Oczyszczanie i właściwości deacetylazy chityny z *Absidia orchidis*

Krzysztof W. Szewczyk, Małgorzata Orzeszak

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Purification and properties of chitin deacetylase from *Absidia orchidis*

Summary

Methods of purification of chitin deacetylase are discussed. A two step method of purification of chitin deacetylase from mycelial extracts of the fungus *Absidia orchidis* by chromatography is presented. The crude enzyme extract was purified by a gel chromatography and then by ion exchange chromatography. Specific activity of purified enzyme was 12.3 U/mg and final purification degree was 147. The apparent molecular mass of the enzyme was 75 kDa. When O – hydroxyethylated chitin (glycol chitin) was used as a substrate, the optimum pH for enzyme activity was 5,5 and the optimum temperature was 50°C.

Key words:
chitin deacetylase, purification.

1. Wprowadzenie

Chityna występuje w strukturach szkieletu zewnętrznego licznych bezkręgowców, a także w ścianie komórkowej grzybów. Jest ona głównym odpadem z przetwórstwa bezkręgowców morskich (1). Chityna jest kopolimerem zbudowanym z reszt N-acetylo-D-glukozaminy i D-glukozaminy połączonych wiązaniami β-(1→4)-glikozydowymi. Chityna nie jest polimerem jednorodnym. W naturze występuje często w powiązaniu z innymi polimerami, np. białkami. Chityna jest nierozpuszczalna w wodzie i w większości rozpuszczalników. Ogranicza to jej przemysłowe zastosowanie. Jednakże poprzez deacetylację chityny otrzymuje

Adres do korespondencji

Krzysztof W. Szewczyk, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, ul. Waryńskiego 1, 00-645 Warszawa.

się chitozan, związek dobrze rozpuszczalny w rozcieńczonych kwasach takich jak kwas octowy, kwas solny, znajdujący wielorakie zastosowanie w rolnictwie, przemyśle kosmetycznym i medycynie (2-4).

Chitozan jest obecnie produkowany na skalę przemysłową w wyniku chemicznej deacetylacji chityny. Proces ten polega na poddaniu chityny działaniu stężonych roztworów ługu sodowego (40-50%) w podwyższonej temperaturze. Jest to kosztowna metoda zaś produkt charakteryzuje się zróżnicowanym stopniem acetylacji (od 10 do 45%) i masą cząsteczkową. Alternatywną metodą może być enzymatyczna hydroliza chityny. Enzymem katalizującym deacetylację reszt N-acetyloglukozaminy jest deacetylaza chityny. Enzym ten został wykryty w ekstraktach z grzybni *Mucor rouxii* (5-9), *Absidia coerulea* (10), *Aspergillus nidulans* (11), u bezkręgowców (12), w roślinnym patogenie *Colletotrichium lindemuthianum* (13-16) oraz w liściach ogórka zainfekowanego przez *Colletotrichium langenarium* (17).

Techniczne wykorzystanie deacetylazy chityny zależy od opracowania ekonomicznych metod otrzymywania technicznych preparatów tego enzymu oraz określenia właściwości otrzymanych preparatów. Wydajność i aktywność surowych preparatów deacetylazy chityny otrzymywanej z hodowli różnych drobnoustrojów zależy od wielu czynników: stosowanego szczepu drobnoustrojów, składu pożywki, warunków hodowli oraz metod wydzielania preparatu. Brak jest dostatecznych danych doświadczalnych pozwalających na jednoznaczne określenie optymalnych technik otrzymywania technicznych preparatów deacetylazy chityny. W pracy przedstawiono i porównano metody otrzymywania surowych preparatów deacetylazy chityny, metody jej oczyszczania oraz właściwości oczyszczonego enzymu. Przedstawiono własną metodę oczyszczania preparatu deacetylazy chityny.

2. Otrzymywanie deacetylazy chityny

2.1. Otrzymywanie roztworów surowych

Deacetylaza chityny występuje w rozpuszczalnej frakcji cytoplazmy komórek grzybowych i jest częściowo uwalniana do płynnego środowiska hodowlanego (4). Prezentowane w literaturze przedmiotu metody otrzymywania surowych preparatów deacetylazy chityny można podzielić na dwie zasadnicze grupy: metody, w których preparat enzymatyczny otrzymuje się z płynu pohodowlanego oraz metody wykorzystujące dezintegrację biomasy drobnoustrojów.

Alfonso i wsp. (11) prowadzili hodowle stacjonarne *Aspergillus nidulans* w temperaturze 25°C. Po odwirowaniu grzybni roztwór poreakcyjny był zatężany pod próżnią w temperaturze 30°C. Następnie białka były wytrącane za pomocą 1% roztworu kwasu taninowego, a precypitat oczyszczano na kolumnie odsalającej TD-10.

Tokuyasu i wsp. (15) prowadzili hodowlę *Colletotrichum lindemuthianum* bez dostępu światła w temperaturze 22°C przez 18 dni. Białka wytrącano siarczanem amonu.

Tsigos i wsp. (14) prowadzili hodowlę *Colletotrichum lindemuthianum* we wstrząsarkach w temperaturze 25°C przez 72 h. Płyn pohodowlany po filtracji był zatężany przez ultrafiltrację, a następnie oczyszczany przez dializę.

W metodach, w których wykorzystuje się biomasę drobnoustrojów stosowano mielenie zamrożonej biomasy z piaskiem szklanym. Otrzymany homogenizat był filtrowany lub wirowany i poddawany dalszemu zatężaniu. Gao i wsp. (10) namnażali *Absidia coerulea* w hodowlach wstrząsanych w temperaturze 25°C przez 48 h. Homogenizat podawali wirowaniu i wykorzystywali uzyskany supernatant jako surowy preparat enzymatyczny.

Kafetzopoulos i wsp. (9) prowadzili hodowle stacjonarne, z mieszaniem i napowietrzaniem, *Mucor rouxii* na minimalnej pożywce w temperaturze 28°C przez 24 h. Supernatant uzyskany po filtracji homogenizatu biomasy poddawano precypitacji siarczanem amonu.

Aktywność uzyskiwanych surowych preparatów deacetylazy chityny nie jest duża i wynosiła od 0,002 J/mg do 1,4 J/mg preparatu. Uzyskano zbliżone aktywności preparatów surowych otrzymywanych z homogenizatów komórek i z płynów pohodowlanych.

2.2. Oczyszczanie deacetylazy chityny

Oczyszczone preparaty deacetylazy chityny uzyskiwano w wyniku wielostopniowego oczyszczania z wykorzystaniem różnorodnych technik chromatograficznych. Stosowane metody można podzielić na dwu- i trójstopniowe. W pierwszym stopniu oczyszczania wykorzystywano chromatografię jonowymienną lub hydrofobową. W kolejnych stopniach oczyszczania wykorzystywano chromatografię jonowymienną i/lub filtracje żelową.

W metodzie zaproponowanej przez Alfonso i wsp. (11) surowy ekstrakt enzymatyczny z *Aspergillus nidulans* jest podawany na kolumnę jonowymienną Mono Q HR 5/5 równoważoną 10 mM roztworem fosforanu sodu o pH 7,5, a białka są wymywane gradientowo 0-1 M roztworem NaCl. Następnie frakcje uzyskane po rozdziale chromatograficznym na kolumnie jonowymiennej zawierające deacetylazę chityny są przepuszczane przez kolumnę do filtracji żelowej Superose 12 HR 10/30. Kolumna ta jest równoważona 50 mM roztworem fosforanu sodu o pH 7,5 zawierającym 150 mM NaCl.

W trójstopniowej metodzie zastosowanej przez Gao i wsp. (10) surowy ekstrakt z grzybni *Absidia coerulea* jest rozdzielany na kolumnie oddziaływań hydrofobowych (Butyl Toyopearl-650M) równoważoną buforem (40 mM kwas cytrynowy-fosforan sodowy i 1,9 M siarczan amonu, pH 5,2). Białka są wymywane w liniowym gradiencie siarczanu amonu (1,9-0 M). Frakcje zawierające deacetylazę chityny są metodą

filtracji żelowej, na kolumnie Gigapite równoważonej buforem (5 mM HEPES i 5 mM $MgCl_2$, pH 6,2). Białka z kolumny są wymywane w liniowym gradiencie NaCl (0-1 M) w buforze B. Frakcje zawierające deacetylazę są oczyszczane na kolumnie oddziaływań hydrofobowych (DEAE Toyopearl-650 M) równoważonej buforem C (20 mM Tris-HCl, pH 7,2). Białka wymywane są w liniowym gradiencie NaCl (0,05-0,25 M).

W trójstopniowej metodzie zaproponowanej przez Kafetzopoulosa i wsp. (9) surowy ekstrakt z grzybni *Mucor rouxii* jest podawany na kolumnę chromatograficzną oddziaływań hydrofobowych (phenyl-Sepharose CL-4B) równoważoną buforem (20 mM Tris-HCl, pH 7,5/2,1 M siarczan amonu), a białka są wymywane w liniowym gradiencie siarczanu amonu (2,1-0 M). Frakcje zawierające aktywny enzym są następnie rozdzielane na kolumnie jonowymiennej (Q-Sepharose) równoważonej buforem (20 mM Tris-HCl o pH 8). Białka z kolumny są wymywane w liniowym gradiencie NaCl (0-0,75 M). Frakcje zawierające deacetylazę są następnie oczyszczane na kolejnej kolumnie jonowymiennej (SP Sepharose) równoważonej buforem (25 mM mrówczan sodu). Białka są wymywane w liniowym gradiencie NaCl (0-1,2 M).

Surowy ekstrakt z *Colletotrichum lindemuthianum* (14) jest podawany na kolumnę jonowymienną (Q-Sepharose) równoważoną buforem (20 mM Bis-Tris-HCl, pH 5,8). Białka są wymywane w liniowym gradiencie NaCl (0-0,5). Frakcje zawierające aktywną deacetylazę są oczyszczane metodą filtracji żelowej (kolumna Sephacryl S300 równoważona 20 mM roztworem Tris-HCl o pH 7,4). Kolejnym etapem oczyszczania jest chromatografia jonowymienna (kolumna MonoS równoważona buforem 50 mM mrówczan sodu, pH 4,0). Białka wymywane są w liniowym gradiencie NaCl (0-1 M). Z kolei w metodzie zaproponowanej przez Tokuyasu i wsp. (15), surowy ekstrakt, otrzymany również ze szczepu *Colletotrichum lindemuthianum*, jest podawany najpierw na kolumnę oddziaływań hydrofobowych (butyl-Toyopearl 650 M równoważona buforem 20 mM czteroboran sodu/HCl, pH 8,5 nasyconym w 25% siarczanem amonowym). Do wymywania białek z kolumny jest stosowany liniowy gradient siarczanu amonu w buforze. Zebrane frakcje zawierające aktywną deacetylazę chityny są rozdzielane na kolumnie jonowymiennej (Q-Sepharose Fast Flow równoważona buforem 20 mM trójetanoloamina/HCl, pH 7,5, z dodatkiem 50 mM NaCl). Białka są wymywane w liniowym gradiencie NaCl. Frakcje zawierające aktywny enzym są następnie podawane na kolejną kolumnę jonowymienną (Resource-Q). Do wymywania białek jest stosowany liniowy gradient NaCl (0-150 mM).

Porównanie omówionych metod oczyszczania deacetylazy chityny przedstawiono w dalszej części pracy.

3. Właściwości deacetylazy chityny

Deacetylaza chityny katalizuje deacetylację chityny i innych acetylowanych chitooligomerów. Jest jednak nieaktywna wobec peptydoglikanu ze ściany komórkowej bakterii, acetylowanej heparyny i acetylowanej galaktozoaminy (1). W porównaniu

z innymi enzymami ściany komórkowej drobnoustrojów jest ona mało poznana, w literaturze wskazuje się na duże rozbieżności wyników uzyskiwanych przez poszczególnych badawczy.

Aktywność deacetylazy chityny najczęściej określa się metodą opracowaną przez Araki i Ito (5). Do buforu 50 mM Tes-NaOH o pH 5,5 dodaje się substrat (glikol chityny) i roztwór enzymatyczny. Całość inkubuje się przez 10 minut w temperaturze 30°C. Następnie oznacza się kwas octowy uwolniony z substratu, stosując enzymatyczną metodę Bergmeyera (18). Dostępne są gotowe zestawy do wykonania tych oznaczeń (10). W praktyce stosowane są różne modyfikacje metody Araki i Ito polegające na zmianie buforu, a także temperatury i czasu inkubacji (9,10,15).

Jedna jednostka aktywności enzymu [J] odpowiada ilości enzymu potrzebnej do uwolnienia z substratu 1 μmola kwasu octowego podczas 1 minuty.

Dane dotyczące masy cząsteczkowej deacetylazy chityny nie są jednoznaczne. Deacetylaza pochodząca z grzybni *Mucor rouxii* jest monomerem o masie cząsteczkowej 75-80 kDa. Jest to glikoproteina zawierająca 30% węglowodanów, głównie mannozy (9,19). Według Arcidiacono i wsp. (6) enzym, wyizolowany również z grzybni *Mucor rouxii*, ma masę cząsteczkową 20 kDa. Martinou i wsp. (7) stwierdzili występowanie dwóch form deacetylazy z grzybni *Mucor rouxii* – jednej o masie 38 kDa (będącej przypuszczalnie produktem degradacji właściwego enzymu) i drugiej o masie 75-80 kDa. Wprowadzając bardziej zachowawcze warunki oczyszczania, tj. chromatografię immunopowinowactwa, otrzymali tylko jedno białko enzymatyczne o masie 75 kDa. Taką samą masę ma według Gao i wsp. (10) deacetylaza chityny z grzybni *Absidia coerulea*. Natomiast deacetylaza pochodząca z *Colletotrichum lindemuthianum* ma masę cząsteczkową 31,5-33 kDa (15). Według Tsigosa i wsp. (14) enzym wyizolowany z tego samego szczepu ma masę cząsteczkową około 250 kDa, a deacetylaza z grzybni *Aspergillus nidulans* ma masę cząsteczkową 27,5 kDa (11).

Optymalna wartość pH dla deacetylazy chityny zależy od rodzaju mikroorganizmu z jakiego została wyizolowana. Deacetylaza pochodząca z grzybni *Mucor rouxii* (8) wykazuje optymalne działanie wobec glikolu chityny przy pH 4,5, natomiast deacetylaza wyizolowana z grzybni *Absidia coerulea* (9) przy pH 5,0. Ten sam enzym otrzymany z *Aspergillus nidulans* (10) jest stabilny przy pH 4-7,5 i wykazuje optymalne działanie wobec glikolu chityny przy pH 7,0. Deacetylaza pochodząca z *Colletotrichum lindemuthianum* (13) przejawia maksymalną aktywność wobec glikolu chityny przy pH 8,5. Enzym otrzymany z tego samego szczepu przez Tokuyasu i wsp. (14) wykazuje optymalną aktywność przy pH 11-12.

Aktywność deacetylazy zależy także od buforu używanego do sporządzania mieszanin reakcyjnych. Enzym ten jest hamowany przez kwasy organiczne, głównie kwas octowy i cytrynowy (4). W roztworze Tris-HCl deacetylaza pochodząca z *Mucor rouxii* wykazuje maksymalną aktywność wobec glikolu chityny przy pH 4, natomiast w buforze octanowym i w buforze TES-NaOH przy pH 5 (5). Deacetylaza wyizolowana przez Araki i Ito (4) wykazuje kilkakrotnie mniejszą aktywność wobec glikolu chityny w buforze octanowym niż w roztworze mrówczanu sodu.

Deacetylaza pochodząca z grzybni *Mucor rouxii* (9), *Aspergillus nidulans* (11) *Absidia coerulea* (10) oraz *Colletotrichum lindemuthianum* (14) wykazują optymalne działanie wobec glikolu chityny w temperaturze 50°C. Enzym otrzymany z tego samego szczepu przez Tokuyasu i wsp. wykazuje największą aktywność w temperaturze 60°C (15).

Deacetylaza chityny wyizolowana z grzybni *Mucor rouxii* jest stabilna w zakresie temperatur od 0 do 40°C, natomiast w temperaturze 50°C utrzymuje około 85% swej maksymalnej aktywności (8). Enzym pochodzący z *Colletotrichum lindemuthianum* utrzymuje ponad 90% swojej aktywności po 45 h przetrzymywania w temperaturze 50°C (14,16). Deacetylaza z grzybni *Absidia coerulea* charakteryzuje się wysoką odpornością temperaturową i utrzymuje 100% aktywność po godzinnym przetrzymywaniu w temperaturze 50°C (10).

Przechowywanie grzybni *Mucor rouxii* przez 4 miesiące w temperaturze -20°C nie zmienia znacząco aktywności deacetylazy. Nieznaczny wzrost aktywności może być jednak spowodowany poprzez częściową denaturację współistniejących białek. Natomiast przechowywanie ekstraktu z grzybni w temperaturze 0°C przez 6 dni nie zwiększa aktywności enzymu (8).

Stabilność enzymu określana jest poprzez pomiar aktywności deacetylazy w próbkach przetrzymywanych w różnych temperaturach. Przedstawione dane mają tylko charakter jakościowy, a nie ilościowy. Nie określono bowiem stopnia dezaktywacji enzymu, co pozwoliłoby na porównanie wyników uzyskanych przez różnych badaczy.

W literaturze wskazuje się, że obecność w roztworze soli metali o stężeniu powyżej 10 mM może działać hamującą na aktywność deacetylazy chityny (9-11). Preparaty otrzymywane z różnych drobnoustrojów mogą się różnić odpornością na działanie niektórych substancji. Deacetylaza chityny otrzymana z *Colletotrichum lindemuthianum* (14) jest odporna na działanie kwasów karboksylowych (mrówkowego, octowego, propionowego) zaś enzym otrzymany z *Mucor rouxii* jest hamowany przez kwasy karboksylowe, zwłaszcza kwas octowy (9). Jony kobaltu zwiększają aktywność deacetylazy chityny otrzymanej z *Colletotrichum lindemuthianum* (14). W przypadku preparatów otrzymanych z *Mucor rouxii* i *Absidia coerulea* nie stwierdzono zależności aktywności od stężenia jonów kobaltu (9,11).

4. Materiały i metody

Do badań wykorzystano szczep grzybów strzępkowych *Absidia orchidis* z własnej kolekcji. Hodowle prowadzono w bioreaktorze BIOFLO III firmy New Brunswick o objętości roboczej 5 dm^3.

4.1. Pożywka

Jako pożywkę stosowano podłoże o następującym składzie: 4,0 g glukozy,1,0 g peptonu, 0,1 g ekstraktu drożdżowego, 0,5 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 g K_2HPO_4, 0,1 g NaCl, 0,5 g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,01 g $CaCl_2$.

Hodowlę grzybów prowadzono w następujących warunkach:

- temperatura 26°C,
- pH 5,5,
- napowietrzanie 7 dm^3/min,
- mieszanie 200 obr/min,
- czas hodowli 48 godzin.

4.2. Przygotowanie surowego ekstraktu enzymatycznego

Surowy ekstrakt enzymatyczny przygotowywano w następujący sposób:

- oddzielenie biomasy (wirowanie, 6000 obr/min, 20 min),
- homogenizacja biomasy w buforze Tris-HCl o pH 7,3,
- przechowywanie biomasy przez 3 dni w temperaturze -18°C i 1 dzień w temperaturze 4°C,
- wirowanie i filtracja supernatantu,
- nasycenie supernatantu siarczanem amonu (80% nas.),
- wirowanie i rozpuszczenie precypitatu w buforze.

4.3. Oczyszczanie enzymu

Do oczyszczania preparatu enzymatycznego stosowano zestaw do chromatografii preparatywnej BioPilot firmy Pharmacia. Aparat składa się z kolumn chromatograficznych dobieranych do aktualnie prowadzonego procesu, zestawu pomp do dozowania próbki i rozpuszczalników, detektorów oraz automatycznego kolektora frakcji. Stosowano kolumnę Sephacryl S-100 High Resolution 26/60 do filtracji żelowej oraz kolumnę jonowymienną HiLoad Q Sepharosae 26/10.

4.4. Oznaczanie aktywności

Aktywność deacetylazy chityny oznaczano metodą Ataki i Ito (5) stosując jako substrat glikol chityny.

4.5. Oznaczanie masy cząsteczkowej enzymu

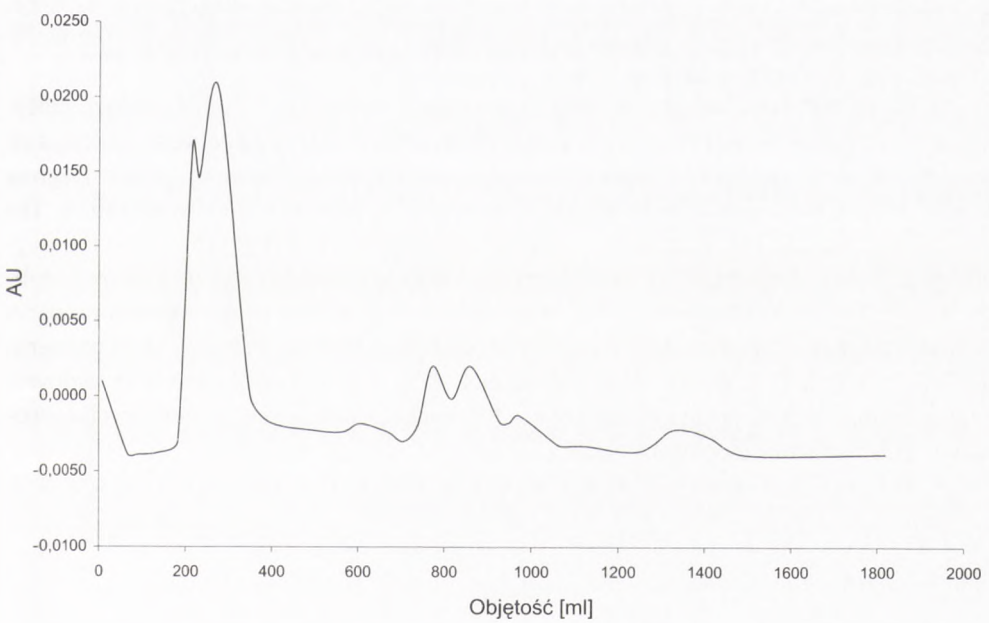
Masę cząsteczkową deacetylazy chityny oznaczano stosując elektroforezę żelową (SDS-PAGE).

5. Wyniki i dyskusja

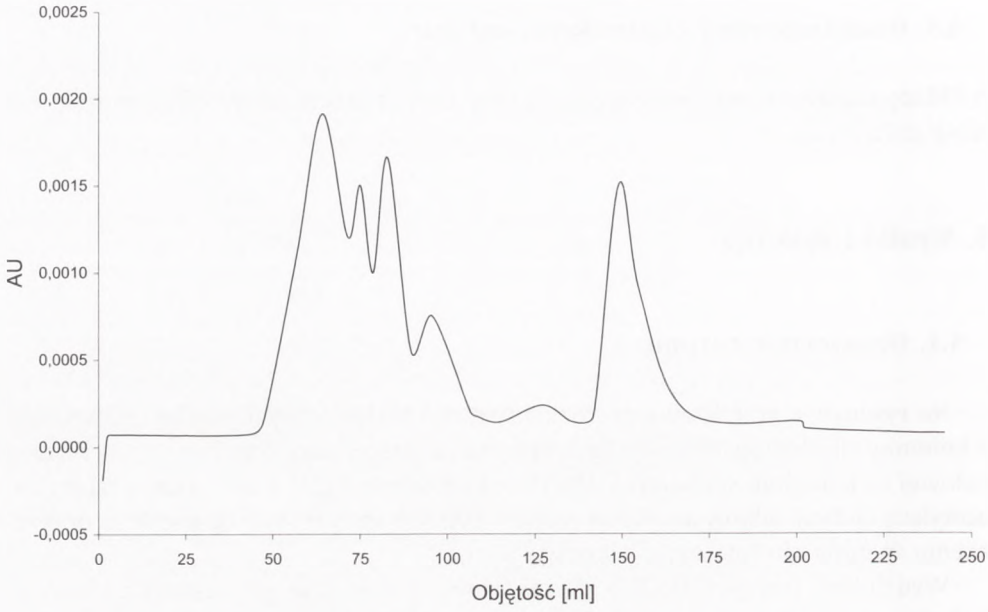
5.1. Oczyszczanie enzymu

Na rysunku 1 przedstawiono rozkład stężeń białek (chromatogram) na wylocie z kolumny chromatograficznej dla oczyszczania deacetylazy chityny metodą filtracji żelowej na kolumnie Sephacryl S-100 High Resolution 26/60. Frakcja zawierająca deacetylazę chityny odpowiada ilości eluentu 200-350 cm^3. Frakcję tę poddano oczyszczeniu metoda chromatografii jonowymiennej.

Wydzielone frakcje (200-350 ml) częściowo oczyszczonego enzymu podano na kolumnę jonowymienną HiLoad Q Sepharose 26/10. Na rysunku 2 przedstawiono wyniki oczyszczania deacetylazy chityny na kolumnie jonowymiennej. Zebrane frakcje (145-175 ml) zawierające deacetylazę chityny używano jako oczyszczony roztwór enzymatyczny.



Rys. 1. Chromatogram po kolumnie Sephacryl S-100 High Resolution 26/60.



Rys. 2. Chromatogram po kolumnie HiLoad Q Sepharose 26/10.

Sprawdzono również inną kolejność oczyszczania preparatu. W pierwszym etapie zastosowano chromatografię jonowymienną zaś w drugim filtrację żelową. Uzyskano mniejsze wartości stopnia oczyszczenia niż w układzie filtracja żelowa – chromatografia jonowymienna (20).

W tabeli 1 przedstawiono zestawienie wyników oczyszczania deacetylazy chityny wyizolowanej z różnych mikroorganizmów. Największą wydajność otrzymano w przypadku stosowania metody trójstopniowej zaproponowanej przez Tsigosa i wsp. (14), natomiast największy stopień oczyszczenia uzyskano w metodzie Tokuyasu i wsp. (15) (oczyszczanie trójstopniowe: kolumna hydrofobowa – jonowymienna – jonowymienna). W wielu metodach wykorzystywane są kosztowne i szybko zużywające się kolumny oddziaływań hydrofobowych. W pracy zaproponowano prostą i tanią metodę dwustopniową wykorzystującą filtrację żelową i chromatografię jonowymienną. Uzyskano dobrą wydajność oczyszczania preparatu oraz zadowalający stopień oczyszczenia, zbliżony do wartości uzyskiwanych w niektórych metodach trójstopniowego oczyszczania.

Tabela 1

Oczyszczanie deacetylazy chityny

Mikroorganizm	Metoda oczyszczania	Wydajność oczyszczania [%]	Aktywność właściwa surowego ekstraktu [J*/mg]	Aktywność właściwa oczyszczonego enzymu [J*/mg]	Stopień oczyszczenia
Aspergillus nidulans (11)	IE + GF	3,5	1,4	25,0	18
Absidia coerulea (10)	HA+GF+HA	4,1	0,022	11,4	517
Mucor rouxii (9)	HA+IE+IE	11,9	0,031	3,0	97
Colletotrichum lindemuthianum (14)	IE+GF+IE	16,0	0,002	0,2	110
Colletotrichum lindemuthianum (15)	HA +IE+IE	4,1	0,012	18,4	944
Absidia orchidis	GF+IE	14	0,08	12,3	147

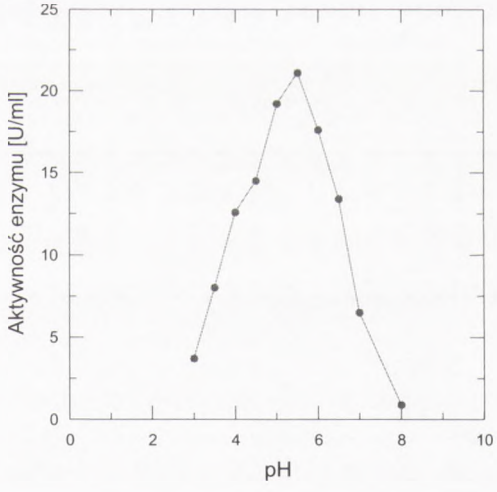
* Jedna jednostka aktywności [J] odpowiada ilości enzymu potrzebnej do uwolnienia z substratu 1 μmola kwasu octowego w ciągu 1 minuty.

Oznaczenia: IE – chromatografia jonowymienna, GF – filtracja żelowa, HA – chromatografia oddziaływań hydrofobowych.

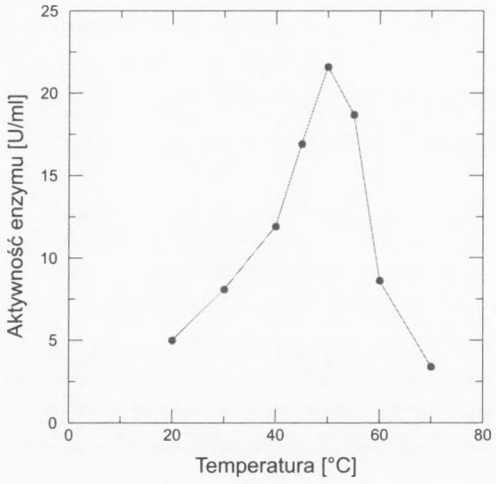
5.2. Właściwości deacetylazy chityny

Masa cząsteczkowa deacetylazy chityny określona przy użyciu elektroforezy żelowej (SDS-PAGE) wynosiła ok. 75 kDa. Wartość ta jest zbliżona do wartości masy cząsteczkowej podawanej w literaturze przedmiotu (7,9,10) dla preparatów otrzymywanych z *Mucor rouxii*.

Na rysunku 3 przedstawiono zależność aktywności deacetylazy chityny od temperatury. Największą aktywność enzymu uzyskano przy pH roztworu 5,5. Na rysun-



Rys. 3. Zależność aktywności deacetylazy chityny z *Absidia orchidis* od pH.



Rys. 4. Zależność aktywności deacetylazy chityny z *Absidia orchidis* od temperatury.

ku 4 przedstawiono zależność aktywności deacetylazy chityny od temperatury. Największą aktywność enzymu uzyskano w temperaturze 50°C.

Tabela 2

Właściwości deacetylazy chityny

Źródło	Masa cząsteczkowa [kDa]	Optimum pH*	Optimum temperatury* [°C]
Aspergillus nidulans (11)	27,5	7,0	50
Absidia coerulea (10)	75	5,0	50
Mucor rouxii (7)	75		
Mucor rouxii (9)		4,5	50
Colletotrichum lindemuthianum (14)	250	8,5	50
Colletotrichum lindemuthianum (15)	31,5-33	11-12	60
Absidia orchidis	75	5,5	50

* aktywność mierzona względem glikolu chityny

6. Podsumowanie

Przedstawiono metody wydzielania i oczyszczania deacetylazy chityny. Porównano istniejące metody: dwu- i trójstopniowe. Stwierdzono, że największy stopień oczyszczenia uzyskuje się stosując metodę trójstopniowego oczyszczania (kolumna hydrofobowa – jonowymienna – jonowymienna).

Do oczyszczenia deacetylazy chityny z surowego ekstraktu z hodowli grzybów strzępkowych *Absidia orchidis* zastosowano metodę dwustopniową. W pierwszym stopniu oczyszczania zastosowano filtrację żelową, w drugim – chromatografię jonowymienną. Uzyskano ogólny stopień oczyszczenia równy 147 – porównywalny z osiągnięciami w metodach trójstopniowych.

Zbadano zależność aktywności oczyszczonej deacetylazy chityny, mierzonej względem glikolu chityny, od temperatury i pH. Uzyskano dane zbliżone do wyników uzyskanych dla preparatów deacetylazy chityny pochodzącej z innych źródeł.

Literatura

1. Roberts G. A. F., (1992), *Chityn Chemistry*, The Macmillan Press, London.
2. Arcidiacono S., Lombardi S., Kaplan D. L., (1989), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. Skiak- Braek G., Anthonsen I., Sandford P., Elsevier Applied Science, London, New York, 319-332.
3. Kołodziejska J., Wojtasz-Pająk A., Sikorski Z. E., (1995), Biotechnologia, 3(30), 133-138.
4. Szewczyk K.W., Jaworska M., (2001), Plastics Rev., 8, 34-35.
5. Ataki Y., Ito E., (1975), Eur. J. Biochem., 55, 71-78.
6. Arcidiacono S., Lombardi S., Kaplan D. L., (1989), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. Skiak-Braek, G., Anthonsen I., Sandford P., Elsevier Applied Science, London, New York, 319-332.
7. Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V., (1993), J. Chromatogr., 644, 35-41.
8. Kołodziejska J., Malesa-Ciecwierz M., Lerska A., Sikorski Z. E., (1999), J. Food Biochem., 23(1), 45-57.
9. Kafetzopoulos D., Martinou A., Bouriotis V., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 2564-2568.
10. Gao X-D., Katsumoto T., Kazukiyo O., (1995), J. Biochem., 117, 257-263.
11. Alfonso C., Nuero O. M., Santamaria F., Reyes F., (1995), Current Microbiobiology, 30, 49-54.
12. Arachami M., Gowri N., Sundara-Rajulu G., (1986), in: *Chitin in Nature and Technology*, Eds. Muzzarelli R., Jeunioux G., Gooday G. W., Plenum Press, New York, London, 263-268.
13. Kaus H., Jeblicki W., Young D. H., (1983), Plant. Sci. Lett., 28, 231-236.
14. Tsigos I., Bouriotis V., (1995), J. Biolog. Chem., 270(44), 26286-26291.
15. Tokuyasu K., Ohinishi-Kameyama M., Hayashi K., (1996), Biosci. Biotech. Biochem., 60(10), 1598-1603.
16. Tsigos I., Martinou A., Varum K., Kafetzopoulos P., Christodoulidon A., Tzanodaskalaki M., Bouriotis V., (1994), in: *Chitin Word*, Wirtschaftsverlag NW, Bremerhaven, 98-107.
17. Siegrist J., Kauss H., (1990), Physiol. Molec. Plant Pathol., 36, 267-273.
18. Bergmeyer H. U., (1974), Methods Enzym. Anal., 1, 112-117.
19. Kafetzopoulos D., Martinou A., Bouriotis V., (1993), in: *Chitin Enzymology*, Ed. Muzarelli R. A. A., Eur. Chitin Soc., Ancona, 147-157.
20. Plewka M, Szewczyk K. W., (1999), *3rd International Conference of the European Chitin Society*, Potsdam, (1999), materiały, 6.