Yu. Ya. Yangildina<sup>2</sup>, G. A. Teregulova<sup>3</sup>,  
G. E. Aktuganov<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State University

32 Zaki Validi Street, 450074 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

<sup>2</sup>Ufa State Petroleum Technological University

1 Kosmonavtov Street, 450062 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

<sup>3</sup>*Ufa Institute of Biologys, Russian Academy of Sciences  
69 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*\*Email: gleakt@anrb.ru*

The novel exo-chitosanase with Mw 41 kDa was isolated from culture supernatant of chitosan-degrading fungus, *Penicillium* sp. IB-37-2 and characterized. Using the procedures of ultrafiltration, affinity adsorption and hydrophobic chromatography 43-fold purification of the enzyme was reached. The main physic-chemical and catalytic properties of the chitosanase were studied.

**Keywords:** chitosanase, exo- $\beta$ -D-glucosaminidase, *Penicillium*, purification.