

Н. А. ТИУНОВА, Д. А. ПИРИЕВА, М. Г. ЭПШТЕЙН

ОЧИСТКА И ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ХИТИНАЗЫ И ХИТОБИАЗЫ ACTINOMYCES SP.

(Представлено академиком А. И. Опариным 7 II 1973)

Хитиназа актиномицетов исследовалась несколькими авторами (1-4). Адсорбцией на бауксите и хитине удалось отделить хитиназу от хитобиазы и показать, что преобладающим продуктом расщепления хитина под действием хитиназы является хитобиоза. Методом электрофореза показана неоднородность хитиназы.

Недавно было высказано предположение о том, что хитиназа микроорганизмов содержит в своей системе фермент, аналогичный C_1 -ферменту целлюлазной системы, необходимый при расщеплении хитина с нативной, упорядоченной структурой (5). В настоящей работе показана возможность фракционирования хитиназы актиномицета и очистки ее от хитобиазы методом гельфильтрации и хроматографии на гидроксилapatите. Приводятся доказательства в пользу существования фермента типа C_1 в хитиназной системе актиномицета.

Фермент был получен из культуры *Actinomyces* sp. при глубинном культивировании его на минеральной среде, содержащей хитин и дрожжевой экстракт в качестве источников углерода (5). Фильтрат культуральной жидкости был насыщен сернокислым аммонием, выпавший в осадок фермент растворен в воде, диализован против 0,001 M фосфатного буфера pH 7,0 и высушен лиофильно. Полученный препарат после очистки на сефадексе Г-25 и повторного высаливания сернокислым аммонием был фракционирован гельфильтрацией через сефадекс Г-75. Другая часть полученного препарата фермента после очистки от балластных белков и пигментов на ДЭАЭ-сефадексе А-50 была подвергнута хроматографии на гидроксилapatите (6) при ступенчатом элюировании.

Активность хитиназы определяли как по расщеплению коллоидного, так и «природного» хитина (полученного из панцирей крабов путем промывания их 5% раствором HCl и 3% NaOH). В опытах использовали хитин после измельчения его на кофейной мельнице. Из этого хитина получали коллоидный хитин (2).

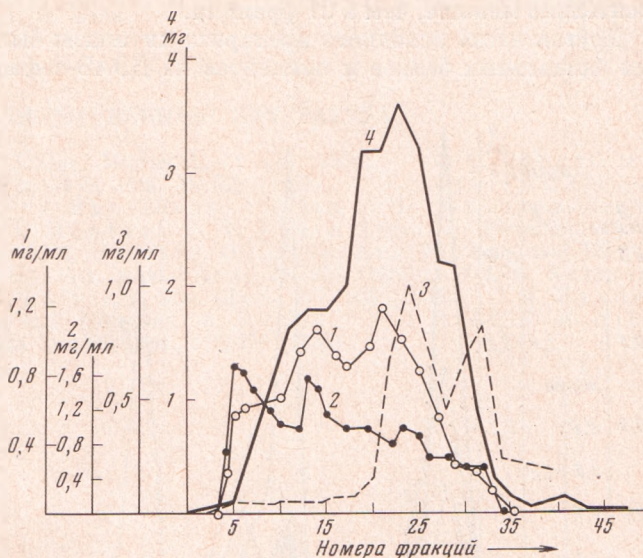
При определении активности хитиназы по расщеплению коллоидного хитина к 1 мл суспензии коллоидного хитина, содержащему 10 мг сухих веществ, добавляли 0,5 мл фермента и 0,5 мл веронал-ацетатного буфера pH 7,0. Смесь инкубировали при 40° в течение 20 час., затем разбавляли 2 мл воды и отфильтровывали. В 1 мл прозрачного фильтрата определяли восстанавливающие сахара с динитросалициловой кислотой. При определении активности хитиназы по расщеплению нативного хитина пользовались методом Монреаля и Риза (5). В этом случае инкубация фермента и субстрата длилась 24 часа при 40°. Активность фермента выражали в миллиграммах N-ацетил-D-глюкозамина, образующегося в условиях опыта при действии 1 мл раствора фермента.

Активность фермента хитобиазы определяли по хитобиозе (димер N-ацетил-D-глюкозамина), специально полученной для этой цели путем гельфильтрации через сефадекс Г-15 из кислотного гидролизата хитина. К 0,1 мл раствора фермента добавляли 0,3 мл веронал-ацетатного буфера

pH 7,0 и 0,1 мл 0,15% раствора хитобиозы. После инкубации в течение 1 часа при 40° в смеси определяли количество N-ацетил-D-глюкозамина (8). Активность выражали в миллиграммах N-ацетил-D-глюкозамина, образующегося под действием 1 мл испытуемого раствора фермента.

При гельфильтрации через сефадекс Г-75 системы ферментов, расщепляющих хитин (рис. 1), было найдено, что этим методом можно очистить некоторую часть хитиназы (фракции 4—20) от хитобиазы (фрак-

Рис. 1. Фракционирование хитиназы и хитобиазы актиноциета на сефадексе Г-75 в веронал-ацетатном буфере pH 7,0 с ЭДТА 10⁻³ M. Размер колонки 130 × 2,5 см, фракции 11 мл. Активность хитиназы на размолотом (1) и на коллоидном (2) хитине, 3—активность хитобиазы, 4—содержание белка



ции 21—33). Хитиназа неоднородна и при гельфильтрации делится по крайней мере на три компонента. Методом хроматографии на бумаге продуктов расщепления хитина под действием фракций 5—7, 13—15 и 19—23 было найдено, что в качестве преобладающего продукта реакции образуется дисахарид, небольшое количество моносахарида и следы трисахарида. Количество моносахарида было определено в реакционной смеси после инкубации нативного хитина в течение 20 час. с фракциями, содержащими хитиназу (табл. 1).

Таблица 1

Общее количество восстанавливающих сахаров и моносахарида при ферментативном расщеплении хитина

№ фракций	Восстанавливающие сахара, мг/мл	N-ацетил-D-глюкозамин	
		мг-мл	% от восстанавливающих сахаров
5—7	0,438	0,018	4,1
13—15	0,716	0,026	3,6
19—23	0,730	0,112	15,3

Таблица 2

Отношение активности по коллоидному (CH_x) и нативному (CH₁) хитину во фракциях после гельфильтрации через сефадекс Г-75

№ фракций	CH _x	CH ₁	CH _x /CH ₁
	восстанавливающие сахара, 1 мг на 1 мл фракции		
5	1,720	0,571	3,0
14	1,480	1,080	1,4
21	0,920	1,192	0,8

Из табл. 1 следует, что при действии на нативный хитин фракции, в значительной степени очищенные от хитобиазы, образовывали главным образом олигосахариды и только около 4% моносахарида от общего количества восстанавливающих сахаров. Фракции 19—23, содержащие хитобиазу, образовывали моносахарида значительно большее количество.

На рис. 1 видно, что при более высокой активности на коллоидном хитине (фракции 5—7) активность на нативном хитине была заметна ниже, чем во фракциях 13—15 и 19—23. В табл. 2 приведено соотношение актив-

ностей по коллоидному (CH_x) и нативному (CH_1) хитину в 5, 14 и 21 фракциях, полученных при гельфильтрации через сефадекс Г-75.

Из табл. 2 следует, что соотношение активности хитиназы на коллоидном и нативном хитине в отдельных фракциях неодинаково и различается более чем в 3 раза. Этот факт можно объяснить тем, что при гельфильтрации, хотя и не происходит полного разделения CH_1 - и CH_x -ферментов хитиназной системы, но количество CH_1 -фермента в 5 фракции содержится относительно меньше, чем в 21 фракции.

Другая часть исходного препарата хитиназы была очищена от некоторых балластных белков и пигментов на ДЭАЭ-сефадексе А-50 при рН 8,0,

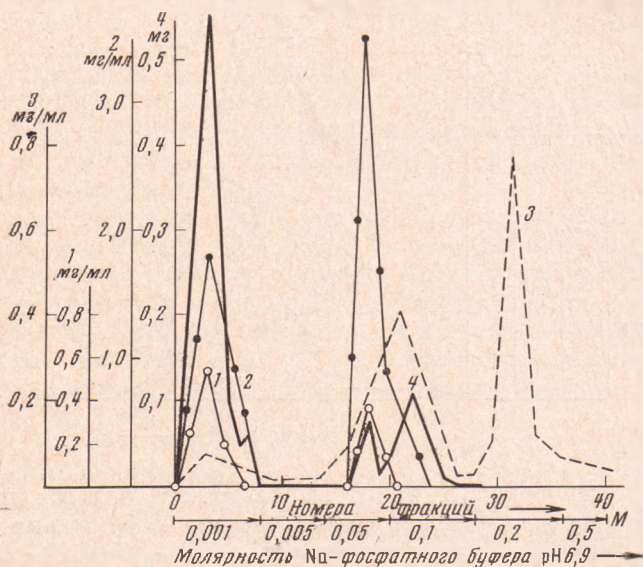


Рис. 2. Хроматография на гидроксиланатите (9). Колонка (10 × 2 см) уравновешена Na-фосфатным буфером 0,001 M, рН 6,9, ферменты элюировали тем же буфером 0,005; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 M. Обозначения те же, что и на рис. 1

в 0,05 M трис-буфере. Ферменты, не адсорбировавшиеся на ДЭАЭ-сефадексе, были фракционированы на гидроксиланатите при рН 6,9 (рис. 2). Этим способом удается получать высокоочищенный (в 170 раз) компонент хитобиазы (фракции 30—33), совершенно лишенный активности на коллоидном и нативном хитине. Хитиназа на гидроксиланатите разделилась на 2 компонента (фракции 1—6 и 17—20), имеющие при определении на коллоидном хитине одинаковый рН-оптимум, равный 6,0. Оба компонента хитиназы были активны как на коллоидном, так и на нативном хитине и содержали небольшое количество хитобиазы. Отношение CH_x/CH_1 во 2—3 фракциях равно 4, то же отношение в 17—18 фракциях равно 10. Это, как и данные табл. 2, свидетельствует о том, что в хитинолитической системе ферментов изучаемого актиномицета имеется особый CH_1 -фермент, участвующий при расщеплении нативного хитина.

Первым веским доказательством в пользу существования CH_1 -фермента в целлюлозной системе ферментов явилось обнаружение синергизма между двумя фракциями целлюлазы при действии на целлюлозу с высокоупорядоченной нативной структурой (9, 10). Нами была исследована активность на нативном хитине 2—3 фракции и 17—18 отдельно и при их совместном действии. Оказалось, что при объединении этих фракций их активность возрастает в 2 раза.

Таким образом, в настоящем исследовании показана возможность разделения ферментов хитиназы и хитобиазы и очистки последнего в 170 раз. Фермент хитиназа неоднороден, но все его компоненты образуют димер в качестве преобладающего конечного продукта расщепления хитина. рН-Оптимум хитиназы ~6,0.

Все полученные фракции этого фермента имеют неодинаковое соотношение активности на коллоидном и нативном хитине, кроме того, обнаружено явление синергизма между различными фракциями хитиназы при действии на нативный хитин. Все это свидетельствует в пользу существования особого C_{H_1} -фермента, аналогичного C_1 -ферменту целлюлазной системы, и необходимого организму при расщеплении хитина с высокоупорядоченной структурой.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
6 II 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ D. M. Reynolds, *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 150 (1954). ² L. R. Berger, D. M. Reynolds, *Biochim. et biophys. acta*, **29**, 522 (1958). ³ C. Jeuniaux, *Chitine et Chitinolyse*, Paris, 1963. ⁴ J. Skujins, A. Pukite, A. D. McLaren. *Enzymologia*, **39**, 353 (1970). ⁵ J. Monreal, E. T. Reese, *Canad. J. Microbiol.*, **15**, 689 (1969). ⁶ A. Tiselins, A. S. Hjerten, O. Levin, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **65**, 132 (1956). ⁷ G. L. Miller, *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959). ⁸ J. L. Reissing, J. L. Strominger, J. F. Leloir, *J. Biol. Chem.*, **217**, 959 (1955). ⁹ M. Mandels, E. T. Reese, *Developm. Ind. Microbiol.*, **5**, 5 (1964). ¹⁰ L. H. Li, R. M. Flora. K. W. King, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **111**, 439 (1965).