

УДК 579.8

*К. И. Мубаракшина, Е. А. Бессолицына*

## **ОЦЕНКА ХИТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ ИЗОЛЯТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДЫ И ПОЧВЫ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

В настоящее время хитин и его производные активно используются в различных областях деятельности человека. Например, в медицине в виде пленок для пересадки искусственной кожи предлагается использовать хитозан или в качестве искусственных мембран для почек.

Превращение хитина в олигосахариды осуществляют специальные ферменты – хитиназы. Хитиназы обнаружены во многих организмах. У высших растений данный фермент выполняет защитную функцию, у насекомых и ракообразных активируется при линьке для гидролиза кутикулы при линьке, микроорганизмы продуцируют хитиназы для переваривания хитинсодержащего сырья.

В работе было проведено выделение бактерий-продуцентов хитиназ из почвы и воды Кировской области, изучены их культурально-морфологические свойства, проведена первичная идентификация, а также качественная и количественная оценка их хитиназной активности.

*Ключевые слова:* хитин, хитиназы, бактерии-продуценты хитиназ, выделение, изучение.

Хитин – полисахарид, образованный остатками аминсахара ацетилглюкозамина. Основной компонент наружного скелета (кутикулы) насекомых, ракообразных и других членистоногих. У грибов заменяет целлюлозу, с которой сходен по химическим и физическим свойствам и биологической роли. Интерес к разрушению хитина вызван по нескольким причинам. В первую очередь интерес вызывает проблема ферментативного гидролиза хитина и хитозана, поскольку в последнее время все более широкое практическое применение находят растворимые олигосахариды данных полимеров. Во-вторых, в хитинолитических ферментах и продуцирующих их микроорганизмах многие

исследователи видят естественное и эффективное средство борьбы с разнообразными паразитическими грибами и беспозвоночными, у которых хитин является важным структурным компонентом клеточной стенки и экзоскелета [1].

Гидролиз хитина осуществляют хитиназы. Хитиназы – это ферменты, катализирующие деградацию хитина, действующие наиболее часто как эндоферменты, отщепляя хитоолигосахариды длиной в 2-6 N-ацетилглюкозаминовых остатков.

Хитиназы обнаружены во многих организмах. В высших растениях хитиназы выполняют защитную функцию от различных патогенных грибов и паразитических насекомых, как и хитиназы у водорослей. Рыбы и млекопитающие также используют хитиназы для защиты. Хитиназы насекомых и ракообразных активизируются для гидролиза хитина кутикулы при линьке. Микроорганизмы продуцируют хитиназы для переваривания хитин-содержащего субстрата, грибы – для частичного гидролиза хитиновой клеточной стенки при клеточной пролиферации.

Многие виды бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Streptomyces* за счёт секреции хитиназ способны использовать хитин в качестве единственного источника углерода. Кроме того, продукция хитиназ многими организмами является важным защитным фактором против воздействия различных патогенных грибов и паразитических насекомых [2].

Нами уже были выделены изоляты бактерий-продуцентов хитиназы из различных источников, находящихся на территории Кировской области, проведена их первичная идентификация и качественная оценка хитиназной активности [3].

Таким образом, целью данной работы является количественная оценка хитиназной активности выбранных изолятов, а также выбор наиболее эффективного продуцента хитиназы.

Наиболее активными продуцентами хитиназы являются бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, поэтому для дальнейших исследований мы отбирали

только те изоляты, которые соответствовали культурально-морфологическим свойствам, характерным выбранным родам.

Материалом для исследования послужили изоляты, выделенные из проб почвы и воды из открытых водоемов Кировской области (г.Киров и Лебяжский район).

Для первичной идентификации изолятов использовали культуральные, морфологические, а также биохимические свойства. После первичной идентификации было предположено, что выбранные изоляты относятся к родам *Bacillus*, *Pseudomonas*. А именно, изоляты № № 4, 7, 57 отнесены к роду *Bacillus*, а № № 6 и 8 – к роду *Pseudomonas*; изоляты № № 4 и 7 отнесены к виду *Bacillus cereus*, а № 57 – к виду *Bacillus subtilis*.

Таким образом, из 57 исследованных изолятов было выбрано 6 для дальнейшей идентификации, изучения свойств, а также определения хитиназной активности.

Кроме первичной идентификации была качественно, а затем и количественно определена хитиназная активность изолятов.

Для качественной оценки хитиназной активности использовали жидкую питательную среду с добавлением хитина.

На рисунке 1 представлены пробирки, содержащие питательную среду с добавлением хитина, полученного из креветок, на 0 день культивирования. Каждые 5 дней на протяжении 20 суток кроме визуальной оценки разложения хитина проводились замеры рН среды, концентрации белка, а также измерение хитиназной активности. На 5 сутки наблюдался активный рост всех изолятов в виде помутнения среды, в некоторых случаях (изолят № 6) происходило образование осадка. Заметное разложение панциря креветки наблюдалось на 10 сутки у некоторых изолятов (№ № 2, 57).

На рисунке 2 представлены те же пробирки на 20 сутки культивирования. Полное разложение панциря наблюдается в пробирках, засеянных изолятами № № 4 и 7. В остальных пробирках отмечено помутнение среды, образо-

вание осадка, а также слабое разложение хитина. Таким образом, можно сделать вывод, что наиболее эффективными продуцентами хитиназы являются изоляты № 4 и № 7.

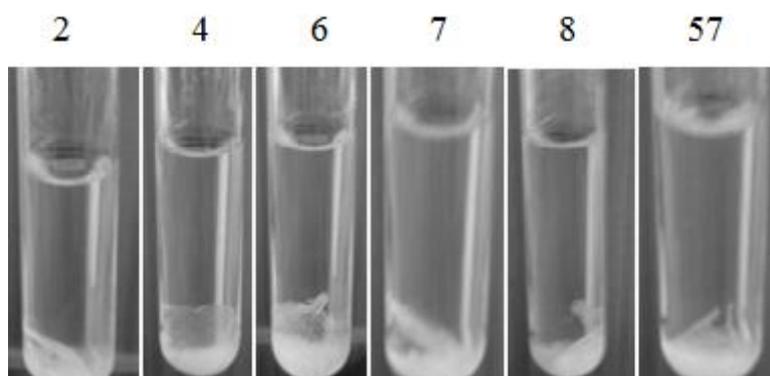


Рис. 1. Расщепление хитина выделенными изолятами в среде (0 день).

Номерами отмечены пробирки с номерами изолятов

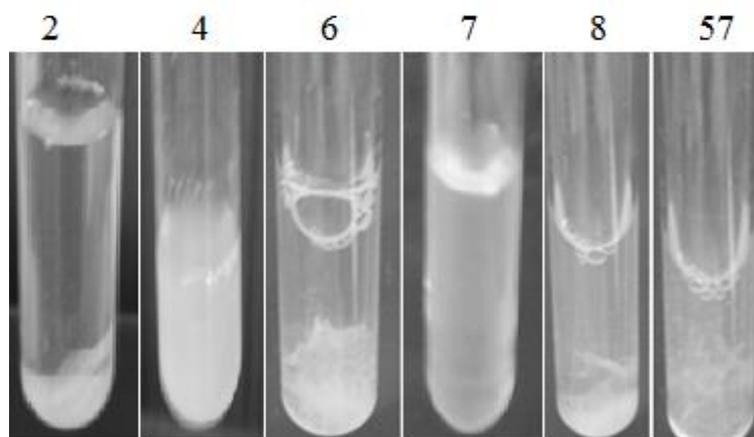


Рис. 2. Расщепление хитина выделенными изолятами в среде (20 день).

Номерами отмечены пробирки с номерами изолятов

Хитиназную активность, концентрацию белка и рН учитывали в динамике через 5, 10, 15 и 20 дней.

Измерение рН проводили потенциометрическим методом с помощью рН-метра. На рисунке 3 представлен график изменения рН в процессе культивирования выбранных изолятов. Как видно, в процессе культивирования значения рН возрастают.

## Биологические науки

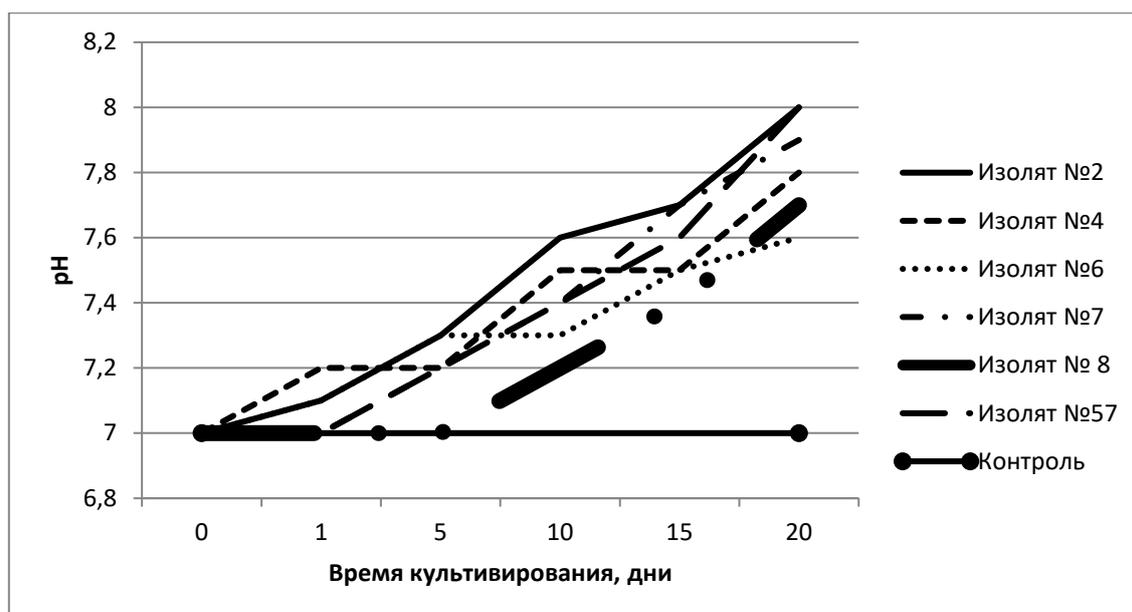


Рис. 3. Изменение pH в процессе культивирования бактерий продуцентов хитиназы

Определение белка в культуральной жидкости проводили с помощью биуретовой реакции, измеряя интенсивность окраски спектрофотометрически при длине волны 540 нм (рисунок 4). Увеличение концентрации белка в культуральной жидкости указывает на то, бактерии активно секретируют белок в питательную среду в том числе для утилизации продуктов гидролиза хитина.



Рис. 4. Изменение концентрации белка в процессе культивирования

Определение хитиназной активности проводили с помощью феррицианидного метода. После приготовления необходимых растворов хитиназную активность определяли с помощью колориметрического определения комплекса продуктов гидролиза хитина. За единицу активности принимали количество фермента, под действием которого образуется 1 мкМ N-ацетилглюкозамина в течение 1 часа в условиях реакции.

На рисунке 5 представлен график зависимости содержания N-ацетилглюкозамина от времени культивирования. На графиках видно, что активный биосинтез хитиназ начинается 10-15 сутки. Этот период также характеризуется максимальным содержанием редуцирующих сахаров и белка, что свидетельствует о высокой биосинтетической активности культуры.

Активность хитиназы выражают в единицах активности, содержащихся в 1,0 г (мл) источника фермента за 1 час инкубации при 37 °С [4].

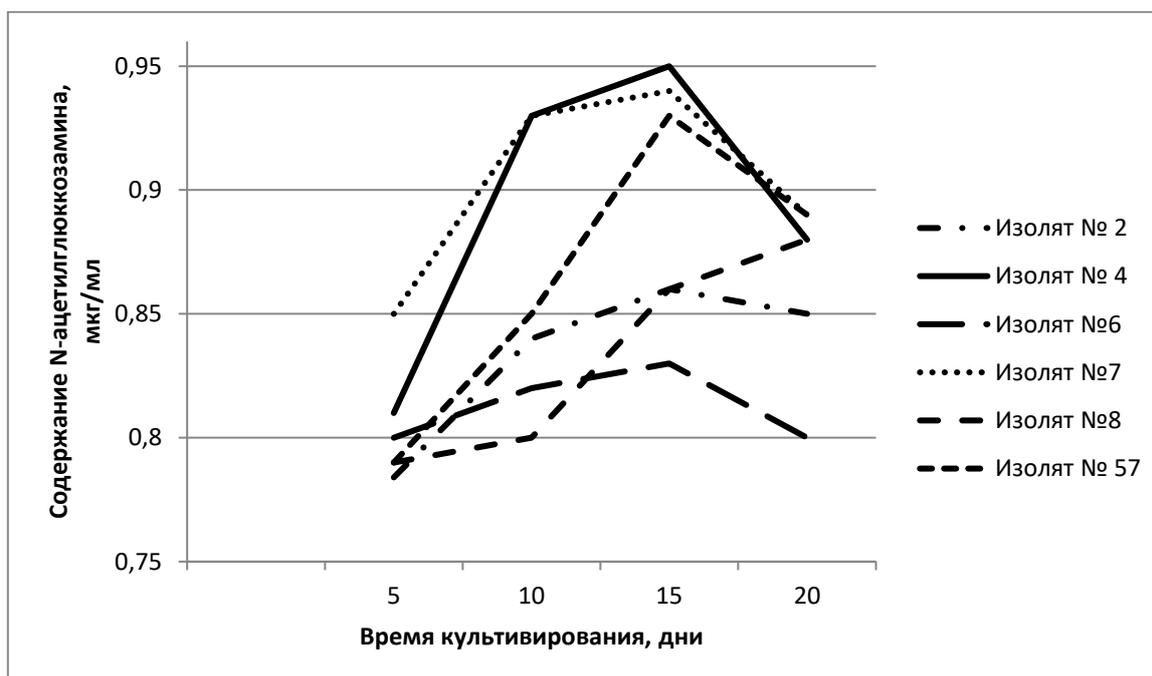


Рис. 5. Изменение хитиназной активности в процессе культивирования

Таким образом, в результате проведенных исследований были выделены изоляты бактерий-продуцентов хитиназы, проведена их первичная идентификация, а также качественная и количественная оценка хитиназной активности.

Из 57 исследованных изолятов 5 обладали хитиназной активностью. Наибольшей хитиназной активностью обладали два изолята – № № 4 и 7, которые по данным первичной идентификации были отнесены к роду *Vacillus*. Максимальная хитиназная активность у данных изолятов наблюдалась на 15 день и составила 0,95 ед/мл и 0,94 ед/мл соответственно.

### Список литературы

1. Журавлева Н. В. Хитинолитические ферменты: источники, характеристика и применение в биотехнологии // Вестник ДВО РАН. – 2004. – № 3. – С. 76–86.
2. Blackwell J. Biogenesis, structure and degradation. – N. Y. ; L. : Plenum press., 1982. – P. 403–428.
3. ОБЩЕСТВО, НАУКА, ИННОВАЦИИ (НПК – 2016) [Электронный ресурс] : Всероссий. ежегод. науч.-практ. конф. : сб. статей, 18–29 апреля 2016 г. / Вят. гос. ун-т. – Киров, 2016. – С. 192–198.
4. Yen M. T., Yang J. H., Mau J. L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells // Carbohydr. Polym. – 2009. – V. 75. – P. 15–21.

**МУБАРАКШИНА Ксения Игоревна** – магистрант кафедры микробиологии, Вятский государственный университет». 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: heavenly9@mail.ru

**БЕССОЛИЦЫНА Екатерина Андреевна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: bess2000@mail.ru