



Chitozanaza z grzybów strzępkowych *Absidia orchidis*

Małgorzata M. Jaworska¹, Hideo Kusaoke²

¹Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

²Department of Applied Physics and Chemistry, Fukui University of Technology, Fukui, Japan

Chitosanase from *Absidia orchidis*

Summary

Absidia orchidis can be used as a source of several enzymes, amongst which chitosanase is one of the most interesting. Chitosanase hydrolyses the links between the mers of glucosamine or between mers of glucosamine and N-acetylglucosamine in the chains of chitosan and chitin.

The aim of the presented work was the preliminary investigations of the chitosanase from the fungus *Absidia orchidis*. This chitosanase is an intracellular enzyme with molecular weight approx. 36 000 Da. The optimal conditions for a hydrolysis of chitosan were pH 4.5 and temperature 25°C. This enzyme is stable at the optimal temperature for 24-48 hours, but after 7 days it was inactivated.

Key words:

chitosanase, chitosan, *Absidia orchidis*.

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) 200-206 2002

1. Wprowadzenie

Grzyby strzępkowe *Absidia orchidis* są mikroorganizmami wykorzystywanymi do produkcji chitozanu. Mogą być także wykorzystywane jako źródło enzymów, między innymi enzymów chitozanolitycznych.

Chitozanaza jest enzymem hydrolizującym wiązania β -1,4 glikozydowe między merami glukozaminy (GlcN-GlcN) lub między merami glukozaminy i N-acetylglukozaminy (GlcN-GlcNAc) w łań-

cuchach chityny i chitozanu. Efektem hydrolizy są polimery o krótszych łańcuchach lub oligomery obu polimerów. Szczególne znaczenie mają oligomery chitozanu, gdyż mogą one być wykorzystywane jako aktywatory odporności roślin na patogeny grzybowe. Mechanizm aktywacji nie został jednak dotąd jednoznacznie wyjaśniony.

Chitozanaza jest wytwarzana przez szereg mikroorganizmów, najczęściej bakterii. W większości przypadków są to enzymy zewnątrzkomórkowe, jak np. wytwarzane przez *Streptomyces* sp. (1,2), *Penicillium spinulosum* (3), *Bacillus* sp. (4), *Bacillus cereus* (5), *Bacillus circulans* (6) czy *Acinetobacter* sp. (7). Wewnątrzkomórkowe chitozazazy są spotykane znacznie rzadziej. Wyizolowano je m.in. z surowego ekstraktu komórkowego szczepów *Aspergillus fumigatus* (8) i *Bacillus pumilus* (9). Obecność chitozazazy wykazano także w surowym ekstrakcie komórkowym grzybów wykorzystywanych do produkcji chitozanu: *Absidia orchidis* (10) i *Mucor rouxii* (11).

Celem prezentowanej pracy była wstępna charakterystyka chitozazazy pochodzącej z grzybów strzępkowych *Absidia orchidis*. Praca obejmowała określenie optymalnego pH, optymalnej temperatury, termostabilności oraz specyficzności substratowej (chityna, chitozan).

2. Materiały i metody

2.1. Mikroorganizmy

Grzyby strzępkowe *Absidia orchidis* NCAIM F 00642, były hodowane na pożywce YPG, w hodowlach wstrząsanych (250 obr/min) w temperaturze 26°C przez 1-2 dni.

2.2. Chitozanaza

Grzybnię wydzielano z płynu pohodowlanego poprzez wirowanie (6000 obr/min, 20 min). Biomasa homogenizowano, oddzielono surowy ekstrakt komórkowy (wirowanie 24 000 obr/min, 45 min), a następnie wysalano białka siarczanem amonu (90% nasycenia, 4°C). Wytrącone białka były odfiltrowane (średnica porów sącza 0,45 µm) i były przechowywane na membranach filtracyjnych w temperaturze -18°C. Tuż przed rozpoczęciem eksperymentu, enzymy z 1-2 membran filtracyjnych były rozpuszczane w 10 mL buforu bursztynowego (0,1M, pH 4,5) i filtrowane przez membranę o średnicy porów 0,20 µm w celu usunięcia nierozpuszczonych białek. Klarowny roztwór stosowano w doświadczeniach.

2.3. Chityna i chitozan

W doświadczeniach stosowano chitynę, darowaną przez France Chitin (Francja), otrzymaną z krewetek oraz wyprodukowany z niej chitozan o stopniu acetylacji 39,6%.

2.4. Układ badawczy

Wszystkie doświadczenia prowadzono w 50 mL kolbach Erlenmeyera, w których umieszczano 25 mL buforu bursztynowego (0,1M) o odpowiednim pH i 100 mg chitozanu lub chityny. Kolby umieszczano we wstrząsarce (250 obr/min) w odpowiedniej temperaturze. Reakcja enzymatyczna była inicjowana przez dodanie 1 mL roztworu chitoznanazy i zatrzymywana przez dodanie 1-2 kropli 1N NaOH.

2.5. Metody analityczne

Stężenie białka mierzono spektrofotometryczną metodą Lowry'ego (12) z albuminą krwi bydlęcej jako standardem.

Stężenie cukrów redukujących oznaczano spektrofotometryczną metodą Schalesa (13) z glukozaminą jako standardem.

2.6. Aktywność enzymu

Miarą aktywności chitoznanazy była zmiana stężenia cukrów redukujących w trakcie trwania doświadczenia, będąca efektem działania enzymu. Aktywność chitoznanazy wyrażano jako ilość cukrów redukujących (CR) wytworzona w ciągu 1 godziny przez 1 mg chitoznanazy (w postaci ilości białka), [ng CR/(mg · godz.)].

3. Wyniki doświadczeń

Grzyby strzępkowe *Absidia orchidis* zawierają w ścianie komórkowej znaczne ilości chitozanu. Stwierdzono także, że grzyby te wytwarzają również enzym chitozanolityczny, chitoznanazę, scharakteryzowany jako enzym wewnątrzkomórkowy (10). Wyizolowana chitoznanaza ma masę cząsteczkową około 37 000 Da, zaś sekwencja genu odpowiedzialnego za jej kodowanie jest w 44-48% zgodna z sekwencją genu kodującego chitoznanazę wewnątrzkomórkową u *Aspergillus oryzae* i *Aspergillus fumigatus* (10).

Celem prezentowanych badań było przeprowadzenie wstępnej charakterystyki chitoznanazy z *Absidia orchidis*. W badaniach określono optymalne pH, optymalną

temperaturę, termostabilność oraz specyficzność działania względem chitozanu i chityny.

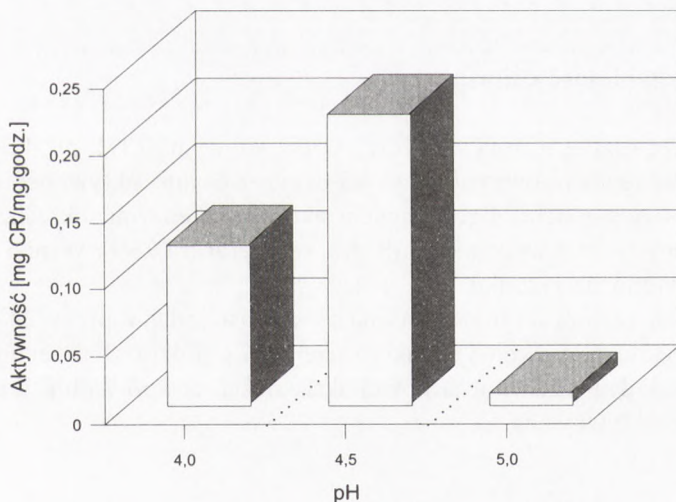
3.1. Wpływ pH na aktywność chitozanazy

Chitozan zmieszano z buforem bursztynowym (0,1M) o pH w zakresie 4,0-5,0, a następnie reakcję zainicjowano przez dodanie 1 mL roztworu enzymu. Doświadczenia prowadzono w temperaturze pokojowej. Wyniki przedstawiono na rysunku 1.

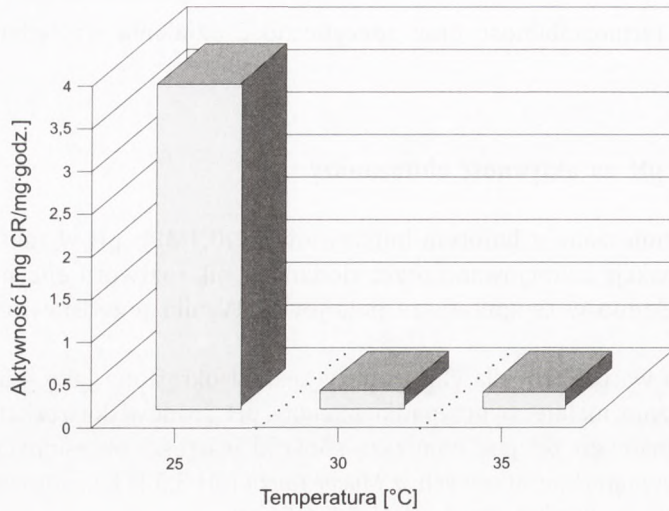
Optymalna wartość pH dla chitozanazy została określona jako 4,5. Aktywność enzymu wyraźnie maleje w przypadku zmiany pH środowiska reakcji. Określona wartość optymalnego pH jest najniższą spośród wartości określonych dla innych chitozanaz wewnątrzkomórkowych: z *Mucor rouxii* (pH 5,5 (11)), z *Aspergillus fumigatus* (pH 5,5 (8)) i z *Bacillus pumilus* (pH 5,5-6,5 (9)).

3.2. Wpływ temperatury na aktywność chitozanazy

Chitozan zmieszano z buforem bursztynowym (0,1M, pH 4,5) i przetrzymywano w różnych temperaturach w zakresie 25-35°C. Wyniki doświadczenia przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 1. Wpływ pH na aktywność chitozanazy.



Rys. 2. Wpływ temperatury na aktywność chitoznanazy.

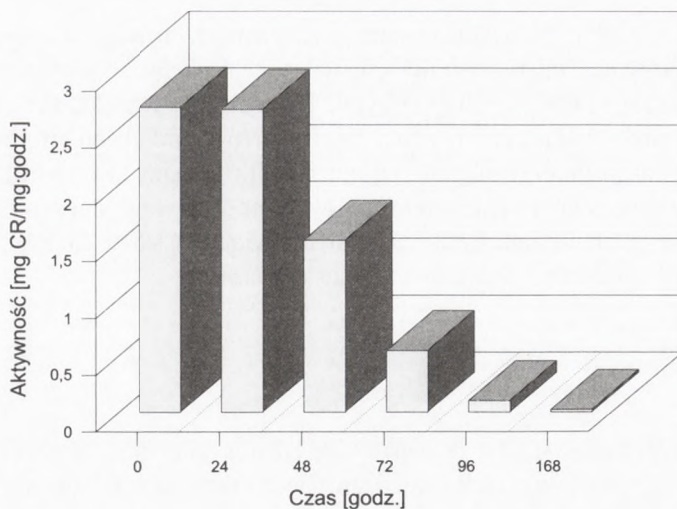
Wraz ze wzrostem temperatury obserwowano wyraźny spadek aktywności enzymu. Najwyższą aktywność chitoznanazy uzyskano w temperaturze 25°C i w tej temperaturze prowadzono dalsze doświadczenia.

Optymalne temperatury określone dla innych chitoznanaz wewnątrzkomórkowych były znacznie wyższe: 40°C dla *Mucor rouxii* (11), 50-60°C dla *Aspergillus fumigatus* (8) i 30-50°C dla *Bacillus pumilus* (9).

3.3. Termostabilność chitoznanazy

Chitoznanazę rozpuszczoną w buforze bursztynowym (0,1M, pH 4,5) przechowywano w termostacie w temperaturze 25°C przez 7 dni. Aktywność enzymu była sprawdzana w odstępach 24-godzinnych; aktywność enzymu określano w warunkach optymalnych dla chitoznanazy: pH 4,5, temperatura 25°C. Wyniki doświadczenia przedstawiono na rysunku 3.

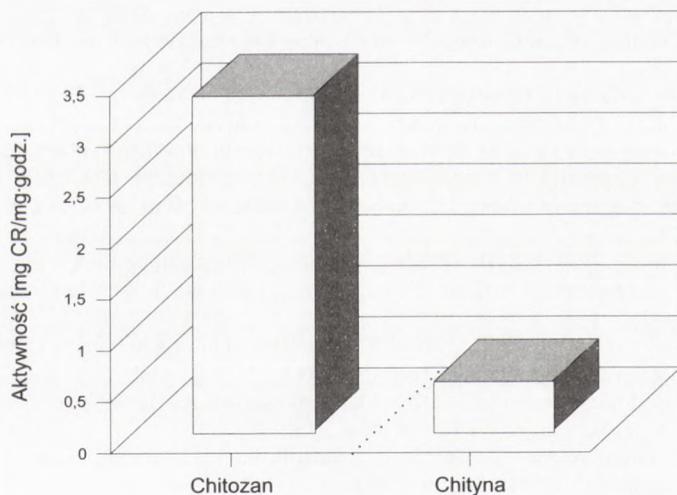
Chitoznanaza zachowała niezmienną aktywność jedynie przez 24 godziny. Następnie obserwowano powolną dezaktywację: po 72 godzinach przechowywania enzym zachował jedynie 20% początkowej aktywności, zaś po 7 dniach enzym został całkowicie dezaktywowany.



Rys. 3. Termostabilność chitozanyzy. Enzym był przechowywany w temperaturze 25°C bez substratu przez wskazany czas.

3.4. Specyficzność substratowa

Chitynę oraz chitozan zmieszano z buforem bursztynowym (0,1M, pH 4,5) i przetrzymywano w temperaturze 25°C. Reakcję zainicjowano przez dodanie 1 mL roztworu enzymu. Wyniki doświadczeń przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 4. Specyficzność substratowa chitozanyzy.

Chitozanaza z *Absidia orchidis* wykazuje aktywność zarówno w stosunku do chitozanu jak i chityny. Enzym uwolnił jednak więcej cukrów redukujących w trakcie hydrolizy chitozanu niż hydrolizy chityny. Stosunkowo wysoka aktywność względem chityny może świadczyć o znacznej zawartości połączeń merów GlcN-GlcN i GlcN-GlcNAc w polimerze oraz o zdolności chitozanazy do hydrolizy obu tych połączeń. Jednocześnie różnica między aktywnością względem obu polimerów świadczy o tym, że chitozanaza nie hydrolizuje wiązań GlcNAc-GlcNAc, które w chitynie stanowią większość połączeń między merami.

4. Wnioski

Grzyby strzępkowe *Absidia orchidis* są interesującymi mikroorganizmami, które mogą służyć nie tylko jako źródło chitozanu, lecz także jako źródło wielu enzymów, np. chitozanazy. W prezentowanej pracy przedstawiono wstępną charakterystykę enzymu i stwierdzono, że optymalne warunki hydrolizy chitozanu to pH 4,5 i temperatura 25°C. Warunki te znacznie odbiegają od optymalnych warunków działania innych chitozanaz wewnątrzkomórkowych. Chitozanaza była stabilna termicznie przez 24-48 godzin, po 7 dniach została całkowicie dezaktywowana.

W pracy nie przedstawiono wyników badań kinetyki procesu. Uzyskane zależności znacznie odbiegają od nielicznych danych literaturowych (opisywanych zależnością Michaelisa-Menten) i wymagają dalszych szczegółowych badań.

Literatura

1. Li T., Brzeziński R., Beaulieu C., (1995), *Plant Physiol. Biochem.*, 33, 599.
2. Boucher I., Dupuy A., Vidal P., Neugebauer W., Brzeziński R., (1991), *App. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 188.
3. Ak O., Bakir U., Guray T., (1998), *Biochem. Arch.*, 14, 221.
4. Shno H., Tsukuda K., Shimasui Y., (1991), *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2421.
5. Piza F. A., Siloto A. P., Carvalho C. V., Franco T. T., (1999), *Brasilian J. Chem. Eng.*, 16, 185.
6. Saito J-I., Kita A., Higuchi Y., Nagata Y., Ando A., Miki K., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 30818.
7. Shimosaka M., Nogawa M., Wang X-Y., Kumehara M., Okazaki M., (1995), *Appl. Environm. Microbiol.*, 61, 438.
8. Kim S. Y., Shon D. H., Lee K. H., (1998), *J. Microbiol. Biotechnol.*, 8, 568.
9. Hutadilok N., Mochimasu T., Hisamori H., Hayashi K-I., Tachikana H., Ishii T., Hirano S., (1995), *Carbohydr. Res.*, 268, 143.
10. Eda T., Kusaoka H., Jaworska M., (2000), VIII międzynarodowa konferencja chityny i chitozanu, Yamaguchi (Japonia), Materiały konferencyjne, 203.
11. Kolodziejska I., Malesa-Ciecwierz M., Gorna E., Wojtasz-Pajak A., (1996), in: *Chitin Enzymology*, vol. 2, Ed. R. A. A. Muzzarelli, Atec Edizioni, Italy, 415.
12. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J., (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
13. Imoto T., Yagishita K., (1971), *Agr. Biol. Chem.*, 35, 1154.