

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 577.124.22

ПРИМЕНЕНИЕ ХИТИНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ ХИТИНА И ХИТОЗАНА

^{1,2}Рысакова К.С. ORCID ID 0000-0002-8111-0708,
¹Новиков В.Ю. ORCID ID 0000-0003-1733-5838

¹Полярный филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»
«Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства
и океанографии имени Н.М. Книповича», Мурманск, Российской Федерации;

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Мурманский арктический университет», Российской Федерации, e-mail: rysakova@pinro.vniro.ru

Ферментативная биотрансформация хитина предназначена для получения олигомеров хитина и хитозана, низкомолекулярного хитозана, мономеров N-ацетилглюказамина и D(+)-глюказамина, широко применяемых в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, косметологии. Ферментативная технология отличается экологической безопасностью и возможностью получать чистые продукты с заданными свойствами. Цель исследования – провести анализ научных сведений по использованию хитинолитических ферментов для модификации и получения олигомеров и мономеров хитина и хитозана. Объектом аналитического обзора является проблема переработки хитинсодержащего сырья методами биотехнологии. Авторами статьи проведен анализ количественных данных, оценена достоверность научной литературы, выделены ключевые работы и дана объективная оценка имеющимся результатам. В обзоре рассмотрены последние данные о различных ферментах, участвующих в превращении хитина в природе: хитиназах, хитозаназах, деацетилазах, глюказаминазах и т.д. Приведены данные об источниках этих ферментов, некоторых свойствах и их способности трансформировать природный хитин. Отмечается, что в последние годы для решения задачи ферментативной переработки хитина ведется поиск ферментов, способных разрушать кристаллическую структуру хитина, например, окислением хитина или применением ферментов с несколькими связывающими доменами. Отмечено, что в отличие от жестких химических способов переработки хитина ферментативные методы с участием активных белковых веществ требуют предварительной подготовки хитина для снижения его кристалличности и увеличения доступности ферментов. На основании анализа опубликованных результатов по ферментам ракообразных был сделан вывод о возможности использования собственных ферментов ракообразных для модификации хитина с получением низкомолекулярных олигосахаридов хитина и хитозана, а также мономера N-ацетилглюказамина.

Ключевые слова: хитин, биотрансформация, ракообразные, хитиназы, хитозаназы, глюказаминидазы, деацетилазы, олигомеры хитина, хитоолигомеры, N-ацетилглюказамин, D(+)-глюказамин, экологически чистая технология

APPLICATION OF CHITINOLYTIC ENZYMES FOR MODIFICATION OF CHITIN AND CHITOSAN

^{1,2}Rysakova K.S. ORCID ID 0000-0002-8111-0708,
¹Novikov V.Yu. ORCID ID 0000-0003-1733-5838

¹Polar Branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution
"All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography" (N.M. Knipovich Polar Research
Institute of Marine Fisheries and Oceanography), Murmansk, Russian Federation;
²Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education
"Murmansk Arctic University", Russian Federation, e-mail: rysakova@pinro.vniro.ru

Enzymatic biotransformation of chitin is designed to produce chitin and chitosan oligomers, low molecular weight chitosan, N-acetylglucosamine and D(+)-glucosamine monomers, which are widely used in medicine, the food industry, agriculture, and cosmetology. The enzymatic technology is characterized by environmental safety and the ability to obtain pure products with specified properties. The purpose of the study: to analyze scientific information on the use of chitinolytic enzymes for the modification and production of oligomers and monomers of chitin and chitosan. The object of the analytical review is the problem of processing chitin-containing raw materials by biotechnology methods. The authors of the article analyzed quantitative data, assessed the reliability of scientific literature, identified key works and gave an objective assessment of the available results. The review examines the latest data on various enzymes involved in the conversion of chitin in nature: chitinases, chitosanases, deacetylases, glucosaminidases, etc. Data on the sources of these enzymes, some properties, and their ability to transform natural chitin are presented. It is noted that in recent years, in order to solve the problem of enzymatic chitin processing, a search has been underway for enzymes capable of destroying the crystal structure of chitin, for example, by chitin oxidation, or the use of enzymes with multiple binding domains. It is noted that, unlike harsh chemical methods of chitin processing, enzymatic methods involving active protein substances require preliminary preparation of chitin to reduce its crystallinity and increase the availability of enzymes. Based on the analysis of the published results on crustacean enzymes, it was concluded that it is possible to use crustacean own enzymes to modify chitin to produce low-molecular-weight oligosaccharides of chitin and chitosan, as well as the monomer N-acetylglucosamine.

Keywords: chitin, biotransformation, crustaceans, chitinases, chitosanases, deacetylases, glucosaminidases, chitin oligomers, chito oligomers, N-acetylglucosamine, D(+)-glucosamine, environmentally friendly technology

Введение

Хитин – природный полисахарид, широко распространенный в животном мире – микроорганизмах, насекомых, ракообразных, моллюсках, а также в грибах. По структуре хитин аналогичен целлюлозе за исключением наличия ацетамидной группы у второго углеродного атома. По аналогии с целлюлозой хитин играет в основном функцию защитного и поддерживающего каркаса организмов, являясь прочным и гибким соединением. Хитин является основным компонентом экзоскелета ракообразных, таких как крабы, креветки, и насекомых. Кроме того, он содержится в клеточных стенках грибов, радуле моллюсков и внутренних раковинах и клювах головоногих моллюсков, таких как осьминоги.

Синтез хитина в природе осуществляется в живых организмах с помощью ферментов хитинсигназ. Объемы воспроизведения хитина в природе составляют по разным оценкам 10^{12} – 10^{14} т в год, что ставит этот полисахарид по распространенности на второе место после целлюлозы [1, 2].

Хитин является достаточно инертным веществом, которое не растворяется в воде и большинстве растворителей, имеет плотную упорядоченную структуру, высокую молекулярную массу. Хитин обладает низкой токсичностью и инертен в желудочно-кишечном тракте млекопитающих. Из-за своих физико-химических свойств хитин в нативном состоянии используется очень ограниченно, например в виде хлопьев или мелкоизмельченного порошка [3]. Хитин широко используется для иммобилизации ферментов, целых клеток, например, в пищевой промышленности для осветления фруктовых соков, переработки молока [4]. Хитин также используется для очистки промышленных сточных вод [5], в качестве вспомогательного вещества и носителя лекарств в виде пленок, гелей или порошков для приложений, связанных с мукодегезивностью, хитиновые пленки и волокна получили применение в медицине и фармацевтике в качестве материала для перевязки ран и контролируемого высвобождения лекарств [6].

Наиболее широкие возможности раскрываются при модификации хитина в различные производные: хитозан, водорастворимые низкомолекулярные хитин, хитозан и их олигомеры, мономеры N-ацетилглюкозамина и соли D(+)-глюкозамина.

Разработаны различные способы получения производных хитина, которые включают химические, физические и ферментативные.

Наиболее широко используются химические методы гидролиза гликозидной

и ацетамидной связей в молекуле хитина под действием кислот и щелочей, приводящие к деполимеризации молекулы хитина и деацетилированию его мономерных ацетилглюкозаминных звеньев.

Получение хитозана заключается в термохимическом деацетилировании хитина. Эта реакция протекает в концентрированных растворах кислот или щелочей. Так как гликозидные связи очень чувствительны к кислой среде и практически не расщепляются в щелочной, деацетилирование избирательно осуществляют в сильнощелочной среде при высокой температуре [7, 8].

Химическая деградация хитина обычно проводится с использованием сильных кислот (HCl, HNO₂, HF, H₃PO₄) или слабых кислот (уксусная кислота, аскорбиновая кислота), но также применяется смесь органических кислот (гидроксиусусная кислота, молочная кислота и гидратированная лимонная кислота) [9].

Непереработанный хитин не имеет высокой экономической ценности и в больших количествах доступен в качестве побочного продукта пищевой промышленности. Широкое применение находят различные производные хитина, обладающие растворимостью в водных системах и различной биологической активностью. Основные цели биотрансформации хитина – это получение хитозана и низкомолекулярного хитозана, олигосахаридов хитина и хитозана, мономеров – N-ацетилглюкозамина и солей D(+)-глюкозамина.

Хитозан, линейный полимер, состоящий из множества мономеров D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, может быть получен из хитина путем ферментативной или химической обработки до олигомеров с определенной длиной цепи и степенью ацетилирования. Хитозан имеет ряд коммерческих и биомедицинских применений. Он обладает доказанными антибактериальными, противогрибковыми и антиаллергенными свойствами и поэтому представляет интерес для сельскохозяйственной и фармацевтической промышленности. Его можно использовать в качестве средства для обработки семян и биопестицида, чтобы предотвратить грибковые инфекции семян и растений. В фармацевтической промышленности его можно использовать в бинтах и других кровоостанавливающих средствах в качестве антибактериального агента.

Получение хитозана заключается в термохимическом деацетилировании хитина. Эта реакция протекает в концентрированных растворах кислот или щелочей. Так как гликозидные связи очень чувствительны к кислой среде и практически не расщепляются в щелочной, деацетилирование избирательно осуществляют в сильнощелочной среде при высокой температуре [7, 8].

пляются в щелочной, деацетилирование избирательно осуществляют в сильно щелочной среде при высокой температуре [10, 11].

Цель исследования – провести анализ научных сведений по использованию хитинолитических ферментов для модификации и получения олигомеров и мономеров хитина и хитозана.

Материалы и методы исследования

В работе использовался метод систематического литературного обозрения, а также метаанализ литературных данных. По теме исследования было проанализировано 36 научных источников с использованием баз Science Direct, Ingenta и E-library и др. При этом большинство научных работ на иностранном языке и выпущены в последние годы. Авторами статьи проведен анализ количественных данных, оценена достоверность научной литературы, выделены ключевые работы и дана объективная оценка имеющимся результатам.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Классификации хитиназ

Хитиназы (Е.С. 3.2.2.14) относятся к гликазидгидролазам, которые гидролизуют хитин до его мономера N-ацетилглюкозамина путем разрыва гликозидных связей. Молекулярная масса хитиназ колеблется в пределах 20–90 кДа. Хитиназы подразделяются на две основные группы: эндохитиназы и экзохитиназы. Эндохитиназы произвольно расщепляют хитин на внутренних участках в случайных местах, образуя низкомолекулярные олигомеры, такие как хитотриоза, хитотриоза и диацетилхитобиоза, формируя димер диацетилхитобиозы и растворимые низкомолекулярные полимеры GlcNAc. Экзохитиназы были далее разделены на две подкатегории: хитобиозидазы, которые катализируют постепенное высвобождение диацетилхитобиозы, начиная с нередуцирующего конца хитиновой микрофибриллы, и 1-4- β -глюкозаминидазы, расщепляющие олигомерные продукты эндохитиназ и хитобиозидаз, тем самым обраzuя мономеры GlcNAc [12].

2. Основные источники хитинолитических ферментов

Хитинолитические ферменты, способные расщеплять молекулу хитина до низкомолекулярных соединений вплоть до мономеров в различных организмах, таких как членистоногие, моллюски, нематоды, грибы, растения и прокариоты [13, 14].

В зависимости от потребностей организмов они выполняют различные функции, такие как защита от патогенов и пи-

щевая цель. В частности, многочисленные исследования показали, что у ракообразных хитиназы играют важную роль в физиологических процессах, таких как линька, переваривание хитина в пище и иммунная защита [15, 16]. Некоторые данные говорят о том, что хитиназы могут участвовать в осморегуляции при изменении солености воды или реагировать на это изменение [17].

В настоящее время основное внимание уделяется хитинолитическим, хитозанолитическим, деацетилирующим и другим хитиномодифицирующим ферментам, синтезируемым микробиологически. Описаны различные микроорганизмы (бактерии, грибы), производящие ферменты различной субстратной специфичности и различного действия на хитин/хитозан.

Микроорганизмы вырабатывают хитиназу для переваривания хитинового питательного вещества или для частичного гидролиза хитиновой клеточной стенки для пролиферации клеток.

Хитин является основным компонентом клеточной стенки грибов. Грибные хитиназы, как и бактериальные хитиназы, имеют множество функций, поскольку играют важную роль в питании, морфогенезе и процессах развития грибов.

У высших растений хитиназы используются для защиты от растительных патогенов и вредителей [18]. Хитиназы морских водорослей также играют роль в защите, аналогичную хитиназам растений [19]. У насекомых и ракообразных хитиназа действует путем деградации экзоскелетного хитина в кутикуле или панцире в процессе линьки.

Хитиназы являются важнейшими ферментами для ракообразных. Хитиназа играет важную роль в физиологических процессах у ракообразных, таких как линька, переваривание хитина в пище и иммунная защита [16].

Синтез и превращения хитиновых структур, осуществляемые несколькими хитин-синтезирующими и хитинолитическими ферментами, необходимы для роста и развития членистоногих. В предлиночный период эпидермис выделяет хитиназы, которые разрушают внутренние слои старого экзоскелета, одновременно синтезируя новый экзоскелет [20]. Пищеварительный тракт выделяет хитиназы, которые разрушают поступающий с пищей хитин и защищают от вирусных патогенов [21]. Хитиназа (1,4- β -поли-N-ацетилглюкозаминидаза, ЕС 3.2.1.14) – это эндоугликозидаза, которая расщепляет внутренние связи в полимерах хитина, образуя олигомерные фрагменты и хитобиозу. Они, в свою очередь, гидролизуются до N-ацетил- β -глюкозамина N-ацетил- β -глюкозаминидазой и хитобиозидазой [20].

Хитинолитические ферменты играют важную роль в защите ракообразных от патогенных грибов [14]. Хитиназа также была обнаружена у млекопитающих и рыб. Таким образом, эти живые организмы производят и используют хитиназу для своих специфических и биологических целей. Также приводятся сведения о существовании различных хитинолитических ферментов в тканях и органах морских организмов – рыб, беспозвоночных. Обсуждается вопрос источника хитинолитических ферментов у рыб и беспозвоночных, а именно, являются ли эти ферменты эндогенными, или они синтезируются присутствующими во внутренних органах животных различными микроорганизмами. Более тщательные исследования подтвердили эндогенный путь образования этих ферментов [22].

Ракообразные представляют потенциальный возможный источник хитинолитических, хитозанолитических и других ферментов, модифицирующих хитин, для промышленного производства. Это обусловлено большими объемами отходов переработки ракообразных.

3. Биотрансформация хитина

Основные цели биотрансформации хитина – это получение водорастворимых производных (хитозана, олигомеров, мономеров): хитозана, низкомолекулярных хитина и хитозана, олигосахаридов хитина (ацетилированных хитоолигосахаридов), хитоолигосахаридов (олигосахаридов хитозана), N-ацетилглюкозамина и солей D(+) глюкозамина.

Основным сырьем для получения хитиновых продуктов в настоящее время считаются отходы промышленной переработки ракообразных, которые содержат большие количества хитина и требуют утилизации.

Переработка хитинсодержащих отходов осуществляется преимущественно химическими способами. Хитин извлекают щелочной депротеинизацией и кислотной деминерализацией. Хитин перерабатывают с получением хитозана щелочным деацетилированием хитина и D(+) глюкозамина гидролизом в концентрированных кислотах.

Последние годы все больше внимания уделяется возможности замены химических способов ферментативными или биотехнологическими.

Промышленное производство хитинолитических ферментов пока находится в стадии становления. Предпочтение отдается микробиологической технологии получения хитинолитических ферментов. Например, в подробных публикациях российских ученых [23, 24] оценивается возможность промышленного микробиологического производства хитинолитических ферментов.

Несмотря на значительный прогресс в области биотехнологической переработки хитина, достигнутый за последние десятилетия, химические подходы преобладают над ферментативными на промышленном уровне. Зеленые технологии сдерживаются чрезмерной стоимостью производства высококачественных ферментов и более низким выходом по сравнению с химическими способами переработки [25]. Высокая степень кристалличности нативного хитина в водном растворе представляет собой дополнительную проблему, требующую более устойчивой стратегии предварительной обработки в долгосрочной перспективе.

Ферментативные способы, представленные в различных научных публикациях, до настоящего времени не получили достаточного обобщения в отличие от химических способов. Хитиназы рассматриваются подробно, но редко делается акцент на практической стороне вопроса – как применять хитиназы для переработки хитина и какие продукты могут быть получены?

Производство хитинолитических ферментов из отходов ракообразных или рыб пока отсутствует, хотя идея потенциального выделения хитинолитических ферментов из внутренних органов этих гидробионтов и их практическое применение для получения ХОС присутствует в публикациях некоторых ученых [26, 27].

Благодаря интересным данным о биологической активности олигомеров хитина и хитозана, хитинолитические ферменты привлекли к себе большое внимание, а хитиназа рыб и ракообразных может быть использована для производства целого ряда хитиновых продуктов для здоровья. Кроме того, из-за несовместимых физико-химических свойств хитиновых продуктов, полученных кислотным или щелочным гидролизом, постоянно востребованы дешевые хитинолитические ферменты с улучшенной каталитической способностью. В этой связи отходы морского рыболовства являются потенциальным источником для извлечения хитиназ с высокой катализической способностью.

4. Получение олигосахаридов хитина и хитозана

Химический подход модификации хитина породил ряд проблем, связанных с загрязнением окружающей среды. В отличие от них, ферментативный подход способен восполнить этот недостаток. Поэтому биодеградация, особенно ферментативный гидролиз, имеет большое значение для переработки хитиновых отходов с целью получения низкомолекулярных продуктов, в первую очередь олигосахаридов [28, 29].

Хотя многие хитиназы уже изучены, поиск экологически безопасных ресурсов и стратегий для получения олигосахаридов хитина и хитозана остается сложной задачей [5].

По сравнению с химическими и физическими методами, ферментативный метод является экологически чистым, а процесс легко контролируется. Кроме того, олигомеры могут быть получены без каких-либо дополнительных модификаций.

Однако стоимость ферментов все еще относительно высока, а отсутствие фундаментального понимания каталитических механизмов ферментов препятствует получению хитоолигосахаридов и их мономеров с помощью ферментативного подхода.

В первую очередь изучается действие специфических ферментов – хитиназ, хитозаназ.

В последнее время было изучено и охарактеризовано множество хитиназ из различных видов, включая животных, растения, насекомых, грибы и бактерии. Морские бактерии являются прекрасными источниками для производства хитиназ. В частности, бактерии, которые постоянно выживают при низких температурах, в основном выделяют холодаадаптированные ферменты, что важно в низкотемпературной каталитической реакции. Специфические ферменты могут превращать хитин в биологически активные соединения, такие как хитоолигосахариды и N-ацетил-D-глюкозамин (GlcNAc), которые могут найти применение в медицине и биотехнологии. Ферменты, участвующие в естественном производстве хитоолигосахаридов, можно разделить на два типа: ферменты, осуществляющие специфический ферментативный гидролиз (хитиназа, хитозаназа, глуканаза и т.д.), и ферменты, осуществляющие неспецифический ферментативный гидролиз (лизоцим, протеаза, липаза, амилаза, целлюлаза и т.д.). По сравнению с кислотным гидролизом, ферментативное разложение, очевидно, проще в эксплуатации и контроле. Что еще более важно, ферментативная деградация может генерировать продукты без дополнительных модификаций. Однако стоимость, доступность и специфичность ферментов ограничивают их применение и коммерческое использование.

Несколько типов неспецифических протеолитических и полисахаридных гидролаз были использованы для получения хитозановых олигомеров. К ним относятся папаин, пепсин и проназа, различные типы целлюлозы, лизоцим. Например, в образец хитозана добавляли смесь пектиназы из *Phizopus oryzae*, папаина из латекса папайи. Реакция деполимеризации протекает при 39 °C в тече-

ние 24 ч. Оказалось, что при этом образуется олигомер хитозана с содержанием олигомеров (димеров-октамеров) 33%, а димеров-тетрамеров – 54% [30].

5. Получение N-ацетилглюкозамина и D(+)-глюкозамина

Мономером хитина является глюкозамин (GlcN), который также обладает множеством биоактивных свойств, включая функции в органогенезе растений и эмбриогенезе беспозвоночных. Глюкозамин и его ацетилированное производное (N-ацетилглюкозамин (GlcNAc)), которые могут быть получены из хитина/хитозана, широко применяются в пищевой, экономической, косметической и фармацевтической промышленности, особенно при лечении артрита [10]. Соответственно, в промышленности востребованы высокоэффективные процессы получения глюкозамина. Безусловно, хитин является подходящим биосырьем для производства глюкозамина благодаря его обильному воспроизведению в природе.

Превращение хитина в N-ацетилглюкозамин осуществляется при избирательном расщеплении гликозидных связей, а получение глюкозамина включает либо деацетилирование и гидролиз хитина, либо деполимеризацию хитина и деацетилирование образующегося N-ацетилглюкозамина. Ферментативный гидролиз является экологически чистым методом получения мономеров хитина и хитозана. Ферменты, участвующие в хитинолитической системе, представлены следующим образом: эндохитиназы (ЕС 3.2.1.1.4), экзохитиназы (ЕС 3.2.1.14), хитобиазы (ЕС 3.2.1.30) и β -N-ацетил-гексозаминидазы (ЕС 3.2.1.52). Эти ферменты работают совместно, превращая хитин в N-ацетил-D-глюкозамин. Эндохитиназы гидролизуют хитин до олигомеров, таких как хитотетраозы и хитотриозы. Причем N-ацетил-хитобиазы преобладают в конечных продуктах гидролиза хитина эндохитиназами. В отличие от них, экзохитиназы высвобождают N-ацетил-хитобиозу без образования GlcNAc или олигомеров. β -N-ацетил-гексозаминидазы могут расщеплять N-ацетил-хитобиозу, N-ацетилхитотриозу и N-ацетил-хитотетраозу до мономеров GlcNAc.

Экзо- β -D-глюкозаминидаза (экзохитозан, ЕС 3.2.1.165) расщепляет хитозан или олигомеры хитозана, последовательно высвобождая D-глюкозамин из нередуцирующего терминала. Таким образом, гидролиз на основе экзо- β -D-глюкозаминидазы является потенциальным методом получения D-глюкозамина. Экзо- β -D-глюкозаминидаза демонстрирует более высокую скорость

расщепления хитотетраозы и хитопентаозы. Она может расщеплять GlcN-GlcNAc, но не GlcNAc-GlcNAc.

Ферментативный гидролиз для получения глюкозамина является перспективным подходом. Однако этот подход сложнее, чем химический гидролиз, поскольку необходимо учитывать как производство ферментов, так и производство глюкозамина. Кроме того, ферментативные процессы все еще нуждаются в тщательной оптимизации для решения вопросов, связанных с низким выходом и неполным превращением хитина в мономеры.

6. Отходы переработки ракообразных и способы их утилизации

Продукция рыболовства и аквакультуры не полностью используется для потребления человеком. Фактически переработка рыбы, моллюсков и других морских животных приводит к образованию значительного количества отходов, которые, в зависимости от вида, могут достигать 50–70 % от общего объема производства [31].

Отходы рыболовства и аквакультуры обычно выбрасываются в море или на свалки, в лучшем случае перерабатываются в рыбную муку и рыбий жир [14].

В рыбной промышленности и аквакультуре растет потребность в переходе на безотходный подход за счет полной утилизации продукции рыболовства и аквакультуры, сокращения образования отходов и повышения ценности производимых отходов. Переработка отходов рыболовства и аквакультуры не только снижает их серьезное воздействие на окружающую среду, но и повышает их экономическую ценность [31, 32].

В рамках концепции «голубой биоэкономики», в которой устойчивое использование океана и его ресурсов является приоритетом, крайне важно минимизировать и/или исключить образование отходов [33]. Благодаря обилию ценных биомолекул (ферментов, белков/пептидов, полиненасыщенных жирных кислот, каротиноидов, минералов и гидроксиапатита, а также полисахаридов, включая хитин и гликозаминогликаны) отходы переработки морских гидробионтов представляют ценное сырье [34, 35].

Ферменты из отходов переработки морских гидробионтов представляют интерес с нескольких точек зрения. Во-первых, наличие уникальных свойств, высокой активности, разнообразной субстратной специфичности. Во-вторых, было обнаружено, что ферменты морского происхождения обладают свойствами холодовой адаптации (то есть активны в диапазоне от 0 до 30 °C,

но нестабильны при температуре выше 50 °C [36]. В-третьих, получение ценных ферментов – элемент комплексной переработки отходов, получение продуктов с добавленной стоимостью.

Уникальные возможности представляют отходы переработки ракообразных. После получения пищевой продукции – мышечной ткани конечностей крабов или креветок остается до 60 % отходов, включающих несъедобный хитиновый покров и внутренности. Многочисленные исследования показывают, что эти отходы являются сырьем для получения различных углеводов (полисахаридов – хитина, хитозана, их производных, моносахаридов – глюкозамина и ацетилглюкозамина, липидов и каротиноидов, активных белков – ферментов, обладающих широким спектром различной субстратной активности – протеолитической, коллагенолитической, хитино- и хитозанолитической и др. В конечном счете неутилизируемый белок панцирь содержащих отходов и внутренностей может послужить сырьем для получения ферментативных белковых гидролизатов различного назначения. Минеральная часть панциря ракообразных, представляющая комплекс карбонатов и фосфатов кальция, магния и других металлов, оказывается хорошим минеральным премиксом в корма сельскохозяйственной птицы и животных.

Заключение

Таким образом, анализ сведений по использованию ферментов для биотрансформации хитина показал, что эта проблема очень актуальна и решаема. В настоящее время основное внимание уделяется использованию микробиологических источников ферментов и получению рекомбинантных ферментов с заданными свойствами. Тем не менее вопрос выделения ферментов, существующих в отходах промысла и переработки рыбы и беспозвоночных, остается также важным. С нашей точки зрения, выделение хитинолитических ферментов в рамках комплексной безотходной технологии переработки промысловых крабов может быть целесообразным. Идеи, высказываемые в проанализированных публикациях, позволяют разработать научный подход к подготовке хитина для ферментолиза, а также развить методы аналитического определения, экстракции и очистки ферментов из тканей ракообразных. В перспективе рассматривается возможность использования ферментных систем морских микроорганизмов, проявляющих хитинолитическое действие.

Список литературы

1. Bastiaens L., Soetemans L., D'Hondt E., Elst K. Sources of chitin and chitosan and their isolation // In: Chitin and Chitosan: Properties and Applications / L.A.M. Van Den Broek, C.G. Boeriu (Eds.). Hoboken, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2020. P. 1–34. DOI: 10.1002/9781119450467.ch1.
2. Yadav M., Goswami P., Paritosh K., Kumar M., Pareek N., Vivekanand V. Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials // Bioreour. Bioprocess. 2019. Vol. 6. Article ID 8. DOI: 10.1186/s40643-019-0243-y.
3. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications // Prog. Polym. Sci. 2006. Vol. 31. Is. 7. P. 603–632. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
4. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review // Enzyme Microb. Technol. 2004. Vol. 35. № 2–3. P. 126–139. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
5. Kosyakov V.N., Yakovlev N.G., Veleshko I.E. Application of chitin-containing fiber material "Mycoton" for actinide absorption // J. Nucl. Sci. Technol. 2002. Vol. 39 (suppl. 3). P. 508–511. DOI: 10.1080/00223131.2002.10875518.
6. Yin H., Du Y., Dong Z. Chitin oligosaccharide and chitosan oligosaccharide: Two similar but different plant elicitors // Front. Plant Sci. 2016. Vol. 7. P. 522. DOI: 10.3389/fpls.2016.00522.
7. Soon C.Y., Tee Y.B., Tan C.H., Rosnita A.T., Khalina A. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration // Int. J. Biol. Macromol. 2018. Vol. 108. P. 135–142. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.138.
8. Srinivasan H., Kanayairam V., Ravichandran R. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1 // Int. J. Biol. Macromol. 2018. Vol. 107. Part A. P. 662–667. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.035.
9. Khiari Z., Mason B. Comparative dynamics of fish by-catch hydrolysis through chemical and microbial methods // LWT. 2018. Vol. 97. P. 135–143. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.06.032.
10. Novikov V.Yu., Derkach S.R., Konovalova I.N., Dolgopyatova N.V., Kuchina Yu.A. Mechanism of heterogeneous alkaline deacetylation of chitin: A review // Polymers. 2023. Vol. 15. Is. 7. P. 1729. DOI: 10.3390/polym15071729.
11. Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications // Mar. Drugs. 2015. Vol. 13. Is. 3. P. 1133–1174.
12. Aly M.M., Sediq A.N., Baghdadi A.M., Amasha R.H. Chitin and chitinases, production, characterization and applications // IOSR j. pharm. biol. sci. 2019. Vol. 14. Is. 2. Ser. 1. P. 36–43. URL: <http://www.iosrjournals.org/iosr-jpbs/papers/Vol14-issue2/Series-1/E1402013643.pdf> (дата обращения: 12.11.2025). DOI: 10.9790/3008-1402013643.
13. Dukariya G., Kumar A. Distribution and biotechnological applications of chitinase: A review // Int. J. Biochem. Biophys. 2020. Vol. 8. Is. 2. P. 17–29. DOI: 10.13189/ijbb.2020.080201.
14. Liu M., Chen C., Wu Q.-C., Chen J.-L., Dai L.-S., Chu S.H., Liu Q.-N. Chitinase involved in immune regulation by mediated the toll pathway of crustacea *Procambarus clarkii* // Fish Shellfish Immunol. 2021. Vol. 110. P. 67–74. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.12.015.
15. Liu W., Lyu Q., Qin Z. Preparation of chitoooligosaccharides and its monomer // Oligosaccharides of Chitin and Chitosan. Bio-manufacture and Applications / Ed. by Liming Zhao. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019. P. 29–54. DOI: 10.1007/978-981-13-9402-7_3.
16. Ye C., Lu Z., Sarath B.V., Zhang X., Liu X., Zhao L., Pan G., Lin L. Cloning and expression analysis of chitinase-3B from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) during molting cycle // J. Fish. China. 2019. Vol. 43. Is. 4. P. 751–762. DOI: 10.11964/jfc.20180511272.
17. Lv J., Liu P., Wang Y., Gao B., Chen P., Li J. Transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* in response to salinity stress provides insights into the molecular basis of osmoregulation // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. Is. 12. P. e82155. DOI: 10.1371/journal.pone.0082155.
18. Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedermann-Merdigoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B. Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens // Biochimie. 1993. Vol. 75. Is. 8. P. 687–706. DOI: 10.1016/0300-9084(93)90100-7.
19. Shirota K., Sato T., Sekiguchi J., Miyauchi K., Mochizuki A., Matsumiya M. Purification and Characterization of Chitinase Isozymes from a Red Algae, *Chondrus verrucosus* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008. Vol. 72. Is. 12. P. 3091–3099. URL: https://www.researchgate.net/publication/23627479_Purification_and_Characterization_of_Chitinase_Isozymes_from_a_Red_Algae_Chondrus_verrucosus (дата обращения: 22.10.2025).
20. Zou E., Bonvillain R. Chitinase activity in the epidermis of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as an *in vivo* screen for molt-interfering xenobiotics // Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2004. Vol. 139. Is. 4. P. 225–230. DOI: 10.1016/j.cca.2004.11.003.
21. Zhang J., Sun Y., Li F., Huang B., Xiang J. Molecular characterization and expression analysis of chitinase (Fcchi-3) from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* // Mol. Biol. Rep. 2010. Vol. 37. Is. 4. P. 1913–1921.
22. Khiari Z. Enzymes from fishery and aquaculture waste: Research trends in the era of artificial intelligence and circular bio-economy // Mar. Drugs. 2024. Vol. 22. Is 9. P. 411. DOI: 10.3390/md22090411.
23. Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И. Особенности деполимеризации хитозана хитиназами, хитозаназами и неспецифическими ферментами при получении биоактивных хитоолигосахаридов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 6. С. 551–567. DOI: 10.7868/S0555109917060022.
24. Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Варламов В.П. Биотехнологические аспекты ферментативного получения биоактивных хитоолигосахаридов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 315–337. DOI: 10.1134/S0555109919040020.
25. Arnold N.D., Bruck W.M., Garbe D., Bruck T.B. Enzymatic modification of native chitin and conversion to specialty chemical products // Mar. Drugs. 2020. Vol. 18. Is. 2. P. 93. DOI: 10.3390/md18020093.
26. Pan D., He N., Yang Z., Liu H., Xu X. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization // Dev. Comp. Immunol. 2005. Vol. 29. Is. 2. P. 103–112.
27. Affes S., Aranaz I., Hamdi M., Acosta N., Ghribel-Bellaaj O., Heras A., Nasri M., Maalej H. Preparation of a crude chitosanase from blue crab viscera as well as its application in the production of biologically active chito-oligosaccharides from shrimp shells chitosan // Int. J. Biol. Macromol. 2019. Vol. 139. P. 558–569. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.116.
28. Fu X., Guo Y., Jin Y., Ma M. Bioconversion of chitin waste using a cold-adapted chitinase to produce chitin oligosaccharides // LWT. 2020. Vol. 133. P. 109863. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109863.
29. Krolicka M., Hinz S.W.A., Koetsier M.J., Joosten R., Eggink G., van den Broek L.A.M., Boeriu C.G. Chitinase Chi1 from *Myceliphthora thermophila* C1, a thermostable enzyme for chitin and chitosan depolymerization // J. Agric. Food Chem. 2018. Vol. 66. Is. 7. P. 1658–1669. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04032.
30. Tischenko G., Simunek J., Brus J., Netopilik M., Pejkarek M., Walterova Z., Koppova I., Lenfeld J. Low-molecular-weight chitosans: preparation and characterization // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 86. Is. 2. P. 1077–1081. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.04.073.

31. Khiari Z. Sustainable upcycling of fisheries and aquaculture wastes using fish-derived cold-adapted proteases // *Front. Nutr.* 2022. Vol. 9. P. 875697. DOI: 10.3389/fnut.2022.875697.
32. Valimaa A.L., Makinen S., Mattila P., Marnila P., Pi-hlanto A., Maki M., Hiiidenhovi J. Fish and fish side streams are valuable sources of high-value components // *Food Qual. Saf.* 2019. Vol. 3. Is. 4. P. 209–226. DOI: 10.1093/fqsafe/fyz024.
33. Verissimo N.V., Mussagy C.U., Oshiro A.A., Mendonça C.M.N., Santos-Ebinuma V.D.C., Pessoa A., Oliveira R.P.D.S., Pereira J.F.B. From green to blue economy: Marine biorefineries for a sustainable ocean-based economy // *Green Chem.* 2021. Vol. 23. P. 9377–9400. DOI: 10.1039/D1GC03191K.
34. Caruso G., Floris R., Serangeli C., Di Paola L. Fishery wastes as a yet undiscovered treasure from the sea: biomolecules sources, extraction methods and valorization // *Mar. Drugs.* 2020. Vol. 18. Is. 12. P. 622. DOI: 10.3390/md18120622.
35. Singh S., Negi T., Sagar N.A., Kumar Y., Tarafdar A., Sirohi R., Sindhu R., Pandey A. Sustainable processes for treatment and management of seafood solid waste // *Sci. Total Environ.* 2022. Vol. 817. P. 152951 (17 p.). DOI: 10.1016/j.scitenv.2022.152951.
36. Wang G.-x., Gao Y., Hu B., Lu X.-l., Liu X.-y., Jiao B.-h. A novel cold-adapted ‘beta’-galactosidase isolated from *Halomonas* sp. S62: gene cloning, purification and enzymatic characterization // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 29. P. 1473–1480. DOI: 10.1007/s11274-013-1311-7.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 25-16-00064.

Financing: The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation, project No. 25-16-00064.