



## Wytwarzanie chitozanu z grzybów strzępkowych

Małgorzata M. Jaworska, Ewa Konieczna

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

### Chitosan from the fungi

#### Summary

The method of chitosan separation from fungus cell walls was presented by White, Farina, Fulton in 1979. Since that time many other investigators worked on that subject. None of them succeeded in developing a technology that would be worth-while as far as the economical aspect of the matter is concerned.

The yield of chitosan from fungal mass or from cultivation medium depends on several factors like: strain of fungi used, cultivation method (submerged cultures or solid-state cultures), cultivation parameters (pH, temperature, time of cultivation).

The aim of this paper was to compare the literature and own data presenting the influence of culture conditions on chitosan yields.

#### Key words:

chitosan, fungi, Mucorales.

### 1. Wprowadzenie

Chitozan jest jedną z najważniejszych pochodnych chityny. Znajduje on potencjalne zastosowanie w takich dziedzinach jak: medycyna, farmacja, dietetyka, stomatologia, biotechnologia, ochrona roślin, ochrona środowiska. Oba polimery, chityna i chitozan, zbudowane są z merów N-acetylglukozaminy (GlcNAc) i glukozaminy (GlcN) połączonych liniowo ze sobą w sposób przypadkowy (1,2). Różnica między nimi polega na zawartości merów GlcNAc w łańcuchu polimeru: jeżeli zawartość ta jest większa niż 45% to polimer klasyfikowany jest jako chityna, zaś gdy

#### Adres do korespondencji

Małgorzata M. Jaworska,  
Wydział Inżynierii  
Chemicznej i Procesowej,  
Politechnika Warszawska,  
ul. Waryńskiego 1,  
00-645 Warszawa;  
e-mail:  
jaworska@ichip.pw.edu.pl

#### biotechnologia

2 (57) 78-87 2002

jest mniejsza, to zaliczany jest do chitozanów (3). Mianem chitozan określa się zatem dużą grupę liniowych polimerów będących kopolimerami GlcN i GlcNAc, a nie związek o ściśle zdefiniowanej budowie. Klasyfikacja polimeru do jednej z tych grup oparta jest także na rozpuszczalności: chitozan, w przeciwieństwie do chityny, jest rozpuszczalny w rozcieńczonych kwasach organicznych oraz w kwasie solnym (4).

Obecnie chitozan produkowany jest na skalę przemysłową na drodze chemicznej deacetylacji chityny, która polega na oderwaniu grup acetylowych połączonych z aminowym podstawieniem w łańcuchu glukozy i przekształceniu merów GlcNAc w mery GlcN. Proces deacetylacji prowadzony jest przy użyciu stężonej zasady sodowej (40-50%) w podwyższonej temperaturze (90-120°C) i przy podwyższonym ciśnieniu. Jakość chitozanu otrzymywanego w tym procesie zależy od surowca (źródło chityny, miejsce pozyskiwania) oraz od warunków prowadzenia procesu deacetylacji (stężenia NaOH, temperatury, czasu reakcji). Słabym punktem metody chemicznej jest znaczna ilość ścieków zawierających stężony roztwór NaOH oraz charakteryzujących się wysokimi wartościami ChZT.

W badaniach prowadzonych przez Araki i Ito (5) oraz Bartnickiego et al. (6,7) wykazano, że chitozan jest naturalnym składnikiem ścian komórkowych grzybów strzępkowych należących do Mucorales. Jest on tworzony w wyniku działania syntetazy chityny i deacetylazy chitynowej. W pierwszym etapie syntetaza chityny polimeryzuje łańcuch chityny (prekursorem chityny jest urydyno- di fosfo- N-acetyl glukoamina; UDP-GlcNAc). Łańcuch ten, w chwili tworzenia, poddawany jest enzymatycznej deacetylacji przez deacetylazę chityny: mery GlcNAc przekształcane są w mery GlcN i w efekcie końcowym otrzymujemy łańcuch chitozanu.

Chitozan wydzielony ze ścian komórkowych grzybów strzępkowych, w przeciwieństwie do chitozanu produkowanego na drodze chemicznej, ma powtarzalne właściwości (tab. 1) co jest bardzo istotne, np. w zastosowaniach medycznych.

Tabela 1

Właściwości chitozanu wydzielonego z grzybów strzępkowych *Absidia orchidis*

Hodowla	Stopień acetylacji* (%)	ŚLMCz** kDa
M3	24,1	602
M3 - A	23,9	553

\* stopień acetylacji (procentowa zawartość merów GlcNAc) oznaczony na podstawie widma podczerwieni zgodnie z procedurą Shigemasa et al. (8);

\*\* średnia lepkościowa masa cząsteczkowa oszacowana za pomocą równania Mark-Houwinka ze stałymi wyznaczonymi przez Rinaudo et al. (9).

Metoda wydzielania chitozanu ze ścian komórkowych została po raz pierwszy zaprezentowana przez White, Farina, Fulton (10) w 1979 r. Obejmuje ona 3 nastę-



pujące po sobie etapy: 1) namnożenie biomasy i wydzielenie jej z płynu pochowlańczego, 2) alkaliczną separację kompleksu polimerów ścian komórkowych, 3) kwaśną ekstrakcję chitozanu z kompleksu polimerów. Chociaż metoda ta jest znana od przeszło 20 lat, do chwili obecnej nie opracowano technologii, która byłaby opłacalna z ekonomicznego punktu widzenia. Główne problemy tej technologii polegają na zbyt niskiej wydajności chitozanu. Wydajność chitozanu zależy bowiem od wielu czynników:

- doboru właściwego „producenta” chitozanu,
- metody hodowli (wgłębna lub w podłożu stałym, hodowla okresowa, półkresowa, ciągła),
- warunków prowadzenia hodowli (pH, temperatura, czas).

Wpływ wymienionych czynników na wydajność chitozanu z jednostki objętości pożywki (1 litr) omówiony zostanie w prezentowanej pracy. Porównane zostaną dane literaturowe oraz wyniki prac własnych. Za podstawę do porównania przyjęto wydajność chitozanu z jednostkowej objętości pożywki.

## 2. „Producenci” chitozanu

Chitozan jest składnikiem ścian komórkowych grzybów strzępkowych należących do Mucorales. Szczepami najczęściej stosowanymi w badaniach nad wytwarzaniem chitozanu były szczepy *Mucor rouxii* i *Absidia coerulea*. Nie są one jednak jedynymi, u których stwierdzono obecność chitozanu w ścianie komórkowej. W 1989 r. Shimahara et al. (11) zbadali około 125 szczepów w celu doboru szczepów o najwyższej zawartości polimeru w biomase. Podobne badania przeprowadzili także Rane i Hoover w 1993 r. (12) (zbadali 12 szczepów) oraz Tan et al. w 1996 r. (13) (zbadali 13 szczepów). Sumaryczne zestawienie wyników tych badań przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Szczepy *Mucoraceae* charakteryzujące się najwyższą wydajnością chitozanu

Szczep	Wydajność chitozanu* (mg/L)	Literatura
1	2	3
<i>Absidia butleri</i> , HTU 1001	900	(11)
<i>Absidia orchidis</i> , HUT 1034	815	(11)
<i>Absidia glauca</i> , NRIC 1181	700	(11)
<i>Absidia japonsica</i> , AHU 9006	620	(11)
<i>Absidia coerulea</i> , ATCC 14076	488	(12)
<i>Absidia coerulea</i> , ATCC 14076	1800	(14)
<i>Rhizopus acetoinus</i> , HTU 1219	645	(11)
<i>Rhizopus circinans</i> , HTU 1235	575	(11)

1	2	3
<i>Mucor rouxii</i> , NRRL 1894	371	(12)
<i>Mucor rouxii</i> , ATCC 24905	320	(13)
<i>Mucor rouxii</i> , DSM 1191	297	(12)
<i>Gongronella butleri</i> , USDB 0201	467	(13)
<i>Cunninghamella echinulata</i> ,	399	(13)

\* Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w hodowlach wstrząsanych (150-250 obr/min), w 24-28°C, czas hodowli wynosił od 24 do 72 godz.

Porównując wydajności chitozanu uzyskanego z biomasy poszczególnych szczepów wskazano na rodzaj *Absidia*, *Mucor* i *Rhizopus* jako na najlepszych „producentów” chitozanu. W zestawieniu takim wskazuje się także na brak powtarzalności wydajności chitozanu przy stosowaniu tego samego szczepu pochodzącego jednak z różnych źródeł, np. Rane i Hoover (12) w hodowlach *Mucor rouxii* oznaczonego jako DSM 1191 uzyskali wydajność 297 mg/L, podczas gdy w hodowli szczepu oznakowanego jako NRRL 1894 uzyskali wydajność 371 mg/L. Wyniki zaprezentowane przez badaczy używających tego samego szczepu różnią się jeszcze bardziej, np. wydajność chitozanu otrzymanego z biomasy *Absidia coerulea* ATCC 14076 uzyskiwana przez zespół Rane i Hoover wynosiła 488 mg/L (12), a przez zespół Muzzarelli et al. (14) wynosiła 1800 mg/L.

### 3. Metody hodowli

Grzyby strzępkowe będące źródłem chitozanu mogą być namnażane w hodowlach wgłębnych (wstrząsanych, okresowych prowadzonych w różnego rodzaju bioreaktorach, hodowlach ciągłych) lub w hodowlach w podłożu stałym.

#### 3.1. Hodowle wgłębne

Hodowle wgłębne są najczęściej spotykanym w literaturze sposobem namnażania biomasy do produkcji chitozanu. Hodowle tego typu można podzielić na:

– hodowle okresowe prowadzone w bioreaktorach o różnej objętości pożywki (od 0,6 do 11,0 L) lub prowadzone jako hodowle wstrząsane w kolbach Erlenmeyera (objętość pożywki w kolbie od 0,1 do 0,6 L),

– hodowle ciągłe, prowadzone w bioreaktorach o objętości pożywki od 0,6 do 10,0 L i przy szybkości wymywania od 0,03 do 0,25 godz<sup>-1</sup>.

Porównanie wyników uzyskiwanych w różnych typach hodowli wgłębnych przedstawiono w tabeli 3.



Tabela 3

## Wydajność chitozanu w różnych typach hodowli wglębnych

Szczep	$V_{\text{pożywki}}/V_{\text{naczynia}}$ L/L	Wydajność chitozanu mg/L	Literatura
Hodowle wstrząsane			
<i>Absidia orchidis</i> , HUT 1034	0,2/0,5	815	(11)
<i>Absidia glauca</i> , NRIC 1181	0,2/0,5	700	(11)
<i>Absidia coerulea</i> , ATCC 14076	0,6/2,0	488	(12)
<i>Absidia coerulea</i> , NRRL 1315	0,6/2,0	476	(12)
<i>Mucor rouxii</i> , ATCC 24905	0,6/2,0	320	(12)
Hodowle okresowe prowadzone w bioreaktorze			
<i>Absidia orchidis</i> , NCAIM F 00642	4,5/6,0	1900	–
<i>Absidia glauca</i> , AR KFL	4,5/6,0	555	(15)
<i>Absidia coerulea</i> , ATCC 14076	0,6/1,2	909	(12)
<i>Absidia coerulea</i> , IMI 202719	4,5/6,0	209	(15)
<i>Mucor rouxii</i> , ATCC 24905	11,0/14,0	1200	(10)
Hodowle ciągłe			
<i>Absidia coerulea</i> , ATCC 14076*	0,6/1,2	1366	(12)

\* szybkość wymywania 0,025 h<sup>-1</sup>.

W zaprezentowanych wynikach podkreśla się złożoność problemu. Świadczą one wyraźnie, że sposób prowadzenia hodowli ma istotny wpływ na wydajność chitozanu. Można to wyraźnie zaobserwować porównując wyniki uzyskane w hodowlach szczepu *Absidia coerulea* ATCC 14076: w hodowli wstrząsanej uzyskano wydajność chitozanu 488 mg/L (12), w hodowli okresowej prowadzonej w bioreaktorze uzyskano wydajność chitozanu 909 mg/L (12), zaś w hodowli ciągłej uzyskano wydajność chitozanu 1366 mg/L (12). We wszystkich przypadkach skład pożywki oraz jej objętość były jednakowe, jednak uzyskane wydajności różniły się nawet 3-4-krotnie. Podobną zależność zaobserwowano także dla szczepu *Mucor rouxii* ATCC 24905 (odpowiednio 320 mg/L w hodowli wstrząsanej (12) i 1200 mg/L w hodowli okresowej w bioreaktorze (10)).

W przypadku innych mikroorganizmów brak jest wystarczających danych do porównania. Można jednak stwierdzić, że w hodowlach okresowych prowadzonych w bioreaktorze uzyskiwano wyższe wydajności niż w hodowlach wstrząsanych.

Hodowle ciągłe były stosowane zdecydowanie rzadziej niż inne hodowle wglębne. Wynika to głównie z trudności związanych z utrzymaniem stabilności tego typu hodowli. Nieliczne doniesienia (16,17) wskazują na porastanie przez grzyby wewnętrznych powierzchni bioreaktora (ścianki powyżej poziomu cieczy, pokrywa górna), elektrod (powodują zaburzenie odczytów), mieszadeł oraz zatykanie odprowadzenia roztworu pochodowlanego z naczynia fermentora przez rozwijającą się w nich

biomasę. Te wszystkie niedogodności powodują, że prowadzenie hodowli ciągłych w celu namnożenia biomasy jest bardzo kłopotliwe.

### 3.2. Hodowle w podłożu stałym

Hodowle w podłożu stałym prowadzone w celu namnożenia biomasy do produkcji chitozanu są znacznie rzadziej spotykane w literaturze niż hodowle wgłębne. Badania takie prowadzone były przez zespół Crestina et al. (18) przy wykorzystaniu grzybów *Lentinus edodes* należących do Basidiomycetes oraz Nwe et al. (19) przy wykorzystaniu grzybów *Gongronella butleri* USDB 0201. Porównanie wyników hodowli przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4

#### Wydajność chitozanu w hodowli w podłożu stałym

Grzyby	Podłoże	Wydajność chitozanu g/kg	Czas hodowli dni	Literatura
<i>Lentinus edodes</i> *	słoma	6	12	(18)
<i>Gongronella butleri</i> USDB 0201	słodkie ziemniaki	ok. 5,6	7	(19)

\* Basidiomycetes.

Wydajność chitozanu otrzymywanego z hodowli w podłożu stałym, jak się wydaje, jest znacznie wyższa niż wydajność chitozanu z hodowli wgłębnych. Jednak wydajność w tych ostatnich podawana jest w odniesieniu do jednostki objętości pożywki, a nie względem zawartości w niej składników odżywczych. W takim przypadku wydajność odniesiona do sumy składników byłaby znacznie wyższa. Ujemną stroną hodowli w podłożu stałym jest czas trwania hodowli: od 7 do 12 dni, podczas gdy w hodowlach wgłębnych czas ten wynosi od 48 do 72 godz. (2-3 dni). Korzystniejsze, jak się wydaje, jest zatem namnażanie biomasy w hodowlach wgłębnych niż w hodowlach w podłożu stałym.

### 4. Warunki prowadzenia hodowli wgłębnej

Warunki prowadzenia hodowli w istotny sposób wpływają na wydajność chitozanu. Spośród najistotniejszych czynników wymienić należy: pH, temperaturę, czas prowadzenia hodowli.



#### 4.1. pH pożywki

Grzyby strzępkowe stosowane w biotechnologicznym wytwarzaniu chitozanu hodowane są najczęściej na pożywce YPG lub pożywce YPG wzbogaconej w sole mineralne. pH pożywki waha się w granicach od 6,0 do 6,5 i jest obniżane po sterylizacji do wartości pH od 4,5 do 5,5. W trakcie wzrostu mikroorganizmów w podłożu pH środowiska obniża się zazwyczaj od 3,0 do 3,5. Taka zmiana warunków środowiska może wpływać na wydajność chitozanu. Jednak wpływ pH był stosunkowo rzadko badany (tab. 5).

Tabela 5

##### Optymalne pH pożywki

Szczep	pH optymalne	Literatura
<i>Absidia coerulea</i> , ATCC 14 076	4,5-6,0	(12)
<i>Absidia coerulea</i> , NRRL 1315	3,5-5,0	(12)
<i>Absidia orchidis</i> , NCAIM F 00642	5,0-7,0	–
<i>Mucor rouxii</i> , ATCC 24905	3,0-6,0	(12)

Na podstawie zaprezentowanych danych wskazuje się, że optymalne pH środowiska jest sprawą indywidualną dla każdego szczepu. Wyraźnie to widać w przypadku szczepów *Absidia coerulea* – optymalne pH środowiska zmieniało się wraz z pochodzeniem szczepu. Różnice te stają się jeszcze wyraźniejsze w obrębie rodzaju (*Absidia*). Jednak jest to zawsze zakres pH odpowiadający środowisku kwaśnemu.

#### 4.2. Temperatura hodowli

Temperatura prowadzenia hodowli jest kolejnym parametrem w istotny sposób wpływającym na wzrost biomasy i produkcję chitozanu. Zakres optymalnej temperatury dla szczepów należących do Mucorales przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6

##### Optymalna temperatura hodowli

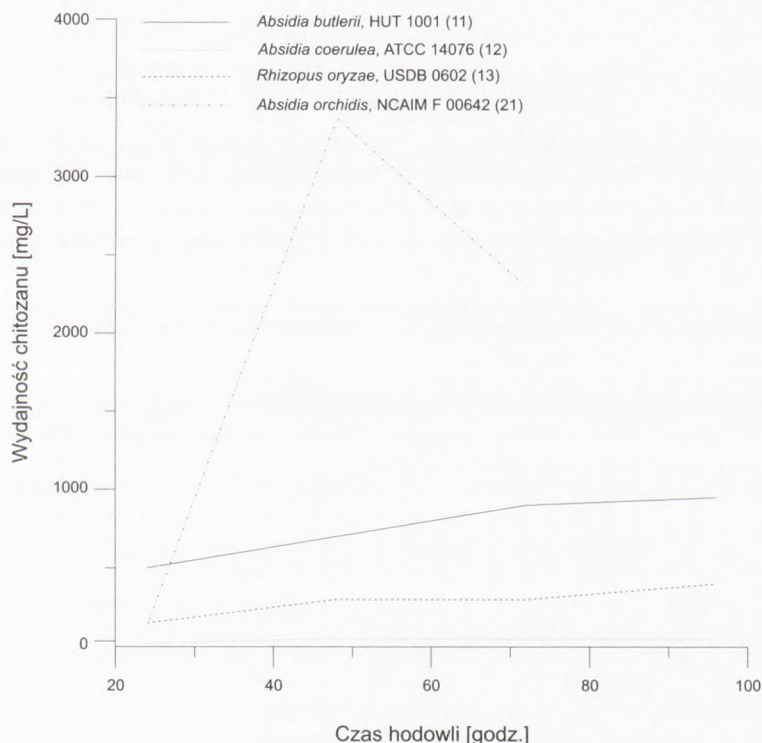
Szczep	Zakres temperatury	Literatura
<i>Absidia coerulea</i> , ATCC 14076	21-28°C	(12)
<i>Absidia coerulea</i> , NRRL 1315	21-28°C	(12)
<i>Absidia orchidis</i> , NCAIM F 00642	25-27°C	–
<i>Mucor rouxii</i> , ATCC 24905	21-32°C	(12)

Wszystkie szczepy należą do mikroorganizmów mezofilnych. Optymalna temperatura dla szczepów *Absidia* waha się w zakresie 21-28°C, zaś dla *Mucor rouxii* jest ona nieznacznie wyższa (do 32°C).

### 4.3. Czas hodowli

Optymalny czas hodowli grzybów strzępkowych ma istotne znaczenie dla opłacalności biotechnologicznego wytwarzania chitozanu, gdyż rzutuje na koszty produktu końcowego. Należało zatem określić optymalny czas prowadzenia hodowli węgłonej, pozwalający na namnożenie znacznych ilości biomasy zawierającej znaczne ilości chitozanu. Badania tego typu przeprowadzono dla niektórych szczepów Mucoraceae i pokazano bardzo interesującą zależność (rys. 1).

Wydajność chitozanu rosła początkowo bardzo szybko (72 godz. dla *Absidia butlerii*, 48 godz. dla *Absidia coerulea* i *Rhizopus oryzae*), a następnie obserwowano znacznie wolniejszy wzrost (*Absidia butleri*) lub stabilizację (*Rhizopus oryzae*) na tym



Rys. 1. Wpływ czasu hodowli na wydajność chitozanu.



samym poziomie wydajności. Jedynie w przypadku szczepu *Absidia coerulea* po 72 godz. hodowli zaznaczył się niewielki wzrost wydajności polimeru.

Porównując wydajność chitozanu uzyskiwaną z biomasy w różnych fazach wzrostu mikroorganizmów można stwierdzić, że optymalny czas trwania hodowli odpowiada końcowej fazie wzrostu wykładniczego mikroorganizmów (11-13,21).

## 5. Wnioski

Wytwarzanie chitozanu z grzybów strzępkowych może stać się interesującą alternatywą dla produkcji polimeru metodą chemiczną. Wynika to przede wszystkim ze wzrastającego z roku na rok zapotrzebowania na chitozan oraz z ograniczonych dostaw chityny pochodzącej jedynie z przetwórstwa rybnego. Chitozan pochodzący z grzybów strzępkowych nie odbiega jakościowo od chitozanu otrzymywanego z chityny, a czasami jego stosowanie jest znacznie korzystniejsze (np. w zastosowaniach medycznych). Głównym problemem związanym z wytwarzaniem chitozanu jest uzyskanie odpowiednio wysokiej wydajności procesu. W porównaniu z pierwszymi publikacjami ukazującymi się w literaturze światowej na temat wytwarzania chitozanu z grzybów strzępkowych udało się zintensyfikować proces od 0,4-1,2 g/L (10,11) do 3,3 g/L (21) w hodowlach wgłębnych. Było to możliwe dzięki wykorzystaniu odpowiedniego szczepu charakteryzującego się wysoką zawartością chitozanu w kompleksie polimerów ściany komórkowej, oraz dzięki indywidualnemu dobraniu warunków hodowli dla wybranego szczepu. Należy podkreślić to jednoznacznie, że warunki hodowli (optymalne pH, temperatura, czas hodowli) powinny być dobierane indywidualnie dla danego szczepu. Zmieniając zatem szczep wykorzystywany do produkcji chitozanu należy ponownie określić indywidualne preferencje danego mikroorganizmu.

## Literatura

1. Aiba S., (1991), *Int. J. Biol. Macromol.*, 13, 40.
2. Varum K. M., Smidsrod O., (1997), in: *Advances in Chitin Science*, Eds. Domard A., Roberts G. A. F., Varum K. M., Jacques Andre Pub., Lyon, France, 168.
3. „Surowce i przetwory z ryb i innych zwierząt wodnych. Chitozan” – PN-89/A-86850.
4. Robert G. A. F., (1992), *Chitin chemistry*, The MacMillan Press LTD, London, Great Britain, 1.
5. Araki Y., Ito E., (1975), *Eur. J. Biochem.*, 55, 71.
6. Davis L. L., Bartnicki-Garcia S., (1984), *Biochemistry*, 23, 1065.
7. Bartnicki-Garcia S., (1989), in: *Chitin and Chitosan*, Eds. Skjak-Braek G., Anthonsen T., Sanford P. A., Elsevier Applied Science, London and New York, 23.
8. Shigemasa Y., Matsura H., Sashiva H., Saimoto H., (1996), in: *Advances in Chitin Science*, Eds. Domard A., Jeuniaux Ch., Muzzarelli R. A. A., Roberts G. A. F., Jacques Andre, Lyon, 204.
9. Rinaudo M., Milas M., Le Dung P., (1993), *Int. J. Bio. Macromol.*, 15, 281.
10. White S. A., Farina P. R., Fulton I., (1979), *Appl. Envir. Microb.*, 38, 323.
11. Shimahara K., Takaguchi Y., Kobayashi T., Uda K., Sannan T., (1989), in: *Chitin and chitosan*, Eds. Skjak-Braek G., Anthonsen T., Sandford P., Elsevier Appl. Sci., Bonn, 171.

12. Rane K. D., Hoover D. G., (1993), *Food Biotech.*, 7, 11.
13. Tan S. Ch., Tan T. K., Wong S. M., Khor E., (1996), *Carbohydrate Polymers*, 30, 239.
14. Muzzarelli R. A. A., Iliari P., Tarasi R., Dubini B., Xia W., (1994), *Carbohydrate Polymers*, 25, 45.
15. Jaworska M. M., Szewczyk K. W., Konieczna E., (1998), in: *Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives*, Ed. Struszczyk H., Polish Chitin Society, Łódź, 95.
16. Davoust N., Hansson G., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 618.
17. Jaworska M. M., Szewczyk K. W., (2000), VIII Międzynarodowa Konferencja Chityny i Chitozanu, Yamaguchi (Japonia), Materiały konferencyjne, 117.
18. Crestini C., Kovac B., Giovannozzi-Sermanni G., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 207.
19. Nwe N., Chandkrachang S., Stevens W. F., (2000), VIII Międzynarodowa Konferencja Chityny i Chitozanu, Yamaguchi (Japonia), Materiały konferencyjne, 219.
20. Jaworska M. M., Szewczyk K. W., (1998), in: *Advances in Chitin Science*, Eds. Chen R. H., Chen H. C., National Taiwan Ocean University, 489.
21. Jaworska M. M., Roubinek O. K., Konieczna E., (2000), in: *Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives*, Ed. Struszczyk H., Polish Chitin Society, Łódź, 97.