

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“

**Получаване, пречистване и характеристика на
микробни хитинази**

***инж.* Юрий Михайлов Стойков**

АВТОРЕФЕРАТ

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Научна област 5. Технически науки

**Професионално направление 5.11. Биотехнологии (докторантска
програма „Технология на биологично активните вещества“)**

Научни ръководители:

Чл.-кор. проф. д.т.н. Атанас Иванов Павлов

Проф. д.т.н. Алберт Иванов Кръстанов

София, 2018

Въведение

Световното потребление на ензими и ензимни препарати непрекъснато нараства, като през 2014 година то възлиза на 4,2 милиарда долара. Очаква се то да достигне 6,2 милиарда долара през 2020г. Най-голям дял се падат на ензимите от микробен произход.

Хитиназите са ензими които разкъсват β -гликозидната връзка между 1 $\rightarrow$ 4 въглеродни атома на N-ацетил D-глюкозамин в молекулата на хитина, с получаване на хитоолигомери.

Поради недостатъчния брой достъпни хитинази на пазара, задача на настоящия дисертационен труд бе да се изолират и идентифицират продуценти на хитинази и да се оптимизират условията на култивиране. Така получените ензимни препарати да бъдат пречистени и охарактеризирани, както и да се изследва и приложимостта на съответните хитинази. Липсата на пряко сравнение между бактериални и плесенни хитинази в литературата обуславя необходимостта това да бъде застъпено в настоящата работа.

Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е подбор, оптимизиране на условия за култивиране и сравнителен анализ на бактериални и плесенни продуценти в качеството им на биологични матрици за получаване на хитинази.

За постигане на целта бяха поставени следните задачи за изпълнение:

1. Изолиране микробни продуценти на хитинази от естествени източници. Оценка на бактериални и плесенни продуценти в качеството им на матрици за получаване на хитиназа.
2. Подбор на високо продуктивни щам-продуценти.
3. Идентификация на подобрите щам-продуценти чрез молекулярно-генетични методи.
4. Оптимизиране условията на култивиране и състава на ферментационната среда за подобрите щам-продуценти, с оглед максимална биосинтеза на целевия ензим.
5. Изолиране и пречистване на целевия ензим от получените ензимни препарати.
6. Подбор на протокол за получаване на пречистен ензим и проучване методите за най-ефективното му съхранение.
7. Характеристика на пречистения ензим.
8. Предварителни проучвания възможностите за приложение на ензимите.

Материали и методи

- 1. Изолати** - Предоставени са от Биодинамика ООД, (два бактериални изолата – 15.2 и C27; плесенен изолат – H5)
- 2. Хранителни среди** – За изпълнение на експерименталното програма на диселтацията са използвани: разновидност на среда LB (Luria-Bertani) с добавка на колоиден хитин; PDA (Potato Dextrose Agar); твърда агаризирана среда със единствен въглероден източник – колоиден хитин; хранителна среда с изходен състав - дрождев екстракт, NaCl, колоиден хитин, и нишесте; при експериментите със системи с временно разбъркване тип RITA - течна фаза (KH_2PO_4 , NaCl, MgSO_4 , NH_4NO_3) и твърдата фаза (хитин, оризови трици или пшенични трици, премесени с колоиден хитин на прах);

- 2.1. Селекция на високо активни колонии на щам C27** бе проведена по метода на многократно разсяване на селективна среда.

3. Идентификация

C27/5 бе идентифициран посредством секвенция на 16S rDNA участък, а H5 бе идентифициран посредством секвенция на намножен ITS rDNA фрагмент.

4. Оптимизиране състава на хранителната среда и условията за биосинтеза на хитиназа

4.1. Оптимизиране състава на хранителната среда на щам C27/5

- 4.1.1. Оптимизиране на въглероден източник** – входящи променливи са: хитин на прах, колоиден хитин, хитин на люспи,

високомолекулен хитозан (HM chitosan), нискомолекулен хитозан (LM chitosan) и карбоксиметил целулоза (СМС), както и вторичните въглеродни източници - глюкоза, захароза, галактоза, арабиноза, рафиноза, малтоза, фруктоза, лактоза, ксилоза, нишесте, манит, рамноза, глицерин и меласа.

4.1.2. Оптимизиране на азотения източник – входящи променливи са: NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NaNO_3 , казеин, пептон, триптон, дрождев екстракт, месен екстракт, триптион + дрождев екстракт (в съотношение от хранителната среда за поддържане на микробни продуценти) и хитин като единствен източник на азот.

4.1.3. Оптимизация концентрацията на компонентите в хранителната среда – входящи променливи са: колоиден хитин, дрождев екстракт и нишесте

4.1.4. Изследване на влиянието на някой условия на култивиране на продуценти на хитиназа - Изследвано бе влиянието на възрастта на посевния материал върху биосинтезата на хитиназа; количеството на посевния материал; началното рН на хранителната среда в интервал от 5.0 до 10; температурата на култивиране .

4.2. Оптимизиране състава на хранителната среда и условия на култивиране на щам Н5

4.2.1. Оптимизиране на азотен източник - входящи променливи са: NH_4NO_3 , пептон, дрождев екстракт, месен екстракт, карбамид.

4.2.2. Оптимизация на концентрацията на компонентите в хранителната среда- входящи променливи са: колоиден хитин, карбамид и KH_2PO_4 .

4.2.3. Изследване на влиянието на някои условия на култивиране на продуцента на хитиназа – Изследвано бе Влияние честотата на имерсия и степента на аерация; възрастта на посевния материал; на началното рН в интервал от 3.0 до 7.0; температурата на култивиране в интервал 20 – 32 °С.

5. Изолиране и пречистване

5.1. Подготовка на културалната течност, концентриране, лиофилизация и подготовка на ензимен разтвор - Биомасата бе отделена от културалната среда посредством центрофугиране. Така получената културална течност бе концентрирана под вакуум и лиофилизирана.

5.2. Утаяване с амониев сулфат - чрез стъпаловидно прибавяне на амониевия сулфат към белтъчния разтвор.

5.3. Утаяване с органични разтворители - чрез стъпаловидно прибавяне на добре охладен (-18°C) разтворител към белтъчния разтвор.

5.4. Елиминираща по размер хроматография

Елиминиращата по размер хроматография бе проведена на FPLC BioLogic LP System на Biorad, окомплектована с BioFrac fraction collector и UV reader – 265 nm, и колони Econo-Column със диаметър 15 mm и дължина 500 и 1000 mm.

5.5. Йонообменна хроматография

За йоннообменно хроматографско разделяне бяха използвани колони на Biorad: Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q; Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High S; Bio-Scale™ Macro-Prep® High DEAE.

5.6. Електрофореза в полиакриламиден гел (SDS-PAGE) - Молекулната маса на ензима бе определена с електрофореза Mini-Protean Tetra Cell на Biorad.

6. Изследване на свойствата на пречистения ензим от щам C27/5

6.1. Определяне на рН профил на действие на ензима Определяне на температурен профил на действие на ензима - Чрез анализ на ензимната активност при 30, 40, 45, 50, 55, 60 и 70°C

6.3. Определяне на температурна стабилност - температурната стабилност бе определяна при 22, 28, 40, 55 и 70°C за период от 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72 и 120 h.

6.4. Определяне на кинетичните параметри – K_m и V_{max}

6.5. Определяне на субстратната специфичност на действие

Субстратната специфичност бе определена спрямо субстратите: колоиден хитин, хидролизиран 1h със HCl; колоиден хитин, хидролизиран 2h със HCl; колоиден хитин, хидролизиран 3h със HCl; колоиден хитин, хидролизиран 5h със HCl; ниско молекулен хитозан; високомолекулен хитозан; карбоксиметил целулоза; нишесте; хитин на прах; хиалуронова киселина.

6.6. Изследване влиянието на някои метални йони върху ензимната активност - $AgNO_3$, $Pb(CH_3COO)_2$, $NiCl_2$, $HgCl_2$, $CaCl_2$, $CuSO_4$, $MgSO_4$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$ и EDTA.

6.7. Изследване влиянието на някои органични разтворители върху ензимната активност - етанол, метанол, ацетон, изопропанол, меркаптоетанол, DMSO (диметилсулфоксид), DMF (диметилформамид), толуен и ацетонитрил в крайна концентрация в пробата 1 и 2.5 %.

5. Аналитични методи

7.1. Ензимна активност - Метод за определяне на редуциращи захари с 4-хидроксibenзоена киселина хидразид (РАНВАН); Метод за

определяне на редуциращи захари с 3,5 - динитросалицилова киселина (ДНСК); Метод за определяне на хитиназна активност с карбоксиметил хитин – римазол брилиант виолет (CM-Chitin-RBV); Метод за определяне на едно и екзо хитиназна активност с оцветени с паранитрофенол (PNP) субстрати.

7.2. Определяне на белтък по метод на Брадфорд

7.3. Определяне на хидролизните продукти на хитиназата

7.4. Използван софтуер и статистическа обработка на данните

Статистическият анализ и графичното оформление на получените резултати са извършени със Scientific Graph System SigmaPlot[®] v. 11.0 (Systat Software, Inc., USA) и Microsoft[®] Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA) MINITAB 14 (Minitab Inc.). За изготвяне на настоящата работа бяха използвани също софтуерните продукт Microsoft[®] Word 2010 (Microsoft, Redmond, USA).

Резултати и дискусия

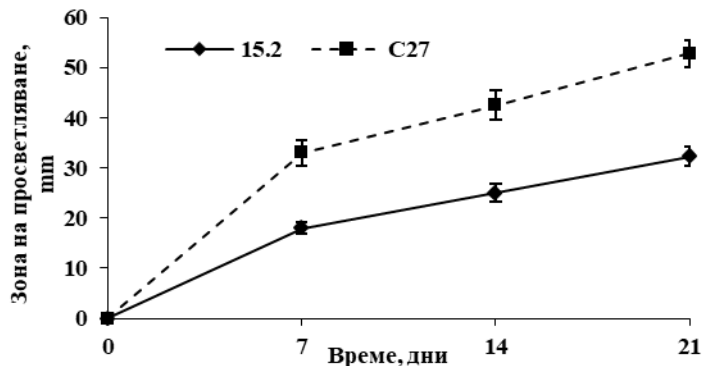
1. Първичен скрининг

1.1. Първичен скрининг на бактериални изолати

Изолат 15.2 е бактериален изолат от неспорообразуващи пръчковидни грам положителни бактерии, които образуват бели лъскави неравни колонии с неправилни краища.

Изолат C27 е бактериален изолат от пръчковидни грам положителни бактерии. Образува малки, бели, лъскави, правилни, кръгли колонии с равни краища.

Всички щамове бяха подложени на първичен скрининг на твърда агаризирана среда, с единствен въглероден източник – хитин. Контролирани бяха диаметра на зоната на просветляване.



Фиг. 1. (3) Динамика на нарастване на зоните на просветляване при развитие на изолати 15.2 и C27 върху селективна среда с хитин

Изолат C27 формира по-големи зони на просветляване в по-ранен етап (Фиг. 1). Той образува зона с диаметър 33 mm на седмия ден, докато при изолат 15.2 диаметърът на зоната е 18 mm на същия ден, а на 21-я ден е 32 mm.

За по-прецизно сравняване на хитинолитичната активност на двата бактериални щама са култивирани в течна хранителна среда (Табл. 1).

И двата щама показаха сравнима активност, но изолат C27 проявява един порядък по-висока активност спрямо оцветения субстрат CM-Chitin-RBV, което обуславя и високата му специфична активност.

Табл. 1. Хитиназна активност на изолати 15.2 и C27 при развитие в течна хранителна среда.

Изолат	рН на средата	Време	ДНСК*		CM-Chitin-RBV**	
			IU/ml	IU/mg	AU/ml	AU/mg
15.2	рН 6.0	120h	-	-	-	-
		144h	0.3	5.2	-	-
	рН 7.0	120h	-	-	-	-
		144h	0.3	4.6	5.3	70.6
C27	рН 8.0	120h	-	-	-	-
		144h	0.3	2.7	55.5	437.0

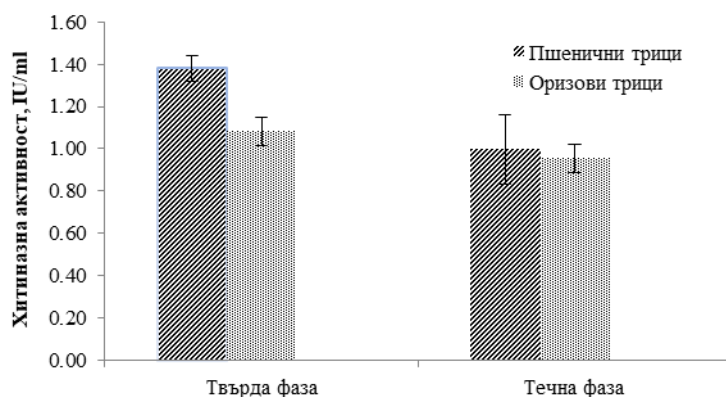
Въз основа на първичния скрининг на агаризирана среда, както и резултатите от култивирането на течна хранителна среда бе избран изолат C27 като бактериален изолат, обект на по нататъшни проучвания.

1.1.1. Подбор на по високо продуктивни колонии на изолат C27

Чрез многократно препосояване на селективна среда, бяха избрани високо продуктивни колонии, които в следствие са култивирани в течна хранителна среда. Най- висока активност показаха изолат C27/5 като той проявява 12,21% по-висока активност спрямо ДНСК метода, и 16.05% спрямо метода с CM-Chitin-RBV съотнесен към активността на изолат C27/2 (Таб. 1).

1.2. Първичен скрининг на плесенни изолати

За целта бе избрана слабо позната система за култивиране на плесени – системи с временно разбъркване.



Фиг. 2. (6) Разпределение между фазите на хитиназната активност, получена при култивиране на изолат Н5 в култивационна система с временно разбъркване.

Проведени бяха експерименти с няколко твърди субстрата – пшенични трици, оризови трици и хитин на люспи. Твърдият субстрат бе смесен със сух колоиден хитин. На Фиг. 2 са представени резултатите от култивиране на изолат Н5 на трите различни субстрата, както и разпределението на хитиназната активност между отделните фази (твърда и течна фаза).

Представените по-горе резултати показват, че двата изолата (плесенния Н5 и бактериален С27/5) са продуценти на хитиназа с висок потенциал. Ето защо следващите експерименти по оптимизиране на хранителната се провеждат и с двата изолата.

2. Идентификация

2.1. Идентификация на изолат С27/5

Изолат C27/5 бе идентифициран чрез 16S rDNA регион. Получени бяха фрагменти от 864 нуклеотидни последователности. След сравняване на нуклеотидната последователност в *Nucleotide BLAST* най-висока хомоложност бе проявена с тази на *Bacillus thuringiensis* Bt407 (100%). От получения резултат, както и от предварителната морфологична характеристика, може да се заключи с високо ниво на достоверност, че идентифицирания щам принадлежи към род *Bacillus* и по точно вид *Bacillus thuringiensis* и ще е наименуван като щам *Bacillus thuringiensis* C27/5. За улеснение и по-лесна проследяемост за напред в дисертационния труд той ще се споменава само като щам C27/5.

2.2. Идентификация на изолат H5

Изолат H5 бе идентифициран като бе намножен и секвениран ITS rDNA участък. Получена бе последователност от 507 нуклеотида. Най-висока хомоложност бе проявена с тази на *Petromyces alliaceus* NHRL 35084 (100%). *Petromyces alliaceus* се явява теломорфен щам спрямо *Aspergillus alliaceus*. Въз основа на тези резултати може да заключим с висока степен на достоверност, че изолат H5 принадлежи към вид *Petromyces alliaceus*, и за напред ще бъде наименуван като щам *Petromyces alliaceus* H5. За улеснение в настоящия дисертационен труд той ще се споменава като щам H5.

3. Оптимизация на хранителната среда и условия на култивиране на щам C27/5

3.1. Оптимизация на хранителната среда по С и N източник

3.1.1. Оптимизация на първичен въглероден източник

Най-силно хитиназната активност бе индуцирана при култивиране с колоиден хитин. Това най-вероятно се дължи на по-голямата достъпност

до молекулата на хитина вследствие на частичната хидролиза със солна киселина.

3.1.2. Оптимизация на вторичен въглероден източник

Положителен ефект оказва само включването в хранителната среда на нишесте. Ето защо следващите култивирания се извършват в присъствие на нишесте в хранителната среда.

3.1.3. Оптимизация на азотен източник

Всички азотни източници са приравнени по съдържание на азот към първоначално използваната хранителна среда. Хитиназната активност силно се повлиява от присъствието на дрождев екстракт.

3.1.4. Оптимизация на състава на хранителната среда чрез използване на математически методи на моделиране

Проведе се експеримент на три нива и централна точка. Получено бе регресионното уравнение, описващо изследваните зависимости е:

$$Y = 0.973394 + 0.3514x_1 + 0.2379x_2 + 0.1866x_3 - 0.0361x_1x_1 - 0.0303x_2x_2 - 0.0184x_3x_3 - 0.0042x_1x_2 + 0.0165x_1x_3 - 0.0059x_2x_3$$

Коефициент на детерминация $R^2 = 82.7\%$

От така получен модел бе изведен и оптималния състав на хранителната среда:

- Дрождев екстракт - 7.76 g/l
- NaCl – 10 g/l
- Хитин – 6.7 g/l
- Нишесте – 2.2 g/l

Теоретично максималната активност получена от модела е 3.11 IU/ml. Експериментално полученият максимум бе 2.55 IU/ml. Разликата може да се обясни както с коефициента на детерминация, така и с големите грешки, получавани при ниските стойности на хитиназната активност.

3.2 Възраст и количество на посевен материал

Най-добри резултати бяха получени при посевния материал с възраст 48 h, като неговата динамика е характерна със значително по-висок стръмен профил на биосинтеза в часовете между 24 и 48 часа (1.53 IU/ml на 24 h), и достигане на най-високата си стойност на 48-мия час (2.30 IU/ml на 48 h).

Количеството на посевния материал не оказва значително влияние върху крайната активност на хитиназата в културалната среда.

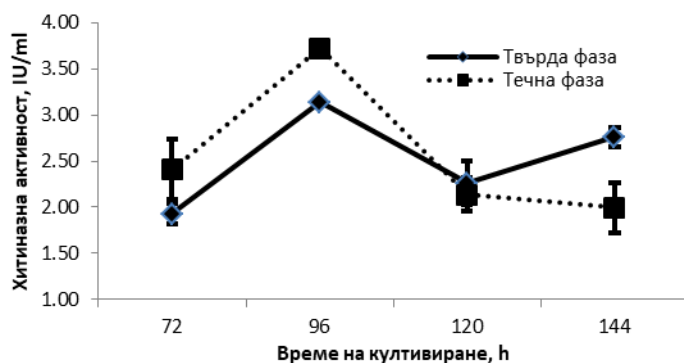
3.4. Влияние на рН и температура

Изследвано бе и влиянието на активната киселинност на средата върху продуцирането на хитиназа, като бе избран широк интервал от рН 5 до 10. Статистически значимо повишаване на хитиназната активност, обаче, не е отчетено при различните стойности на активна киселинност. От технологични съображения, а именно по-лесно запазване на стерилността на хранителната среда, следващите експерименти се провеждат с рН 8.0 на приготвяната хранителна среда.

Температурата влияе обратнопропорционално на хитиназната активност като най-високи стойности на хитиназна активност се наблюдават при температура 24°C и $2,75 \pm 0,28$ IU/ml.

4. Оптимизация на хранителната среда и условията на култивиране на щам Н5

4.1. Динамика на биосинтез на хитиназа



Фиг. 3. (18) Динамика на биосинтеза на хитиназа от щам Н5 при култивиране в системи с временно разбъркване.

Култивирането на щам Н5 бе провеждано в модифицирани системи с временно разбъркване, като над решетката бе поставен твърд субстрат. При култивирането първоначално, до 96 h, ензимната активност се покачва до 3.72 ± 0.06 IU/ml в течната и 3.13 ± 0.01 IU/ml в твърдата фаза (Фиг. 3). След това се наблюдава рязък спад на 120 h до 2.26 ± 0.24 IU/ml в твърдата фаза и 2.14 ± 0.18 IU/ml в течната фаза. Впечатление прави и разпределението на хитиназната активност между фазите – в експоненциалния участък на нарастване на ензимната активност се наблюдава по-високо присъствие в течната фаза, което може да се обясни от относително високия хидромодул на системата – 40.

4.2. Оптимизация на азотен източник

Изследвано бе и влиянието на азотните източници върху биосинтезата на хитиназа от щам Н5. Всички източници бяха приравнени по съдържание на азот към това на първоначалната среда съдържаща амониев нитрат - 8.74 g/l съдържание на азот. Карбамидът повлиява

положително върху биосинтезата на хитиназа (233 IU/биореактор съотнесено към 144 IU/биореактор при амониевия нитрат).

На база на гореописаните резултати бе определен следният компонентен състав на хранителната среда:

Течна фаза – карбамид – 3.75 g/l, KH_2PO_4 – 2 g/l, NaCl – 1 g/l, MgSO_4 – 1 g/l

Твърда фаза - Пшенични трици 5g, колоиден хитин 0.25g

4.3. Оптимизация на състава на хранителната среда чрез използването на математически методи за моделиране

Оптимизацията бе проведена по отношение източниците на въглерод, азот и фосфор - колоиден хитин, карбамид и калиевия дихидроген фосфат.

От резултатите на така планирания експеримент бе получено регресионно уравнение, описващо:

$$Y = 287.263 + 14.4502X_1 - 77.4148X_2 - 18.5741X_3 + 48.1987X_1^2 + 27.1653X_1X_2 - 51.3866X_3^2$$

Коефициент на детерминация - $R^2 = 91.60$.

След изследване на максимума на отклика съгласно изведеното регресионно уравнение бяха определени оптималните стойности на независимите променливи:

Твърда фаза

- Колоиден хитин - 13 g/100g пшенични трици
- Пшенични трици – 5 g

Течна фаза

- Карбамид– 13 g/l
- KH_2PO_4 – 6.7 g/l
- NaCl – 1 g/l
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1 g/l

Максималната активност изчислена от модела бе 401.84 IU/биореактор, а експериментално получената е 423.84 IU/биореактор.

4.4. Честота на имерсия

След оптимизация на концентрацията на компонентите на хранителната среда бе проведена оптимизация честотата на имерсия. Имерсията през 6 часа бе тази, която бе ползвана по - време на оптимизацията на компонентите и концентрацията на хранителната среда. Очаквано тя показва най-високи резултати (342IU/биореактор), тъй като концентрацията на компонентите на хранителната среда са оптимизирани при тази честото, и ако разглеждаме честотата на имерсия като честота с която се доставят свежи хранителни вещества от течната фаза към твърдата фаза (подхранване), то повишаване или понижаване честотата на подхранването би имало негативен ефект върху процеса.

4.5. Влияние на възрастта на посевния материал

Щам Н5 образува аскоспори, които са преплетени в мицела и трудно се отделят от него. С увеличаването възрастта на посевния материал се увеличава броят на аскоспорите, като те обикновено започват да се формират след 7-я ден, и образуването им се улеснява при съхранение в хладилни условия. Вегетативният (пети ден) посевен материал показва сравними (190 IU/биореактор на 5-я ден, 173 U/биореактор на 14-я ден и

218 IU/биореактор на 14-я ден), като най-висока е получената активност на 7-я ден (314 IU/биореактор) дори по-високи резултати по сравнение с този с преобладаващ споров материал.

4.6. Влияние на рН и температура

Изследвано бе и влиянието на активната киселинност на хранителната среда върху биосинтезата на хитиназа. Основателно най-висока активност се наблюдава при рН 5.0 – 249 IU/биореактор.

Влиянието на температурата върху биосинтезата не бе толкова осезаемо (Фиг. 25) като при 24°C бе 260 IU/биореактор, а при 32°C бе 228 IU/биореактор. Рязък спад в активността бе наблюдавана при температура от 20°C като тя пада с близо 41.6% спрямо тази при 24°C и получената активност е 151 IU/биореактор.

От така направената оптимизация компонентите на хранителната среда качествено и количествено, както и дефиниране на оптималните условия на култивиране и за двата щама бяха – съответно Н5 и С27/5. По време на тази оптимизация, щам Н5 повиши 1.8 пъти продуктивността си (от първоначалната оптимизация на азотен източник 144 IU/биореактор, на 259 IU/биореактор при оптимизацията на температурата), а щам С27/5 7.97 пъти (от първоначалното култивиране на течна хранителна среда - 0.345 IU/ml, на 2.75 IU/ml при оптимизация на температура на култивиране. При щам Н5 в твърдата фаза е отчетена 2.67 IU/g а в течната фаза 1.21 IU/ml което дава средна активност от 1.40 IU/ml (ако приемем, че твърдата фаза 1g = 1ml). При щам С27/5 тази активност е 2.75 IU/ml.

Въз основа на своето приложение, хитиназите могат да бъдат обект на изследване сами по себе си (с перспектива за приложение като

пречистени ензими за получаване хитоолигополимери, протопласти и т.н.), или като част от биологичен механизъм (т.е. да се изследва цялостния потенциал на един организъм за биоконтрол на насекоми и растителни патогенни плесени). Бактериалните хитинази притежават значителна температура стабилност и са определяни като най – добрите хитин лизиращи организми. Плесенните хитинази от своя страна освен своите ентомопатогенни и антифунгални свойства са интересни и с глюкозилтрансферазната си активност. И двете приложения за биозащита на растения, предполага използване на продуцентите *in situ*. Въз основа на разлики в перспективата на приложение, резултатите от получената активност, и поставените задачи в дисертационния труд бе взето решение по нататъшните изследвания по пречистването и характеристиката да се проведе само с хитиназа C27/5.

5. Изолиране и пречистване на хитиназа от щам C27/5

5.1. Концентриране на културална течност

Първоначално културалната среда, получена в колби бе центрофугирана при 6000 rpm за 10 min за отделяне на биомасата от културалната течност. Така получената културална течност бе охладена в хладилник до 4°C след което бе концентрирана с ротационен вакуум изпарител при 40°C, 165 rpm на колбата и максимален вакуум. При тази стъпка се цели намаляване на обема около 10 пъти, след което концентратът бе лиофилизиран.

Табл. 2. (13) Концентриране на културална течност от изолат C27/5

Стъпка	Обем, мл	Общо белтък, mg	Тотална активност, AU***	Специфична активност, AU/mg	Добив, %
Културална течност	1600	293	365333	1246	100.0
Вакуум концентрат	130	156	347967	2236	95.2
Леофилизат*	24**	159	332400	2097	87.3

* - вакуум концентрирано при 40°C

** - количеството е представено в грамове сух продукт

*** - тоталната активност е получена по CM-Chitin-RBV метод

Полученият сух продукт беше в основата на разработване на по нататъшна схема на пречистване, и се използва като изходен продукт.

5.2. Фракциониране

5.2.1. Фракциониране с органични разтворители

Органичните разтворители, използвани за фракционирането бяха ацетон, етанол и изопропанол.

При утаяването с ацетон като утаител бе наблюдавана много слаба активност при всички фракции, което показва, че ацетонът първо не успява да утаи ензима в даден диапазон, а и ниската активност подсказва че най-вероятно той денатурира голяма част от активния белтък. При утаяване с етанол се наблюдаваше сходни резултати с тези при утаяване с ацетон, дори липса на активност в отделните фракции. При използване на утаител изопропанол се наблюдават значително по-високи добиви по активност, като при отношение 1:1.5 проба:изопропанол той е 30% и значително пречистване от 2.26 пъти.

5.2.2. Фракциониране с амониев сулфат

Табл. 3. (18) Фракциониране на предварително лиофизирана културална течност от щам C27/5 с амониев сулфат при 4°C и 10% сухо вещество

Степен на насищане на АС	Тотална активност, IU	Добив, %	Специфична активност, IU/mg	Пречистване, пъти
Изходен	66606	100.0	10702	1.0
20%	1609	2,42	1460	0,14
40%	25549	38,36	15851	1,48
Супернатанта	0	0	0	0

Фракционирането с амониев сулфат е много по-често използвано при работа с белтъци. В Табл. 3 са представени резултатите от фракционирането на концентрат с амониев сулфат от културална течност на щам C27/5, като бе извършено степенно. Във фракцията, ресуспендирана след утаяване с амониев сулфат с насищане 40% се наблюдава значителна хитиназна активност - 38% добив от хитиназната

активност или 25549 IU като същевременно се постига пречистване от 1.48 пъти.

Табл. 4. (19) Фракционирание на концентрат от културална течност от щам C27/5

Утаител	Фракция	Тотална активност IU	Добив, %	Специфична активност, IU/mg	Пречистване, пъти
Етанол	Изходна	27654	100.00	1735	1.00
	1:1	197	0.71	82	0.05
	Супернатанта	6603	23.88	5320	3.07
Ацетон	Изходна	26478	100.00	2830	1.00
	1:1.5	2019	7.63	360	0.13
	Супернатанта	1739	6.57	1221	0.43
Изопропанол	Изходна	20115	100.00	1569	1.00
	1:1,5	6057	30.11	3543	2.26
	Супернатанта	0	0.00	5279	3.37
Амониев сулфат	Изходна	66606	100.00	10702	1.00
	40%	25549	38.36	15851	1.48
	Супернатанта	0	0.00	0	0.00

В заключение, въз основа на получените резултати от фракционирането на концентрат от културална течност от щам C27/5 с органични разтворители и амониев сулфат (Табл. 4) може да се заключи, че етанолът и ацетонът не са подходящи органични разтворители за фракционирането на хитиназа C27/5. Те инактивират ензима, като етанолът при отношение 1:2 проба:утаител не утаява ензима. Единствено изопропанолът показва добри резултати при утаяването като същевременно и пречиства частично ензима (2.26 пъти). Амониевият сулфат дава най-добри резултати по добив по активност, като при степен на насищане 40% в утайката се установяват 38% от хитиназната активност със степен на пречистване 1.48 пъти. В тази стъпка на пречистване основна цел е да постигнем висок добив по активност.

При фракционирането с изопропанол бе постигната по-висока степен на пречистване но има по-нисък добив по активност, докато при утаяването с амониев сулфат се постига по-висок добив по активност, но по-ниска степен на пречистване.

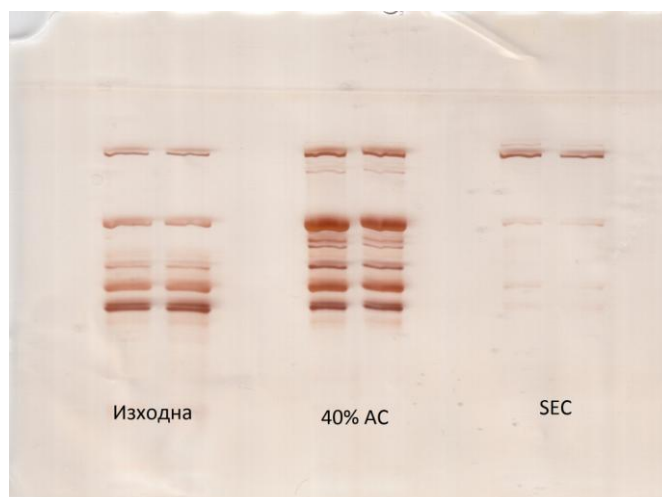
5.3. Елиминираща по размер хроматография (SEC)

Бактериалните хитинази обикновено са в диапазона от 10 до 75kDa като тези на щамове *Bacillus thuringiensis* са близки до горната граница. Поради тази причина е подбрана смола Sephadex G75, която има значителна разделителна способност в съответния диапазон. Използвана бе еднометрова колона с диаметър 1 cm, като бе нанесена 0.5 ml проба – концентрат след утаяване с амониев сулфат и totalното количество белтък бе 0.4g.

Табл. 5. (20) Пречистване на хитиназа от щам C27/5

Стъпка	Тотална активност, IU	Добив, %	Специфична активност, IU/mg	Пречистване, пъти
Изходен	56832	100	4527	1
40% AC	22889	40.28	4430	0,98
SEC Sephadex® G-75	40626	71.49	31208	6.89

Добивът по активност спрямо изходната проба е 71,49%. Това което е значително по-високо от предходната стъпка – утаяването с амониев сулфат (40,28%) (Таб. 20). Най-вероятно това се дължи на остатъчния амониев сулфат в пробата след утаяване, като той оказва негативно влияние на активността. Пречистването на пробата за стъпката с SEC също е значително – 6,89 пъти.



Фиг. 4. (31) Електрофореза на изходна ензимен концентрат от щам C27/5, утаена с амониев сулфат фракция със степен на насищане 40% и SEC (100 cm колона с пълнеж Sephadex G75 и подвижна фаза 50mM KH_2PO_4 , 150mM NaCl, pH 6.0 и скорост на потока 0.2 ml/min)

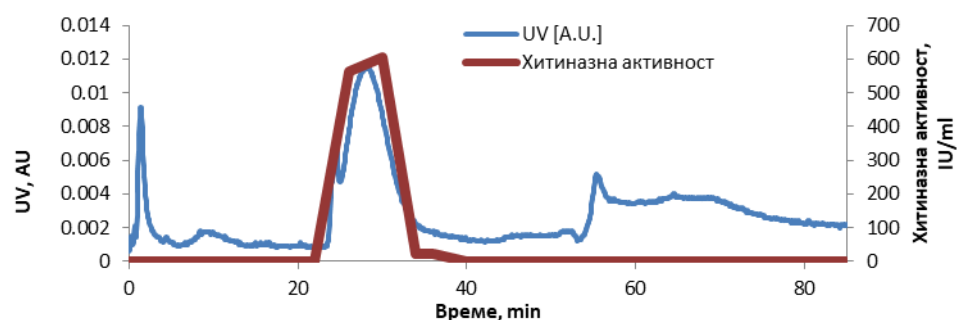
Направената електрофореграма на 10% SDS-PAGE (Фиг. 4) потвърждава значителното очистване на пробата от съпътстващите белтъци. Наблюдава се липса на промяна в качествения състав на пробата преди и след утаяването с амониевия сулфат. Въпреки това, степента на пречистване след SEC не е достатъчна, и е необходима последваща стъпка.

5.4. Йоннообменна хроматография

За този етап на пречистване бяха използвани следните колона

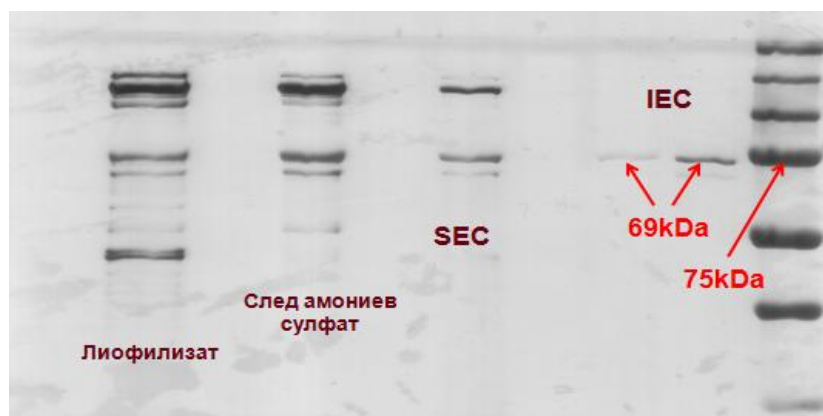
Bio-Scale™ Mini Macro-Prep® High Q – силно анионообменна колона

При pH 9.3 се наблюдава ясно изразен пик около 30 мин, като той и притежава цялата хитиназна активност е пробата (Фиг. 5).



Фиг.5. (44) Елуационен профил и ензимната активност на фракция след SEC от щам C27/5 (Bio-Scale™ Macro-Prep® High Q - 20mM tris - 0.5M NaCl 25mM tris pH 9,3 – pH и йонен градиент)

Така получената проба бе подложена на SDS-PAGE с концентрация на гела 8% (Фиг. 6). След йоннообменната хроматография се наблюдава един банд, който съотнесен със стандартизирани по молекулна маса белтъци, дава молекулна маса около 69kDa.



Фиг.6. (45) Електрофореза на изходна ензимен концентрат (лиофилизат) от щам C27/5; утаена с амониев сулфат фракция със степен на насищане 40%; и SEC (100 cm колона с пълнеж Sephadex G75 и подвижна фаза 50mM KH_2PO_4 , 150mM NaCl, pH 6.0 и скорост на потока 0.2 ml/min и подобрен протокол на запълване на колоната); фракция след IEC (Bio-Scale™ Macro-Prep® High Q - 20mM tris - 0.5M NaCl 25mM tris pH 9,3 – pH и йонен градиент); Молекулни маркери.

Табл.6. (21) Основни показатели в процеса на пречистване на хитиназа C27/5 при първоначално утаяване с амониев сулфат, последващ SEC и IEC.

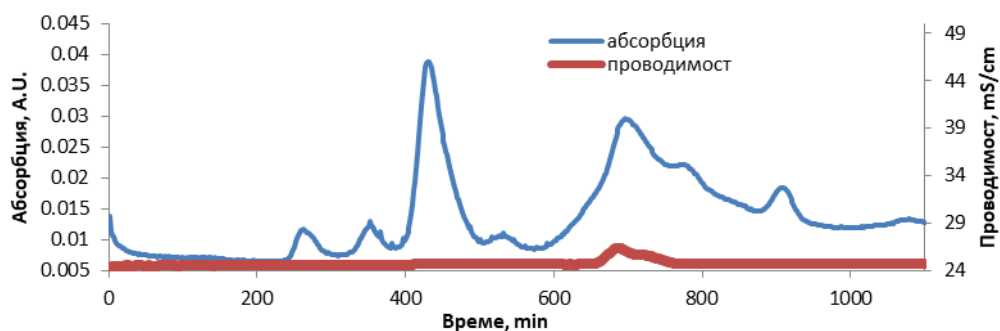
Стъпка	Общ белтък, mg	Тотална активност, IU	Специфична активност, IU/mg	Добив, %	Пречистване, пъти
Изходен	12.6	56832	4527	100.0	1.0
40% AC	5.2	22889	4430	40.28	0.98
SEC	1.3	40626	31208	71.49	6.89
Sephadex® G-75	0.14	6888	42726	12.12	10.32
IEC High Q					

В Табл. 6 са представени добивите по активност, пречистването в пъти, както и специфичната и тоталната активност за уточнената по-горе схема на пречистване. Следва да се отбележи високият добив след SEC, както и значителното пречистване (71.49% добив по активност и 6.89 пъти пречистване). Въпреки това, пречистването в една стъпка със SEC не осигурява достатъчно добра разделителна способност. IEC значително повишава пречистването (от 6.89 пъти при SEC на 10.32 пъти при IEC), но последвано от висока загуба на активност (от 40626 IU на 6888IU) което и дава и ниския добив от 12.12%.

Взето бе решение да се оптимизира елиминиращата по размер хроматография на хитиназа C27/5

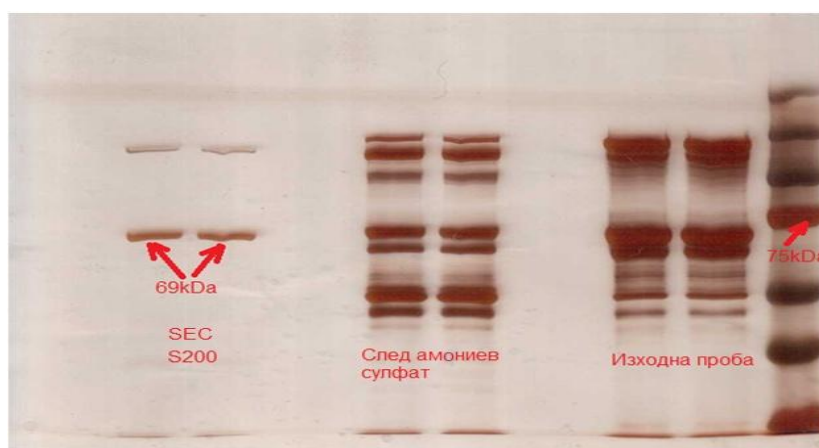
5.5. Две последователни елиминиращи по размер хроматографии

Експериментът бе проведен и със смоли Sephadex G150 и Sephacryl s200. Sephadex G150 дава задоволителни резултати. При Sephacryl S200 обаче се наблюдават два пика, които се появяват преди целевия белтък (Фиг. 7). „Остротата” на пика Sephacryl S200.

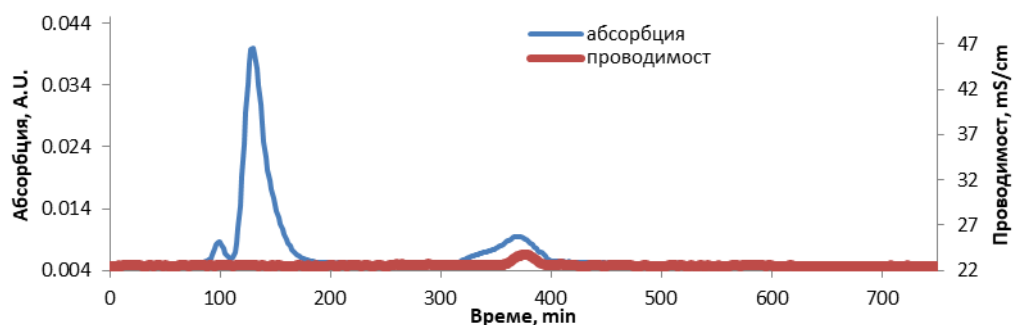


Фиг. 7. (51) Елуационен профил на утаена с амониев сулфат (степен на насищане 40%) фракция на ензимен концентрат от щам C27/5, (100 cm колона с пълнеж Sephacryl s200 и подвижна фаза 50mM KH_2PO_4 , 150mM NaCl, pH 6.0 и скорост на потока 0.2 ml/min)

Направената електрофореграма на пробата след SEC (Фиг. 8) показва отново наличие на един високомолекулен банд.



Фиг.8. (52) Електрофореза на фракция след SEC (100 cm колона с пълнеж Sephacryl s200 и подвижна фаза 50mM KH_2PO_4 , 150mM NaCl, pH 6.0 и скорост на потока 0.2 ml/min); утаена с амониев сулфат фракция със степен на насищане 40%; изходен ензимен концентрат (лиофилизат) от щам C27/5; Молекулни маркери (Kaleidoscope™ Standards 1610395).



Фиг. 9. (53) Елуационен профил на утаена с амониев сулфат (степен на насищане 40%) фракция на ензимен концентрат от щам C27/5, (50 cm колона с пълнеж Biogel P100 и подвижна фаза 50mM $C_2H_3NaO_2$, 150mM NaCl, pH 4.0 и скорост на потока 0.2 ml/min)

При концентриране на целевия пик и повторното му пускане на SEC на колона запълнена с Biogel P100 (Фиг. 9) бе наблюдаван появата на два пика – преди и след целевия белтък.



Фиг.10. (54) Електрофореза на изходна ензимен концентрат (лиофилизат) от щам C27/5; утаена с амониев сулфат фракция със степен на насищане 40%; и SEC (100 cm колона с пълнеж Sephacryl s200 и подвижна фаза 50mM KH_2PO_4 , 150mM NaCl, pH 6.0 и скорост на потока 0.2 ml/min и подобрен протокол на запълване на колоната); фракция след SEC (50 cm колона с пълнеж Biogel P100 и подвижна фаза 50mM $C_2H_3NaO_2$, 150mM NaCl, pH 4.0 и скорост на потока 0.2 ml/min); Молекулни маркери (Kaleidoscope™ Standards 1610395).

Така получената проба, бе пусната на електрофореза, заедно с предходните стъпки на пречистване (Фиг. 10). Наблюдава се само един банд след SEC с P100.

Табл. 7. (22) Основни показатели в процеса на пречистване на хитиназа C27/5 при първоначално утаяване с амониев сулфат, последващи две стъпки с SEC.

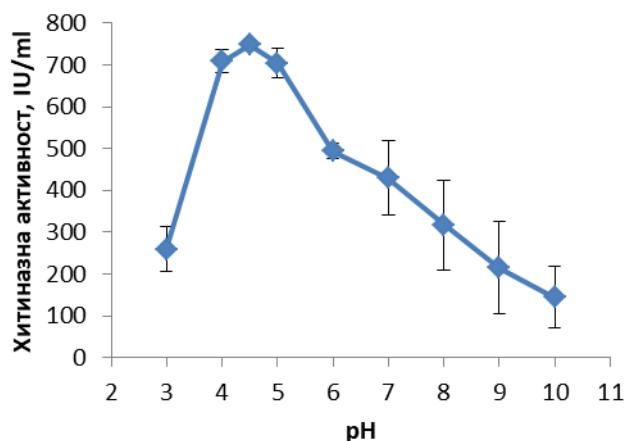
Стъпка	Общ белтък, mg	Тотална активност, IU	Специфична активност, IU/mg	Добив, %	Пречистване, пъти
Изходен	57.7	404690	7010	100.0	1.0
40% AC	14.4	355665	24647	87.89	3.52
SEC Sephacryl S200	0.5	253725	504262	62.70	71.93
SEC Biogel P100	0.496	196045	395148	48.44	56.37

От така получената схема на пречистване бе съставена таблица с добивите по активност и пречистване (Табл. 7). При съставянето на тази таблица пробата с амониев сулфат бе пропусната през 50см колона с Sephadex G25 за обезсоляване. Основната цел за разработването на тази схема е постигната, като крайният добив на активност се повишава четири пъти (от 12.12% до 48.44%). Повишена бе и степента на пречистване, както на крайната, така и на предходните стъпки на пречистване.

6. Характеристика на хитиназа от щам C27/5

6.1. pH профил на пречистената хитиназа

Характеристиката на хитиназа от щам C27/5 започна с определяне на pH оптимума на действие на ензима. Ензимът показва максимум на хитиназна активност при pH 4.5, като профилът му притежава неправилна камбановидна форма – характерна за пречистените ензими (Фиг. 11).



Фиг. 11 (56) pH профил на пречистена хитиназа от щам C27/5

6.2. Температурен профил на пречистената хитиназа

Определен бе и температурният оптимум на пречистената хитиназа от C27/5. Оптималната температура е 55°C като се наблюдава експоненциално покачване на активността от 40°C, последвано от рязък спад при 60 и 70°C. Интересно е, че при 40°C ензимът проявява едва 51% от активността си, и дори при 60°C той проявява по-висока активност от колкото при 40°C.

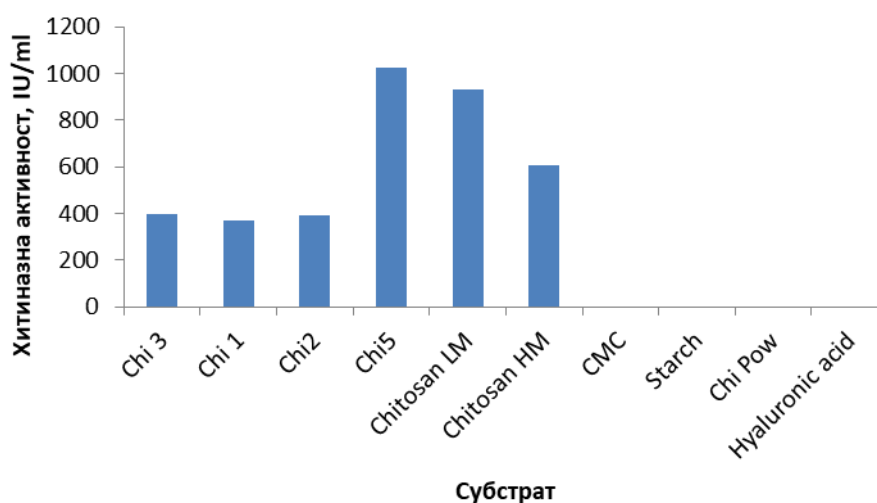
6.3. Температурна стабилност на пречистената хитиназа

Изследвана бе и термостабилността на ензима като при оптималните условия (55°C) ензимът запазва 50% от активността си в продължение на 60 минути. През 120-те часа на проведения експеримент пречистеният ензим запазва най-добре активността си при стайна температура (22°C) или при температури близки до стайната (28°C) като загубата на активност в изследвания период е не повече от 20%.

6.4. Кинетична характеристика на пречистената хитиназа

Хитиназата от щам C27/5 също бе охарактеризирана чрез определяне основните кинетични константи. Получените резултати са обработени по метода на Лайнуевър – Бърк (Lineweaver-Burk). От полученото уравнение на права, са изчислени стойностите на K_m и V_{max} , които са съответно K_m е 3.35 mg/ml а $V_{max} = 20.2 \mu\text{M/ml/min}$.

6.5. Субстратна специфичност



Фиг. 12. (62) Субстратна специфичност на хитиназа от щам C27/5.

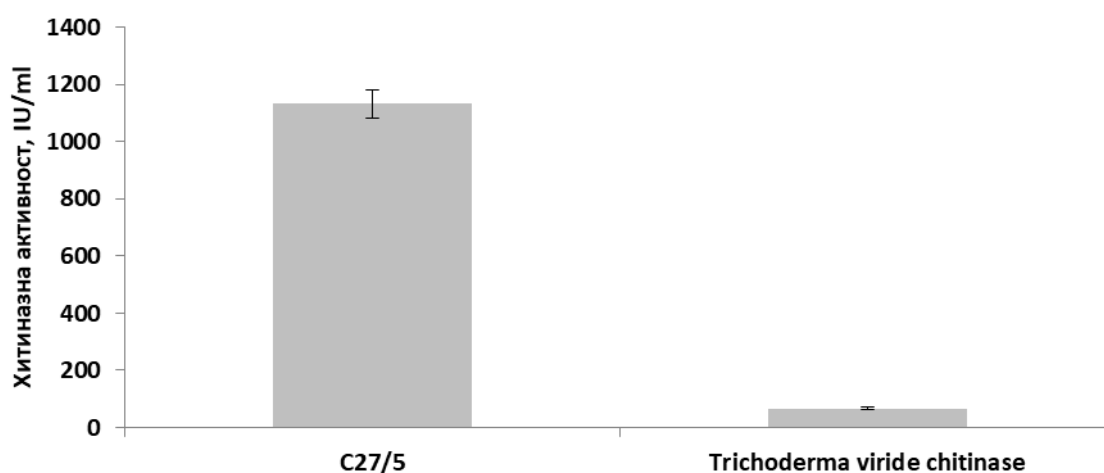
Chi 1 – хитин хидролизиран 1 час, Chi 2 - хитин хидролизиран 2 час, Chi 3 - хитин хидролизиран 3 час, Chi 5 - хитин хидролизиран 5 час. Chitosan LM – нискомолекулен хитозан, Chitosan HM – вискомолекулен хитозан, CMC – карбокси метил целулоза, Starch – нишесте, Chi Pow – хитин на прах, Hyaluronic acid – хиалуронова киселина.

Активността на хитиназа C27/5 бе изследвана и срещу други субстрати (Фиг. 12). Впечатление прави високата активност спрямо силно хидролизиран колоиден хитин. Активността не се различава съществено при колоиден хитин хидролизиран 1, 2 и 3 часа. Докато се наблюдава повишаване с 2.59 пъти на активността към хитин хидролизиран 5 часа спрямо този хидролизиран 3 часа. Същевременно проявява висока активност към ниско и високо молекулен хитозан.

6.6. Ендо и екзохитиназна активност

Изследвана бе и способността на хитиназа C27/5 да действа в краищата (екзохитиназна) и във вътрешността (еднохитиназна) на хитиновата полимерна верига. За целта бяха използвани три субстрата: PNP-NAG, PNP-chitobiose и PNP-chitotriose. Хитиназа C27/5 проявява слаба активност и към трите субстрата. Спрямо PNP-NAG проявената активност е 7.8 IU/ml, спрямо PNP-chitobiose - 3.3 IU/ml, и спрямо PNP-chitotriose - 4.8 IU/ml. Впечатление прави по-високата активност на хитиназата от *Trichoderma viride* и към трите субстрата с повече от един порядък (168 IU/ml спрямо PNP-NAG, 155 IU/ml спрямо PNP-chitobiose, и 117 IU/ml спрямо PNP-chitotriose).

6.7. Сравнителна характеристика на хитиназа от C27/5 и хитиназа от *Trichoderma viride*



Фиг. 13 (67) Сравнение на активността на хитиназа C27/5 и хитиназа от *Trichoderma viride* по отношение на колоиден хитин.

Сравнение бе направено между активността на хитиназа C27/5 и хитиназната активност от *Trichoderma viride* срещу колоиден хитин (Фиг. 13). Хитиназа C27/5 показва 17.32 пъти по-висока активност спрямо колоиден хитин от тази на хитиназа от *Trichoderma viride* (1131 IU/ml

срещу 65 IU/ml). Значителна е разликата и в специфичната активност (3162 IU/mg срещу 65 IU/mg).

6.8. Относителна активност в присъствието на някои йони

Охарактеризирането на хитиназа C27/5 продължи с изследване на влиянието на някои химични и физични фактори върху ензимната активност. Първо е изследвано влиянието на някои метални йони (Табл. 8). Влиянието йоните на Zn^{+2} и Cu^{+2} не бе установено, поради интерферирането им с метода за определяне на хитиназна активност (РАНВАН). Впечатление прави повишената относителна активност в присъствие на Co^{+2} което довежда до 2.52 пъти повишаване на активността, а на Ni^{+2} 1.86 пъти. В същото време EDTA не оказва влияние на активността.

Табл. 8. (23) Относителна активност на хитиназа от щам C27/5 в присъствие на някои йони.

Йон	Хитиназна активност, IU/ml	Относителна активност, %
Ag^{+}	447	60 ± 0.97
Pb^{+2}	510	68 ± 13.37
Ni^{+2}	1393	186 ± 8.52
Hg^{+2}	571	76 ± 1.74
Ca^{+2}	941	126 ± 5.04
Cu^{+2}	-	-
Mg^{+2}	884	118 ± 0.58
Co^{+2}	1887	252 ± 10.65
Zn^{+2}	-	-
Mn^{+2}	1082	145 ± 9.53
Fe^{+2}	990	132 ± 0.01
EDTA	725	97 ± 15.81
контрола	748	100 ± 6.74

6.9. Относителна активност в присъствието на органични разтворители

Освен влиянието на метални йони е изследвано и влиянието на някои органични разтворители в различни концентрации (1 и 2.5%). Всички те оказват негативно влияние върху хитиназната активност.

6.10. Влияние на ултравиолетова светлина и ултразвук

Изследвано е и влиянието на някои физични фактори като ултравиолетова светлина и ултразвук върху процеса на хидролиз. Влиянието на ултравиолетовата светлина върху хитиназа C27/5 е по – скоро негативно. При дължина на вълната със пик във видимия спектър (365 nm) инактивирането е слабо осезаемо, докато в UV спектъра (245nm) активността спада до 15.8%, което граничи с пълната инактивация. Ултразвука също не оказва позитивно влияние върху хитиназната активност.

6.11. Антиплесенна активност на хитиназа C27/5.

Антиплесенната активност на хитиназа C27/5 бе изследвана срещу някои плесени. Впечатление прави, че най – силна антиплесенна активност хитиназа C27/5 проявява срещу *Alternaria* sp. като диаметърът на зоните на просветляване е между 10 и 12mm. Много представители на рода *Alternaria* са патогени по растенията (*A.arborescens*, *A. arbusti*, *A.blumeae*, *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. burnsii*, *A. gaisen*, *A. infectoria*, *A. longipes* и др.) което дава добри перспективи на приложение на дадения ензим в борбата с тези патогени.

Изводи

Въз основа на проведените изследвания и получените резултати могат да се направят следните обобщени изводи:

1. Изолирани и идентифицирани са два нови продуцента (бактериален – C27 и плесенен – H5), проявяващи висока хитиназна активност. Бактериалният е определен като *Bacillus thuringiensis*, а плесенният - като *Petromyces alliaceus*. За първи път щам от вида *Petromyces alliaceus* се съобщава като продуцент на хитинази.
2. За първи път бе използвана система с временно разбъркване тип RITA за биосинтез на ензими. Системата е подходяща за култивиране на плесенни гъби с цел биосинтеза на хитинази като е постигнато високо ниво на биосинтеза на ензима за кратко време.
3. Оптимизирането на условията за култивиране и съставът на ферментационната среда позволява повишаване на ензимната активност и при двата щам, като при щам *Petromyces alliaceus* H5 повишението е почти два пъти а при щам *Bacillus thuringiensis* C27/5 - 8 пъти.
4. С разработеният оригинален протокол за изолиране и пречистване на хитиназа от щам *Bacillus thuringiensis* C27/5, включващ концентриране, фракционироване и двустепенна елиминираща по размер хроматография се получава електрофоретично чист ензимен препарат.
5. Разработеният протокол позволява постигане на висока степен на пречистване на ензима - 56 пъти при едновременно висок добив на активност - 48%.
6. Пречистеният ензим от щам *Bacillus thuringiensis* C27/5 се характеризира с хитиназна и хитозаназна активност, рН оптимум

при 4.5, температурен оптимум при 55°C и максимална температурна стабилност при стайна температура и проявява 17 пъти по-висока активност спрямо колоиден хитин от тази на хитиназа от *Trichoderma viride*.

7. Хитиназата от щам *Bacillus thuringiensis* C27/5 запазва над 60% от активността си в присъствието на тежки метали (Ag^+ , Pb^{+2} , Hg^{+2}) и повишава активността си 2.25 пъти в присъствието на Co^{+2} . Запазва над 60% от активността си в присъствието на 1% органични разтворители и над 75% в 2.5%-ни разтвори. .
8. Хитиназата от щам *Bacillus thuringiensis* C27/5 има потенциал за приложение в борбата с някои плесенни патогени от род *Alternaria*, тъй като значително потиска тяхното развитие.

Приноси

Новост за науката

1. Потвърдено е съществуването на телеоморфна форма на *Aspergillus alliaceus* - *Petromyces alliaceus*.
2. За първи път са получени данни за синтеза на ензима хитиназа от представител на род *Petromyces* - *Petromyces alliaceus* H5.
3. Изолиран е нов високо ефективен продуцент на хитиназа от бактериален произход, който е идентифициран като *Bacillus thuringiensis* C27/5.
4. Установена е възможността за приложение на хитиназен препарат от щам *Bacillus thuringiensis* C27/5 в борбата с плесенни фитопатогени от род *Alternaria*.

Методични

1. Адаптиран е метод за определяне на хитиназна активност въз основа на освободените редуциращи захари с парахидроксibenзхидразид (РАНВАН).
2. За пръв път са използвани системи с временно разбъркване тип RITA за получаване на ензими.
3. На базата на математичното моделиране е разработена оптимизирана схема за биосинтезата на хитиназа от *Bacillus thuringiensis* C27/5.
4. Разработен е протокол за получаване на електрофоретично чист ензимен препарат с хитиназна активност. Получени са данни за физикохимичните и кинетични свойства на пречистения ензим.

Списък с научните публикации във връзка с дисертационната работа

1. Публикации в научни списания

Stoykov Y., Pavlov A., Krastanov A., Chitinase biotechnology: Production, purification, and application, *Eng. Life Sci.*, vol. 15, no. 1, pp. 30–38, Jan. 2015.

2. Публикации в сборници от конференции

Draganova D., Valcheva I., Stoykov Y., Tumbariski Y., Krastanov A., Isolation and Identification of new chitinolytic fungus *Petromyces alliaceus* H5, *Bioprospect*, vol. 24, no. 3, pp. 71–75, 2014.

Stoykov Y., Krastanov A., Pavlov A. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by bacterial soil isolate. Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends. Wageningen Academic Publishers, pp. 618-624, 2014.

3. Презентации на конференции

Draganova D., Valcheva I., Stoykov Y., Tumbariski Y., Krastanov A., “Isolation and Identification of new chitinolytic fungus *Petromyces alliaceus* H5, BioTech 2014 and 6th Czech - Swiss Symposium, June 11-14, 2014. Prague, Czech Republic.

Stoykov Y., Krastanov A., Pavlov A. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by bacterial soil isolate. *Microbiologia balcanica*, 8th Congress of Microbiology, October 2 -5, 2013. Veliko Tarnovo, Bulgaria.

Stoykov Y., Krastanov A., Pavlov A. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by bacterial soil isolate. 5th International Conference on Enviromental, Industrial and Applied Microbiology, October 2 -4 2013. Madrid, Spain.

Обобщение

Основна цел на дисертационния труд е получаване, пречистване и характеристика на микробни хитинази.

Вследствие на изпълнението на научните задачи на дисертацията са изолирани и идентифицирани два щам продуцентката на хитиназа - *Bacillus thuringiensis* C27/5 и *Petromyces alliaceus* H5. Оптимизирана е хранителната среда и условията на култивиране на двата щам. Най-високи резултати при щам *Bacillus thuringiensis* C27/5 (2.75 IU/ml) бяха получени при култивиране в колби с течна хранителна в продължение на 48ч, посяти с 48 часов посевен материал, начално рН на средата 8.0, температура 24°C и оптимизирана хранителна среда. За първи път, с цел получаване на ензими, бе култивиран щам *Petromyces alliaceus* H5 в системи с временно разбъркване тип RITA. Най- високи резултати (1.40 IU/ml среда активност за двете фази) бяха получени при посяти с 7 дневен посевен материал, начално рН на средата 5.0, температура 28°C, честота на имерсия 6ч и оптимизирана хранителна среда.

Изолирана и пречистена бе хитиназа от щам *Bacillus thuringiensis* C27/5. Първоначално културалната течност бе вакуум концентрирана и лифилно изсушена, като концентрата запази 87.3% от активността си. Така полученият сух концентрат бе рехидратитан и фракциониран с амониев сулфат, последван от елеминираща по размер хроматография на Sephadex G75. Фракциите, проявили хитиназна активност, бяха подложени на йонообменна хроматография с анионообменна колона High Q, като бе получен краен добив от 12.12% и 10.32 пъти пречистване. Разработена бе и втора схема на пречистване, като вместо йоннообменна хроматография бе включена втора елеминираща по размер хроматография с Biogel P100.

Така оптимизираната схема повиши добива до 48.44% и 56.37 пъти пречистване.

Пречистеният ензим бе характеризиран, като той прояви най-висока активност при рН 4.5 и температура 55°C и запази над 80% стабилност при стайна температура. Запазва над 60% от активността си в присъствието на тежки метали (Ag^+ , Pb^{+2} , Hg^{+2}), и повишава активността си 2.25 пъти в присъствието на Co^{+2} . Запазва над 60% от активността си в присъствието на 1% органични разтворители и над 75% в 2.5%-ни разтвори. Проявява 17 пъти по-висока активност към колоиден хитин спрямо хитиназа от *Trichoderma viride* и има потенциал за приложение в борбата с някои плесенни патогени от род *Alternaria*, тъй като значително потиска тяхното развитие.

Summary

The main aim of the presented thesis is production, purification and characteristics of microbial chitinases.

As consequence of implementation of scientific strategy of this thesis were isolated and identified two chitinolytic strains - *Bacillus thuringiensis* C27/5 and *Petromyces alliaceus* H5. Medium composition and cultivation conditions were optimized. Highest enzyme production of strain *Bacillus thuringiensis* C27/5 (2.75 IU/ml) were obtained during liquid broth cultivation in flasks for 48h, inoculated with 48h inoculums, starting medium pH 8.0, temperature 24°C and optimal medium composition. For the first time temporary immersion systems type RITA were used for enzyme production during cultivation of strain *Petromyces alliaceus* H5. Highest results (1.40 IU/ml average activity for both phases) were obtained from cultivation units inoculated with 7 days

inoculum, starting pH of the medium 5.0, temperature 28°C, immersion frequency 6h⁻¹ and optimal medium composition.

Isolated and purified was chitinase from *Bacillus thuringiensis* C27/5. Initially Cultural broth was vacuum concentrated and cold dried, as 87.3% of activity was saved. Thus obtained concentrate was rehydrated and fractioned with ammonium sulfate, followed by size exclusion chromatography with Sephadex G75. Fractions exhibited enzyme activity were purified using ion exchange chromatography using anion exchange column Biorad High Q, as 12.12% activity yield and 10.32 purification fold was obtained. Developed was second purification scheme as, ion exchange chromatography step was replaces by second size exclusion chromatography step using Biorad Biogel P100. Thus, obtained purification scheme, yield 48.44% of activity and 56.37 fold purification on the final step.

Purified enzyme was characterized, as optimal pH and temperature were 4.5 and 55°C. It kept over 80% of it activity during storage at room temperature, and over 60% in presence of heavy metal ions (Ag⁺, Pb⁺², Hg⁺²), as it increase its activity by 2.25 fold in presence of Co⁺². Chitinase from *Bacillus thuringiensis* C27/5 kept 60% of activity in 1% organic solvents and over 75% of activity in 2.5% same solvents. It reveal 17 times higher activity to colloidal chitin then chitinase from *Trichoderma viride*, and it has potential application in biocontrol of fungal plant pathogen as it significantly suppress growth of strains *Alternaria* sp.