

## Обнаружение хитинолитической активности в пищеварительных органах гидробионтов Баренцева моря

К.С. Рысакова<sup>1,2</sup>, В.Ю. Новиков<sup>2</sup>, В.А. Мухин<sup>2</sup>, С.И. Овчинникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Биологический факультет МГТУ, кафедра биохимии

<sup>2</sup> Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н. М. Книповича (ПИНРО)

**Аннотация.** В работе исследуется специфическая хитинолитическая активность ферментных препаратов морских гидробионтов и использование этих препаратов для совершенствования технологии получения хитиновых веществ из панцирей ракообразных. Исследование хитиназной активности ферментных систем ракообразных и других морских организмов имеет большое значение для изучения биохимии и установления физиологического состояния организма. Хитиназы представляют интерес для технологии модификации хитина и хитозана с целью получения производных, в частности, олигосахаридов, проявляющих высокую фармацевтическую и биологическую активность.

**Abstract.** The paper considers the specific chitinolytic activity of the marine hydroinvertebrates' enzymes and use of these enzymes for perfection of technology of chitinous substance reception from crustaceans' armours. Research of chitinolytic activity of crustaceans and other marine organisms fermental systems has great value for studying biochemistry and organism physiological condition. The knowledge of chitinases is of great importance for technology of updating of chitin and chitosan for production of derivatives, in particular, oligosaccharides, showing high pharmaceutical and biological activity.

### 1. Введение

В пищеварительном тракте некоторых видов животных встречаются ферменты класса гидролаз, расщепляющие хитин – один из наиболее трудно гидролизуемых полисахаридов. У животных, питающихся организмами с хитиновым покровом, развилась хитинолитическая активность.

В природе может существовать два пути катаболизма хитина. Один путь хорошо изучен, определены микроорганизмы, использующие хитин, как источник энергии, углерода и азота, а также ферменты, принимающие участие в процессе. Этот путь заключается в расщеплении хитина под действием хитиназ первоначально до хитоолигосахаридов и далее до хитобиозы, с последующим превращением ее в N-ацетилглюкозамин в присутствии N-ацетил-β-глюкозаминидазы и в глюкозамин при действии N-ацетилглюкозаминидазы. Позднее был предложен второй, так называемый "хитозановый" путь ферментативной модификации хитина, начинающийся с процесса деацетилирования (Deshpande, 1986).

Хитиназа, расщепляющая гликозидные связи хитина, секретируется у многих видов рыб, рептилий, амфибий, птиц и у насекомыхных млекопитающих (Jeuniaux, 1993), встречается она также у различных ракообразных. Тот факт, что камчатский краб питается животными, имеющими хитиновый покров, привел нас к предположению, что в его пищеварительных железах содержатся ферменты, способные гидролизовать нативный хитин и, следовательно, снижать его молекулярную массу (ММ), а также ММ полученного из него хитозана. Многочисленные работы, посвященные изучению ферментов гепатопанкреаса камчатского краба, касаются, главным образом, протеиназ. В последние годы исследования ферментативного гидролиза хитина и хитозана получили заметное развитие в связи с разработкой лекарственных препаратов на основе олиго- и моносахаридов хитина и хитозана, а также способов их получения при утилизации отходов переработки ракообразных.

Цель настоящей работы состояла в обнаружении и сравнении хитиназной активности в пищеварительных органах представителей различных таксонов морских беспозвоночных, а также в изучении зависимости хитиназной активности от различных условий: времени инкубации, температуры инкубации фермента, pH раствора субстрата (хитина), концентрации раствора фермента – на примере ферментного препарата, полученного из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*., а также в обнаружении зависимости активности ферментов от доли ацетилированных остатков и в выявлении изменения молекулярной массы хитозана с различной степенью деацетилирования после проведения ферментативного гидролиза.

## 2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись ракообразные (акклиматизированный камчатский краб *Paralithodes camtschaticus*), моллюски (трубач *Buccinum undatum*, серрипес *Serripes groenlandicus*), иглокожие (кукумария *Cucumaria frondosa*, морская звезда *Asterias rubens*).

Выбор объектов исследований был обусловлен значительными биологическими запасами этих видов животных в Баренцевом море и недостаточным развитием рациональных технологий их переработки.

Одним из общепринятых и наиболее доступных способов получения комплексных ферментных препаратов является обработка сырья ацетоном, т.е. получение ацетонового порошка (АП) (Сахаров и др., 1988). Путем обезжиривания и обезвоживания чистым холодным ацетоном в соотношении 1:10 для дальнейшей оценки хитиназной активности нами были получены АП из пищеварительных органов различных морских беспозвоночных.

При определении хитиназной активности в качестве субстрата использовали коллоидный хитин, полученный путем переосаждения креветочного хитина в концентрированной соляной кислоте. Для сравнения использовали ферментный препарат (ФП) из гепатопанкреаса камчатского краба, полученный нами по разработанной ранее схеме.

Эндохитиназную активность оценивали по уменьшению оптического поглощения суспензии коллоидного хитина после инкубации при 37°C в течение 30 мин (Declaire et al., 1996). Оптическую плотность суспензии измеряли при 700 нм до начала инкубации ( $D_{700(0)}$ ) и после ( $D_{700(30)}$ ). Эндохитиназную активность ( $U_{endo}$ ) определяли в процентах уменьшения оптической плотности.

Экзохитиназную активность ( $U_{exo}$ ) рассчитывали по выходу образующегося при гидролизе хитина N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). Содержание GlcNAc определяли в растворе гидролизата после центрифугирования по реакции с 4-диметиламинобензальдегидом.

## 3. Результаты и их обсуждение

### 3.1. Хитиноподобная активность ферментов морских беспозвоночных

В результате исследований была определена и сравнена активность морских беспозвоночных. Обнаружена, в той или иной степени, экзо- и эндохитиназная активность в АП, полученных из пищеварительных органов всех исследуемых объектов. Из полученных данных (табл. 1) и графика (рис. 1) видно, что наибольшая хитиноподобная активность получена в ферментных препаратах, полученных из камчатского краба и морской звезды. Вероятнее всего, это связано с объектами питания данных беспозвоночных.

Пищевой спектр камчатского краба, по данным ПИПРО, достаточно разнообразен (Мухин, Новиков, 2002; Манушин, 2001). В пище краба по массе преобладают иглокожие, особенно морские звезды (от 32 % от массы всей пищи весной до 55 % осенью). Только 4.5 % исследованных крабов питаются икрой рыб, и то лишь весной. Количественно же этот вид корма незначим в питании камчатского краба в Баренцевом море. Краб утилизирует бентос, преимущественно малоиспользуемый рыбами, отходы промысла, и сам является объектом питания (Герасимова, Кочанов, 1997). Большинство морских звезд – хищники, питающиеся главным образом моллюсками, мелкими ракообразными и другими беспозвоночными.

Доля ракообразных с хитиновым покровом в пищевом рационе камчатского краба и морской звезды значительно выше, чем в рационе кукумарии, трубача и серрипеса, питающихся в основном путем фильтрации морской воды. Вероятно, именно этим и объясняется повышенная хитиназная активность в пищеварительных органах этих хищных беспозвоночных, необходимая им для полного переваривания своих жертв и для лучшего усвоения питательных веществ.

Следует отметить, что, соотношение между экзо- и эндохитиназной активностью в исследованных препаратах сравнимо и имеет один порядок, за исключением АП из морской звезды, в котором обнаружена аномально высокая активность эндохитиназ (табл. 1).

Значительное различие в соотношении экзо- и эндохитиназной активности ферментов краба и морской звезды объясняется, по-видимому, тем, что краб использует продукты гидролиза хитина для построения собственного панциря, поэтому гидролиз обеспечивает получение легко усваиваемого ацетилглюкозамина. Морская звезда во время пищеварительного акта, вероятно, лишь разрушает хитин, что обеспечивает ей доступность белковой составляющей своих жертв, а для этого не требуется разложение хитина до мономеров, т.е. высокой экзохитиназной активности.

Таким образом, мы показали присутствие хитиназной активности в пищеварительных органах морских беспозвоночных различных таксонов, наличие которой можно рассматривать как эволюционную адаптацию. Решающую роль на соотношение эндо- и экзохитиназной активности, по-видимому, играет трофическая специализация организмов.

Таблица 1. Хитиноподобная ( $U_{endo}$ ,  $U_{exo}$ ) активность ферментных препаратов из гепатопанкреаса морских беспозвоночных

Объект	$U_{endo}$	$U_{exo}$	$U_{exo}/U_{endo}$
Серрипес <i>Serripes groenlandicus</i> (АП)	0.836	0.198	0.237
Трубач <i>Buccinum undatum</i> (АП)	0.409	0.352	0.861
Кукумария <i>Cucumaria frondosa</i> (АП)	0.346	0.077	0.223
Морская звезда <i>Asterias rubens</i> (АП)	14.544	0.091	0.0063
Краб <i>Paralithodes camtschaticus</i> (АП)	4.324	1.825	0.422
Краб <i>Paralithodes camtschaticus</i> (ФП)	9.277	3.866	0.417

АП – ацетонный порошок, полученный путем обезжиривания и обезвоживания пищеварительных органов беспозвоночных; ФП – ферментный препарат из гепатопанкреаса краба, полученный по технологии (Мухин, Новиков, 2002).

### 3.2. Свойства хитиноподобных ферментов краба

Подробное исследование специфической хитиноподобной активности провели на примере ферментного препарата, полученного из гепатопанкреаса камчатского краба. Инкубацию ферментов и субстрата проводили в водяном термостате при температуре 37°C, за исключением случая изучения температурной зависимости. Были получены зависимости активности ферментов от времени инкубации, температуры инкубации, концентрации фермента и pH рабочего раствора.

#### Зависимость от продолжительности инкубации

График зависимости активности от времени инкубации имеет обычную для ферментативных реакций форму (рис. 1а). Графики эндо- и экзохитиназной зависимости практически совпадают при соответствующих масштабах осей ординат.

Преобразование графиков к полулогарифмическим осям (рис. 1б) показывает, что они могут быть представлены линейными трендами. Полученная зависимость указывает на первый (или псевдопервый) порядок ферментативной реакции гидролиза хитина.

Преобразование к линейной зависимости, исходя из предположения о первом (псевдопервом) порядке реакции, показано на рис. 2 (Шмид, Сапунов, 1985). Константы реакций первого порядка составили для эндохитиназной активности  $k = 0.0337 \text{ мин}^{-1}$ , для экзохитиназной активности  $k = 0.0978 \text{ мин}^{-1}$ .

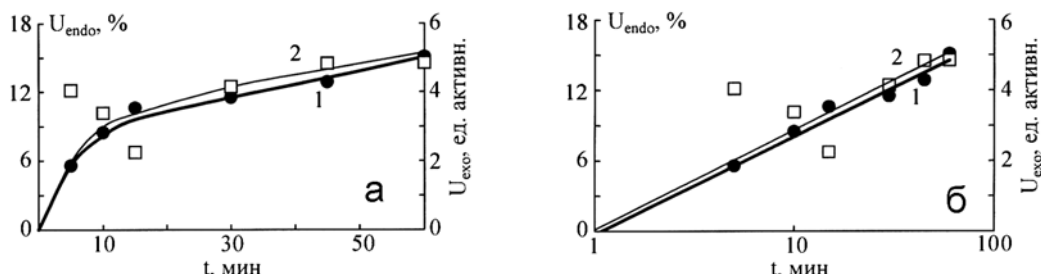
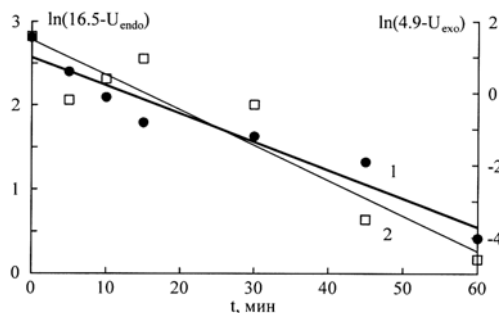


Рис. 1. Зависимость активности фермента от времени инкубации: а – в линейных координатах, б – в полулогарифмических. 1 – эндохитиназная активность, 2 – экзохитиназная активность.

Рис. 2. Преобразование кинетических кривых к линейному виду, исходя из предположения о первом порядке реакции.

1 – эндохитиназная активность  $\ln(16.5 - U_{endo})$ ;  
2 – экзохитиназная активность  $\ln(4.9 - U_{exo})$ .



#### Зависимость активности от температуры

Скорость ферментативной реакции, как и почти любого другого химического процесса, повышается обычно в 1.5-2.2 раза с повышением температуры на 10°C (среднее значение 1.8). Однако за

то время, которое необходимо для определения ферментативной активности, часть фермента денатурирует при высокой температуре, так что повышение температуры приведет, в конечном счете, к снижению скорости реакции (Скоупс, 1985).

На рис. 3 приведены графики температурной зависимости эндо- и экзохитиназной активности. Наблюдаемые оптимумы, по-видимому, совпадают, хотя скорость дезактивации экзохитиназной активности заметно больше, чем таковая для эндохитиназной активности. Оптимальной температурой в обоих случаях является 36.5-37.0°C.

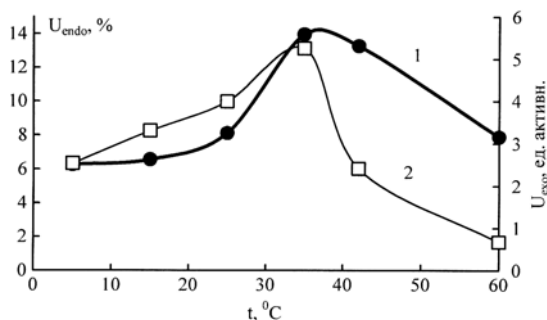


Рис. 3. Зависимость активности фермента от температуры инкубации.

1 – эндохитиназная активность, %, 2 – экзохитиназная активность, ед. активн.

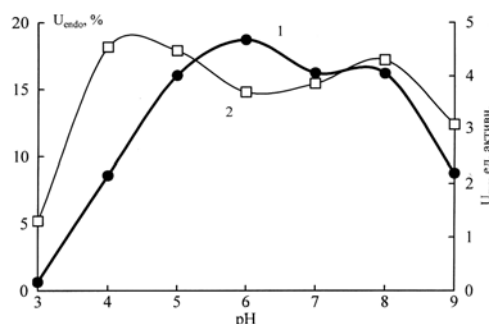


Рис. 4. Зависимость активности фермента от pH раствора хитина.

### Зависимость ферментативной активности от pH

Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации водородных ионов, и часто эта зависимость выражается кривой с максимумом или максимумами. Причина такой зависимости заключается в наличии в молекуле белка-фермента кислых и основных функциональных групп. С энзимологической точки зрения оптимум pH определяют как значение pH (или интервал значений pH), при котором достигается максимальная активность (максимальная величина скорости реакции).

Из данных, приведенных на графике (рис. 4), можно видеть, что зависимости эндо- и экзохитиназной активности от pH имеют по два максимума. При этом второй максимум в щелочной области, по-видимому, совпадает и лежит около 8.0. Первые максимумы не совпадают. Для эндохитиназной активности оптимум pH близок к 6.0, а для экзохитиназной активности сдвинут в кислую область – около 4.3. Обнаруженное отличие позволяет считать, что за эти два вида активностей, отвечают различные ферменты.

### Зависимость активности от концентрации ферментного препарата

На рис. 5 изображены зависимости эндо- и экзохитиназной активности от концентрации ферментного препарата.

Наблюдаемое различие формы кривых, вероятно, подтверждает предположение о существовании различных ферментов, отвечающих за эти два вида специфической активности ферментного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба.

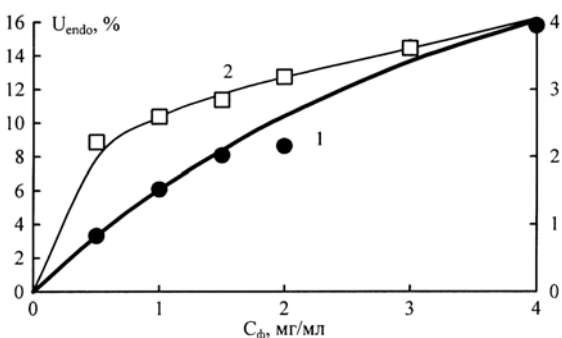


Рис. 5. Зависимость активности фермента от его концентрации при 50°C ( $C_{\phi}$ , мг/мл).

1 – эндохитиназная активность, %, 2 – экзохитиназная активность, ед. активн.

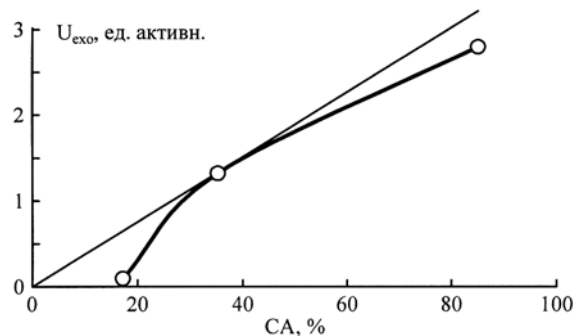


Рис. 6. Зависимость экзохитиназной активности ферментного препарата ( $U_{exo}$ , мг NAG/мл) от степени ацетилирования субстрата (CA, %).

Условия инкубирования: время инкубации 30 мин, температура инкубации 37°C.

**Обнаружение хитозаназной и деацетилазной активности. Влияние степени ацетилирования субстрата**

В ходе исследований была обнаружена зависимость экзохитиназной активности ферментов от степени ацетилирования в образцах хитина и хитозана (табл. 2, рис. 6).

Из данных, приведенных в табл. 2 и на рис. 6, следует, что хитиназная активность фермента, определенная по выходу N-ацетилглюкозамина, увеличивается с увеличением СА субстрата. Такое повышение активности может быть объяснено ростом количества ацетилированных звеньев в молекуле хитина/хитозана. Если предположить, что активность фермента по отношению к хитину/хитозану не зависит от степени ацетилирования полимера, тогда следует ожидать линейной зависимости активности от количества ацетильных групп в молекуле полимера. В нашем случае наблюдается отклонение от линейности. При СА меньше 35 % активность начинает уменьшаться быстрее с уменьшением СА. По-видимому, активность фермента по отношению к хитозану (хитозаназная активность) меньше его хитиназной активности.

Таблица 2. Зависимость экзохитиназной активности ферментов от степени ацетилирования в образцах хитина и хитозана

	CSN	CSS-1	CSS-2
Степень ацетилирования СА, %	85.0	35.2	17.2
$U_{exo}$ , ед. активн.	2.8	1.32	0.0965

CSN – хитин; CSS-1 и CSS-2 – хитозан с различными степенями ацетилирования.

При высоком содержании ацетилированных звеньев в молекуле хитина также отмечается некоторое отклонение от ожидаемой линейной зависимости  $U_{exo}$  от СА. По-видимому, оптимальная для ферментативного расщепления конфигурация субстрата возникает при средней СА хитина и хитозана около 40-50 %.

Для оценки возможности использования ферментов из гепатопанкреаса краба для модификации хитозана проведена обработка двух образцов CSS-1 и CSS-2 и определено изменение молекулярной массы и степени ацетилирования хитозана с различной начальной степенью ацетилирования.

Из полученных данных (табл. 3) следует, что в ходе ферментативного гидролиза хитозана наблюдается уменьшение молекулярной массы, что свидетельствует о наличии хитиназной и хитозаназной активности в данном ферментном комплексе. Данные показывают, что с уменьшением степени ацетилирования (или снижением доли ацетилированных звеньев в молекуле полисахарида) относительное изменение молекулярной массы и степени полимеризации уменьшается. Статистическая обработка результатов показала, что различие ММ в исходном и ферментированном хитозане с СА = 35.2 % (CSS-1) является достоверным. Для образцов хитозана с СА = 17.2 % (CSS-2) различие ММ статистически недостоверно. Это подтверждает предыдущий вывод о том, что фермент имеет меньшую хитозаназную активность.

Отмечается также статистически достоверное уменьшение степени ацетилирования обоих образцов хитозана, что подтверждает наличие деацетилазной активности комплекса ферментов гепатопанкреаса камчатского краба, которое было предварительно установлено ранее в лаборатории ПИНРО (Novikov, Mukhin, 2003).

Таблица 3. Молекулярная масса, степень полимеризации и степень ацетилирования образцов хитозана с различной начальной степенью ацетилирования до и после ферментативного гидролиза

	CSS-1			CSS-2		
	ММ, кД	СП	СА, %	ММ, кД	СП	СА, %
Исходный	329±44	1873	35.2±1.1	280±46	1694	17.2±2.5
Ферментированный	274±52	1561	30.6±2.6	241±58	1435	12.2±2.4
Относительное изменение, %	16.7	16.7	13.1	15.3	14.7	29.1

ММ – молекулярная масса, кД; СП – степень полимеризации; СА – степень ацетилирования, %.

**4. Выводы**

В результате проведенных исследований обнаружено наличие экзо- и эндохитиназной активности в ферментных препаратах, полученных из камчатского краба, серрипеса, трубоча, кукумари, морской звезды. Наибольшей хитиназной активностью обладают ферменты, выделенные из камчатского краба и морской звезды. Причем эндохитиназная активность выше у фермента выделенного из морской звезды, а экзохитиназная – из краба.

Это связано с тем, что в пищевом рационе камчатского краба и морской звезды преобладает большее число мелких ракообразных с хитиновыми покровами, и поэтому для построения собственных покровов им необходимо более интенсивное расщепления хитиновых молекул.

Детально изучен ферментативный гидролиз хитина и хитозана под действием ферментного препарата, полученного из гепатопанкреаса камчатского краба. Получены зависимости эндо- и экзохитиназной активности ФП от продолжительности инкубации, концентрации ФП, температуры и pH реакционной среды. Определены оптимальные условия гидролиза.

Подтверждено наличие в ферментном комплексе хитиназной, хитозаназной и деацетилазной активности и установлена зависимость активности ФП от степени ацетилирования субстрата.

## Литература

- Declaire M., De Cat W., Tang V.H.** Determination of endo- and exochitinase activity of *Serratia marcescens* in relations to culture media composition and comparison of their antifungal properties. *Chitin Enzymology. Proc. of the 2<sup>nd</sup> Int. Symp. on Chitin Enzymology, May 8-11, 1996, Senigallia (Ancona), Italy, v.2, p.165-169, 1996.*
- Deshpande M.V.** Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *Journal of Scientific and Industrial Research, v.45, p.273-281, 1986.*
- Jeuniaux C.** Chitinolytic systems in the digestive tract of vertebrates: A review. *Chitin Enzymology. Proc. of the 2<sup>nd</sup> Int. Symp. on Chitin Enzymology, May 8-11, 1993, Senigallia (Ancona), Italy, p.233-244, 1993.*
- Novikov V.Yu., Mukhin V.A.** Hydrolysis of chitin and chitosan under the action of enzymes of *Paralithodes camtschaticus*. *Advances in Chitin Science. Proc. from the 5<sup>th</sup> Int. Conf. of the European Chitin Society (EUCHIS'02). Trondheim, Norway, NTNU, v.VI, p.313-314, 2003.*
- Герасимова О.В., Кочанов М.А.** Трофические взаимоотношения камчатского краба *Paralithodes camtschatica* в Баренцевом море. В сб.: *Исследования промысловых беспозвоночных Баренцева моря. Мурманск, ПИИРО, с.35-58, 1997.*
- Манушин И.Е.** Трофические взаимоотношения камчатского краба с местной фауной, Мурманские рыбные ресурсы; сайт: [www.murfish.ru](http://www.murfish.ru), 2001.
- Мухин В.А., Новиков В.Ю.** Протеолиз и протеолитические ферменты в тканях морских беспозвоночных. *Мурманск, ПИИРО, 118 с., 2002.*
- Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Артюков А.А., Кофанова Н.Н.** Очистка и характеристика коллагенолитической протеазы из гепатопанкреаса *Paralithodes camtschatica*. *Биохимия, т.53, с.1844-1849, 1988.*
- Скоупс Р.** Методы очистки белков. *М., Мир, 358 с., 1985.*
- Шмид Р., Сапунов В.Н.** Неформальная кинетика. В поисках путей химических реакций. *М., Мир, 264 с., 1985.*