

Enzymatyczna modyfikacja chityny

Ilona Kołodziejska¹

Anna Wojtasz-Pająk²

Zdzisław E. Sikorski¹

¹Katedra Technologii Utrwalania Żywności
Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska
Gdańsk

²Zakład Technologii i Mechanizacji Przetwórstwa
Morski Instytut Rybacki
Gdynia

1. Wprowadzenie

Chityna jest jednym z najobficiej rozpowszechnionych w naturze polisacharydów. Występuje ona w ścianach komórkowych większości grzybów oraz w strukturach szkieletu zewnętrznego licznych bezkręgowców, w tym skorupiaków i owadów. W światowym przetwórstwie bezkręgowców morskich powstają rocznie duże ilości odpadów, zawierających około 120 000 ton chityny, z czego 50% stanowi chityna kryla (1).

Chityna jest homopolimerem zbudowanym z reszt N-acetylo-D-glukozaminy połączonych wiązaniami β -(1 \rightarrow 4)-glikozydowymi. Znane są trzy polimorficzne postacie chityny: α , β i γ . Postać α jest najbardziej rozpowszechniona. Ma ona szczególnie zwartą i krystaliczną budowę. W tej postaci dwa sąsiednie łańcuchy polimeru są ułożone antyrównolegle i maksymalnie połączone wiązaniami wodorowymi, tworząc mikrofibryle. W chitynie β dwa sąsiednie łańcuchy są ułożone równolegle, zaś w postaci γ dwa równoległe łańcuchy są związane z jednym antyrównoległym. Mikrofibryle chityny są połączone w fibryle (1,2). W naturze, chityna występuje często w powiązaniu z innymi polimerami — w przypadku bezkręgowców z białkami.

Chityna nie rozpuszcza się w wodzie oraz większości rozpuszczalników, co ogranicza jej przemysłowe zastosowanie. Te właściwości chityny można zmienić przez odpowiednie modyfikacje cząsteczki, w tym przede wszystkim przez deacetylację.

2. Właściwości, zastosowanie i otrzymywanie chitozanu

Wskutek usunięcia grup acetylowych chityny i uwolnienia grup aminowych powstaje chitozan, rozpuszczalny w rozcieńczonych kwasach. Polimer ten ze względu na swoje właściwości obejmujące hydrofilność, oddziaływania międzyfazowe i międzycząsteczkowe oraz biodegradowalność, nietoksyczność i aktywność biologiczną ma szerokie możliwości praktycznego wykorzystania w wielu dziedzinach. Niektóre aktualne i potencjalne zastosowania chitozanu przedstawiono w tab. 1. Ze względu na specyfikę tych zastosowań niezbędne jest wytwarzanie polimeru o bardzo zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych, a jednocześnie o jednolitych, standardowych parametrach decydujących o aktywności chemicznej i biologicznej.

Przemysłowo chitozan otrzymuje się z chityny przez deacetylację w temperaturze przekraczającej 100°C oraz przy użyciu stężonego roztworu wodorotlenku sodu. W tak drastycznych warunkach trudno zapewnić powtarzalność procesu i uzyskać produkt o pożądanej masie cząsteczkowej, określonym

TABELA 1
PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA CHITOZANU (3-6)

| Dziedzina | Rodzaj zastosowania |
|-------------------------------------|--|
| przemysł żywnościowy | <ul style="list-style-type: none"> - klarowanie soków, wina, piwa - oczyszczanie wody pitnej i technologicznej - stabilizowanie, zagęszczanie, ograniczanie pienienia produktów - kontrolowane uwalnianie barwników i składników odżywczych - osadzanie enzymów |
| przemysł kosmetyczny | <ul style="list-style-type: none"> - preparaty kosmetyczne do skóry i włosów |
| medycyna i weterynaria | <ul style="list-style-type: none"> - przyspieszanie procesu gojenia ran - obniżanie poziomu cholesterolu we krwi - stymulowanie układu immunologicznego - hamowanie krwawień - wytwarzanie leków, w tym antybiotyków i innych materiałów biologicznie czynnych |
| ochrona środowiska | <ul style="list-style-type: none"> - koagulowanie białek ścieków przemysłu żywnościowego - usuwanie metali, barwników, ropy, substancji ropopochodnych ze ścieków - wytwarzanie biodegradowalnych opakowań |
| rolnictwo | <ul style="list-style-type: none"> - nośnik środków ochrony roślin o kontrolowanym działaniu - zaprawa do ziarna i nasion o działaniu grzybobójczym - środek powodujący korzystne zmiany flory bakteryjnej gleby |
| biotechnologia | <ul style="list-style-type: none"> - materiał filtracyjny - osadzanie enzymów i żywych komórek - chromatografia |
| przemysł włókienniczy i papierniczy | <ul style="list-style-type: none"> - powlekanie tkanin - wytwarzanie papieru o podwyższonej wytrzymałości |

stopniu deacetylacji i przewidywanej lepkości roztworów, od których zależą funkcjonalne właściwości chitozanu.

Alternatywną metodą otrzymywania chitozanu może być enzymatyczna deacetylacja chityny. Enzym, który katalizuje przemianę chityny do chitozanu przez deacetylację reszt N-acetyloglukozaminy po raz pierwszy zidentyfikowano w ekstraktach z grzybni *Mucor rouxii* (7). Obecność deacetylazy chityny stwierdzono również w grzybach innych gatunków *Zygomycetes* (8), a także u niektórych owadów, skorupiaków i pajęczaków (9).

3. Enzymy uczestniczące w syntezie chityny i chitozanu

W biosyntezie chitozanu uczestniczą jednocześnie dwa główne enzymy — syntaza i deacetylaza chityny (10). Syntaza chityny występuje w formie proenzymu w cytoplazmie w połączeniu z chitosomami. Zadaniem chitosomów jest przemieszczenie syntazy do specyficznych miejsc powstawania ściany komórkowej w błonie cytoplazmatycznej. Następnie, proenzym jest aktywowany przez proteiny i syntaza polimeryzuje na zewnątrz błony cytoplazmatycznej łańcuchy chityny z substratu, UDP-N-acetyloglukozoaminy. Jednocześnie deacetylaza chityny odszczepia grupy acetylowe z powstającej chityny, nie mającej jeszcze sieciujących wiązań wodorowych (10). Mechanizm regulujący wzajemne proporcje chityny i chitozanu w ścianie komórkowej nie jest znany. Uważa się, że syntaza chityny związana przez niezdysocjowane chitosomy polimeryzuje łańcuchy chityny, w których ze względu na przestrzenne ułożenie szybko tworzą się sieciujące wiązania wodorowe i powstają mikrofibryle odporne na działanie deacetylazy i innych enzymów. Natomiast łańcuchy chityny utworzone przez syntazę związaną ze zdysocjowanymi podjednostkami chitosomów są rozproszone i wrażliwe na enzymatyczną deacetylację (11). Z tego względu ściany komórkowe grzybów, u których występuje deacetylaza, zawierają oprócz chityny również chitozan. Zawartość chitozanu w ścianach komórkowych *Mucor rouxii* wynosi 30%, podczas gdy chityny tylko 10% (10).

Uważa się, że biologiczna rola deacetylazy polega na obniżeniu wrażliwości polisacharydów ściany komórkowej na działanie własnych enzymów litycznych oraz niektórych specyficznych enzymów, takich jak np. lizozym. Deacetylaza uczestniczy też w postsyntetycznych modyfikacjach chityny do chitozanu, tworzącego wiązania jonowe z anionowymi związkami jak polifosforany i poliuronidy (7).

4. Biochemiczna charakterystyka deacetylazy chityny

Deacetylaza występuje w rozpuszczalnej frakcji cytoplazmy komórek grzybowych i jest częściowo uwalniana do płynnego środowiska hodowlanego (7). W porównaniu z innymi enzymami uczestniczącymi w biosyntezie i degradacji ściany komórkowej drobnoustrojów jest ona stosunkowo mało poznana.

Deacetylaza chityny z grzybni *Mucor rouxii* wg Kafetzopoulos i współ. (12) jest monomerym o masie cząsteczkowej 75-80 kDa. Jest to glikoproteina o zawartości 30% węglowodanów, głównie mannozy. Enzym wykazuje optymalne działanie wobec glikolu chityny przy pH 4,5 i w temperaturze 50°C. Natomiast deacetylaza z grzybni *Mucor rouxii* wyizolowana przez Arcidiacono i współ. (13) ma masę cząsteczkową 20 kDa. Martinou i współ. (14) stosując w kolejnych stopniach oczyszczania enzymu chromatografię oddziaływań hydrofobowych, a następnie jonowymienną, stwierdzili występowanie dwóch form deacetylazy, jednej o masie 38 kDa i drugiej o masie 75-80 kDa. Według tych autorów deacetylaza o masie 38 kDa jest przypuszczalnie produktem degradacji właściwego enzymu. Wprowadzając bardziej zachowawcze warunki oczyszczania, tj. chromatografię immunopowinowactwa, otrzymali tylko jedno białko enzymatyczne o masie 75 kDa.

Deacetylaza chityny w przeciwieństwie do deacetylazy peptydoglikanu ściany komórkowej niektórych bakterii, nie wymaga obecności Co^{2+} lub Mn^{2+} dla pełnej aktywności i jest tylko nieznacznie inhibowana przez EDTA (7). Kwasy organiczne, szczególnie kwas octowy inaktywują enzym izolowany z *Mucor rouxii* (7,12). Natomiast deacetylaza z *Colletotrichum lindemuthianum* nie traci aktywności w obecności kwasu octowego i w odróżnieniu od enzymu z *Mucor rouxii* wykazuje optymalną aktywność przy pH 8,5 (15).

Deacetylaza chityny jest aktywna wobec chitooligosacharydów zawierających w cząsteczce przynajmniej 4 reszty N-acetylo-D-glukozaminy oraz wobec rozpuszczalnych pochodnych chityny i częściowo zdeacetylowanej chityny (12). Wykazuje ona też aktywność, lecz znacznie mniejszą w porównaniu z rozpuszczalnymi pochodnymi, wobec koloidalnej (mikrokystalicznej) chityny (7).

5. Rola chitynaz w metabolizmie chityny

Chitynazy są szeroko rozpowszechnione w różnych organizmach: bakteriach, grzybach, roślinach i bezkręgowcach. Fizjologiczna funkcja chitynaz zależy od źródła ich występowania. W roślinach, w których chityna nie występuje, chitynazy pełnią funkcje obronne przeciwko grzybowym patogenom. Bakterie wytwarzają chitynazy głównie po to, aby wykorzystać chitynę jako źródło węgla i energii (16). Natomiast najważniejszą rolą chitynaz w organizmach wytwarzających chitynę, w grzybach i stawonogach, jest modyfikacja tego polisacharydu (17,18). Morfogenetyczna rola chitynaz grzybowych polega na regulacji tworzenia krystalicznej struktury chityny w ścianie komórkowej, na dostosowaniu długości mikrofibryli chitynowych do konstrukcji ściany i na tworzeniu wiązań sieciujących pomiędzy chityną a innymi składnikami ściany (19). Mayer i współ. (20) przedstawili model funkcjonowania systemu enzymów: chitynazy, β -N-acetyloglukozaminidazy i syntazy chityny w kontrolowanym metabolizmie polimeru podczas tworzenia rozgałęzień grzybni i wzrostu strzępeków grzybni. Kompleksowe działanie trzech enzymów obejmuje następujące etapy: 1) remodelowanie łańcuchów chityny przez chitynazy w re-

akcjach lizy i transglikozylacji, 2) postępującą hydrolizę skróconych łańcuchów do chitobiozy, która jest następnie dostępna dla β -N-acetyloglukozamidazy, 3) allosteryczną aktywację syntazy chityny przez końcowy produkt chitynolizy, N-acetyloglukozaminę oraz 4) *de novo* syntezę chityny z UDP-N-acetyloglukozaminy.

Enzymy hydrolizujące chitynę są egzochitynazami, odcinającymi kolejne reszty GlcNAc lub $(\text{GlcNAc})_2$ od nieredukującego końca łańcucha lub endochitynazami, hydrolizującymi chitynę w przypadkowych miejscach wewnątrz łańcucha. Znane są chitynazy związane ze ścianami komórkowymi (21,22) i mikrosomami (23,24,25) lub znajdujące się w rozpuszczalnej frakcji cytoplazmy (25,26, 27). W grzybni *Mucor rouxii*, podczas wykładniczego wzrostu, wykryto co najmniej siedem chitynaz o różnych masach cząsteczkowych (23).

6. Enzymatyczna hydroliza chitozanu

Chitozanazy są wytwarzane przez organizmy bytujące w glebie: bakterie, grzyby i promieniowce (28). Wykryto je też w systemie trawiennym ryb (29). Wśród wyizolowanych i oczyszczonych chitozanaz występują enzymy specyficzne tylko wobec chitozanu oraz takie, które hydrolizują również karboksymetylocelulozę (30).

Chitozanazy hydrolizują chitozan wewnątrz łańcucha, a końcowymi produktami są di- i trisacharydy (31) lub oligosacharydy o większym stopniu polimeryzacji (32,33,34). Chitozanazy nie hydrolizują chitosacharydów zawierających mniej niż cztery reszty glukozaminy (32). Aktywność chitozanaz zależy od źródła pochodzenia enzymu i stopnia deacetylacji chitozanu. Chitozanazy izolowane z *Bacillus licheniformis* UTK (32), *Bacillus* sp. No 7-M (35) i *Penicillium islandicum* (36) przejawiają optymalną aktywność wobec chitozanu o stopniu deacetylacji odpowiednio: 65-80%, 70% i 30-70%. Aktywność chitozanazy z *Bacillus circulans* MH-K1 po osiągnięciu maksimum wobec chitozanu o stopniu deacetylacji 80% gwałtownie obniża się z dalszym wzrostem deacetylacji (31). Chitozanazy występujące w żołądku atlantyckiego łososia nie hydrolizują chitozanu całkowicie zdeacetylowanego (29). Chitozanaza z *Penicillium islandicum* wykazuje specyficzność w hydrolizie wiązań glikozydowych między C(1) reszty N-acetylo-D-glukozaminy i C(4) reszty D-glukozaminy w częściowo zacetylowanym chitozanie, a produktami hydrolizy są $(\text{GlcN})_2 \times \text{GlcNAc}$ i $\text{GlcN} \times \text{GlcNAc}$ (36). Natomiast chitozanaza z *Bacillus* sp. No 7-M jest specyficzna tylko względem wiązań $\text{GlcN} \times \text{GlcN}$ (37). Wśród produktów hydrolizy zidentyfikowano chitoooligosacharydy $(\text{GlcN})_2$ do $(\text{GlcN})_4$ oraz heterooligosacharydy $(\text{GlcN})_2 \times \text{GlcNAc} \times (\text{GlcN})_2$, $\text{GlcN} \times \text{GlcNAc} \times (\text{GlcN})_3$, $(\text{GlcN})_2 \times \text{GlcNAc} \times (\text{GlcN})_3$ i $\text{GlcN} \times \text{GlcNAc} \times (\text{GlcN})_4$.

Zainteresowanie enzymami hydrolizującymi chitozan wzrasta ze względu na możliwość praktycznego ich wykorzystania do otrzymywania aktywnych biologicznie chitoooligosacharydów, przejawiających m.in. właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

7. Podsumowanie

Znając udział różnych enzymów w procesach metabolizmu chityny i biochemiczne właściwości tych enzymów oraz enzymów hydrolizujących chitozan można poszukiwać efektywnych metod biotechnologicznego wytwarzania chitozanu i jego pochodnych. Metody enzymatyczne w porównaniu z chemicznymi pozwoliłyby na precyzyjniejsze regulowanie parametrów procesu i jakości produktu.

Wobec tego, że grzyby wytwarzające deacetylazę zawierają również chitozan o dużym stopniu deacetylacji mogą być one jednocześnie wykorzystane jako źródło enzymu i polimeru.

Literatura

1. Roberts G. A. F., (1992), *Chitin Chemistry*, The Macmillan Press., London.
2. Sikorski Z. E., (1992), *Morskie surowce żywnościowe*, WNT, Warszawa, 145-165.
3. *Chitin and Chitosan*, (1989), Eds., Skjak-Braek G., Anthonsen T., Sandford P., Elsevier Applied Science, London and New York.
4. Sikorski Z. E., Bykowski P., in: *Chitin World*, Eds. Karnicki Z., Brzeski M., Bykowski P., Wojtasz-Pająk A., Wirtschftsverlag NW, Bremerhaven, (w druku).
5. *Chitin World*, Eds. Karnicki Z., Brzeski M., Bykowski P., Wojtasz-Pająk A., Wirtschftsverlag NW, Bremerhaven, (w druku).
6. Anonimowo, (winter/spring 1995), Outlook, International Commission on Natural Health Products, Atlanta.
7. Araki Y., Ito E., (1975), *Eur. J. Biochem.*, 55, 71-78.
8. Trudel J., Asselin A., (1990), *Anal. Biochem.*, 189, 249-253.
9. Aruchami M., Gowri N., Sundara-Rajulu G., (1986), in: *Chitin in Nature and Technology*, Eds. Muzzarelli R., Jeuniaux G., Gooday G. W., Plenum, New York and London, 263-268.
10. Davis L. L., Bartnicki-Garcia S., (1984), *Biochemistry*, 23, 1065-1073.
11. Bartnicki-Garcia S., (1989), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. Skjak-Braek G., Anthonsen T., Sandford P., Elsevier Applied Science, London and New York, 23-35.
12. Kafetzopoulos D., Martinou A., Bouriotis V., (1993), in: *Chitin Enzymology*, Ed. Muzzarelli R. A. A., *Eur. Chitin Soc.*, Ancona, 147-154.
13. 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.
14. Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V., (1993), *J. Chromatogr.*, 644, 35-41.
15. Tsigos I., Bouriotis V., (1994), 6th International Conference on Chitin and Chitosan, Gdynia, Abstracts, 35.
16. Schickler H., Haran S., Oppenheim A. B., Chet I., (1993), in: *Chitin Enzymology*, Ed. Muzzarelli R. A. A., *Eur. Chitin Soc.*, Ancona, 375-382.
17. Gooday G. W., Humphreys A. M., McIntosh W. H., (1986), in: *Chitin in Nature and Technology*, Eds. Muzzarelli R., Jeuniaux G., Gooday G. W., Plenum, New York and London, 83-91.
18. Perrakis A., Wilson K. S., Chet I., Oppenheim A. B., Vorgias C. E., (1993), in: *Chitin Enzymology*, Ed. Muzzarelli R. A. A., *Eur. Chitin Soc.*, Ancona, 217-232.
19. Gooday G. W., (1990), in: *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*, Eds. Kuhn P. J., Trinci A. P. J., Jung M. J., Goosey M. W., Copping L. G., Springer Verlag, Berlin, 61-79.
20. Mayer Ch., Horsch M., Linder C., Rast D. M., (1993), in: *Chitin Enzymology*, Ed. Muzzarelli R. A. A., *Eur. Chitin Soc.*, Ancona, 485-492.

21. Zarain-Herzberg A., Arroyo-Begovich A., (1983), *J. Gen. Microbiol.*, 129, 3319-3326.
22. Polacheck I., Rosenberger R. F., (1978), *J. Bacteriol.*, 135, 741-747.
23. Rast D. M., Horsch M., Furter R., Gooday G. W., (1991), *J. Gen. Microbiol.*, 137, 2797-2810.
24. Dickinson K., Keer V., Hitchcock Ch. A., Adams D. J., (1991), *Biochim. Biophys. Acta*, 1073, 177-182.
25. Humphreys A. M., Gooday G. W., (1984), *J. Gen. Microbiol.*, 130, 1359-1366.
26. Pedraza-Reyes M., Lopez-Romero E., (1989), *J. Gen. Microbiol.*, 135, 211-218.
27. Barrett-Bee K., Hamilton M., (1984), *J. Gen. Microbiol.*, 130, 1857-1861.
28. Muzzarelli R. A. A., (1977), in: *Chitin*, Pergamon Press, Oxford, 164-167.
29. Varum K. M., Rosenlund G., Smidsrod O., (1989), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. Skjak-Braek G., Anthonen T., Sandford P., Elsevier Applied Science, London and New York, 299-308.
30. Hedges A., Wolfe R. S., (1974), *J. Bacteriol.*, 120, 844-853.
31. Yabuki M., (1989), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. Skjak-Braek G., Anthonen T., Sandford P., Elsevier Applied Science, London and New York, 197-206.
32. Uchida Y., Tateishi K., Shida O., Kadowaki K., (1992), in: *Advances in Chitin and Chitosan*, Eds. Brine Ch. J., Sandford P. A., Zikakis J. P., Elsevier Applied Science, London and New York, 282-291.
33. Uchida Y., Izume M., Ohtakara A., (1989), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. Skjak-Braek G., Anthonen T., Sandford P., Elsevier Applied Science, London and New York, 373-382.
34. Murakami E., Hasegawa K., Tamura J., (1992), in: *Advances in Chitin and Chitosan*, Eds. Brine Ch. J., Sandford P. A., Zikakis J. P., Elsevier Applied Science, London and New York, 259-267.
35. Izume M., Ohtakara A., (1987), *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1189-1191.
36. Fenton D. M., Eveleigh D. E., (1981), *J. Gen. Microbiol.*, 126, 151-165.
37. Izume M., Nagae S., Kawagishi H., (1992), in: *Advances in Chitin and Chitosan*, Eds. Brine Ch. J., Sandford P. A., Zikakis J. P., Elsevier Applied Science, London and New York, 334-343.

Pracę wykonano w ramach projektu badawczego Nr P06G 003 08 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Enzymatic modification of chitin

Summary

The role of chitinases, chitosanases, and chitin deacetylase in the biosynthesis and modification of chitin is presented. The biochemical properties of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* are characterized in respect to its activity towards various chitin derivatives. This enzyme could be useful in biotechnological production of chitosan from chitin as an alternative method to thermochemical deacetylation.

Key words:

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

Adres dla korespondencji:

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