

# Aktywność deacetylazy chityny i glikozydaz w ekstraktach z grzybnia *Mucor rouxii*

Ilona Kołodziejska<sup>1</sup>

Anna Wojtasz-Pająk<sup>2</sup>

Małgorzata Malesa-Ciećwierz<sup>2</sup>

Celina Niecikowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Technologii Utrwalania Żywności, Wydział Chemiczny Politechnika Gdańska, Gdańsk

<sup>2</sup>Zakład Technologii i Mechanizacji Przetwórstwa Morski Instytut Rybacki, Gdynia

## 1. Wprowadzenie

Chityna, jeden z najobficiej występujących w naturze polisacharydów, nie rozpuszcza się w większości rozpuszczalników, co ogranicza jej przemysłowe zastosowanie. Tę właściwość można zmienić przez odpowiednie modyfikacje chityny, w tym przede wszystkim przez deacetylację. Chitozan — produkt częściowej lub całkowitej deacetylacji chityny, znajduje zastosowanie w przemyśle żywnościowym, kosmetycznym, włókienniczym i papierniczym oraz w medycynie, weterynarii, ochronie środowiska i rolnictwie (1). Przemysłowo deacetylację chityny prowadzi się stężonym, gorącym roztworem wodorotlenku sodu. Powoduje to, szczególnie przy otrzymywaniu chitozanu o małej zawartości grup acetylowych, gdzie stosuje się dwu- lub trzykrotną obróbkę w temperaturze powyżej 100°C — niekontrolowaną hydrolizę polimeru (2). Alternatywną metodą może być enzymatyczna deacetylacja. W porównaniu z metodą chemiczną pozwoliłaby ona na prowadzenie procesu w łagodniejszych warunkach, zapobiegających niekorzystnym, degradacyjnym zmianom produktu w tych przypadkach, gdy wymagana jest duża masa cząsteczkowa polimeru i jego duża lepkość w roztworach. Wyeliminowanie konieczności stosowania gorącego, stężonego roztworu wodorotlenku sodu zmniejszyłoby też uciążliwość pracy i zanieczyszczenie środowiska ściekami.

Deacetylaza chityny występuje m.in. w grzybach *Zygomycetes* (3,4), których ściany komórkowe zawierają oprócz chityny również chitozan (5,6). Biomasa tych grzybów może zatem stanowić materiał wyjściowy zarówno do otrzymywania enzymu, jak i chitozanu.

Celem pracy, która jest fragmentem badań dotyczących biochemicznych właściwości deacetylazy z *Mucor rouxii* i możliwości wykorzystania enzymu do biotechnologicznego wytwarzania chitozanu, było określenie optymalnego pH oraz aktywności deacetylazy w surowych ekstraktach z grzybni wobec chityny i jej pochodnych. Sprawdzone też wstępnie w jakiej mierze substraty i produkty reakcji deacetylacji są podatne na działanie glikozydaz obecnych w nieoczyszczonych ekstraktach.

## 2. Materiały

### 2.1. Materiał biologiczny i podłoża

Źródłem deacetylazy był *Mucor rouxii* ATCC 24905, przekazany nieodpłatnie przez Katedrę Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, przechowywany w temp. 4°C na skosach agarowych YPG (ekstrakt drożdżowy, pepton, glukoza).

Podłoże YPG, zawierające 3 g ekstraktu drożdżowego, 10 g peptonu i 20 g glukozy w 1 l pożywki, przygotowywano ze składników krajowych lub firmy Difco. Kwasowość pożywek regulowano przy użyciu rozcieńczonego kwasu siarkowego. Podłoża ciekłe (pH 4,5) o objętości 200 ml sterylizowano przez 15 minut w temp. 121°C. Podłoża stałe YPG (pH 5,0) przygotowywano z dodatkiem agaru i po sterylizacji rozlewano do jałowych butelek Roux.

### 2.2. Substraty

Stosowano chitynę krystaliczną wyprodukowaną z pancerzy kryla *Euphausia superba* przy zastosowaniu technologii opracowanej w Morskim Instytucie Rybackim w Gdyni (7). Stanowiła też ona materiał do otrzymywania pozostałych substratów.

Chitozany o stopniu deacetylacji od 61 do 94%, oznaczone jako chitozan-61...chitozan-94, otrzymano działając na chitynę 50% roztworem wodorotlenku sodu (1:10 w/w), w warunkach podanych w tabeli 1. Po każdym etapie deacetylacji chitozany przemywano kilkanaście razy wodą (1:10 w/v) i produkt końcowy suszono w temp. 80°C.

Chitynę koloidalną uzyskano po traktowaniu chityny 28% roztworem kwasu solnego (1:14 w/w) przez 3 godziny w temperaturze pokojowej i strąceniu przez rozcieńczenie wodą (1:6 w/v). Strącony polimer sączono i płukano wodą o temp. ok. 70°C do momentu uzyskania pH zawiesiny powyżej 5. Zawiesinę chityny przechowywano w temp. 4°C w obecności 0,02% azydku sodu.

Oligosacharydy N-acetyloglukozaminy zostały otrzymane według opatentowanej procedury polegającej na hydrolizie chityny, acetylacji mieszaniny bezwodnikiem octowym i wyodrębnieniu produktów przy użyciu filtracji żelowej (8). Karboksymetylochitynę otrzymano według Somorina i wsp. (9).



TABELA 1  
WARUNKI DEACETYLACJI CHITYNY I FIZYKOCHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA CHITOZANÓW

czas (min)	Warunki deacetylacji <sup>1</sup>		Charakterystyka chitozanów		
	krotność reakcji	temperatura (°C)	stopień deacetylacji (%)	masa cząsteczkowa	lepkość istotna (ml/g)
15	x 1	85	61	2 036 000	1333
20	x 1	115	64	1 434 000	962
30	x 1	115	73	1 341 000	904
20	x 2	115	84	1 623 000	1080
20	x 3	115	91	1 632 000	1086
60 x 1 + 90 x 1		140	94	343 000	255

<sup>1</sup>50% roztwór wodorotlenku sodu : chityna = 10 : 1 w/w.

### 2.3. Odczynniki

Stosowano zestaw odczynników do oznaczenia kwasu octowego (Boehringer), tlenek glinu (Alumina A-5, Sigma), N-acetyloglukozaminy, chlorowodorek glukozaminy, chlorowodorek 2,9-dimetylo-1,10-fenantroliny (Merck), 2-amino-2-(hydroksymetylo)-1,3-propandiol (Tris, Serva). Pozostałe odczynniki były produkcyjne krajowej.

## 3. Metody

### 3.1. Przygotowanie materiału szczepionego i warunki hodowli *M. rouxii*

Zarodniki ze skosów posiewano na stałe podłoże YPG o pH 5,0 w butelkach Roux i inkubowano 7 dni w temperaturze 28°C (10). Następnie do butelek dodawano 20 ml sterylnej, destylowanej wody i jałową bagietką delikatnie pocierano powierzchnię grzybni w celu zebrania zarodników. Zawiesinę zarodników zlewano do jałowych probówek. Do 200 ml podłoża, w kolbach stożkowych o pojemności 500 ml, wprowadzano ok.  $10^7$  zarodników. Hodowle prowadzono przez 48 godzin w temp. 28°C we wstrząsanej łaźni wodnej o ruchu posuwisto-zwrotnym z częstotliwością 100 cykli/min i amplitudzie 5. Grzybnię oddzielano od cieczy hodowlanej przez filtrację na lejku Büchnera z sączkiem, przemywano zimną wodą destylowaną, zamrażano i przechowywano w temp. -20°C do momentu badań.

### 3.2. Otrzymywanie ekstraktu enzymatycznego

Zamrożoną grzybnię rozcierano z tlenkiem glinu (1:2 w/w) w moździerzu w temp. 0°C przez 15 minut. Następnie ucierając dodawano stopniowo 0,025 M bufor Tris-HCl o pH 7,2, w stosunku mokra grzybnia:bufor = 1:7 w/v. Zawiesinę wstępnie wirowano 10 minut przy 4000 x g, a następnie 60 minut



przy 15 000 x g w temp. 0°C. Stężenie białka w ekstrakcie oznaczano metodą Lowry'ego i wsp. (11).

### 3.3. Oznaczanie aktywności deacetylazy

Aktywność deacetylazy określano przez oznaczanie kwasu octowego uwolnionego ze substratu, stosując enzymatyczną metodę Bergmeyera (12).

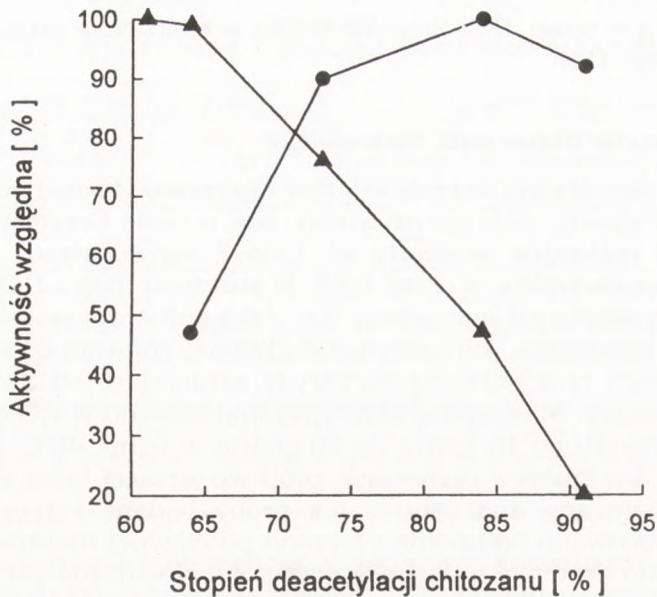
Mieszanina reakcyjna zawierała od 1 do 7 mg substratu i od 0,25 do 0,50 mg białka ekstraktu w 1 ml 0,05 M roztworu Tris i HCl w ilości potrzebnej do uzyskania pH mieszaniny 5,6. Jako substraty stosowano: chitynę krystaliczną i koloidalną, karboksymetylochitynę, chitozan o zróżnicowanym stopniu acetylacji oraz chitooligosacharydy zawierające od 3 do 6 reszt N-acetyloglukozaminy. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w zależności od stosowanego substratu od 15 minut do 20 godzin w temp. 40°C. Reakcję przerywano przez 3-minutowe ogrzewanie prób we wrzącej łaźni wodnej. Próby ślepe przygotowywano analogicznie jak próby badane z tym, że substrat i ekstrakt inkubowano oddzielnie i łączono po cieplnej inaktywacji enzymu. Próby chłodzono do temperatury pokojowej, doprowadzono pH do ok. 8 roztworem NaOH, a następnie wirowano przez 20 minut przy 15 000 x g. W supernatancie oznaczano kwas octowy. Aktywność właściwą deacetylazy wyrażano w J x mg białka<sup>-1</sup>. Jedna jednostka odpowiada takiej ilości deacetylazy, która uwalnia z substratu 1 μmol kwasu octowego w czasie minuty.

Aktywność deacetylazy w zależności od pH określono stosując jako substrat chitozan-61. Zawiesinę chitozanu w wodzie, przez cały czas mieszając, zakwaszono do odpowiedniego pH 0,2 M roztworem kwasu solnego. Poniżej pH 6 substrat rozpuszczał się, natomiast powyżej tego pH tworzył nadal zawiesinę. Do tak przygotowanych substratów dodawano ekstrakt z grzybni i ponownie mierzono pH w temp. 40°C. Reakcję enzymatyczną prowadzono przez 30 minut w temp. 40°C przy stężeniu białka ekstraktu 0,5 mg i substratu 2,5 mg w 1 ml mieszaniny.

### 3.4. Oznaczanie aktywności glikozydaz

Jako substraty stosowano chitynę krystaliczną w postaci zawiesiny, karboksymetylochitynę rozpuszczoną w wodzie, chitozan o stopniu deacetylacji 94% w postaci zawiesiny oraz chitozany o stopniu deacetylacji 94, 91, 84, 73, 64 i 61% rozpuszczone w 0,2 M kwasie octowym (pH roztworów doprowadzono do 5,6 roztworem wodorotlenku sodu).

Mieszaninę reakcyjną zawierającą 2,5 mg substratu i 0,5 mg białka ekstraktu w 1 ml 0,05 M buforu octanowego lub 1 ml 0,05 M roztworu Tris i HCl inkubowano przy pH 5,6 przez 60 minut w temp. 40°C lub 20 godzin w temp. 30°C. Dalsze postępowanie przeprowadzono jak w pkt. 3.3. z omiśnięciem etapu regulacji odczynu do pH 8. W supernatancie oznaczano cukry redukujące metodą Nelsona, zmodyfikowaną wg Dygerta i wsp. (13). Aktywność właściwą enzymów wyrażano jako wartość absorbancji —  $A_{450} \times \text{mg białka}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ . W wybranych doświadczeniach oznaczano w mieszaninie re-



Rys. 1. Wpływ pH na aktywność ekstraktu z grzybni *M. rouxii* w deacetylacji chityny. Jako substrat stosowano chitozan-61 (2,5 mg/ml), stężenie białka ekstraktu wynosiło 0,5 mg/ml; czas reakcji 30 min w temp. 40°C. pH regulowano 0,2 M roztworem HCl jak opisano w pkt. 3.3.

akcyjnej zawartość monomerów GlcNAc metodą Reissiga i wsp. (14). Równolegle w oddzielnych próbach, stosując tę samą metodę, oznaczano monomery GlcN w formie pochodnej GlcNAc, po uprzedniej acetylacji bezwodnikiem octowym (15).

Wyniki oznaczeń aktywności enzymów są średnimi z trzech oddzielnych prób tego samego ekstraktu.

## 4. Wyniki i dyskusja

### 4.1. Wpływ pH na aktywność deacetylazy chityny

Surowy ekstrakt deacetylazy wykazywał maksymalną aktywność wobec chitozanu-61 w pH 5,2-5,9 (rys. 1). Optymalne pH oczyszczonych enzymów, wyizolowanych przez innych autorów ze szczepów *Mucor rouxii* ATCC 24905 oraz *Mucor rouxii* AHU 6019, mieściło się w szerszym zakresie (4,0-5,9 wobec glikolu chityny) (3,6,16). Na aktywność deacetylazy i optymalne pH tego enzymu duży wpływ wywiera również rodzaj stosowanego buforu lub roztworu, w którego środowisku prowadzona jest reakcja. Enzym ten inhibują kwasy organiczne, szczególnie kwas octowy (produkt deacetylacji) i cytrynowy (3), często używane jako składniki buforów. Deacetylaza wyizolowana z grzybni *M. rouxii* przez Araki i Ito (3) przejawiała kilkakrotnie mniejszą aktywność



wobec glikolu chityny w buforze octanowym niż w buforze: kwas 2-[2-hydroksy-1,1-bis(hydroksymetylo)etylo]amino-etanosulfonowy (TES)-NaOH i w roztworze mrówczanu sodu, a optymalne pH wynosiło odpowiednio 5,8, oraz 5,5-5,9 i 5,5. Enzym wyizolowany z *M. rouxii* przez Kafetzopoulou i wsp. (16) wykazywał maksymalną aktywność w deacetylacji glikolu chityny przy pH 4,5 w 0,025 M roztworze glutaminianu sodu. Deacetylaza otrzymana z tego samego szczepu przez Arcidiacono i wsp. (6) przejawiała maksymalną aktywność przy pH 4 w roztworze Tris-HCl, a w buforze TES-NaOH i buforze octanowym przy pH 5, przy czym mniejszą niż w roztworze Tris-HCl.

Deacetylaza chityny *M. rouxii* przy pH 8 zachowuje w degradacji rozpuszczalnego glikolu chityny nawet do 35% maksymalnej aktywności (3,6). Brak aktywności przy tym pH wykazany w naszych badaniach wobec chitozanu-61 (rys. 1) jest przypuszczalnie spowodowany straceniem się substratu w pH 8.

#### 4.2. Aktywność ekstraktów z grzybni *M. rouxii* w deacetylacji chityny i jej pochodnych

Spośród badanych rozpuszczalnych w wodzie chitooligosacharydów, zawierających w cząsteczce od 3 do 6 reszt N-acetyloglukozaminy, największą aktywność wykazywał ekstrakt enzymatyczny wobec (GlcNAc)<sub>6</sub> (tab. 2). Deacetylaza, podobnie jak to wykazali Kafetzopoulos i wsp. (16), nie była aktywna wobec chitooligosacharydów zawierających mniej niż cztery reszty GlcNAc. Enzym wyizolowany z grzybni *M. rouxii* przez Araki i Ito (3) przejawiał aktywność deacetylazy także wobec trisacharydu, lecz dopiero po 48 godzinach inkubacji w 30°C. Również deacetylaza z *Colletotrichum lindemuthianum* po przedłużonej inkubacji z (GlcNAc)<sub>3</sub> wykazywała aktywność, mniejszą jednak niż wobec (GlcNAc)<sub>4</sub> (17).

TABELA 2  
AKTYWNOŚĆ EKSTRAKTÓW Z GRZYBNI *M. rouxii*  
W DEACETYLACJI ROZPUSZCZALNYCH W WODZIE CHITOOLOGOSACHARYDÓW

Substrat	Aktywność właściwa (mJ x mg białka <sup>-1</sup> )
(GlcNAc) <sub>3</sub>	0,00
(GlcNAc) <sub>4</sub>	1,07
(GlcNAc) <sub>5</sub>	5,18
(GlcNAc) <sub>6</sub>	13,12

Czas reakcji 30 min w temp. 40°C, pH 5,6.

Krystaliczna chityna jest odporna na działanie deacetylazy, natomiast polimorficzna (koloidalna) postać chityny jest znacznie łatwiej deacetylowana (tab. 3). Podobne wyniki uzyskali Davis i Bartnicki-Garcia (5) oraz Tsigos i wsp. (17). Najbardziej podatny na enzymatyczną deacetylację był rozpuszczony chitozan o stopniu deacetylacji 61%. Chitozan-91, zwłaszcza w postaci zawiesiny, jest substratem mało podatnym na działanie enzymu. Aktywność deacetylazy

wobec rozpuszczalnej w wodzie karboksymetylochityny była ośmiokrotnie niższa niż wobec chitozanu-61. Świadczy to, że nie tylko rozpuszczalność substratu wpływa na jego podatność na atak enzymu, lecz decyduje o tym również rodzaj, liczba i rozmieszczenie podstawników w cząsteczce.

TABELA 3  
AKTYWNOŚĆ EKSTRAKTÓW Z GRZYBNI *M. rouxii*  
W DEACETYLACJI CHITYNY, CHITOZANU I KARBOKSYMETYLOCHITYNY

Substrat	Aktywność właściwa (mJ x mg białka <sup>-1</sup> )
chityna krystaliczna <sup>1</sup>	0,04
chityna koloidalna <sup>1</sup>	1,24
chitozan-61 (rozpuszczony) <sup>2</sup>	19,40
chitozan-91 (rozpuszczony) <sup>2</sup>	3,87
chitozan-91 (zawiesina) <sup>2</sup>	0,33
karboksymetylochityna <sup>2</sup>	2,40

<sup>1</sup>Czas reakcji 20 godz. w temp. 40°C, pH 5,6.

<sup>2</sup>Czas reakcji 30 min w temp. 40°C, pH 5,6.

Araki i Ito (3) stosując jako substrat glikol chityny stwierdzili, że aktywność deacetylazy jest inhibowana przez powstające produkty reakcji: zdeacetylowany glikol chityny i kwas octowy. W optymalnych warunkach uzyskali oni, podobnie jak Arcidiacono i wsp. (6), tylko ok. 30-50% deacetylację tego substratu.

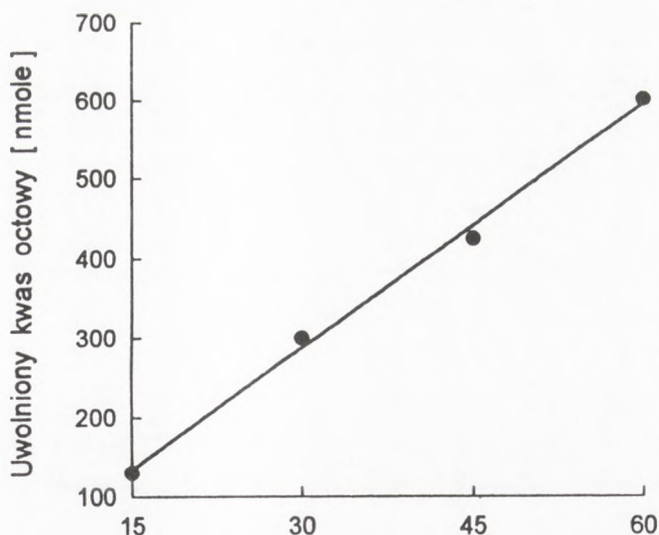
Zbadano również wpływ czasu reakcji na aktywność deacetylazy wobec chitozanu-61. Nie ulegała ona zmianom w ciągu 60 minut reakcji (rys. 2). Stosując jako substraty rozpuszczone chitozany o różnym stopniu deacetylacji stwierdzono, że aktywność enzymu jest tym mniejsza, im mniej grup acetylowych w cząsteczce zawiera wyjściowy substrat (rys. 3). Według Tsigosa i wsp. (17) wszystkie reszty GlcNAc w chitozanie mogą być deacetylowane przez enzym. Możliwe byłoby zatem otrzymanie całkowicie zdeacetylowanego produktu, mimo zmniejszania się aktywności enzymu w miarę postępu reakcji.

W metodzie chemicznej w stosunkowo łagodnych warunkach można otrzymać chitozan o stopniu deacetylacji ok. 60% (tab. 1). Wyniki uzyskane przez Tsigosa i wsp. (17) oraz własne wskazują, że dalszą deacetylację można by prowadzić na drodze enzymatycznej.

#### 4.3. Aktywność ekstraktów z grzybni *M. rouxii* w hydrolizie chityny i jej pochodnych

W nie oczyszczonych ekstraktach muszą znajdować się również enzymy hydrolityczne:  $\beta$ -N-acetyloglukozaminidaza i chitynazy, które *in vivo* współuczestniczą wraz z innymi enzymami w biosyntezie ściany komórkowej grzy-

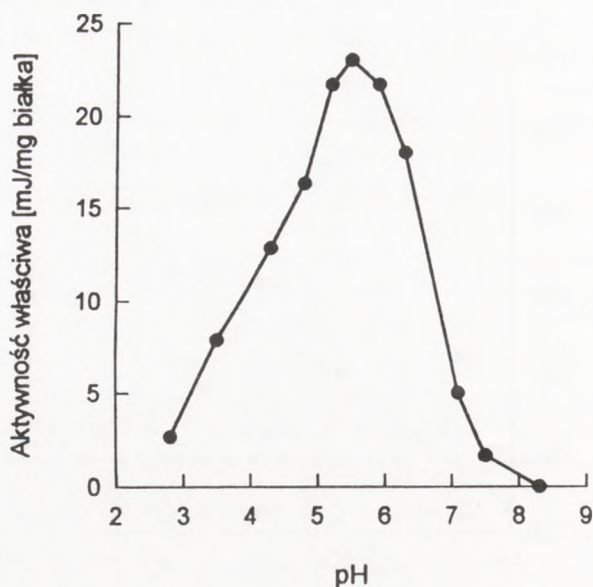




Rys. 2. Wpływ czasu reakcji na aktywność deacetylazy w ekstrakcie z grzybni *M. rouxii*. Jako substrat stosowano chitozan-61 (2,5 mg/ml), stężenie białka ekstraktu wynosiło 0,5 mg/ml; temp. reakcji 40°C, pH mieszaniny reakcyjnej 5,6.

bów. Enzymy hydrolityczne, ze względu na skutki jakie wywołują, są niepożądane w procesie enzymatycznej deacetylacji chityny, jeśli celem jest otrzymanie chitozanu o możliwie dużej masie cząsteczkowej i lepkości. Sprawdzone zatem, w jakiej mierze chityna kryla i jej pochodne ulegają degradacji przez enzymy obecne w ekstraktach z grzybni *M. rouxii* ATCC 24905. Stwierdzono, że krystaliczna chityna nie jest hydrolizowana przez enzymy ekstraktu, natomiast w próbie zawierającej koloidalną chitynę, po 20 godzinach inkubacji z ekstraktem enzymatycznym w temp. 30°C, wykazano obecność produktów hydrolizy (tab. 4). Wśród tych produktów występowały monomery N-acetyloglukozaminy (0,025  $\mu$ mola w 1 ml mieszaniny reakcyjnej) stanowiące jednak tylko ok. 20% ogólnej ilości cukrów redukujących, których stężenie w 1 ml mieszaniny reakcyjnej odpowiadało 0,14  $\mu$ mola równoważnika GlcNAc. Świadczy to o obecności w badanych ekstraktach endochitynaz, choć nie można wykluczyć występowania egzochitynaz odszczepiających disacharydy od nieredukującego końca łańcucha chityny. Wytwarzanie więcej niż jednej formy chitynazy przez szczep *M. rouxii* ATCC 24905 zostało stwierdzone przez Pedraza-Reyes i Lopez-Romero (18) oraz Rast i wsp. (19). Z naszych doświadczeń wynika też, że aktywność enzymów chitynolitycznych *M. rouxii* jest ok. trzykrotnie niższa wobec rozpuszczonej karboksymetylochityny niż wobec nierozpuszczalnej koloidalnej chityny (tab. 4).





Rys. 3. Wpływ stopnia deacetylacji chitozanu na aktywność deacetyazy (▲) i glikozydaz (●) ekstraktu z grzybnicy *M. rouxii*. Jako substraty stosowano rozpuszczone chitozany o stopniu deacetylacji 61, 64, 73, 84, 91% (w stężeniu odpowiadającemu 3900 nmolom grup acetylowych/ml i 2,5 mg/ml przy określaniu odpowiednio aktywności deacetyazy i glikozydaz), stężenie białka ekstraktu wynosiło 0,5 mg/ml; temp. reakcji 40°C, pH 5,6.

TABELA 4  
AKTYWNOŚĆ EKSTRAKTÓW Z GRZYBNICY *M. rouxii*  
W HYDROLIZIE CHITYNY, CHITOZANU I KARBOKSYMETYLOCHITYNY

Substrat	Aktywność właściwa ( $A_{450} \times \text{mg białka}^{-1} \text{ xh}^{-1}$ )
chityna krystaliczna <sup>1</sup>	0,000
chityna koloidalna <sup>1</sup>	0,020
karboksymetylochityna <sup>1</sup>	0,007
chitozan-94 (rozpuszczony) <sup>2</sup>	0,720
chitozan-94 (zawiesina) <sup>2</sup>	0,030

<sup>1</sup>Czas reakcji 20 godz. w temp. 30°C, optymalnej dla aktywności chitynolitycznej ekstraktu, pH 5,6.

<sup>2</sup>Czas reakcji 1 godz. w temp. 40°C, optymalnej dla aktywności chitozanolitycznej ekstraktu, pH 5,6.

Enzymy ekstraktu tylko nieznacznie hydrolizowały chitozan-94 w postaci zawiesiny, natomiast ten sam substrat po rozpuszczeniu w kwasie octowym był degradowany w największym stopniu spośród wszystkich badanych polimerów (tab. 4). Enzymy hydrolityczne *M. rouxii* mogą zatem degradować

nie tylko chitynę, lecz również chitozan powstający wskutek jej enzymatycznej deacetylacji.

Wśród produktów hydrolizy chitozanu, w odróżnieniu od tych, które powstają wskutek degradacji koloidalnej chityny, nie stwierdzono monomerów GlcNAc, a także monomerów GlcN. Na obecnym etapie badań nie można określić jakie enzymy hydrolityczne są odpowiedzialne za degradację chitozanu, może być on bowiem hydrolizowany nie tylko przez chitozanazy, lecz również przez chitynazy (20) i niektóre enzymy hydrolizujące pochodne celulozy (21,22).

Aktywność chitynaz i chitozanaz zależy od stopnia deacetylacji chitozanu. Chitynazy pochodzenia mikrobiologicznego degradują chitozany o stopniu deacetylacji z zakresu 58-93%, a ich aktywność zmniejsza się wraz ze wzrostem zawartości wolnych grup aminowych w substracie (20). Aktywność wobec chitozanu zdeacetylowanego w 93% jest np. ok. 5-10 razy mniejsza niż wobec chitozanu-58 (20). Enzymy ekstraktów z grzybni badanego szczepu *M. rouxii* wykazywały odwrotną właściwość, bowiem stopień katalizowanej przez nie hydrolizy chitozanu zwiększał się ze wzrostem deacetylacji substratu i był maksymalny dla chitozanu-84 (rys. 3). Substrat o wyższym stopniu deacetylacji (chitozan-91) był już hydrolizowany z mniejszą aktywnością, co zgadza się z wynikami Yabuki (23), który badał enzymy z *Bacillus circulans* MH-K1. Chitozanaza z innego szczepu rodzaju *Bacillus* (*Bacillus* sp., 7-M) produkowała natomiast najwięcej chitoooligosacharydów z chitozanu o stopniu deacetylacji 99%, lecz dopiero po kilkugodzinnej reakcji (24).

Uzyskane wyniki wskazują, że w badanych ekstraktach obecne są nie tylko chitynazy, lecz również inne enzymy hydrolityczne, prawdopodobnie chitozanazy.

## 5. Wnioski

— Częściowo zacetylowany i rozpuszczony chitozan jest podatnym substratem na działanie deacetylazy z *Mucor rouxii*. Metodę enzymatyczną można wykorzystać do otrzymywania chitozanu o małej zawartości grup acetylowych.

— Deacetylaza nie działa na krystaliczną chitynę. Niezbędne są zabiegi modyfikujące właściwości chityny i zwiększające jej podatność na enzymatyczną deacetylację.

— W nieoczyszczonych ekstraktach z grzybni *Mucor rouxii* znajdują się enzymy hydrolityczne, które mogą degradować zarówno substrat, jak i produkt deacetylacji chityny lub jej pochodnych. Preparaty deacetylazy powinny być wolne od tych enzymów, przy otrzymywaniu chitozanu o dużej masie cząsteczkowej i lepkości.

Praca była finansowana przez Komitet Badań Naukowych w ramach projektu badawczego Nr 5 P006G 003 08 oraz działalności statutowej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.



## Literatura

1. Kołodziejska I, Wojtasz-Pajak A., Sikorski Z. E., (1995), *Biotechnologia*, 3(30), 133-139.
2. Roberts G. A. F., (1992), *Chitin Chemistry*, The Macmillan Press., London, 64-80.
3. Araki Y., Ito E., (1975), *Eur. J. Biochem.*, 55, 71-78.
4. Trudel J., Asselin A., (1990), *Anal. Biochem.*, 189, 249-253.
5. Davis L. L., Bartnicki-Garcia S., (1984), *Biochemistry*, 23, 1065-1073.
6. Arcidiacono S., Lombardi S. J., Kaplan D. L., (1989), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. Skjak-Braek G., Anthonsen T., Sandford P., Elsevier Applied Science, London and New York, 319-332.
7. Brzeski M., Mieczkowska M., Sowa K., Stolz H., Wojtasz-Pajak A., Neugebauer W., (1985), *Studia i Materiały, Seria S, 2*, Wydawnictwo Morskiego Instytutu Rybackiego, Gdynia, 13-23.
8. Szafranek J., Synak E., Gajdus J., Wojtasz-Pajak A., Brzeski M., (1991), Patent P 292 375.
9. Somorin O., Nishi N., Tokura S., (1982), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. Hirano S., Tokura S., The Japanese Society of Chitin and Chitosan, Tottori, 54-56.
10. Bartnicki-Garcia S., Nickerson W.J., (1962), *J. Bacteriol.*, 84, 841-858.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
12. Bergmeyer H. U., Mollering H., (1974), in: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3, Ed. Bergmeyer H.U., Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, New York and London, 1520-1528.
13. Dygert S., Li L.H., Florida D., Thoma J. A., (1965), *Anal. Biochem.*, 13, 367-374.
14. Reissig J. L., Strominger J. L., Leloir L. F., (1955), *J. Biol. Chem.*, 217, 959-966.
15. Roseman S., Daffner I., (1956), *Anal. Chem.*, 28, 1743-1746.
16. Kafetzopoulos D., Martinou A., Bouriotis V., (1993), in: *Chitin Enzymology*, Ed. Muzarelli R. A. A., Eur. Chitin Soc., Ancona, 147-154.
17. Tsigos I., Martinou A., Varum K., Kafetzopoulos D., Christodoulidou M., Tzanodaskalaki M., Bouriotis V., (1995), in: *Chitin World*, Eds. Karnicki Z., Wojtasz-Pajak A., Brzeski M., Bykowski P., Wirtschaftsverlag NW, Bremerhaven, 98-107.
18. Pedraza-Reyes M., Lopez-Romero E., (1989), *J. Gen. Microbiol.*, 135, 211-218.
19. Rast D. M., Horsch M., Furter R., Gooday G. W., (1991), *J. Gen. Microbiol.*, 137, 2797-2819.
20. Ohtakara A., Izume M., Mitsutomi M., (1988), *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3181-3182.
21. Hedges A., Wolfe R.S., (1974), *J. Bacteriol.*, 120, 844-853.
22. Tanaka R., Muraki E., Fujishima S., Yaku F., (1992), in: *Advances in Chitin and Chitosan*, Eds. Brine Ch. J., Sandford P. A., Zikakis J. P., Elsevier Applied Science, London and New York, 276-281.
23. Yabuki M., (1989), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. Skjak-Braek G., Anthonsen T., Sandford P., Elsevier Applied Science, London and New York, 197-206.
24. Izume M., Nagae S., Kawagishi H., Mitsutomi M., Ohtakara A., (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 448-453.

### The activity of chitin deacetylase and glycosidases of the crude enzyme extracts of *Mucor rouxii* mycelium

#### Summary

The crude enzyme extract obtained from *Mucor rouxii* had optimal deacetylase activity against chitosan acetylated in 39% in the pH range of 5.2-5.9. Its activity against water-soluble chito-oligosaccharides, containing from 3 to 6 N-acetylglucosamine residues, was the highest in respect to (GlcNAc)<sub>6</sub> and nil against substrates containing less than 4 N-acetylglucosamine residues.

Crystalline chitin was resistant to the deacetylase and to glycosidases present in the extract; amorphous chitin was noticeably more susceptible to these enzymes. Chitosan in the form of suspension was slightly deacetylated and hydrolysed by enzyme extracts. Solubilized chitosan acetylated in 39% was most susceptible to enzymatic deacetylation. The deacetylase activity in the extract was inversely related and the chitosanolytic activity was proportional to the deacetylation degree of soluble chitosan.

**Key words:**

*Mucor rouxii*, chitin deacetylase, glycosidases, chitinases, chitosanases, chitin, chitosan.

*Adres do korespondencji:*

Ilona Kołodziejaska, Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Utrwalania Żywności, ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk.