

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biochemie



Juraj Medek

Expresa a charakterizace nové fungální chitindeacetylasy
Expression and characterization of a novel fungal chitin deacetylase

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Kristýna Slámová, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 22.8.2024

Podpis:

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucí své práce doc. RNDr. Pavla Bojarové, Ph.D., za odborné rady a trpělivost při zpracování této práce. Děkuji Ing. Kristýně Slámové, Ph.D., za její rady při práci na praktické části, konzultace při zpracování výsledků i za pomoc při sepisování práce. Dále děkuji Ing. Lucii Petráskové, Ph.D., za pomoc při měření a interpretaci hmotnostních spekter.

Abstrakt

Chitin je druhým nejrozšířenějším biopolymerem v přírodě. Jeho deriváty chitosan a zejména chitooligosacharidy vykazují široké spektrum biologických aktivit a jsou využitelné v biomedicíně, zemědělství, potravinářství, kosmetice a dalších oborech. Chitooligosacharidy (COS) jsou charakterizovány stupněm polymerace, stupněm acetylace a vzorem acetylace. Jejich syntéza je prováděna nejčastěji chemickými metodami, které mají ale nežádoucí negativní vliv na životní prostředí. Proto se v poslední době stala biotechnologická cesta jejich syntézy cílem mnoha výzkumů. Biotechnologické metody využívají enzymy jako chitinasy, chitosanasy a chitindeacetylasy pro efektivní, spolehlivou a ekologicky udržitelnou syntézu definovaných COS. Bohužel v současnosti stále nejsou k dispozici metody pro robustní biosyntézu definovaných chitooligosacharidů v průmyslovém měřítku.

Cílem této práce byla exprese nové fungální chitin deacetylasy z *Aspergillus flavus* (*AfCDA*) v expresním systému *Pichia pastoris*, její purifikace pomocí FPLC a studium jejích vlastností a katalytických schopností.

Exprese a produkce enzymu byla úspěšně provedena v měřítku přibližně 1 g/l produkčního média. Purifikací produkčních médií pomocí FPLC se nepodařilo získat enzymový izolát, a proto bylo v reakčních směsích používáno koncentrované nepurifikovaného médium.

Výsledky LC-MS analýzy a stanovení koncentrace uvolněného acetátu pomocí komerční soupravy poskytly klíčové informace o katalytických vlastnostech *AfCDA*. Enzym je schopen deacetylovat chitooligosacharidy se stupněm polymerizace 3–8, tj. včetně těch, které jsou málo nebo úplně nerozpustné ve vodě. V chitooligosacharidových substrátech deacetyluje všechny monomerní jednotky kromě jedné, pravděpodobně terminální jednotky na redukujícím či neredukujícím konci řetězce. Výsledný vzor acetylace COS produktů po reakci s *AfCDA* je tedy pravděpodobně AD_n nebo D_nA .

Klíčová slova

deacetylase; chitooligosacharid; HPLC; chitindeacetylasy; *Pichia pastoris*

Abstract

Chitin is the second most abundant biopolymer in nature. Its derivatives chitosan and especially chitooligosaccharides exhibit a broad spectrum of biological activities with applications in biomedicine, agriculture, food industry, cosmetics and other fields. Chitooligosaccharides (COS) are characterized by their degree of polymerization, degree of acetylation and pattern of acetylation. Their synthesis is mostly carried out by chemical methods, which bring unwanted negative effects on the environment. Therefore, the biotechnological method of COS synthesis has recently become the focus of research. Biotechnological methods involve the use of specific enzymes, such as chitinases, chitosanases and chitin deacetylases for an efficient, reliable and sustainable synthesis of defined COS.

The aim of this study was the expression of a novel fungal chitin deacetylase from *Aspergillus flavus* (*AfCDA*) in the *Pichia pastoris* expression system, its purification by FPLC and the study of its properties and catalytic abilities.

Expression and production of the enzyme was successfully carried out at a scale of about 1 g/l of production medium. Its subsequent purification by FPLC failed to yield an enzyme isolate, and therefore, a concentrate of unpurified medium was used in reactions instead.

The results of LC-MS analysis and the determination of acetate concentration using a commercial kit provided key information on the catalytic properties of *AfCDA*. The enzyme is able to deacetylate chitooligosaccharides with a degree of polymerization of 3–8, i.e. including those that are poorly or completely insoluble in water. The enzyme deacetylates all monomeric units of its substrates except one, probably the terminal unit at the reducing or non-reducing end of the chain. Thus, the resulting pattern of acetylation of COS products after reaction with *AfCDA* is probably AD_n or D_nA.

Keywords

deacetylation; chitooligosaccharide; HPLC; chitin deacetylase; *Pichia pastoris*

Obsah

Seznam použitých skratek	7
1 Teoretický úvod	9
1.1 Chitin	9
1.1.1 Charakteristika chitinu	9
1.1.2 Struktura chitinu	9
1.1.3 Chitooligosacharidy	10
1.1.4 Příprava chitooligosacharidů	11
1.2 Biologické účinky chitooligosacharidů (COS)	13
1.2.1 Vlastnosti chitinu a jeho derivátů	13
1.2.2 Antimikrobiální účinky COS	14
1.2.3 Antioxidační účinky COS	15
1.2.4 Protizánětlivé účinky COS	16
1.2.5 Protinádorové účinky COS	17
1.2.6 Imunostimulační účinky COS	18
1.2.7 Účinky COS na hojení ran a obnovu tkání	19
1.2.8 Elicitory obranyschopnosti rostlin	19
1.2.9 Další biologické účinky COS	20
1.3 Enzymová syntéza COS	21
1.3.1 Biotechnologický proces izolace chitinu z přírodních zdrojů	21
1.3.2 Enzymová hydrolýza chitinu	22
1.3.3 Enzymová syntéza COS	24
1.4 Chitindeacetylasy	25
1.4.1 Klasifikace	25
1.4.2 Katalytická aktivita chitindeacetylasy	27
2. Cíle práce	32
3. Experimentální část	33
3.1 Použitý materiál	33
3.1.1 Přístroje	33
3.1.2 Biologický materiál	34
3.1.3 Chemikálie	34
3.1.4 Pufry a roztoky	36

3.1.5 Komerční soupravy	37
3.2 Metody	37
3.2.1 Štěpení a purifikace plasmidu	37
3.2.2 Kultivace a elektroporace <i>P. pastoris</i>	39
3.2.3 Screening produkce <i>AfCDA</i>	39
3.2.4 Analytické reakce enzymu s COS	40
3.2.5 Velkoobjemová produkce <i>AfCDA</i>	41
3.2.6 Purifikace <i>AfCDA</i>	41
3.2.7 Stanovení katalytických vlastností <i>AfCDA</i>	42
3.2.8 Sledování průběhu reakcí pomocí sady na stanovení acetátu	43
3.2.9 Optimalizace podmínek detekce TLC	44
3.2.10 HPLC-MS analýza	44
4. Výsledky	47
4.1 Produkce chitindeacetylasy z <i>A. flavus</i> (<i>AfCDA</i>) v <i>P. pastoris</i>	47
4.2 Velkoobjemová produkce a purifikace <i>AfCDA</i> pomocí FPLC	50
4.3 Stanovení katalytických vlastností <i>AfCDA</i>	53
4.3.1 Testování reakčních podmínek pro <i>AfCDA</i>	53
4.3.2 Katalytické schopnosti <i>AfCDA</i>	55
4.4 HPLC-MS analýzy složení reakčních směsí	60
5. Diskuze	74
6. Závěr	78
Literatura	79
Přílohy	87

Seznam použitých zkratek

A	acetylovaný monomer, <i>N</i> -acetylglukosamin
CDA	chitindeacetylase
CFU	jednotka tvořící kolonii (angl. <i>colony forming unit</i>)
COS	chitooligosacharidy
COX-2	cyklooxygenasa-2
D	deacetylovaný monomer, glukosamin
DA	stupeň acetylace (angl. <i>degree of acetylation</i>)
DP	stupeň polymerizace (angl. <i>degree of polymerization</i>)
faCOS	plně acetylované chitooligosacharidy (angl. <i>fully acetylated chitooligosaccharides</i>)
fdCOS	plně deacetylované chitooligosacharidy (angl. <i>fully deacetylated chitooligosaccharides</i>)
FPLC	rychlá proteinová kapalinová chromatografie (angl. <i>fast protein liquid chromatography</i>)
GlcN	glukosamin
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HILIC	kapalinová chromatografie založená na hydrofilních interakcích (angl. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>)
IBD	zánětlivé onemocnění střev (angl. <i>inflammatory bowel disease</i>)
IL-10	interleukin-10
L	β -smyčka (angl. β -loop)
LC	kapalinová chromatografie (angl. <i>liquid chromatography</i>)
LPS	lipopolysacharid
MF	mobilní fáze
MMP-9	matrixová metaloproteinasa-9
MS	hmotnostní spektrometrie (angl. <i>mass spectrometry</i>)
MW	molekulová hmotnost (angl. <i>molecular weight</i>)

ot./min	otáček za minutu
PA	vzor acetylace (angl. <i>pattern of acetylation</i>)
paCOS	částečně acetylované chitooligosacharidy (angl. <i>partially acetylated chitooligosaccharides</i>)
PGE ₂	prostaglandin E ₂
<i>p</i> -NP	<i>para</i> -nitrofenol
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným (angl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (angl. <i>thin-layer chromatography</i>)

1. Teoretický úvod

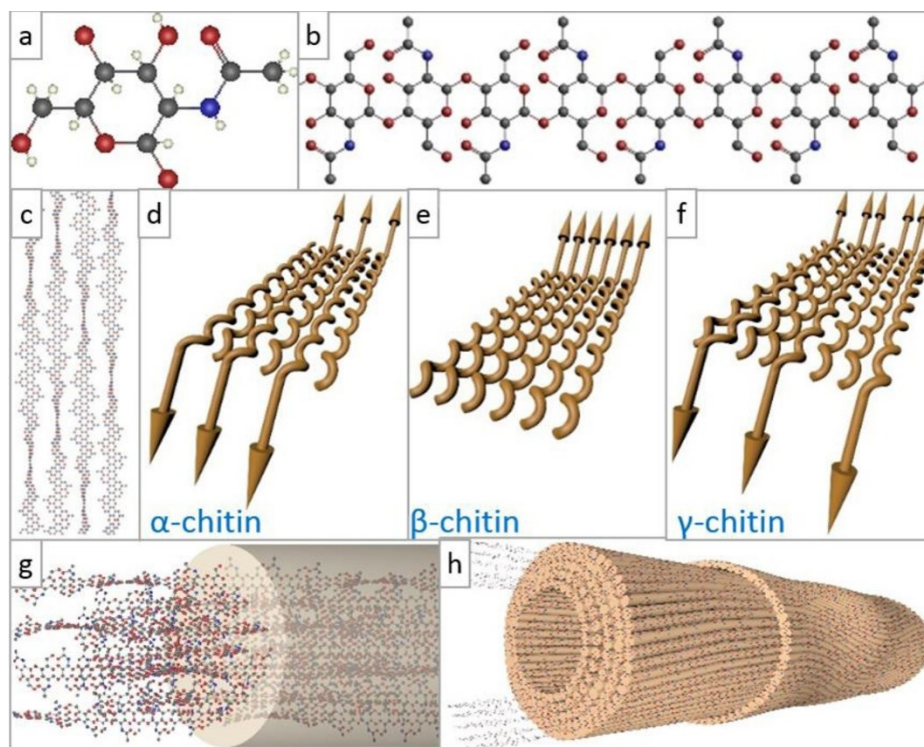
1.1. Chitin

1.1.1. Charakteristika chitinu

Chitin je po celulóse druhým nejrozšířenějším organickým polymerem v přírodě. Je to biopolymer složený z opakujících se podjednotek *N*-acetylglukosaminu (GlcNAc) spojených $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidovými vazbami, takže se svou strukturou podobá celulóse. Chitin se nachází především v membránách hub, schránkách korýšů a exoskeletu hmyzu, zatímco v rostlinách a obratlovcích se téměř nevyskytuje [1]. Hlavním průmyslovým zdrojem chitinu je zatím odpad z mořských živočichů v potravinářském průmyslu. Celosvětově se ročně vyprodukuje přibližně 9,3 miliardy tun schránek korýšů obsahujících 15 až 40 % chitinu [2]. Získávání chitinu z tohoto zdroje má význam nejen pro využití odpadního materiálu, ale také pro zkoumání chemických a biologických vlastností chitinu a jeho derivátů [2].

1.1.2. Struktura chitinu

Chitinová vlákna se spolu asociují do tří možných krystalických forem, tj. α -, β - a γ -chitin (viz Obr. 1). Shluky chitinových vláken většinou vytvářejí vyšší struktury navázáním chitin-vázajících proteinů. Kutikuly korýšů jsou tvořeny dvourozměrnými listy krystalického α -chitinu s antiparalelními vlákny β -chitinu v asociaci s β -složenými proteiny. Trojrozměrný materiál složený z proteinů a β -chitinu tvoří tvrdé biomateriály, jako například zobák chobotnic. Chitin je v podstatě univerzálním extracelulárním polysacharidem, který ve spojení s bílkovinami definuje mechanické vlastnosti některých tkání a organismů [3]. Jednotlivé řetězce GlcNAc orientované paralelně, nebo antiparalelně na sebe působí silnými mezimolekulárními interakcemi (vodíkovými můstky), což způsobuje jejich nerozpustnost ve vodě a mechanickou odolnost [1].



Obrázek 1. Struktura a polymorfní prostorové konfigurace chitinu. (a) Model molekuly GlcNAc. Atomy kyslíku jsou zvýrazněny červenou barvou, dusíku modrou, uhlíku černou a vodíku bílou. (b) 2D model chitinové kostry. (c) Schematické znázornění uspořádání jednotlivých řetězců. (d) Schematické znázornění orientace řetězců v konfiguraci α -chitinu. (e) Schematické znázornění orientace řetězců v konfiguraci β -chitinu. (f) Schematické znázornění orientace řetězců v konfiguraci γ -chitinu. (g) Znázornění nabalování řetězců do chitinového nanovlákná. (h) Znázornění nabalování nanovláken do chitinového vlákna. (Převzato z M. V. Tsurkan a kol., 2021 [4])

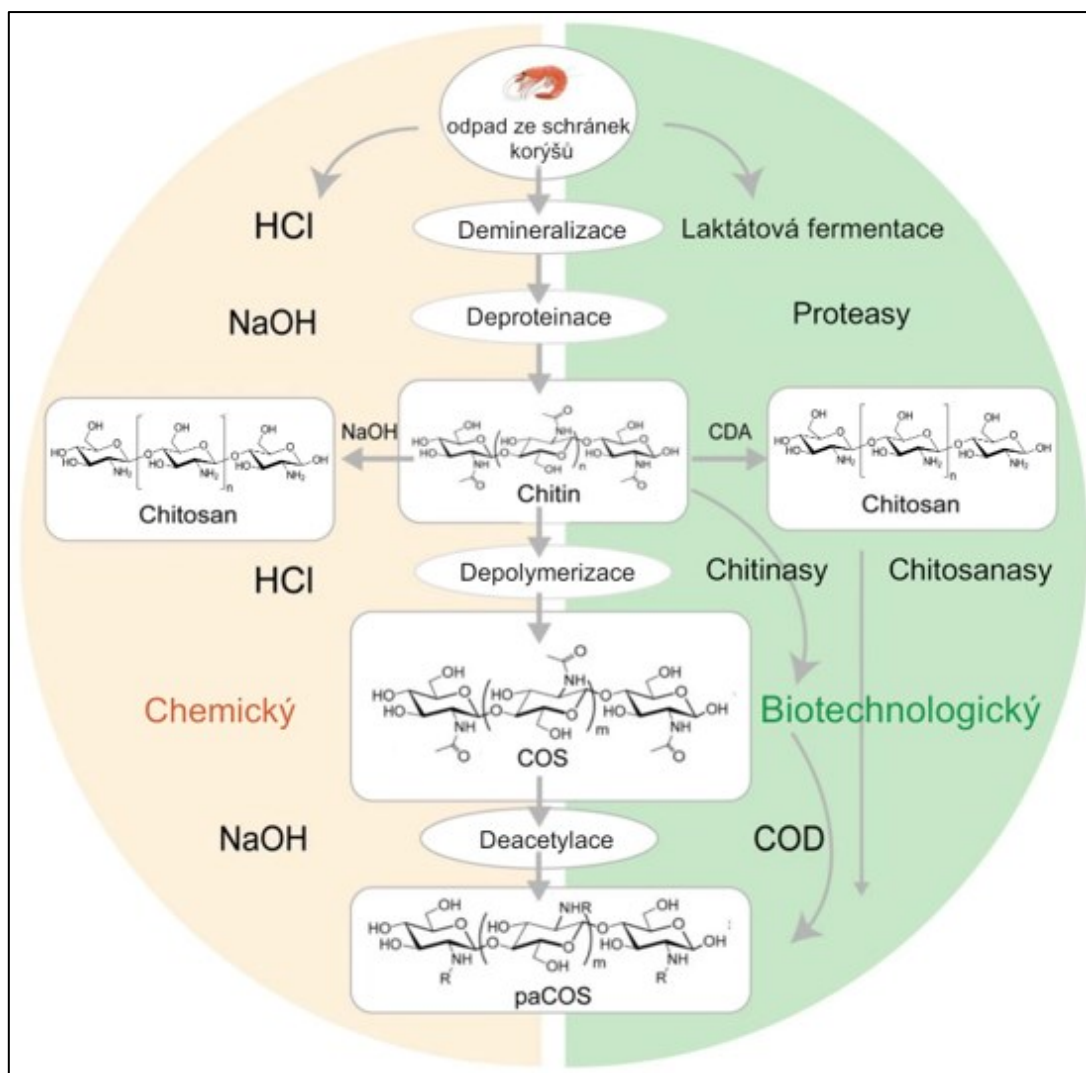
1.1.3. Chitooligosacharidy

Ačkoli je chitin obecně definován jako polymer *N*-acetylglukosaminu, přírodní chitin je spíše kopolymerem náhodně distribuovaných jednotek glukosaminu (GlcN) v řetězcích s převahou GlcNAc. Chitin je primárním prekurzorem chitosanu a chitooligosacharidů. Podobně jako chitin je chitosan kopolymerem GlcN a GlcNAc jednotek, ale převažuje v něm GlcN. Chitosan je proto považovaný za deacetylovaný derivát chitinu a často se definuje podle stupně acetylce (angl. *degree of acetylation*, DA) [5]. Z praktických důvodů se jako chitin označují polymery, u nichž se DA blíží 100 %. Spolu s DA závisí vlastnosti chitinu a chitosanu také na stupni polymerizace (angl. *degree of polymerisation*, DP), který představuje délku řetězce, a na vzoru acetylce (angl. *pattern of acetylation*, PA) [6]. DP 4 je označení pro tetramer, DP 5 pro pentamer atd. Na rozdíl od chitinu je chitosan rozpustný v kyselých vodných roztocích, kdy může interagovat s dalšími molekulami v roztoku a vykazovat biologické účinky [7]. V přírodě mají schopnost

syntetizovat chitosan pouze některé kmeny plísní, jako jsou *Zygomycetes*, *Basidiomycetes* a *Ascomycetes* [8].

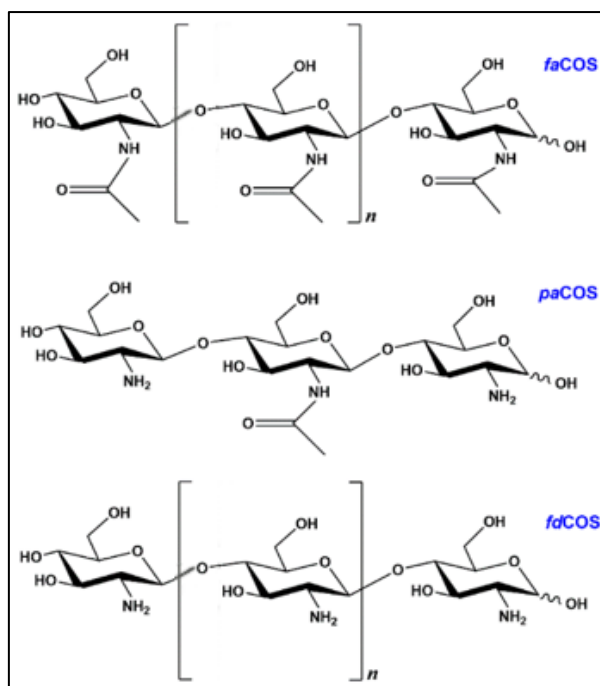
1.1.4. Příprava chitooligosacharidů

Schránky korýšů, jako primární zdroj chitinu obsahují směsný kompozitní materiál složený ze 30-40 % strukturních proteinů, 30-50 % různých forem uhličitanů a fosforečnanů vápenatých a pouze 15-40 % chitinu spolu se stopovým množstvím pigmentů a lipidů [9]. Industriální extrakce chitinu (viz Obr. 2) využívá primárně chemické metody a skládá se ze dvou hlavních kroků, a to demineralizace a deproteinace, po nichž následuje depolymerizace na oligomery s různým DP. Demineralizace neboli dekalifikace zahrnuje ošetření silnou kyselinou, obvykle kyselinou chlorovodíkovou, za vzniku rozpustných vápenatých solí, které se uvolňují do roztoku [10]. Deproteinace se dosáhne zahřátím chitinu v alkalickém roztoku. Obvykle se používá 50% NaOH a teplota až 160 °C. NaOH lze nahradit KOH nebo i slabšími zásadami, jako je Na_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nebo Na_3PO_4 . Tyto modifikace však také způsobují náhodné štěpy v chitinové kostře a náhodné deacetylaci GlcNAc jednotek, což vede ke vzniku chitosanů a chitooligosacharidů (COS) bez definovaných DP, DA a PA parametrů [11]. Purifikovaný chitin se depolymeruje kyselou hydrolyzou a získané COS jsou *N*-deacetylované pomocí 50% NaOH za vzniku částečně acetylovaných chitooligosacharidů (angl. *partially acetylated chitooligosaccharides*, paCOS). Biotechnologická metoda, která využívá k extrakci chitinu fermentaci bakteriemi mléčného kvašení a proteasy a následně specializované enzymy, jako chitinasy, chitosanasy a chitin deacetylasy, má značné výhody, včetně vysoké efektivity, specifčnosti a spolehlivosti v kvalitě získaných produktů (viz kapitola 3). Proto se v poslední době stala centrem zájmu výzkumu [12].



Obrázek 2. Metody zpracování chitinu z odpadních schránek koryšů chemickou (znázorněno žlutým pozadím) a biotechnologickou cestou (znázorněno zeleným pozadím). (Převzato a upraveno ze Z. Huang a kol., 2022 [13])

Hydrolýzou chitinu a chitosanu vznikají různé COS obsahující náhodný poměr a pořadí GlcNAc a GlcN jednotek. Výsledné COS lze rozdělit na tři druhy (viz Obr. 3), a to na plně acetylované COS (angl. *fully acetylated chitooligosaccharides*, faCOS) složené výhradně z GlcNAc, částečně acetylované COS (angl. *partially acetylated chitooligosaccharides*, paCOS) složené z GlcNAc a GlcN v určitém poměru a plně deacetylované COS (angl. *fully deacetylated chitooligosaccharides*, fdCOS) tvořené výhradně z GlcN [14,15].



Obrázek 3. Struktura tří typů COS rozdělených podle DA. Plně acetylované (faCOS), částečně acetylované (paCOS) a plně deacetylované (fdCOS). (Převzato z P. Santos-Moriano a kol., 2019 [16])

Bioaktivita COS je podrobně popsána, zejména jejich protizánětlivé, antibakteriální (zejména proti *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus* a *Escherichia coli*), neuroprotektivní, protinádorové a další účinky. Velikost COS (tj. DP) spolu s parametry DA a PA výrazně ovlivňují jejich vlastnosti [14, 17].

1.2. Biologické účinky chitooligosacharidů (COS)

1.2.1. Vlastnosti chitinu a jeho derivátů

Chitin je biologicky odbouratelný a biokompatibilní, proto jsou jeho biomedicínální aplikace často předmětem výzkumu. Chitin má řadu využití, například v potravinářství, zemědělství, mikrobiologii, nanotechnologiích a chemii [18]. Chitin je však nerozpustný ve vodě, což je jeho značnou limitací a brání jeho aplikacím v živých systémech. Tento problém lze obejít konverzí chitinu na jeho deriváty. Chitosan je také nerozpustný ve vodě, ale je rozpustný v roztocích organických kyselin [19]. Chitosan má důležité fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je biokompatibilita, biologická rozložitelnost a nízká toxicita. Může být hydrolyzován na své nízkomolekulární deriváty, které jsou biologicky aktivnější [20]. Chitosany s $DP \leq 20$ mají široké spektrum biologických aktivit a několik slibných aplikací v biomedicíně, potravinářství

a zemědělství [21]. Heterochitooligosacharidy (GlcNAc i GlcN jednotky) s $DP \leq 10$ jsou typicky rozpustné ve vodě. Rozpustnost COS s vyššími DP závisí na DA a na pH roztoku. V průmyslových aplikacích a ve výzkumu se dává přednost heterochitooligosacharidům [22]. Rozpustnost ve vodě a nižší viskozita COS ve fyziologických podmínkách pravděpodobně souvisí s jejich nižším DP a volnými (nabitými) aminoskupinami v GlcN. Ve srovnání s chitinem a chitosanem se COS lépe vstřebávají a mají vyšší membránovou propustnost [23].

Parametry DP a DA jsou klíčovými faktory, které přímo ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti a biologickou aktivitu chitooligosacharidů. Vlastnosti COS se stejným DP se mohou lišit v důsledku rozdílných DA a PA [24]. Z tohoto důvodu, spolu s obtížností purifikace, je náročné identifikovat konkrétní molekulu s daným účinkem, pokud se na biologické experimenty používá komplexní směs COS [25].

1.2.2. Antimikrobiální účinky COS

Širokospektrální antimikrobiální aktivity chitosanu a COS jsou dobře známy už od roku 1979 [26]. Následně byla pozorována řada antibakteriálních a antifungálních účinků COS proti mnoha různým typům bakterií a hub. Antimikrobiální účinky COS proti různým mikroorganismům spolu s charakteristikou COS jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Antimikrobiální aktivita různých COS se strukturální charakteristikou a odpovídajícím účinkem.

COS	Biologická aktivita	Zdroj
COS (MW 2-30 kDa, DA 8,5 %)	Baktericidní (redukce <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> o 4,5 logCFU/ml po 120 min inkubace)	[27]
COS (MW < 3 kDa, DA 15-20 %)	Baktericidní (99,9% redukce populace <i>Escherichia coli</i> a 90% redukce populace <i>S. aureus</i> po 30 min inkubace)	[28]
COS (DP 2-12)	Antifungální (zpomalení růstu <i>Botrytis cinerea</i> a <i>Alternaria alternate</i>)	[29]
Sulfatované COS (MW 3-5 kDa)	Antivirové (inhibice tvorby syncytia a lytického efektu způsobeného HIV-1)	[30]

Ohledně výzkumu antimikrobiálního potenciálu COS existuje mnoho kontradikcí a nejasností. Ty mohou být způsobeny používáním různých mikroorganismů a metod, ale také kvalitou, čistotou a charakteristikou použitých COS. Ve většině studií byly COS nedostatečně charakterizovány. Jejich MW a skutečná kompozice nebyly plně známy, což vedlo k nejistotám ohledně výsledných bioaktivit. Přestože jsou nyní k dispozici přesně charakterizované COS se známým DP a DA, stále se jedná o směs molekul s různými PA. Použití plně charakterizovaných COS by bylo přínosné pro jasné definování jejich antimikrobiálních účinků a podporu jejich využití v medicíně, zemědělství a potravinářském průmyslu [31]. Molekulární mechanismy antimikrobiální aktivity COS nejsou zcela objasněny, ale pravděpodobně je za ně zodpovědná primární aminoskupina GlcN. COS usmrcují mikroby změnou permeability buněčných membrán, které zabraňují vyplavování buněčného obsahu a regulují transport látek [27].

1.2.3. Antioxidační účinky COS

Stejně jako jiné sacharidy jsou chitosan a jeho deriváty schopny zachycovat volné radikály a snižovat oxidační stres. COS a jejich deriváty mají silnější antioxidační účinky než chitosan [32]. Tabulka 2 shrnuje různé *in vitro* a *in vivo* studie, které zkoumaly antioxidační potenciál COS.

Tabulka 2. Antioxidační aktivita různých COS.

COS	Biologická aktivita	Zdroj
Karboxylované COS	Inhibice myeloperoxidasy v lidských myeloidních buňkách; inhibice oxidace membránových lipidů a proteinů v myších makrofázích	[33]
COS (DA 78-91 %)	Aktivace obranných mechanismů u <i>Araucaria angustifolia</i>	[34]
COS (DP 2-6)	Ochrana endoteliálních buněk pupečníku člověka před oxidačním stresem způsobeným H ₂ O ₂	[35]

COS (DP 2-8)	Ochrana lidských embryonálních hepatocytů před oxidačním stresem způsobeným H ₂ O ₂	[36]
--------------	--	------

Molekulární mechanismus vychytávání volných radikálů prostřednictvím COS není znám. Aminoskupiny jednotek GlcN pravděpodobně formují stabilní radikály reakcí s reaktivními volnými radikály. Studie zaměřená na zjištění vztahu mezi antioxidační aktivitou a fyzikálně-chemickým charakterem COS, zjistila, že nejvyšší antioxidační kapacitu vykazují COS s nízkou MW (5 kDa). Byl rovněž zjištěn vztah mezi relativním množstvím COS s daným poměrem acetylovaných, či deacetylovaných jednotek a jejich antioxidační aktivitou. Ukázalo se, že chitosany s vysokou MW tvoří obalové struktury se silnějšími intramolekulárními interakcemi, což snižuje schopnost hydroxylových a aminoskupin vychytávat radikály. Jejich antioxidační aktivita se tedy zvyšuje s klesajícím DP, ale není významně ovlivněna DA [37].

1.2.4. Protizánětlivé účinky COS

Zánětlivé procesy jsou důležitou odpovědí organismu na různé podněty, jako mikrobiální infekce, ultrafialové záření a imunitní reakce. Excesivní a dlouhodobý zánět může způsobit řadu potíží a onemocnění. COS mají významné protizánětlivé účinky, které jsou shrnuty v Tabulce 3.

Tabulka 3. Protizánětlivé účinky různých COS.

COS	Biologická aktivita	Zdroj
COS (DP 2-6, DA 5 %)	Ochranné účinky proti sepsi indukované lipopolysacharidy u myši	[38]
COS (MW 5-10 kDa, DA 10 %)	Prevence intestinálního zánětu u myši	[39]
COS (MW 1-10 kDa)	Potlačení vyplavení histaminu a intracelulárního Ca ²⁺	[40]
COS konjugované s kyselinou gallovou	Potlačení exprese COX-2 a produkce PGE ₂	[41]

Protizánětlivé účinky COS přímo závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. Antioxidační a protizánětlivé účinky enzymaticky syntetizovaných COS závisí na jejich DP, přičemž ty s nízkým DP vykazují silnější účinky [42]. Bylo navrženo několik mechanismů jejich aktivity. Bylo prokázáno, že COS potlačují expresi prozánětlivých genů vyvolanou lipopolysacharidy (angl. *lipopolysaccharides*, LPS). COS také inhibují LPS indukovanou produkci interleukinu 6 a tumor nekrotizujícího faktoru α v makrofázích snížením úrovně fosforylace MAP kinas. Protizánětlivé účinky perorálně podávaných COS byly zkoumány na experimentálním modelu zánětlivého onemocnění střev (angl. *inflammatory bowel disease*, IBD). Administrace COS zmírnila zkracování tlustého střeva a poškození tkáně u myši, a proto lze COS využít jako nové funkční potravinové aditivum pro pacienty s IBD [43]. Nedávná studie zkoumala efekty suplementace COS na růstovou výkonnost prasat. Prasata, která konzumovala COS po dobu 21 dnů vykazovala vyšší denní přírůstek tělesné hmotnosti ve srovnání s prasaty v kontrolní skupině. Suplementace COS nejen zlepšila aktivitu superoxiddismutasy, katalasy a celkovou antioxidační kapacitu, ale také zvýšila sérové koncentrace interleukinu 6 a imunoglobulinu G. Kromě toho COS zvýšily populaci *Bifidobacterium sp.* a snížily celkovou populaci bakterií v tlustém střevě. Výsledky ukazují, že fyzický růst prasat lze urychlit suplementací COS, protože COS zlepšuje antioxidační a imunitní vlastnosti a vývoj gastrointestinálního traktu [44].

1.2.5. Protinádorové účinky COS

COS lze považovat za potenciální protinádorová léčiva díky jejich prokazatelným anti-tumorovým aktivitám. Mechanismy těchto účinků jsou nejasné, ale na základě předchozích studií lze navrhnout několik možností. Částečně acetylované COS jsou přirozeně kladně nabitě a mohou se adsorbovat na nádorové buňky prostřednictvím elektrostatických interakcí, čímž mění permeabilitu a funkčnost jejich membrán. Zdravé buňky mají kladný povrchový náboj, a proto se při interakci s COS odpuzují [45]. Matrixová metaloproteinasa-9 (MMP-9) je důležitou součástí invaze a metastazování nádorů. Zvýšená exprese MMP-9 může způsobit sekreci endoteliálního růstového faktoru a rozvoj angiogeneze. COS mohou tento účinek potlačit inhibicí exprese MMP-9, což následně způsobí snížení hladiny růstového faktoru [46]. Podle jiné studie COS nezabíjejí nádorové buňky přímo, ale prostřednictvím svých imunostimulačních účinků. COS zvyšují produkci lymfokinů, indukují růstový faktor

lymfocytů a podporují proliferaci cytolytických T-lymfocytů [47]. Různé studie, které se zabývaly protinádorovými účinky, jsou shrnuty v Tabulce 4.

Tabulka 4. Protinádorové účinky různých COS.

COS	Biologická aktivita	Zdroj
COS (DP ≥ 5)	Inhibice angiogeneze, indukce apoptózy	[48]
COS (MW 1-3 kDa)	Inhibice exprese MMP-9 v lidských fibrosarkomových buňkách	[49]
COS (DP 3-8)	Inhibice proliferace lidských hepatocelulárních karcinomových buněk	[50]
COS konjugované s kyselinou gallovou	Inhibice proliferace gastrických nádorových buněk	[51]

Protinádorové účinky COS naznačují jejich možné využití pro léčbu rakoviny, ale je zapotřebí dalšího výzkumu, protože mnoho aspektů je nejasných, například vztah mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi COS a jejich efektem.

1.2.6. Imunostimulační účinky COS

Několik nedávných studií prokázalo potenciál COS jako imunostimulátorů a jejich použití v léčbě rakoviny spojené s imunomodulací. Výsledky těchto studií jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tabulka 5. Imunostimulační účinky různých COS.

COS	Biologická aktivita	Zdroj
COS (MW 5-10 kDa)	Zvýšení exprese cytokinů	[52]
COS (DP 3-8)	Zvýšení proliferace a fagocytózy makrofágů RAW 264.7	[53]
COS (MW 3 kDa)	Zvýšená exprese COX-2 a IL-10	[54]

Je pravděpodobné, že imunostimulační účinky COS jsou způsobeny interakcemi s membránovými receptory na povrchu makrofágů. COS také ovlivňují a zvyšují migraci makrofágů díky svému chemotaktickému účinku [53]. Zvýšení genové transkripce a sekrece cytokinů může být jedním z molekulárních mechanismů podpory imunity pomocí COS.

1.2.7. Účinky COS na hojení ran a obnovu tkání

Úloha chitinu a chitosanu při hojení ran souvisí s jejich imunostimulačními účinky, včetně zvýšené produkce makrofágů a sekrece cytokinů nezbytných pro hojivé procesy [55]. Rovněž se předpokládá, že potenciál COS pro zlepšení hojení ran je důsledkem jejich schopnosti stimulovat produkci fibroblastů regulací fibroblastového růstového faktoru. Následná produkce kolagenu dále napomáhá tvorbě pojivové tkáně. Účinek polyuretanových membrán modifikovaných COS byl předmětem jedné studie, ve které tyto membrány prokázaly několik výhod, jako je zadržování vlhkosti, urychlení procesu hojení a zvýšená antibakteriální aktivita, což jsou nejdůležitější faktory pro obvazy na rány [56]. Chitosan byl také několikrát zkoumán pro účely regenerace kostí, ale jeho nerozpustnost ve vodě, *in vivo* depolymerace a slabá antimikrobiální aktivita snižují jeho potenciál [57]. Jiná studie zkoumala uchycení a proliferaci kmenových buněk z tukové tkáně a mezenchymálních kmenových buněk v reakci na nízkomolekulární COS, vysokomolekulární chitosan a želatinový film. Podle výsledků byl film COS nejlepším materiálem pro osteogenní diferenciaci kmenových buněk a byl stejně účinný jako film želatinový. Proliferace kmenových buněk na fólii s COS byla přibližně 3-krát vyšší než na fólii s chitosanem [58].

1.2.8. Elicitory obranyschopnosti rostlin

Elicitory jsou látky, které mohou v rostlinách vyvolat obranné reakce. U vyšších rostlin zahrnují obranné reakce proti mikroorganismům především syntézu fytoalexinů, hydrolas a inhibitorů proteas. Výsledky několika studií ukazují pozitivní vlivy COS na aktivaci imunitní obrany rostlin [60,61,62]. Účinky COS závisí na koncentraci, DP, době aplikace, způsobu aplikace a růstové fázi rostlin [62]. *N*-Acetylované COS s $DP \geq 3$ vykazovaly vyšší efektivitu jako rostlinné elicitory ve srovnání s deacetylovanými COS a COS s nízkým DP [63]. Acetylová skupina je nezbytná pro funkci a vazbu COS na receptor [60]. Na druhé straně

se funkce a mechanismus chitosanů soustřeďuje kolem kladně nabitých aminoskupin, které způsobují jejich atrakci k záporně nabitým povrchům, jako jsou membrány rostlinných buněk [64]. Využití COS jako elicitoru ve vodním zdroji podpořilo klíčení ječmene a zvýšilo kvalitu sladu [65]. COS v kombinaci s anionickými pektinovými oligomery označenými jako COS-OGA aplikovanými jako rostlinné elicitory úspěšně chránily rajčata (*Solanum lycopersicum*) před infekcí plísni moučnivkou (*Leveillula taurica*). Studie naznačuje, že opakovaná aplikace COS-OGA může chránit rostliny proti chorobě prostřednictvím systémové získané rezistence [66]. Jiná studie zkoumala vliv devíti různých COS na růstové parametry a fotosyntézu sazenic pšenice a prokázala, že COS s DP > 3 významně podpořily růst a fotosyntézu pšenice [67]. Další studie zkoumala vliv COS na obranné mechanismy sazenic pšenice pod solným stresem, kde COS podpořily vývoj rostlin a snížily koncentraci malondialdehydu (markeru oxidačního stresu). COS také podpořily fotosyntézu a zlepšily aktivitu antioxidačních enzymů. Z použitých COS byly nejúčinnější ty s 50% DA, což indikuje závislost bioaktivity COS a DA [68]. Studie, která zkoumala vliv COS na odbourávání kadmia jako toxického těžkého kovu a běžného půdního kontaminantu, ukázala pozitivní vliv COS na vývoj rostlin, zvýšení obsahu chlorofylu, snížení koncentrace malondialdehydu a kadmia v kořenech a výhoncích. Způsobily také změnu v subcelulární distribuci kadmia a zvýšily aktivity oxidačních enzymů [69]. Tyto výsledky podporují využití COS jako elicitorů obrany a ochrany rostlin před patogeny a toxickými kovy a naznačují velký potenciál COS pro použití v biopesticidech a biohnojivech.

1.2.9. Další biologické účinky COS

Nízkomolekulární COS mají potenciální využití jako nosiče léčiv díky unikátním vlastnostem, jako jsou rozpustnost ve vodě, biologická rozložitelnost a nízká toxicita. Nanostrukturní lipidové nosiče pokryté COS obsahující flurbiprofen byly použity pro oční aplikaci léčiv a testovány na bioadhezivní vlastnosti. Výsledky ukázaly významně zpožděnou clearance a zvýšenou penetraci rohovkou. COS tedy změnily vlastnosti nanostrukturního lipidového nosiče a poskytly několik benefitů pro oční aplikaci [70]. Nedávná studie odhalila slibný potenciál all-trans-retinové kyseliny konjugované s nanočásticemi COS jako nosiče léčiv pro doručení kyseliny all-trans-retinové, paklitaxelu a dalších hydrofobních léčiv. Nízká hemolytická aktivita a cytotoxicita nanočástic COS spolu s vysokou enkapsulační účinností naznačují, že COS mohou být účinným nosičem léčiv. [71].

Chitosan má několik známých aplikací v potravinářském průmyslu, ale COS mají oproti chitosanu několik výhod. Antimikrobiální, antioxidační a imunostimulační účinky COS jsou pro tyto aplikace velmi výhodné. Studie ukazují zlepšení antimikrobiální aktivity chitosanového filmu po přidavku COS proti několika typům patogenních bakterií, aniž by se změnila propustnost pro vodní páru. COS tak mají značný potenciál pro inkorporaci do obalů na potraviny [72]. Kombinace COS a lysozymu vykazovala synergii a maximalizaci antimikrobiálního efektu proti Gram-negativním bakteriím, což vedlo k úplné eliminaci *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* a *Bacillus cereus* a redukci *S. aureus*. Trvanlivost mletého masa s přidavkem směsi COS a lysozymu byla prodloužena na 15 dní v chladném prostředí [73]. Antioxidační aktivita COS je slibnou vlastností pro přípravu funkčních potravin se zlepšenou konzervační a nutriční hodnotou [37]. Podobná studie objevila konzervační schopnosti COS při výrobě piva. Poškození kvality piva způsobené kontaminací *L. brevis* lze kontrolovat přidavkem COS během procesu vaření piva, navíc bez omezení fermentačního procesu. Jako nejúčinnější inhibitory testovaných bakterií se ukázaly COS s MW 2 kDa [74].

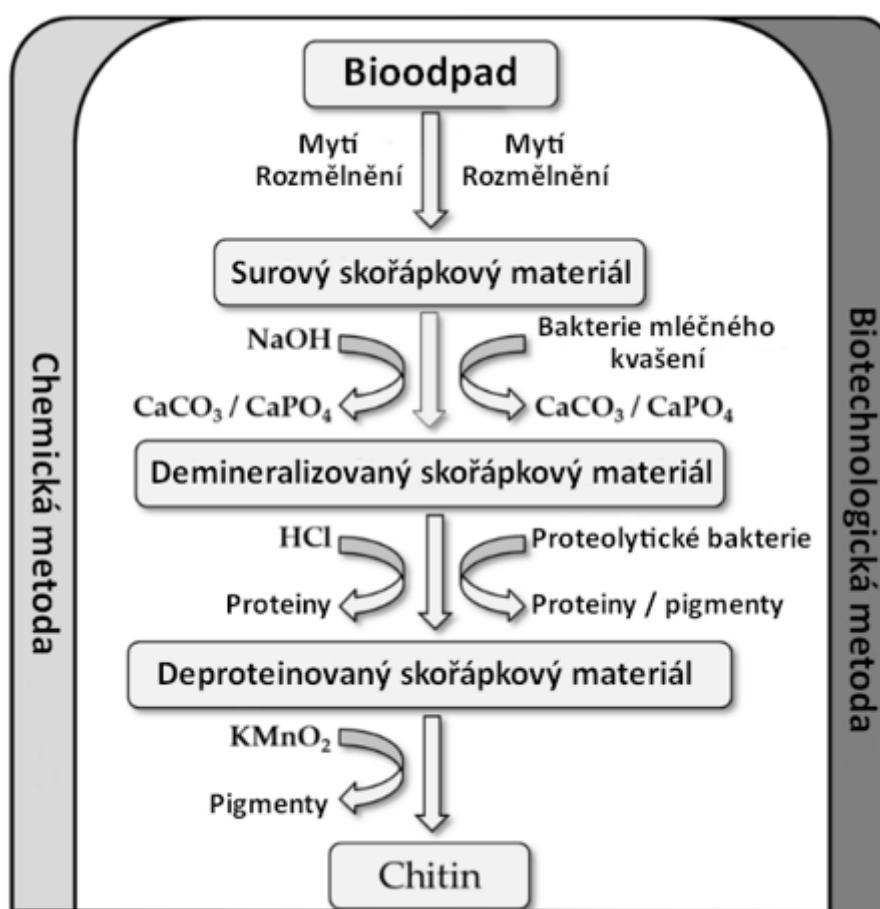
COS mohou působit jako prebiotika, jelikož nejsou trávené lidským organismem, benefitují z nich probiotické bakterie a zároveň mají inhibiční efekt na střevní patogeny. Ukázalo se, že COS s DP 2-8, MW < 1,5 kDa a DA 0,1 % podporují růst *Bifidobacterium sp.* a *Lactobacillus sp.*, a mají tedy prebiotické účinky [75].

1.3. Enzymová syntéza COS

1.3.1. Biotechnologický proces izolace chitinu z přírodních zdrojů

Chemická produkce COS je škodlivá pro životní prostředí a problematická při kontrole DP, DA a PA parametrů produktů. Tyto problémy lze obejít využitím specifických enzymů, a to chitinas, chitosanas a chitindeacetylas, které produkují definované směsi chitosanu a COS [5]. Většina zkoumaných biotechnologických procesů byla zaměřena na přípravu chitinu a chitosanu, ale v některých případech zahrnovala také produkci komerčně cenných vedlejších produktů, jako jsou COS, hydrolasy, chitinasy, karotenoidy a antioxidanty [76]. Běžný biotechnologický způsob extrakce chitinu využívá fermentaci bioodpadu ze schránek korýšů pomocí vybraných *Lactobacillus sp.* Katabolismem přítomné glukosy vzniká kyselina mléčná, která snižuje pH směsi, a tím zabraňuje růstu nežádoucích mikroorganismů.

Demineralizaci umožní kyselina mléčná, která reaguje s vápenatými solemi ve schránkách korýšů, obvykle uhličitany a fosforečnany, za vzniku laktátu vápenatého, který precipituje a odfiltruje se ze směsi. K deproteinizaci dochází rozkladem bílkovin proteolytickými enzymy daného kmene *Lactobacillus*, nebo proteasami přítomnými v bioodpadu. Efektivita fermentace bakteriemi mléčného kvašení závisí na kvantitě inokula, množství glukosy, původním pH a změně pH v průběhu fermentačního procesu a na délce fermentace [77].



Obrázek 4. Srovnání chemických a biotechnologických metod extrakce chitinu z bioodpadu měkkýšů. (Převzato a upraveno z C. Schmitz a kol., 2019 [5])

1.3.2. Enzymová hydrolýza chitinu

Chitinasy (GH18; EC 3.2.1.14) a β -N-acetylhexosaminidasy (GH20; EC 3.2.1.52) jsou enzymy zodpovědné za degradaci chitinu v houbách, hmyzu a korýších pro nutriční účely [78]. Obě enzymové rodiny využívají tzv. substrátem asistovaný katalytický mechanismus, při kterém 2-acetamidová skupina substrátu vytváří intramolekulární nukleofil,

který vede k tvorbě oxazolinového intermediátu [79]. Všechny chitinolytické enzymy patří mezi glykosidasy, ale liší se reakčním mechanismem, termostabilitou a charakterem produktů [80]. Endo-chitinasy (EC 3.2.1.14) se vážou na náhodný řetězec chitinového polysacharidu a hydrolyzují vnitřní glykosidové vazby, přičemž vznikají fragmenty různých velikostí od dimerů po polymery. Tyto enzymy jsou ideální pro produkci COS, protože částečně redukují DP chitinu. Naproti tomu exo-chitinasy, mezi něž patří β -N-acetylhexosaminidasy a chitobiosidasy (EC 3.2.1.52), se vážou na neredukující konec chitinového řetězce a produkují monomerní, případně dimerní jednotky GlcNAc. Tyto enzymy se používají ke kompletní degradaci chitinu, a proto nejsou předmětem zájmu pro produkci COS. Chitosanasy (EC 3.2.1.132) jsou chitinolytické enzymy s vyšší selektivitou. Hydrolyzují vazby GlcN-GlcN a jejich aktivita je tedy závislá na DA a PA [81]. Byla identifikována nová zajímavá třída chitosanas z houby *A. alternata*, která selektivně štěpí za GlcN-GlcNAc páry a nevykazuje žádnou aktivitu vůči plně acetylovaným a deacetylovaným substrátům, což z nich činí ideální enzymy pro výrobu nových strukturně definovaných COS [82]. Další enzymy, jako je celulasa a lysozym, mají také hydrolytickou aktivitu vůči chitinu a chitosanu, ale nejsou pro tyto substráty specifické [83].

Mnoho mikroorganismů dokáže využívat chitin z mořských nebo suchozemských organismů jako zdroj uhlíku a dusíku [84]. Chitin je obecně degradován extracelulárně na monomery a dimery směsí endo-chitinas, exo-chitinas a chitosanas. Jednodušší sacharidy jsou následně asimilovány a metabolizovány. Navzdory účinnosti těchto enzymových mechanismů nebyl dosud realizován kompletní proces konverze chitinu na COS, protože přítomné exo-chitinasy zcela degradují chitin až na monomery, což je nežádoucí. Delece nebo vypnutí genů pro tyto enzymy by mohlo umožnit bakteriální produkci COS z chitinu, ale důsledkem toho by bakterie ztratily schopnost využívat chitin pro účely výživy, čímž by se inhiboval jejich růst. Poskytnutí alternativních zdrojů uhlíku jako glukosy by bakteriím umožnilo růst, ale potlačilo by expresi chitinolytických enzymů, protože bakterie mají tendenci odstavit nepotřebné metabolické dráhy, když je k dispozici výhodnější substrát. Bakteriální degradační procesy se tedy aktuálně využívají pouze pro komerční produkci monomerního GlcNAc [85].

Enzymová hydrolýza chitinu je oproti chemické možná ve vodních roztocích za mírných podmínek, ale za cenu nižší hydrolytické efektivity, protože krystalický chitin není pro enzym snadno dostupný [86]. Také při enzymové syntéze je náročné přeměnit chitin na dobře definované COS. Produkce COS s definovaným DP a DA nad kapacitu

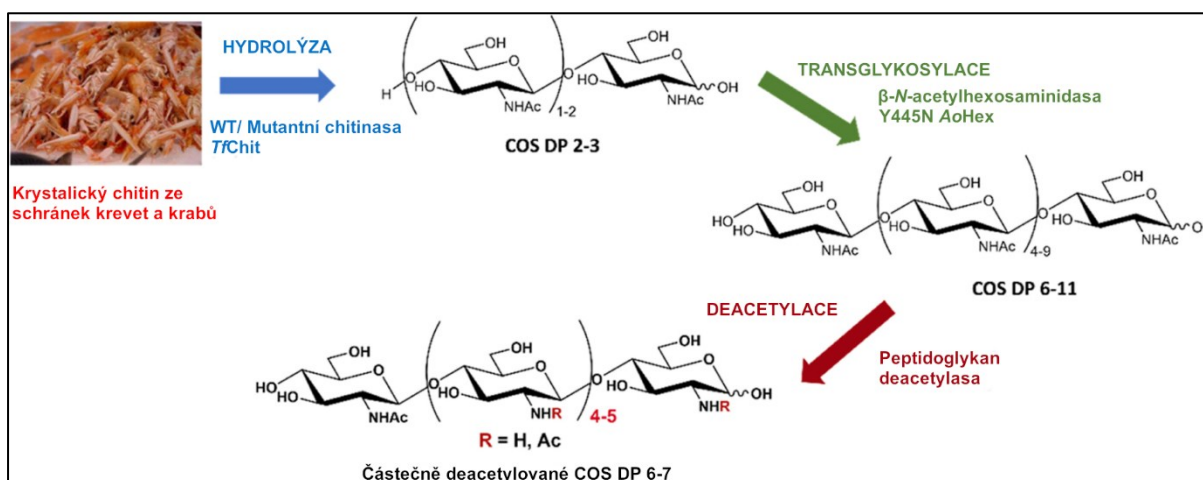
laboratorního měřítka je klíčové pro studium vztahu jejich struktury a aktivity. Za tímto účelem byl v poslední dekádě kladen důraz na vývoj enzymových syntetických metod s využitím mutantních glykosidas [78].

1.3.3. Enzymová syntéza COS

Hybridní procesy syntézy COS kombinací chemických a biologických metod byly úspěšně zavedeny v laboratorním měřítku. Tyto procesy obvykle vyžadují standardy chitinových oligomerů s definovaným DP a využívají kombinaci chemické hydrolyzy chitinu, syntézy COS pomocí chitinas a případně částečnou deacetylaci s pomocí chitindeacetylasy (angl. *chitin deacetylase*, CDA). Proces produkce COS s minimalizovanými škodlivými účinky na životní prostředí vyžaduje tvorbu plně enzymových procesů konverze chitinu na COS kombinací chitinas a chitindeacetylasy, čímž se zamezí používání škodlivých chemických látek. Vzhledem k velkému množství přírodních chitinolytických enzymů a jejich rozdílné substrátové specifitě a charakteru produktů je třeba nejprve podrobně prozkoumat jejich biokatalyticky relevantní vlastnosti. U vícekrokových enzymových reakcí je navíc nutné optimalizovat reakční podmínky pro každý enzym zvlášť [87].

Chitinasy a chitosanasy z různých zdrojů byly exprimovány jako rekombinantní proteiny v heterologních expresních systémech, jako jsou *E. coli* a *Pichia pastoris* [88]. Chitinas D ze *Serratia proteamaculans* byla použita ke konverzi chitosanových polymerů (DA 35 % a DA 61 %) na nedefinované směsi COS s různým DA a $DP \geq 6$ po pouhých 90 min inkubace. Chitinasy a β -N-acetylhexosaminidasy a jejich mutantní varianty jsou úspěšně využívány k biosyntéze vyšších chito oligosacharidů z COS s nižším DP v tzv. transglykosylačních reakcích [78].

Nedávná studie popsala tříkrokový sekvenční plně enzymový postup syntézy COS s $DP \geq 6$ přímo z chitinu (viz Obr. 5), který nemá žádné nežádoucí negativní účinky na životní prostředí, protože je založen na obnovitelném zdroji substrátu a využití enzymů ve vodném prostředí. Pro hydrolyzu chitinu využívá mutantní varianty chitinasy z *Talaromyces flavus* (TfChit), která produkuje nízkomolekulární COS s vysokými výtěžky. Následně jsou pomocí mutantní varianty β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* (AoHex) syntetizovány COS s DP 6-11, rovněž s vysokým výtěžkem. V posledním kroku probíhá deacetylace katalyzovaná peptidoglykandeacetylase z *B. subtilis* (BsPdaC), která dokáže deacetylovat směsi COS obsahující až 7 jednotek GlcNAc [89].



Obrázek 5. Tříkrokový plně enzymový postup syntézy paCOS s DP 6-7 přímo z krystalického chitinu. Hydrolýzou chitinu mutantní chitinasou z *Talaromyces flavus* (*TjChit*) vznikají krátké řetězce COS (DP 2-3), které jsou prodlužovány transglykosylací pomocí β-N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* (*AoHex*) za vzniku COS s DP 6-11. V posledním kroku se řetězce deacetylují peptidoglykandeacetylásou z *B. subtilis* (*BsPdaC*) za vzniku paCOS s DP 6-7. (Převzato a upraveno ze Z. Mészáros a kol., 2024 [89])

1.4. Chitindeacetylasý

1.4.1. Klasifikace

Chitindeacetylasý (EC 3.5.1.41) katalyzují hydrolýzu acetamidové skupiny GlcNAc, tedy odštěpení acetylové skupiny za vzniku GlcN. Reagují s chitinem a COS a produkují chitosan, paCOS nebo fdCOS (Obr. 3) [90]. CDA byly identifikovány u mořských a půdních bakterií, několika hub, několika druhů hmyzu a nejméně jednoho viru. Všechny CDA patří do rodiny sacharidových esteraz 4 (CE4, <https://www.cazy.org>) a sdílejí vysoce konzervovanou homologní doménu NodB, která je nezbytná pro jejich katalytickou aktivitu [91]. První purifikovaná a charakterizovaná CDA (1970) pochází z houby *Mucor rouxii*. Její MW je 75 kDa a pH optimum je 5,5 [92]. Od té doby byly CDA izolovány z hub *Absidia coerulea*, *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum lindemuthianum* a dalších. Jejich fyzikálně-chemické vlastnosti (MW, pH a teplotní optimum, kationt kovu v katalytickém místě a substrátová specifita) byly podrobně studovány [93]. Pro účely identifikace enzymů schopných produkovat vysoce definované COS a pro pochopení reakčního procesu, substrátové specifity a katalytického mechanismu byly zkoumány CDA z dalších organismů, jako jsou archea, mořské bakterie a hmyz (Tabulka 6) [94].

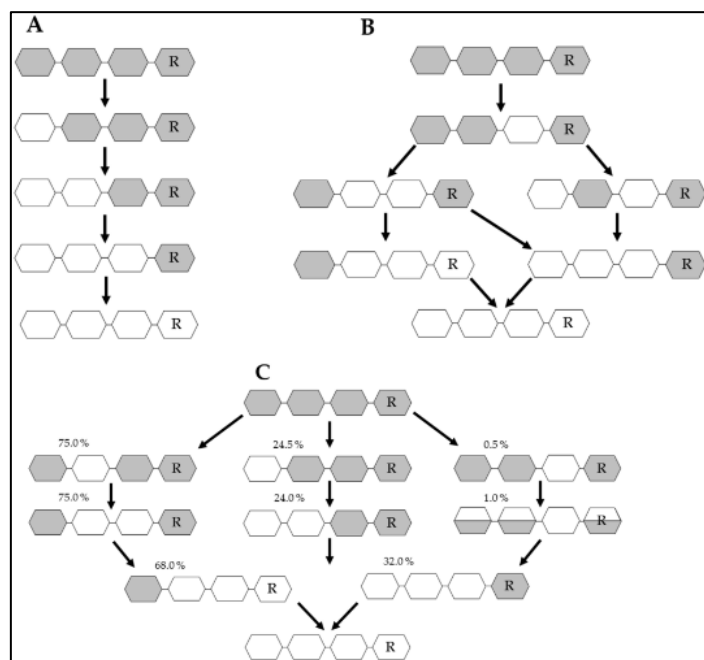
Tabulka 6. Izolované nebo rekombinantní fungální (nad tečkovanou čarou) a bakteriální (pod tečkovanou čarou) chitindeacetylasy s příslušným stupněm polymerace (DP) substrátu a charakterem produkovaných chitoooligosacharidů.

Zkratky: A = acetylovaný monomer (GlcNAc); D = deacetylovaný monomer (GlcN); index n - m = terminální vzdálenost (n = vybraná délka řetězce) a pozice, kde CDA převádí A na D; n. = neznámý [94].

Enzym	Organismus původu	Expresní systém	Substrát	Produkt COS	Zdroj
CICDA	<i>C. lindemuthianum</i>	Přírodní izolát	DP 2-6	D _n	[95]
MrCDA	<i>M. rouxii</i>	Přírodní izolát	DP 3	D _n	[96]
ScCDA1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pichia pastoris</i>	DP 2-6	n.	[97]
ScCDA2	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i> , <i>E. coli</i>	DP 2-7	n.	[98]
FvCDA	<i>Flammulina velutipes</i>	<i>P. pastoris</i>	DP 2-6	n.	[99]
RcCDA	<i>Rhizopus circinans</i>	<i>P. pastoris</i>	DP 6	n.	[100]
PaCDA	<i>Podospora anserina</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>	DP 1-2	D _n	[101]
AnCDA	<i>A. nidulans</i>	<i>E. coli</i>	DP 2-5	D _n	[102]
PgtCDA	<i>Puccinia graminis</i>	<i>E. coli</i>	DP 4-6	AAD _{n-2}	[103]
PesCDA	<i>Pestotiopsis sp.</i>	<i>E. coli</i>	DP 4-6	AAD _{n-3} A	[104]
PcCDA	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	<i>E. coli</i>	DP 4-5	ADDA _{n-3}	[93]
SwCOD	<i>Shewanella woodyi</i>	<i>E. coli</i>	DP 2-4	AD, ADA _{n-2}	[105]
SbCOD	<i>S. baltica</i>	<i>E. coli</i>	DP 2-4	AD, ADA _{n-2}	[106]
ArCE4A	<i>Arthrobacter sp.</i>	<i>E. coli</i>	DP 2-6	D _{n-1} A	[107]
NodB	<i>Rhizobium sp.</i>	<i>E. coli</i>	DP 1-6	ADA _{n-2}	[108]

1.4.2. Katalytická aktivita chitindeacetylas

Na základě konkrétního substrátu a reakčních podmínek mohou CDA produkovat různé plně, nebo parciálně deacetylované COS, jejichž parametry DA a PA jsou jasně definovány. Dvě fungální CDA byly detailně prostudovány, což umožnilo odhalení katalytických mechanismů označovaných jako "multiple-attack" (Obr. 6A) a "multiple-chain" (Obr. 6B). CDA z *M. rouxii* se váže na sacharidový řetězec a způsobuje několik sekvenčních deacetylací. Tento exo-enzym deacetyluje chitooligosacharidy s DP > 2 sekvenčně od neredukujícího konce oligomeru. Výsledný vzor acetylace je D_n (Obr. 6A) [109]. Naproti tomu CDA z *C. lindemuthianum* využívá "multiple-chain" mechanismus, při kterém vzniká aktivovaný enzym-polymer komplex a hydrolyzuje se jediná acetylová skupina před disociací a vytvořením nového aktivovaného komplexu. Tento enzym plně deacetyluje COS s DP 3 a 4, ale redukující konec dimeru GlcNAc (chitobiosa) není schopen deacetylovat [93].

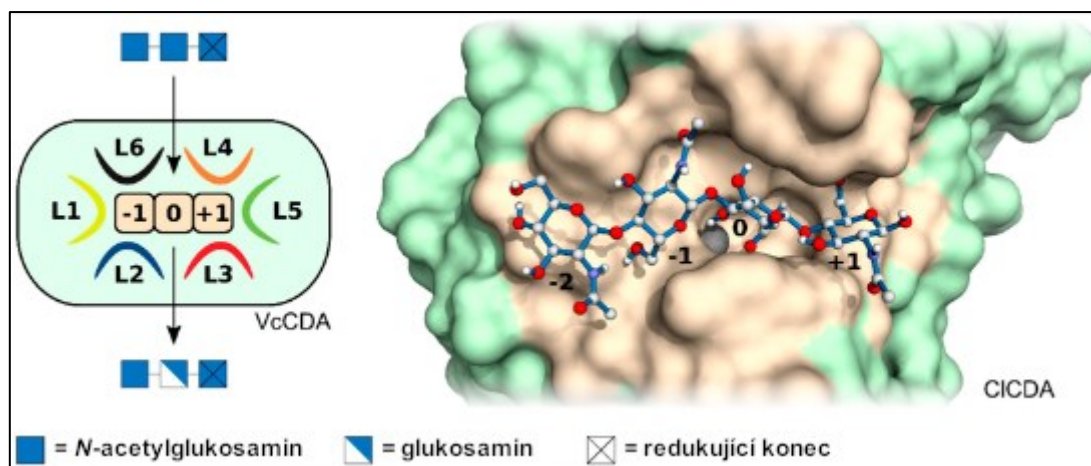


Obrázek 6. Přehled jednotlivých kroků cest enzymové deacetylase chitooligosacharidů. (A) Deacetylase chitinového tetrameru (chitotetraosy) pomocí *M. rouxii* CDA mechanismem "multiple-attack". (B) Deacetylase chitotetraosy CDA z *C. lindemuthianum* mechanismem "multiple-chain". (C) Reakční model navržený pro vysvětlení vzniku parciálně deacetylovaných COS použitím rekombinantní CDA z *P. graminis f. sp. tritici*.

R = redukující konec oligosacharidu; šedý šestiúhelník = GlcNAc; bílý šestiúhelník = GlcN; n % = relativní výtěžek reakce; šedobílý šestiúhelník = z prekursoru mohou náhodně vzniknout tři různé produkty, protože je deacetylována pouze jedna podjednotka GlcNAc [94].

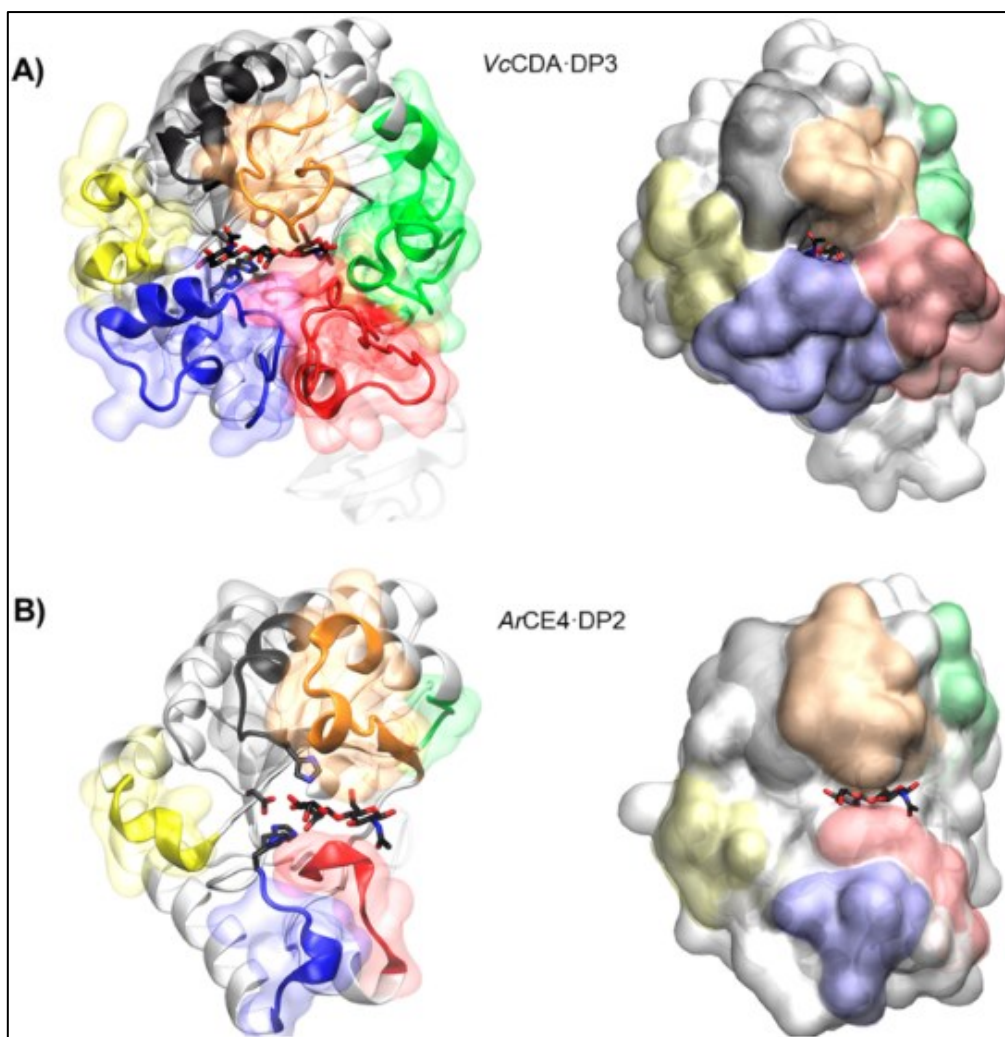
Byl identifikován další mechanismus deacetylace, tzv. "*subsite capping deacetylation model*", při kterém dochází k více katalytickým dějům na jedné molekule substrátu a k sekvenční deacetylaci (Obr. 6C). Tento mechanismus využívají bakteriální CDA, jako je NodB a CDA odvozené od *Rhizobium sp.* a *Vibrio sp.* a nedávno objevená CDA od *Shewanella sp.* což je rod mořských bakterií žijících v extrémních vodních biotopech. Většina bakteriálních CDA preferuje nízkomolekulární COS a je v podstatě neaktivní na polymerním chitinu a chitosanu [110]. Nejlépe prostudovanými CDA, které produkují COS s definovaným DA, jsou NodB z *Rhizobium sp.* a VcCDA z *Vibrio cholerae*. Oba enzymy produkují COS s identickým PA ADA_{n-2} (Tab. 6). Tyto enzymy při kombinaci v jedné reakci generovaly dideacetylované COS s jedinečným a definovaným PA DDA_{n-2} [87]. Tato studie jako první popsala přípravu paCOS se známým PA. Ukázalo se, že pozice struktur β-smyček kolem aktivního místa enzymu hraje klíčovou roli v substrátové specifitě různých CDA. Pochopení vztahu mezi strukturou a funkcí enzymů může pomoci při vysvětlení regioselektivity deacetylace a výsledného PA [105].

Vazebné místo chitindeacetylasy pro substráty se skládá z několika dílčích míst, z nichž každé váže jednu monosacharidovou jednotku substrátu. Katalytické místo, tj. místo, kde se váže jednotka GlcNAc, která bude následně deacetylována za vzniku GlcN, se označuje jako místo {0}. Místa nalevo, tj. směrem k neredukujícímu konci řetězce, jsou číslovány {-1}, {-2} atd., zatímco místa napravo od {0}, tj. směrem k redukujícímu konci řetězce, jsou číslovány {+1} atd. (Obr. 7) [111]. Krystalové struktury několika fungálních CDA ukazují, že jejich vazebná místa se skládají ze čtyř dílčích míst v rozsahu od {-2} do {+1}, zatímco některé bakteriální CDA mají menší počet dílčích míst [112]. Každé dílčí vazebné místo může mít svou vlastní specifitu/ preferenci pro GlcNAc nebo GlcN, což určuje celkovou substrátovou specifitu enzymu a strukturu výsledných produktů.



Obrázek 7. 3D strukturní model fungální chitindeacetylasy CICDA (vpravo) s navázaným substrátem chitotetraosou (GlcNAc)₄ v aktivním místě enzymu (zvýrazněno oranžově) s vyznačenými dílčími vazebnými místy {-2} až {+1}. Schematická reprezentace bakteriální chitindeacetylasy VcCDA (vlevo), u které byly poprvé popsány okolní β -smyčky (angl. β -loops, L). (Převzato a upraveno z M. Bonin a kol., 2020 [113])

Regioselektivita chitindeacetylasy je pravděpodobně ovlivněna dvěma strukturními vlastnostmi, a to pozicí a flexibilitou smyček obklopujících vazebné místo (Obr. 8) a specifitou dílčích vazebných míst pro GlcNAc nebo GlcN podjednotky. Série krystalových struktur VcCDA vytvořených v různých fázích vazby substrátu popisuje skupinu šesti smyček kolem aktivního místa a naznačuje model indukovaného přizpůsobení pro navázání substrátu [112]. Tyto smyčky rozhodují o preferovaném umístění substrátu ve vazebném místě. Jednotlivé jednotky substrátu se tak dostávají do těsné blízkosti aminokyselin tvořících štěrbinu pro vazbu substrátu a katalyticky aktivních aminokyselin v katalytickém místě {0}. Parciální nebo celkový záporný náboj ve štěrbině pro vazbu substrátu může zvýhodňovat vazbu jednotky GlcN a kladný náboj ji může odpuzovat. Vazba jednotky GlcNAc vyžaduje více prostoru a může být podpořena přítomností hydrofobní kapsy pro akomodaci terminálního methylu acetamidové skupiny [113].

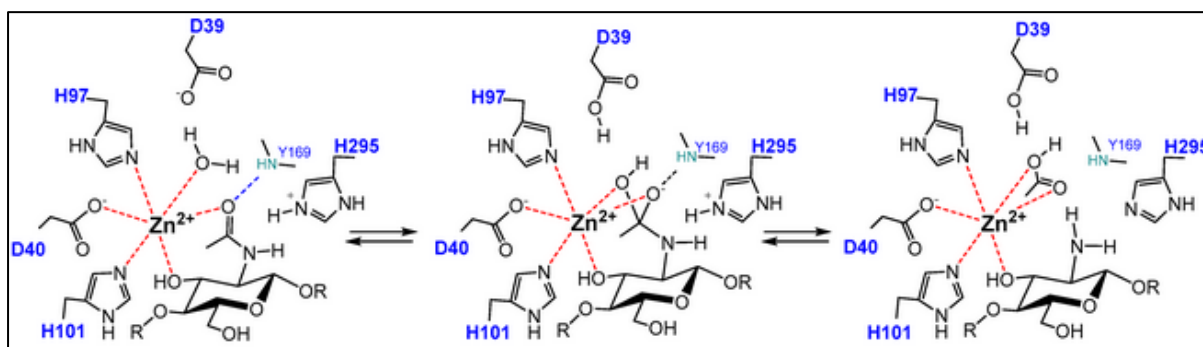


Obrázek 8. 3D struktury komplexů enzym-substrát. (A): *VcCDA* s DP 3 substrátem. (B): *ArCE4* s DP 2 substrátem. β -smyčky obklopující aktivní místo enzymů jsou zvýrazněny barevně (L1 žlutě, L2 modře, L3 červeně, L4 oranžově, L5 zeleně a L6 černě). (Převzato z L. Grifoll-Romero a kol., 2018 [105])

Chitinacetylasy fungují na principu kyselé nebo zásadité katalýzy za asistence kovů. Katalytický mechanismus zajišťují konzervované motivy aktivního místa obsahující triádu vázající kovový kation a obecné kyselé a zásadité aminokyselinové zbytky. *VcCDA* byl prvním enzymem CE4, u kterého byla vyřešena 3D struktura komplexů enzym-substrát pomocí rentgenové krystalografie [112]. Struktura komplexů neaktivního mutanta s chitobiosou (DP 2) a chitotriosou (DP 3) v procesu vazby pro katalýzu ukázala, že na koordinaci kovu se podílí i hydroxylová skupina substrátu. Konkrétně je kation Zn^{2+} koordinován imidazolovými atomy dusíku His97 a His101, karboxylátovou skupinou Asp40, atomem O7 *N*-acetylové skupiny a hydroxylem O3 GlcNAc jednotky (Obr. 9). Deformovaná oktaedrická koordinace je doplněna molekulou vody, která se po aktivaci stává nukleofilem odpovědným za odstranění *N*-acetylové skupiny. V prvním kroku je karbonyl acetamidové skupiny substrátu polarizován koordinací s atomem kovu a následně reaguje s nukleofilní molekulou vody aktivované Asp39,

čímž vzniká tetrahedrální oxyanionový intermediát. His295 protonuje atom dusíku intermediátu a zprostředkuje štěpení C-N vazby a uvolnění acetátu [105]. Teprve nedávno byla popsána struktura komplexu enzym-substrát pro *Arthrobacter* sp. CDA (ArCE4) [97]. Chitobiosový ligand vázaný do aktivního místa vykazuje rovněž stejný typ interakcí s konzervovanými aminokyselinovými zbytky aktivního místa.

Chitindeacetylasy mohou katalyzovat také zpětnou reakci, tj. *N*-acetylaci deacetylovaných glukosaminových jednotek chitooligosacharidů nebo chitosanu při nadbytku acetátu v reakční směsi, přičemž si obvykle zachovávají svou regioselektivitu [113].



Obrázek 9. Schéma katalytického mechanismu za asistence kovu navrženého pro chitindeacetylasy založeného na 3D struktuře komplexu enzym-substrát *VcCDA* s chitobiosou. (Převzato z L. Grifoll-Romero a kol., 2018 [105])

2. Cíle práce

- exprese nové fungální chitindeacetylasy v mikrobiálním expresním systému *Pichia pastoris*, optimalizace purifikace enzymu
- studium schopnosti připraveného enzymu deacetylovat chitooligosacharidy s různým stupněm deacetylace

3. Experimentální část

3.1. Použitý materiál

3.1.1. Přístroje

Analytické váhy Pioneer PA214C	Ohaus, USA
Aparatura na agarosovou elektroforézu	Bio-Rad, USA
Aparatura na SDS-PAGE	Bio-Rad, USA
Automatické pipety	Eppendorf, Německo
Centrifuga 5804 R	Eppendorf, Německo
Centrifuga Minicentrifuge Minispin	Eppendorf, Německo
Centrifuga Universal 320 R	Hettich, Německo
Centrifuga Sorvall RC 6 plus	ThermoFischer Scientific, USA
Centrifugační kolona Amicon 0,5 ml	Merck KgaA, Německo
Centrifugační kolona Amicon 15 ml	Merck KgaA, Německo
FPLC NGC Chromatography System	Bio-Rad, USA
- systémová pumpa F10 - vzorková pumpa NGC Sample Inject Valve Module - UV/VIS detektor Multi-Wavelength Detector II Module - sběrač frakcí NGC Fraction Collector - software ChromLab	
Kapalinový chromatograf HPLC	Shimadzu, Japonsko
- odplynovací jednotka DGU-20A3 - binární pumpa LC-20AD - automatický dávkovač SIL-20AC - termostat pro kolonu CTO-10AS VP - diodový detektor SPD-M20A - MS detektor LCMS-2020 - systémový ovladač CBM-20A - ELS detektor PL-ELS 1000	
	Agilent Technologies Inc., USA

Kolona HILICpak VN-50 4D 5 μm , 4,6 $\times$ 150 mm Shodex TM , Japonsko	
- předkolona HILICpak VN-50G 4A 5 μm , 4,6 $\times$ 10 mm	
Kolona TSKgel Amide-80 5 μm , 4,6 $\times$ 250 mm	Tosoh Bioscience GmbH, Německo
Kolona Luna NH ₂ 5 μm , 4,6 $\times$ 150 mm	Phenomenex, USA
Magnetická míchačka IKA RCT Basic	IKA, Německo
Mikrocentrifuga MiniSpinPlus	Eppendorf, Německo
Mikrotitrační destičky (96 jamek, ploché dno)	ThermoFischer Scientific, USA
pH metr Voltcraft PH-100 ATC	Conrad Electronic, Německo
Plastové odstředivé zkumavky (50 ml)	JetBiofil, Čína
Plastové odstředivky (0,5 l)	JetBiofil, Čína
Purifikační kolona Fractogel	Merck KgaA, Německo
Purifikační kolona Q-Sepharose	Merck KgaA, Německo
Spektrofotometr UVmini-1240	Schimadzu, Japonsko
Spektrofotometr Sunrise Tecan	Tecan, Švýcarsko
Tepelná pistole KX2200	Black & Decker, USA
Termomixer Comfort	Eppendorf, Německo
Váha Secura 1241S	Sartorius AG, Německo
Desky TLC Silikagel 60 F254	Merck KgaA, Německo
Vortex Grant-bio PV-1	Grant Instruments, Velká Británie
Zkumavky (1,5 - 5 ml)	Eppendorf, Německo

3.1.2. Biologický materiál

Buňky <i>P. pastoris</i> KM71H	Invitrogen, USA
Vektor pPICZ α A-AfCDA	Generay, Čína

3.1.3. Chemikálie

Aceton	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Akrylamid	VWR Chemicals BDH®, USA
Barvivo GelRed® Nucleic Acid Stain	Merck KgaA, Německo

Biotin	ThermoFischer Scientific, USA
Bradfordovo činidlo	Bio-Rad, USA
Bromfenolová modř	Serva, Německo
Chlorid sodný	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Coomassie Brilliant Blue R-250	USB Corporation, USA
Destilovaná voda	Rowapur 200, Watrex, Česká republika
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Dodecylsírán sodný, SDS	Serva, Německo
Kyselina etylendiamintetraoctová, EDTA	Carl Roth KgaA, Německo
Ethanol	VWR Chemicals BDH®, USA
Glukosa	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Glycerol	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydroxid amonný, 25%	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydroxid sodný	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Kyselina chlorovodíková	VWR Chemicals BDH®, USA
Kyselina citrónová	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Kyselina mravenčí	Penta, Česká republika
Methanol	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Oxoid™ Pepton P	ThermoFischer Scientific, USA
Oxoid™ Yeast Extract Powder	ThermoFischer Scientific, USA
Peroxodisírán amonný	Sigma-Aldrich, USA
Proteinový standard LMW	GE Healthcare, UK
Restrikční endonukleasa SacI	New England Biolabs, USA
Sorbitol	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Standardy faCOS, DP 1-11	Laboratoř biotransformací, MBÚ AV ČR
Tetracyklín	Sigma-Aldrich, USA
Tetrametyletylendiamid, TEMED	Sigma-Aldrich, USA
Tris-etanolamin	Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Yeast nitrogen base (YNB)	Carl Roth KgaA, Německo
Zeocin	Sigma-Aldrich, USA

3.1.4. Pufry a roztoky

1M K-P (draselno-fosfátový pufr pH 6,0): 31,6 g K_2HPO_4 , 111,4 g KH_2PO_4 v 1 l dest. vody; filtrován přes Büchnerovu nálevku a sterilizován v autoklávu

Roztok YNB: 134 g v 1 l dest. vody; sterilizován v autoklávu

Detekční roztok difenylaminu/anilinu: 2 g difenylaminu v 100 ml ethylacetátu; za stálého míchání přidány 2 ml anilinu, 1 ml 35% HCl a 10 ml 85% H_3PO_4 ; uchováván v tmě při 4°C

- Pufry pro purifikaci:

A1: 10mM C-P pufr (citrát-fosfátový pufr, pH 3,5): 0,96 g kyseliny citrónové, 0,87 g K_2HPO_4 v 0,5 l dest. vody; pH upraveno na 3,5 a filtrováno přes Büchnerovu nálevku

B1: 10mM C-P pufr s 1M NaCl (pH 3,5): 0,96 g kyseliny citrónové, 0,87 g K_2HPO_4 , 29,22 g NaCl v 0,5 l dest. vody; pH upraveno na 3,5 filtrováno přes Büchnerovu nálevku

A2: 10mM C-P pufr (pH 7,0): 0,96 g kyseliny citrónové, 0,87 g K_2HPO_4 v 0,5 l dest. vody; pH upraveno na 7 a filtrováno přes Büchnerovu nálevku

B2: 10mM C-P pufr (pH) 7,0 s 1M NaCl: 0,96 g kyseliny citrónové, 0,87 g K_2HPO_4 , 29,22 g NaCl v 0,5 l dest. vody; pH upraveno na 7 a filtrováno přes Büchnerovu nálevku

- Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE, 15% gel):

Separační gel: 1,1 ml dest. vody, 2,5 ml 30% akrylamid mix (29% akrylamid, 1% N,N' -methylenbisakrylamid), 1,3 ml 1,5M Tris-HCl pufru (pH 8,8), 0,05 ml 10% SDS, 0,05 ml 10% $(NH_4)_2S_2O_8$; 0,002 ml TEMED

Zaostřovací gel: 1,4 ml H_2O ; 0,33 ml 30% akrylamid mix (29% akrylamid, 1% N,N' -methylenbisakrylamid), 0,25 ml 1M Tris-HCl pufru (pH 6,8), 0,02 ml 10% SDS; 0,02 ml 10% $(NH_4)_2S_2O_8$, 0,002 ml TEMED

5× koncentrovaný vzorkový pufr (5 ml): 0,15 g Tris-Cl; 0,39 g DTT; 0,5 g SDS; 0,025 g bromfenolová modř; 1,25 ml glycerol

5× elektroodový pufr (1 l): 5 g SDS; 15 g Tris-Cl; 94 g glycin

Barvicí roztok na gely (100 ml): 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 ml methanol, 45 ml H_2O , 10 ml 99% kyselina octová

Bradfordovo činidlo: 0,01% Coomassie Brilliant Blue R-250, 4,7% ethanol, 8,5% kyselina fosforečná v destilované vodě

Odbarvovací roztok na gely (1 l): 350 ml ethanol, 100 ml kyselina octová, 550 ml dest. vody

Blokovací roztok na gely (1 l): 10 ml kyselina octová, 990 ml destilované vody

50 × Tris-acetát-EDTA pufr (TAE) (1 L): 242 g Tris, 57,1 ml kyseliny octové; 14,6 g EDTA

1% agarosový gel: 0,5 g agaru v 50 ml TAE pufru

3.1.5. Komerční soupravy

GeneJET PCR Purification Kit

ThermoFischer Scientific, USA

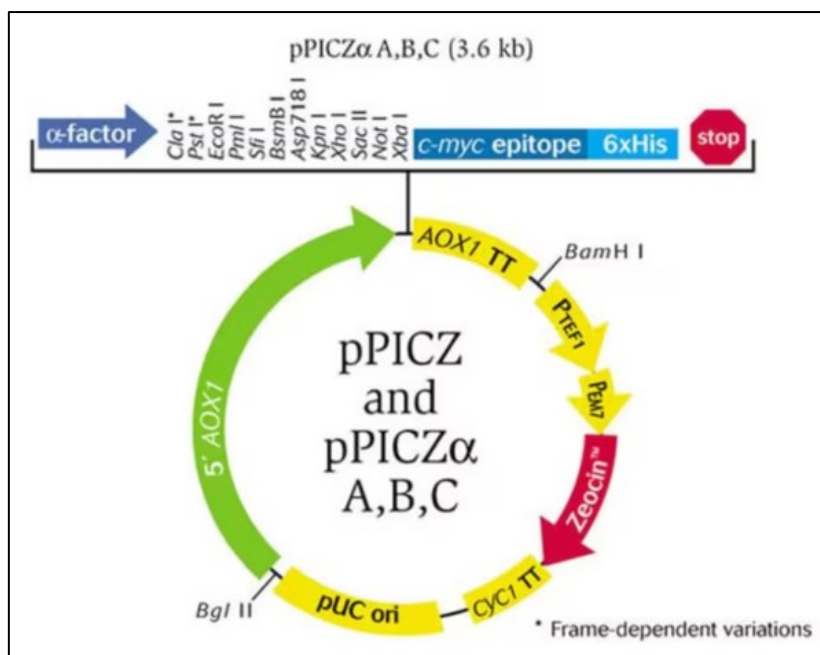
EnzyChrom™ Acetate Assay Kit

Universal Biologicals Ltd., UK

3.2. Metody

3.2.1. Štěpení a purifikace plasmidu

Na obrázku č. 9 je schéma použitého plasmidu pPICZ α A, do kterého byl vložen syntetický gen pro chitindeacetylasi z *Aspergillus flavus* (*AfCDA*) (GenBank ID sekvence: RAQ63986.1; Generay, Čína); klonovací místa EcoRI a KpnI. Sekvence *AfCDA* byla navíc na zakázku optimalizována pro produkci v methylotrofní kvasince *Pichia pastoris*, dále plasmid obsahuje sekvenci pro tzv. α -faktor, který cílí transport exprimovaného proteinu ven z buněk do media.



Obrázek 10. Vektorová mapa plasmidu pPICZαA. Při absenci vhodnějšího zdroje uhlíku využívají buňky *P. pastoris* methanol díky genu kódujícímu alkoholoxidasu (AOX1). Tento gen slouží také jako promotor pro expresi cílového proteinu, tedy *AfCDA*. Gen poskytující rezistenci vůči zeocinu umožňuje selektivní výběr buněk, které byly úspěšně transformovány.

Kruhový plasmid pPICZαA-*AfCDA* byl linearizován endonukleasou SacI (16 h, 37 °C). Reakce byla zahřata na 80 °C po dobu 20 min, aby se deaktivovala SacI, a směs byla centrifugována (10 min, 11 740 × g, 20 °C). Složení reakční směsi: 21,3 µl 0,82 µg/ml plazmidu, 3,5 µl 10 U/µl SacI, 3,5 µl CutSmart pufru, 6,7 µl dest. vody. 1% agarosový gel byl připraven rozpuštěním 0,5 g agarosy v 50 ml TAE pufru. K 1 µl neštěpeného plasmidu se přidaly 4 µl dest. H₂O, 1 µl nanášecího pufru a 0,5 µl 20x koncentrovaného Gel Red barviva. K 5 µl štěpeného plasmidu byly přidány stejné složky, směsi byly naneseny na agarosový gel a rozděleny elektroforézou.

Po ověření úspěšnosti linearizace pomocí elektroforézy byl plasmid purifikován komerční soupravou GeneJET PCR purification kit (ThermoFischer Scientific, USA). Ke 30 µl plazmidu bylo přidáno 30 µl vazebného pufru a směs byla nanesena na kolonu GeneJET a následně centrifugována (60 s, 11 740 × g). Na kolonu bylo naneseno 700 µl promývacího pufru a následně byla centrifugována (60 s, 11 740 × g). Získaný purifikovaný štěpený plasmid byl skladován při -20 °C.

3.2.2. Kultivace a elektroporace *P. pastoris*

Bylo připraveno 50 ml sterilního YP média (0,45 g kvasinkového extraktu, 0,9 g peptonu, 5 ml 10% sterilního roztoku glukosy, 40 ml dest. vody). Do média bylo sterilně inokulováno 50 µl buněčné suspenze kryokonzervované kultury *P. pastoris* KM71H a médium bylo inkubováno na třepačce (24 h, 150 ot./min, 28 °C). Po kultivaci bylo médium s buňkami centrifugováno (10 min, 3150 × g, 4 °C). Peleta byla dvakrát propláchnuta 25 ml sterilní ledové vody a dvakrát 25 ml 1M sterilního ledového roztoku sorbitolu, přičemž při každém propláchnutí byla směs centrifugována (10 min, 3150 × g, 4 °C) a supernatant byl odstraněn. Bylo připraveno 100 ml YP agarového média (1 g kvasinkového extraktu, 2 g peptonu, 10 ml 10% sterilního roztoku glukosy, 100 µl 100 mg/ml zeocinu, 100 µl 5 mg/ml tetracyklinu) a médium bylo rozděleno do 4 Petriho misek.

Po opláchnutí byla buněčná peleta resuspendována v 1 ml 1M sterilního roztoku sorbitolu a temperována na ledu. Ke 30 µl purifikovaného plasmidu bylo přidáno 100 µl buněčné suspenze a směs byla inkubována na ledu po dobu 5 min. Směs byla přenesena do vychlazené elektroporační kyvety a buňky byly elektroporovány (5,3 ms, 2 kV). Bezprostředně po elektroporaci byl do směsi přidán 1 ml 1M sterilního ledového roztoku sorbitolu. Směs byla rozetřena na YP agarové médium v Petriho miskách, které byly následně inkubovány 72 h při 28 °C.

3.2.3. Screening produkce AfCDA

8 g kvasinkového extraktu a 16 g peptonu bylo rozpuštěno v 560 ml destilované vody a rozděleno do osmi 1l Erlenmayerových baněk, které byly sterilizovány v autoklávu. Následně bylo do každé baňky přidáno 10 ml 10% glycerolu, 10 ml 1M K-P pufru (pH 6,0), 10 ml YNB a 200 µl 0,02% biotinu (všechny roztoky byly předem sterilizovány). Každá baňka s celkovým objemem média 100 ml byla zaočkována jednou kolonií z agarového média a inkubována na třepačce (24 h, 220 ot./min, 28 °C). Médium z každé baňky bylo centrifugováno (10 min, 4 500 × g, 16 °C) do samostatných zkumavek.

2,4 g kvasinkového extraktu a 4,8 g peptonu bylo rozpuštěno ve 160 ml destilované vody, rozděleno do osmi 300 ml Erlenmayerových baněk a sterilizováno v autoklávu. Následně byly do každé baňky přidány 3 ml 5% methanolu, 3 ml 1M K-P pufru (pH 6,0), 3 ml YNB a 60 µl 0,02% biotinu. Buněčné pelety po centrifugaci byly resuspendovány v tomto médiu a přeneseny do baněk. Malá část každé pelety byla naočkována na nové agarové médium

pro uchování kolonií pro další použití. Inokulovaná média byla inkubována na třepačce (72 h, 220 ot./min, 28 °C) a každý den bylo do médií přidáno 150 µl 100% methanolu pro indukci exprese *A/CDA*. Třetí den inkubace byl z každého média odebrán 1 ml vzorku a zakoncentrován na 150 µl centrifugací přes kolonku Amicon 0,5 ml (10 min, 11 700 × g); zbytek média byl zlikvidován. K 8 µl koncentrátů byly přidány 2 µl 5 × konc. vzorkového pufru pro proteinovou elektroforézu. Vzorky byly centrifugovány (10 min, 11 700 × g), inkubovány v termomixéru (5 min, 350 ot./min, 99 °C) a znovu centrifugovány. Připravené vzorky byly spolu s markerem molekulové hmotnosti LMW naneseny na 10% nebo 12% gel pro polyakrylamidovou elektroforézu obsahující dodecylsírán sodný (angl. *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Pro detekci proteinů byl gel po elektroforéze (75 min, 130 V) obarven v barvicím roztoku. Koncentrace bílkovin ve vzorcích médií byla stanovena Bradfordovou metodou. Do zkumavek s různě ředěnými vzorky médií v triplicátu o celkovém objemu 100 µl byl přidán vždy 1 ml Bradfordova činidla. Směsi byly inkubovány 15 min při laboratorní teplotě a následně byla změřena absorbance při 595 nm.

Kolonie č. 1, 2, 4 a 5 byly kryokonzervovány pro pozdější použití při produkci *A/CDA*. V 11 Erlenmayerových baňkách byly do 100 ml média (1 g kvasinkového extraktu, 2 g peptonu, 90 ml dest. vody, 10 ml 20% sterilní glukosy) inokulovány jednotlivé kolonie z agarového média. Po inkubaci na třepačce (24 h, 220 ot./min, 28 °C) byla média z baněk odstraněna po centrifugaci (10 min, 4 500 × g, 16 °C), pelety buněk byly resuspendovány v 1 ml 1M sorbitolu a kryokonzervované kultury byly skladovány při -80 °C.

3.2.4. Analytické reakce enzymu s COS

V prvních analytických reakcích bylo vytvořeno 8 reakčních směsí s kombinací enzymu z kolonií 2 nebo 4, různých množství enzymu (10 a 20 µg) a různých reakčních podmínek (pufrů o pH 5 a 7). Reakční směsi o celkovém objemu 300 µl obsahovaly 10 mM substrátu *N,N',N'',N''',N''''*-pentaacetylchitopentaosy (GlcNAc)₅, enzym v odpovídajícím objemu koncentrovaného produkčního média a 50mM Tris-HCl pufr o pH 5 nebo 7. Reakce probíhaly po dobu 24 h (1000 ot./min, 35 °C), přičemž po 8 h byl do reakcí přidán jeden ekvivalent množství enzymu. Průběh reakcí byl sledován tenkovrstvou chromatografií (angl. *thin-layer chromatography*, TLC).

3.2.5. Velkoobjemová produkce *AfCDA*

40 g kvasinkového extraktu a 80 g peptonu bylo rozpuštěno v 2,8 l destilované vody, rozděleno do čtyř 3l Erlenmayerových baněk a sterilizováno v autoklávu. Do sterilního média bylo přidáno 100 ml 10% glycerolu, 100 ml 1M K-P pufru (pH 6,0), 100 ml YNB a 2 ml 0,02% biotinu (všechny roztoky byly předem sterilizovány). Médium bylo očkováno buňkami z kryokonzervované kolonie č. 4 a inkubováno na třepačce (24 h, 220 ot./min, 28 °C). Následně byla média s buňkami centrifugována (10 min, 4500 × g, 16 °C). Supernatant byl následně odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována v produkčním médiu: do čtyř 1l Erlenmayerových baněk bylo připraveno produkční médium (140 ml destilované vody, 20 ml 5% MeOH, 20 ml 1M K-P pufru (pH 6,0), 20 ml YNB, 400 µl 0,02% biotinu a 1 µl 10mM roztoku směsi kationtů kovů Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} a Ni^{2+} ; všechny roztoky byly předem sterilizovány). Kultivace probíhala při 28 °C za třepání na třepačce další tři dny s každodenním přidavkem 1 ml MeOH, následně byla media po centrifugaci (10 min, 4500 × g, 16 °C) spojena a byla provedena purifikace *AfCDA*.

3.2.6. Purifikace *AfCDA*

Spojené supernatanty byly 5 × zředěny destilovanou vodou a poté filtrovány. Médium bylo nanášeno na kolonu s Fractogelem, což je silný kationtový iontoměnič. Zachycené proteiny byly eluovány gradientem pufru B1 v pufru A1 a detekovány UV spektrofotometrickou detekcí při 280 nm. pH odpadního média nezachyceného na koloně FPLC (NGC Chromatography System, Bio-Rad) bylo upraveno na 7, médium bylo skladováno při 4 °C a 1 ml byl zakonzentrován centrifugací (10 min, 11 700 × g) na koloně Amicon na objem 150 µl.

200 ml supernatantu obsahujícího surový enzym bylo koncentrováno na koloně Amicon na objem 5 ml a pH bylo upraveno na 7. 8 µl koncentrovaného supernatantu, koncentrovaného média z FPLC a frakce č. 1-8 obsahující eluovaný protein spolu s 2 µl 5 × konc. vzorkového pufru byly nanášeny na 15% SDS-PAGE gel. Po dokončení elektroforézy (75 min, 130 V) byl gel obarven barvicím roztokem.

Frakce č. 1-8 po purifikaci FPLC byly spojeny a 40 × koncentrovány centrifugací (10 min, 4050 × g) pomocí kolony Amicon. Ve vzorcích spojených frakcí a média před purifikací byla stanovena koncentrace bílkovin Bradfordovou metodou.

Po druhé velkoobjemové produkci *AfCDA* byly změněny podmínky FPLC purifikace. Místo kolony Fractogel (katex) byla použita kolona Q-Sepharose (anex). Použitý C-P pufr měl pH 7 ve srovnání s pH 3,5 při první purifikaci. Vzorky frakcí č. 1-25 spolu se vzorkem média po purifikaci byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (75 min, 130 V) a gel byl následně obarven v barvicím roztoku. Frakce č. 3, 5 a 7 byly spojeny a koncentrovány pomocí kolony Amicon. Před purifikací byl koncentrován i vzorek média a v těchto vzorcích byla stanovena koncentrace bílkovin Bradfordovou metodou.

3.2.7. Stanovení katalytických vlastností *AfCDA*

Byly připraveny dvě reakční směsi o celkovém objemu 250 μ l. Obě obsahovaly 50 μ l 50mM *N,N',N'', N'''*-chitotetraosy (GlcNAc)₄, objem roztoků izolovaného enzymu z FPLC frakcí a koncentrovaného média před první purifikací odpovídající 50 μ g enzymu a příslušný objem 50mM Tris-HCl pufru (pH 7,5). Reakce probíhaly v termomixeru po dobu 24 h (1000 ot./min, 35 °C). Po 30 min, 1 h, 2 h, 4 h a 24 h byly odebrány vzorky pro HPLC-MS analýzu (30 μ l reakční směsi bylo inkubováno 5 min při 99 °C, centrifugováno 10 min při 11 700 $\times$ g a bylo odebráno 20 μ l) a ve stejných časových intervalech byl průběh reakce kontrolován pomocí TLC.

Dále byla zkoumána možnost detekce chitoooligosacharidů pomocí UV detektoru HPLC. Pro srovnání byly v paralelních reakcích použity roztoky substrátů *N,N',N'', N'''*-chitotetraosy a jejího *p*-NP-glykosidu *p*-NP-(GlcNAc)₄. Reakční směsi měly celkový objem 500 μ l a následující složení:

A: 100 μ l 50mM (GlcNAc)₄, 52 μ l surového konc. média (10 μ g enzymu), 348 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

B: 250 μ l 10mM *p*-NP-(GlcNAc)₄, 52 μ l surového konc. média, 198 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

Reakce probíhaly při 1000 ot./min a 35 °C po dobu 24 h. Na detekci pomocí HPLC-MS byly odebrány vzorky po 1 h, 2 h, 4 h a 24 h.

Pro lepší interpretaci výsledků HPLC-MS analýzy byla vytvořena reakční směs, jejíž složení bylo sledováno již v čase 0 h, tj. ihned po smíchání reaktantů. Následně byly odebrány vzorky pro HPLC-MS analýzu také po 15, 30, 60, 120 a 240 min. Směs se skládala

ze 100 μ l 50mM (GlcNAc)₄, 348 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5) a 52 μ l koncentrovaného produkčního média před první FPLC purifikací. Reakce probíhala při 1000 ot./min a 35 °C.

Pro lepší diferenciaci složení reakčních směsí byla u vzorků pro analýzu HPLC-MS reakce zastavena přidáním 100 μ l 100% acetonu namísto tepelné inaktivace (5 min, 99°C). Rovněž byl analyzován vzorek bez enzymu a pufru, tedy čistý roztok 50mM (GlcNAc)₄. Reakční směsi připravené pro tento účel měly následující složení:

A: 100 μ l 50mM (GlcNAc)₄, 52 μ l surového konc. média, 348 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

B: 100 μ l 50mM (GlcNAc)₄, 26 μ l surového konc. média, 374 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

Reakce probíhaly při 1000 ot./min a 35 °C. Po 0, 15, 30, 60 a 120 min byly odebrány vzorky pro HPLC-MS analýzu.

Na vyhodnocení schopnosti AfCDA deacetylovat COS s vyšším DP, včetně těch, které nejsou rozpustné ve vodě, byly navrženy čtyři reakční směsi:

A: 250 μ l 20mM (GlcNAc)₄, 52 μ l surového konc. média, 198 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

B: 250 μ l 20mM (GlcNAc)₅, 52 μ l surového konc. média , 198 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

C: 250 μ l 20mM (GlcNAc)₆, 52 μ l surového konc. média, 198 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

D: 250 μ l 20mM COS o DP 6-11, 52 μ l surového konc. média, 198 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

Reakce probíhaly po dobu 4 h (1000 ot./min, 35 °C). Po 0, 1, 2 a 4 h byly odebrány vzorky pro LC-MS analýzu a stanovení koncentrace acetátu komerční soupravou. Reakce byly opět zastaveny tepelnou inaktivací enzymu (5 min, 99 °C).

3.2.8. Sledování průběhu reakcí pomocí sady na stanovení acetátu

Komerční souprava EnzyChrom™ Acetate Assay Kit (Universal Biologicals Ltd., UK) umožňuje kvantitativní stanovení koncentrace acetátu ve vzorcích. Skládá se ze dvou patentovaných enzymů, roztoku ATP a barviva. V přítomnosti acetátu vznikne po 30 min

inkubace při laboratorní teplotě růžové zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná koncentraci acetátu. Pro kolorimetrické stanovení je rozsah detekce 0,2 až 20 mM acetátu.

Byly připraveny dvě reakční směsi obsahující 100 μ l 50mM (GlcNAc)₄, 52 μ l surového konc. Média a 348 μ l 50mM Tris-HCl pufru (pH 7,5). Průběh reakcí byl sledován pomocí TLC po 1 h, 2 h a 20 h. Po 2 h byly odebrány vzorky pro analýzu pomocí HPLC-MS a enzymové soupravy pro stanovení koncentrace acetátu a po 20 h byl odebrán další vzorek pro HPLC-MS analýzu.

3.2.9. Optimalizace podmínek detekce TLC

Stacionární fázi při TLC detekci byly desky TLC Silikagel 60 F254 (Merck KGaA, Německo). Pro nalezení ideální mobilní fáze bylo testováno několik směsí:

n-BuOH : HCOOH : H₂O v poměru 4: 8: 1 (v/v/v)

n-BuOH : MeOH : 25% NH₄OH aq. : H₂O v poměru 5: 4: 2: 1 (v/v/v/v)

i-PrOH : 25% NH₄OH aq. : H₂O v poměru 7: 2: 1 (v/v/v)

Na detekci COS byly použité roztoky ninhydrinu (2 mg/ml EtOH), difenylaminu/anilinu a H₂SO₄ (10 % v/v v EtOH).

3.2.10. HPLC-MS analýza

HPLC-MS analýzy prováděla Ing. Lucie Petrásková, Ph.D., z Laboratoře biotransformací. Pro optimalizaci stanovení složení reakčních směsí pomocí HPLC byly použity tři HILIC kolony – TSKgel Amide-80 (Tosoh Bioscience GmbH, Německo), HILICpak VN-50 4D (Shodex, Japonsko) a Luna NH₂ (Phenomenex, USA). Měření probíhalo na přístroji HPLC (Agilent Technologies, Inc., USA) s PDA detekcí v rozsahu 190–390 nm. Chromatogramy byly extrahovány při 200 nm. Parametry měření s jednotlivými kolonami jsou uvedeny v Tabulkách 7–9. Parametry MS detekce (detektor LCMS-2020) jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 7. Kolona TSKgel Amide-80. Mobilní fáze: (A) 100% acetonitril. (B) deionizovaná voda. Parametry: teplota kolony 25°C, objem nástřiku 1 µl, průtok 1 ml/min.

Gradientová eluce		
Čas [min]	A [%]	B [%]
0	78	22
7	78	22
20	65	35
25	65	35
26	78	22
35	78	22

Tabulka 8. Kolona HILICpak VN-50 4D. Mobilní fáze: (A) 100% acetonitril. (B) deionizovaná voda. Parametry: teplota kolony 25°C, objem nástřiku 1 µl, průtok 1 ml/min.

Gradientová eluce		
Čas [min]	A [%]	B [%]
0	78	22
5	68	32
10	60	40
12	70	30
15	78	22
20	78	22

Tabulka 9. Kolona Luna NH₂. Mobilní fáze: (A) 100% acetonitril. (B) deionizovaná voda. Parametry: teplota kolony 25°C, objem nástřiku 1 µl, průtok 1,1 ml/min.

Gradientová eluce		
Čas [min]	A [%]	B [%]
0	79	21
8	70	30
12	50	50
13	79	21
15	79	21

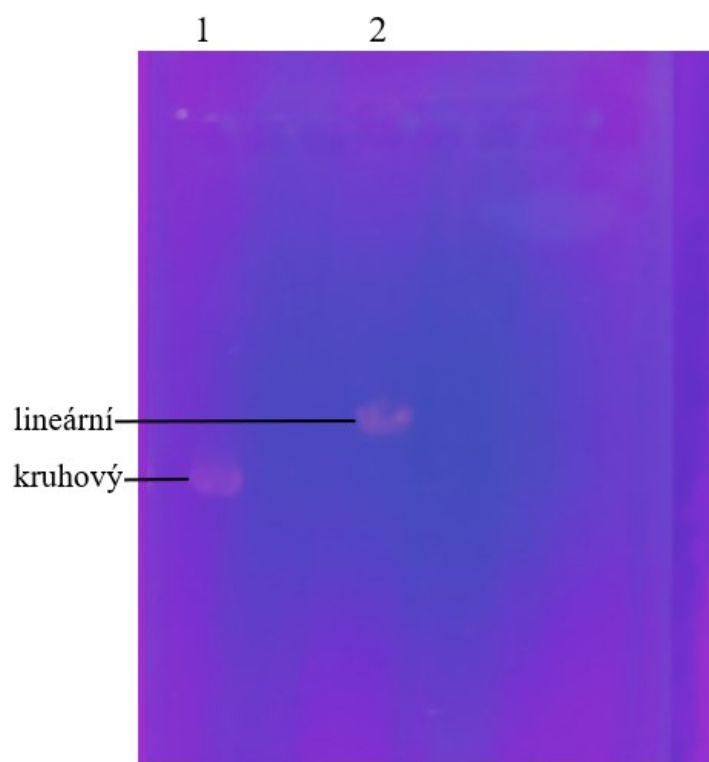
Tabulka 10. Parametry MS detekce.

Ionizační zdroj	ESI
Typ ionizace	ESI + , ESI -
Rozsah m/z	200–2 000
Akviziční mód	SCAN
ESI napětí rozhraní	4,5 kV
Napětí detektoru	1,15 kV
Průtok nebulizačního plynu	1,5 ml/min
Průtok sušícího plynu	15 ml/min
Teplota tepelného bloku	200 °C
DL teplota	250 °C

4. Výsledky

4.1. Produkce chitindeacetylasy z *A. flavus* (*AfCDA*) v *P. pastoris*

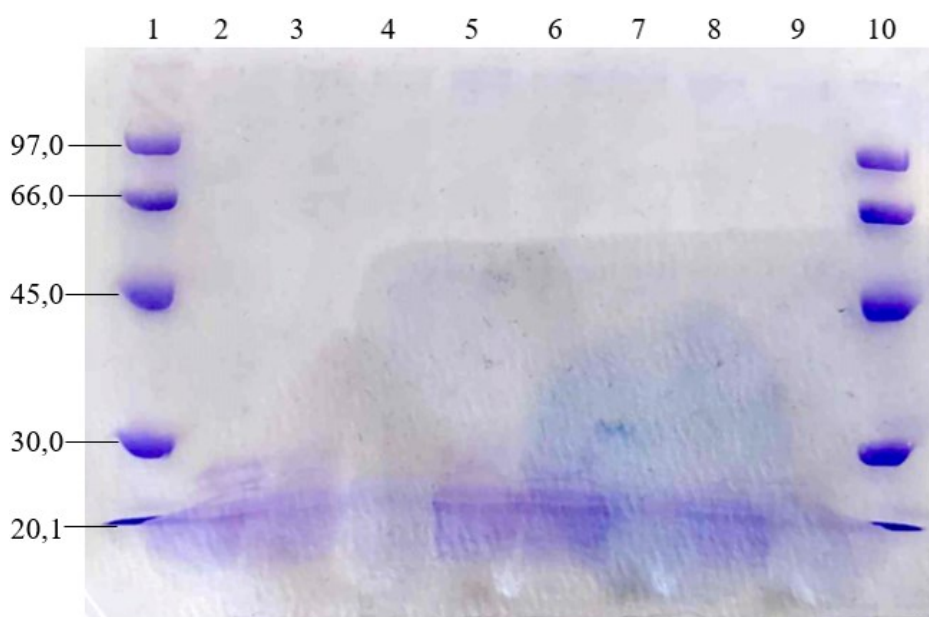
Cirkulární plasmid pPICZ α A-*AfCDA*, který obsahuje gen pro chitindeacetylasu z vláknité houby *Aspergillus flavus* (*AfCDA*, GenBank ID: RAQ63986.1), byl získán komerční syntézou. Nukleotidová sekvence genu *AfCDA* byla na zakázku optimalizována pro produkci v methylotrofní kvasince *Pichia pastoris* (sekvence v Příloze 1). Plasmid byl před transformací buněk *P. pastoris* linearizován restriční endonukleasou *SacI*. Linearizace plazmidu byla ověřena elektroforézou na 1% agarosovém gelu (Obr. 11). Lineární plasmid by měl mít nižší retenční faktor, protože jeho prostorové uspořádání způsobuje vyšší odpor při elektroforetickém pohybu než cirkulární plasmid. Lineární plasmid by tedy měl během elektroforézy urazit kratší dráhu než cirkulární, což je patrné ze snímku gelu. Plasmid byl poté purifikován pomocí soupravy GeneJET Plasmid Miniprep kit.



Obrázek 11. Snímek 1% agarosového elektroforetického gelu osvětleného UV zářením. Do dráhy č. 1 byl nanesen neštěpený cirkulární plazmid a do dráhy č. 2 plazmid štěpený endonukleasou *SacI*.

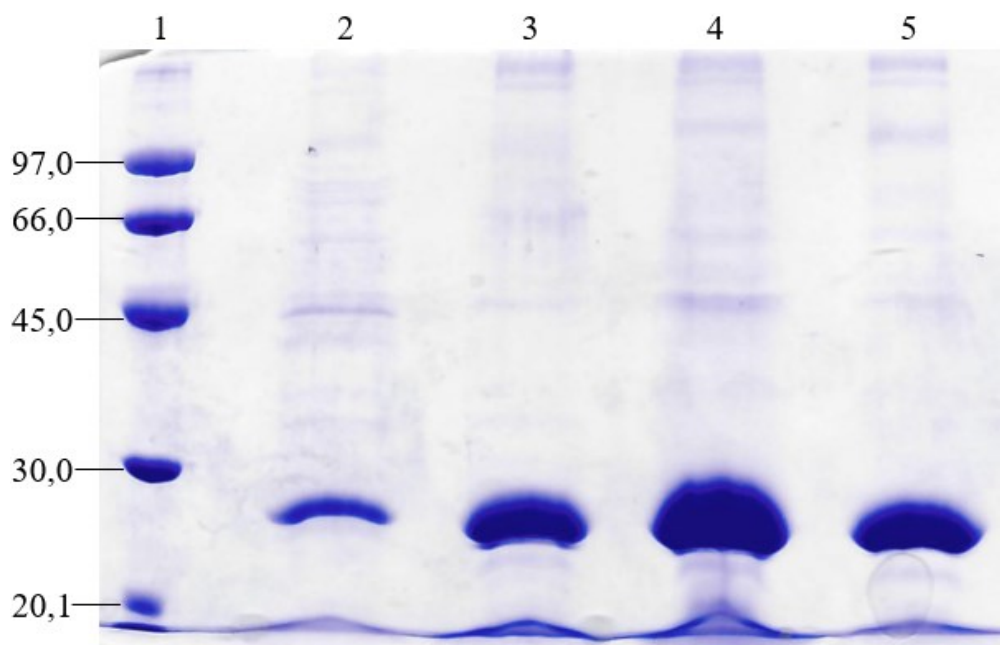
Připravený linearizovaný plasmid pPICZ α A-*AfCDA* byl elektroporací vnesen do čerstvě připravených kompetentních buněk *P. pastoris* KM71H. Pevné agarové médium, na němž byly kultivovány buňky po elektroporaci, obsahovalo tetracyklin o koncentraci 5 μ g/ml pro inhibici růstu nežádoucích mikroorganismů, primárně bakterií. Dále obsahovalo 0,1 mg/ml zeocinu, což je širokospektrální antibiotikum, které je účinné i proti kvasinkám, tedy buňkám *P. pastoris*. Plasmid, kterým byly buňky transformovány, obsahoval mimo jiné gen pro rezistenci vůči zeocinu. To umožnilo selektivní výběr kvasinkových buněk, které byly úspěšně transformovány, a eradikaci zbývajících buněk.

Jednotlivé kolonie z agarového média byly očkovány do kultivačního YP média. Po nárůstu biomasy byly přeneseny do produkčního média obsahujícího methanol. Díky genu AOX1 kódujícímu alkoholoxidasu mohly transformované buňky využívat methanol jako zdroj uhlíku. Tento gen také sloužil jako promotor exprese cílového rekombinantního enzymu *AfCDA*. Po produkci byly vzorky médií obsahující kvasinkové kolonie č. 1-8 spolu s LMW markerem naneseny na 10% SDS-PAGE gel (Obr. 12). Elektroforetickou separací proteinů z médií byla zjišťována přítomnost *AfCDA*. Z nukleotidové sekvence byla pomocí programu ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>) stanovena přibližná molekulová hmotnost *AfCDA* 27 kDa. Ze snímku SDS-PAGE gelu je zřejmé, že kolonie č. 1, 2, 4, 5 a 7 (dráhy 2, 3, 5, 6 a 8) produkovaly nejvíce proteinu dané molekulové hmotnosti. Pro další experiment byly vybrány čtyři kolonie s nejintenzivnějším zbarvením proužků, tedy kolonie 1, 2, 4 a 5.



Obrázek 12. Snímek 10% SDS-PAGE gelu obarveného Coomassie Brilliant Blue. V drahách č. 1 a 10 byl nanesen marker molekulové hmotnosti LMW. V drahách 2-9 byly naneseny vzorky 1–8 z produkčního média.

Po prvním výběru buněčných kolonií byl postup kultivace a produkce opakován. Pro detekci proteinů byla opět použita SDS-PAGE, tentokrát však ve 12% gelu. Na gel byly naneseny vzorky 6,6 × koncentrovaného produkčního média s koloniemi 1, 2, 4 a 5 spolu s markerem MW (Obr. 13). Na snímku gelu jsou pozorovatelné proužky odpovídající MW 27 kDa, tedy s největší pravděpodobností *A/CDA*. Ačkoliv elektroforéza není kvantitativní analytickou metodou, při pohledu na snímek gelu je zřejmé, že intenzita zbarvení proužku v dráze č. 4 při nanesení stejného objemu je relativně mnohem vyšší než u ostatních drah. Lze tedy konstatovat, že buněčná kolonie č. 4 byla nejúspěšněji transformována a produkuje rekombinantní *A/CDA* s nejvyšší efektivitou. Pro budoucí produkce byla tedy použita kolonie č. 4. Dále byla stanovena koncentrace bílkovin v produkčním médiu Bradfordovou metodou. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 11.



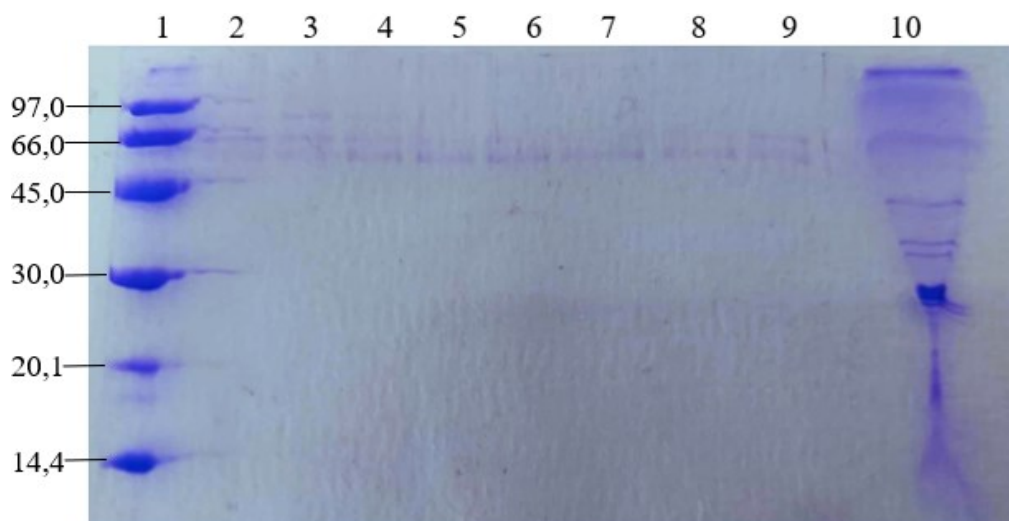
Obrázek 13. Snímek 12% SDS-PAGE gelu obarveného Coomassie Brilliant Blue. Marker molekulové hmotnosti LMW byl nanesen v dráze 1 a vzorky produkčních médií s koloniemi 1, 2, 4 a 5 byly naneseny v drahách 2–5.

Tabulka 11. Koncentrace bílkovin ve vzorkách koncentrovaných produkčních médií s koloniemi 1, 2, 4 a 5 stanovená Bradfordovou metodou.

č. kolonie	1	2	4	5
c (prot.) [mg/ml]	0,24	0,65	1,40	0,60

4.2. Velkoobjemová produkce a purifikace *AfCDA* pomocí FPLC

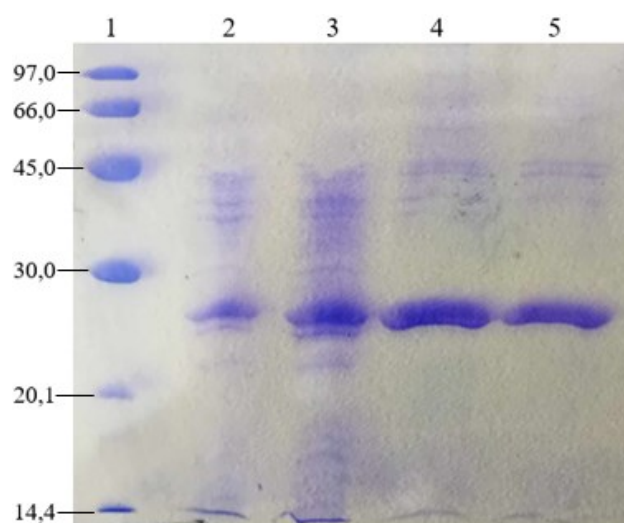
Při velkoobjemové produkci *AfCDA* bylo zachováno složení médií, ale celkový objem média byl zvýšen ze 100 ml na 1 l pro kultivaci biomasy a z 30 ml na 200 ml pro následnou indukovanou produkci proteinu; produkční médium neobsahovalo kvasinkový extrakt a pepton. Navíc byl do produkčního média přidán 1 μ l 10mM roztoku kationtů kovů (viz kapitola 3.2.5) pro zachování katalytické aktivity aktivního místa *AfCDA*. Médium bylo očkováno kolonií č. 4, protože při poslední produkci vykazovala nejvyšší účinnost produkce *AfCDA*. Po ukončení kultivace a odstředění produkčního média byl 5 $\times$ zředěný přefiltrovaný supernatant nanesen na kolonu Fractogel v purifikační sestavě FPLC (kapitola 3.1.1.). Pomocí UV spektrofotometrického detektoru byla během eluce proteinů z kolony měřena absorbance při 280 nm a sbírány frakce o objemu 1,5 ml. Frakce č. 1-7 (maxima hodnoty A na chromatogramu) spolu s koncentrovaným médiem před purifikací a koncentrovaným odpadním médiem po průchodu kolonou FPLC byly nanesený na 15% SDS-PAGE gel (Obr. 14) a separovány elektroforézou. Jediná dráha s viditelným pruhem odpovídajícím MW 27 kDa je dráha s koncentrovaným odpadním médiem (dráha č. 10), zatímco frakce z FPLC purifikace (dráhy č. 2-8) bohužel obsahovaly převážně vysokomolekulární nečistoty. Podmínky purifikace, tedy pH použitých C-P pufrů (pH 3,5) a zvolená kolona (Fractogel - katex), nebyly tudíž pro purifikaci *AfCDA* vhodné (hodnota izoelektrického bodu vypočtená pomocí ProtParam pI = 4,9). Na koloně byly zachyceny pouze neidentifikované nečistoty a *AfCDA* prošel systémem bez zachycení, přestože by se měl vzhledem ke svému vypočtenému pI na koloně zachytit. V dráze č. 9, která obsahovala koncentrované médium před purifikací, by měl být také viditelný proužek odpovídající MW *AfCDA*, ale nebylo pravděpodobně dostatečně koncentrované.



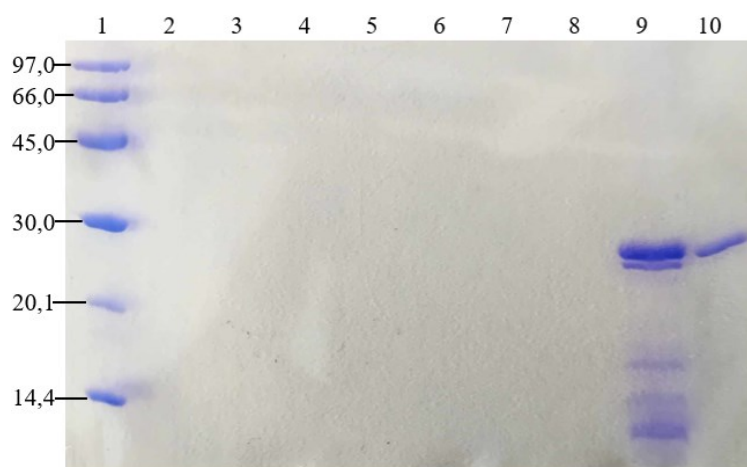
Obrázek 14. Snímek 15% SDS-PAGE gelu obarveného Coomassie Brilliant Blue. V dráze č. 1 byl nanesen marker molekulové hmotnosti LMW. V drahách 2-8 byly nanесeny frakce proteinů 1-7 eluovaných z kolony Fractogel po purifikaci média pomocí FPLC. V dráze 9 je koncentrované médium před purifikací a v dráze 10 koncentrované odpadní médium.

Po další velkoobjemové produkci s podobným postupem byly upraveny podmínky produkce a purifikace. Tentokrát obsahovaly čtyři z osmi produkčních médií 1% kvasinkový extrakt a 2% pepton. pH 10mM C-P pufrů bylo upraveno na 7 a místo kolony Fractogel (katex) byla použita kolona Q-Sepharose (anex). Po ukončení kultivace byly před purifikací vzorky čtyř 10 × koncentrovaných produkčních médií (dvě s 1% kvasinkovým extraktem a 2% peptonem, dvě bez těchto složek) nanесeny na 15% SDS-PAGE gel (Obr. 15) pro screening výsledku produkce. Po centrifugaci produkčního média byl 5 × zředěný přefiltrovaný supernatant nanесen na kolonu Q-Sepharose v systému FPLC. 50 ml supernatantu bylo odebráno a 10 × koncentrováno pro pozdější analýzu. Pomocí UV spektrofotometrického detektoru byla během eluce proteinů z kolony měřena absorbance při 280 nm a sbírány frakce o objemu 1,5 ml. Frakce č. 5–11 (maxima hodnoty A na chromatogramu) spolu s koncentrovaným odpadním médiem a médiem před purifikací byly nanесeny na 15% SDS-PAGE gel (Obr. 16) a separovány elektroforézou. Snímek elektroforetického gelu, na němž byl sledován výsledek produkce (Obr. 15), obsahuje intenzivní proužky odpovídající MW *A/CDA*. Proužky jsou výraznější v drahách, do kterých bylo nanесeno koncentrované médium před purifikací s kvasinkovým extraktem a peptonem, a tyto dráhy obsahují i méně nečistot. Médium bez přídavku těchto složek obsahovalo velké množství nerozpustných nečistot, které ztížily proces koncentrování a přenesly se do vzorku nanесeného na gel. Snímek elektroforetického gelu, pomocí kterého byla ověřena úspěšnost purifikace (Obr. 16) obsahuje proužky s MW odpovídající *A/CDA* jen v drahách s koncentrovaným médiem před purifikací

(č. 9) a koncentrovaným odpadním médiem (č. 10). Dráhy, do kterých byly naneseny FPLC frakce č. 5–11 neobsahovaly detekovatelné množství proteinů, ačkoliv byly hodnoty UV absorbance v těchto frakcích v chromatogramu několikanásobně vyšší, než při předchozí purifikaci. Screeningovou elektroforézou produkčních médií byla tedy potvrzena úspěšnost produkce enzymu, ale ani tyto podmínky purifikace, tedy pH 7,0 použitých C-P pufrů a kolona Q-Sepharose (anex), nebyly vhodné pro purifikaci *AfCDA*. V koncentrovaném médiu před purifikací a odpadním médiu z FPLC byla stanovena koncentrace proteinů Bradfordovou metodou, která měla hodnotu 0,32 mg/ml v médiu před purifikací a 0,15 mg/ml v odpadním médiu.



Obrázek 15. Snímek 15% SDS-PAGE gelu obarveného Coomassie Brilliant Blue. V dráze č. 1 byl nanesen marker molekulové hmotnosti LMW. V drahách 2 a 3 byly naneseny koncentrované vzorky médií před purifikací bez přidavku kvasinkového extraktu a peptonu. V drahách 4 a 5 byly naneseny koncentrované vzorky médií před purifikací obsahujících 1% kvasinkový extrakt a 2% pepton.



Obrázek 16. Snímek 15% SDS-PAGE gelu obarveného Coomassie Brilliant Blue. V dráze č. 1 byl nanesen marker molekulové hmotnosti LMW. V drahách 2-8 byly naneseny frakce proteinů 5–11 eluovaných z kolony Q-Sepharose po purifikaci pomocí FPLC. V dráze 9 je koncentrované médium před purifikací a v dráze 10 koncentrované odpadní médium.

4.3. Stanovení katalytických vlastností AfCDA

Katalytická aktivita připravené chitindeacetylasy byla stanovena reakcí s chitooligosacharidy o DP 4 a vyšší, které jsou připravovány v Laboratoři biotransformací kombinací chemických a enzymových metod a purifikovány gelovou permeační chromatografií. Analýza reakčních směsí a případných produktů je komplikovaná, jelikož žádná jednoduchá metoda pro přímé stanovení chitindeacetylase aktivity dosud nebyla popsána. Bylo tedy nutné dostupnými metodami sledovat vznik deacetylovaných chitooligosacharidů; v této práci byly použity metody tenkovrstvé chromatografie (TLC), vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV a hmotnostním detektorem (HPLC-MS) a sledování vzniku acetátového iontu pomocí komerční soupravy s chromogenním substrátem a spektrofotometrickou detekcí.

4.3.1. Testování reakčních podmínek pro AfCDA

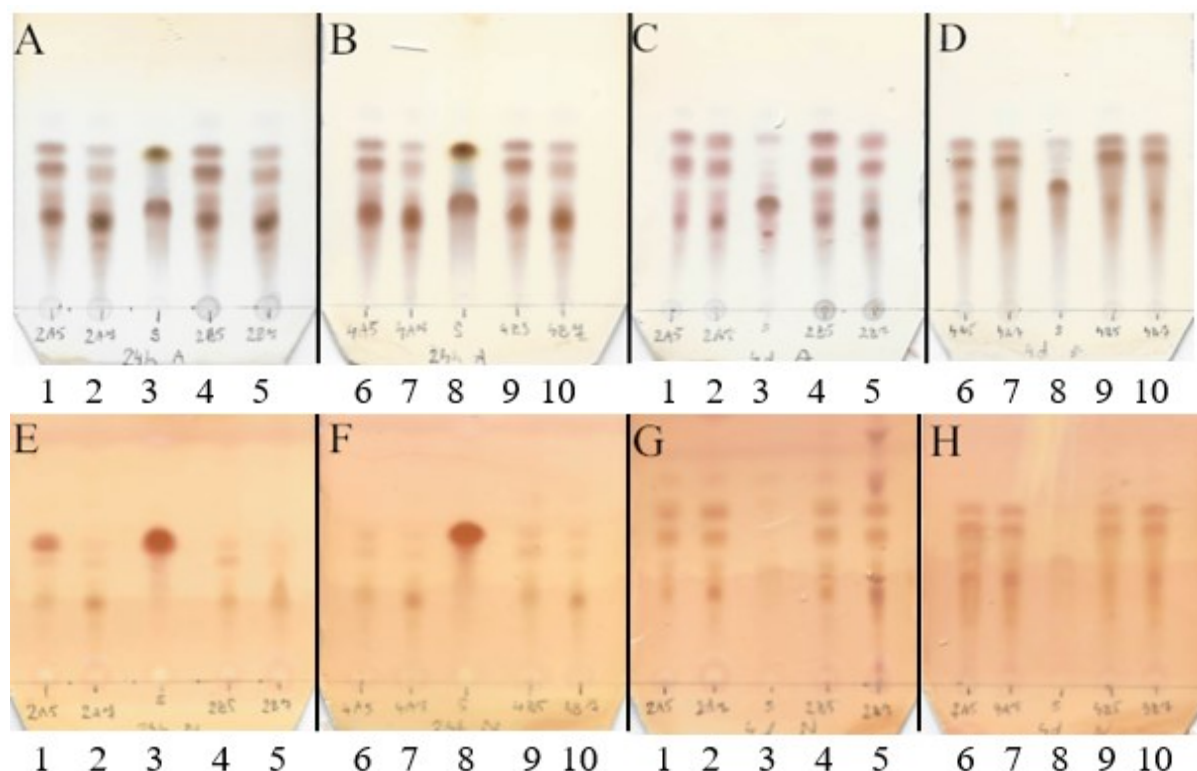
První série reakčních směsí byla vytvořena za účelem porovnání vzorků z koncentrovaných produkčních médií obsahujících kvasinkové kolonie 2 a 4. Byl také zkoumán vliv pH na průběh reakce a potřebné množství enzymu. Jako substrát byl v reakcích použit 5mM (GlcNAc)₅. Složení reakčních směsí je uvedeno v Tabulce 12. Průběh reakcí byl sledován pomocí TLC (Obr. 17). Po 24 h byly vzorky reakcí nanесeny na TLC desky spolu s roztoky 10 mM glukosaminu a 10 mM (GlcNAc)₅ jako standardů. Do reakcí byl po 24 h vždy přidán jeden hmotnostní ekvivalent enzymů (10 nebo 20 µg) a po 4 dnech byl průběh reakce opět sledován pomocí TLC.

Tabulka 12. Složení reakčních směsí. Číslo 2 nebo 4 v označení směsi představuje enzym z koncentrovaného média před purifikací z transformovaných kolonií *P. pastoris* č. 2 a 4. V reakčních směsích byl použit 50mM Tris-HCl pufr o pH 5 nebo 7 a substrátem byl 5mM (GlcNAc)₅. Reakční směsi měly celkový objem 300 µl.

Reakční směs	pH	Koncentrace enzymu [µg/300 µl]	Reakční směs	pH	Koncentrace enzymu [µg/300 µl]
2A5	5	10	4A5	5	10
2A7	7	10	4A7	7	10
2B5	5	20	4B5	5	20
2B7	7	20	4B7	7	20

U reakcí byl sledován časový průběh, vliv pH na aktivitu enzymu a na minimální potřebné množství enzymu pro reakci (Obr. 17). Na destičkách obarvených roztokem difenylaminu/anilinu (A, B, C, D) je patrný posun skvrn směrem ke startu oproti standardu (GlcNAc)₅. Deacetylací chitoooligosacharidů vznikají nabitě aminoskupiny, které zvyšují polaritu látky, a tím snižují hodnotu retenčního faktoru v TLC. Toto pozorování potvrdilo úspěšnost produkce a funkčnost *A/CDA*. Při porovnání TLC desek po 24 h a 4 dnech reakce obarvených roztokem difenylaminu/anilinu nebyl pozorovatelný rozdíl v intenzitě obarvení a poloze skvrn, což naznačuje, že po 24 h byla reakce prakticky ukončena. Mezi drahami obsahujícími reakční směsi s 10 a 20 µg enzymu není pozorovatelný žádný rozdíl. Na destičkách obarvených roztokem ninhydrinu je slaběji pozorovatelná skvrna (GlcNAc)₅ a skvrna glukosaminu je mnohem výraznější, protože ninhydrin reaguje s volnými aminoskupinami a s acetamidovou skupinou nedochází k reakci.

Na základě poznatků získaných z tohoto experimentu, tedy že dle TLC nejsou v jednotlivých reakčních směsích výrazné rozdíly, bylo v dalších reakcích používáno pouze koncentrované médium před purifikací z očkování kvasinkovou kolonií č. 4, pufr o neutrálním pH, množství enzymu 10 µg v jedné reakci a maximální reakční doba 24 h.



Obrázek 17. TLC detekce. Mobilní fáze: *n*-BuOH : MeOH : 25% NH₄OH aq. : H₂O v poměru 5 : 4 : 2 : 1 (v/v/v/v). každá destička byla vyvinutá dvakrát v MF. (A, B, C, D) Detekce roztokem difenylaminu/anilinu. (E, F, G, H) Detekce roztokem ninhydrinu. (A, B, E, F) Složení směsi po 24 h reakce. (C, D, G, H) Složení směsi po 4 dnech reakce. Vzorky: 1) Směs 2A5. 2) Směs 2A7. 3, 8) Standardní 10mM roztoky

glukosaminu a (GlcNAc)₅. 4) Směs 2B5. 5) Směs 2B7. 6) Směs 4A5. 7) Směs 4A7. 9) Směs 4B5. 10) Směs 4B7 (Tabulka 12).

4.3.2. Katalytické schopnosti AfCDA

Reakce určené ke sledování katalytické schopnosti enzymu využívaly výhradně enzym z koncentrovaného média před purifikací z buněčné kolonie č. 4. Hlavním důvodem byl neúspěch purifikací, tj. nepodařilo se v rámci práce získat frakce s izolovaným čistým enzymem. Pro ověření úspěšnosti purifikací byly provedeny reakce také s enzymem z jiných koncentrovaných médií a frakcí z HPLC.

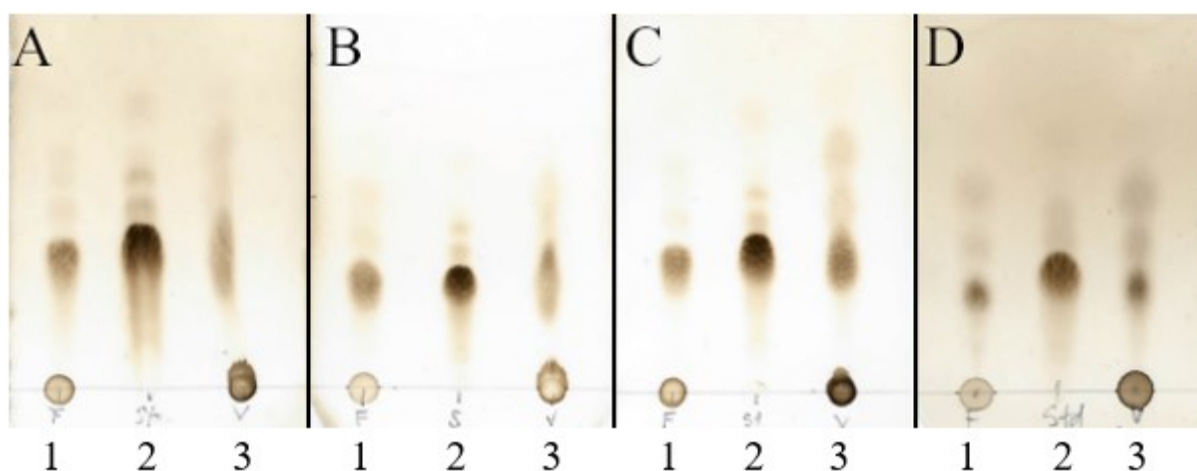
Srovnání zdrojů enzymů

V první reakci, jejíž průběh byl sledován pomocí TLC po 90 min, 200 min, 2 h a 24 h (viz Obr. 18), byla porovnávána směs frakcí č. 1-8 z první purifikace na FPLC a koncentrované nepurifikované produkční médium. Reakční směsi měly následující složení:

F: 50 μ l 50mM (GlcNAc)₄, 165 μ l enzymu (směs frakcí 1–8), 35 μ l 50mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

V: 50 μ l 50mM (GlcNAc)₄, 26 μ l enzymu (koncentrované médium), 174 μ l 50mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

Na všech TLC deskách je patrný malý posun skvrny substrátu (GlcNAc)₄ směrem ke startu, ale žádný zásadní rozdíl mezi oběma reakcemi není patrný.



Obrázek 18. TLC detekce. Mobilní fáze: *i*-PrOH : 25% NH₄OH : H₂O v poměru 7 : 2 : 1 (v/v/v). (A) Reakční směsi po 90 min reakce. (B) Reakční směsi po 200 min reakce. (C) Reakční směsi po 2 h reakce. (D) Reakční

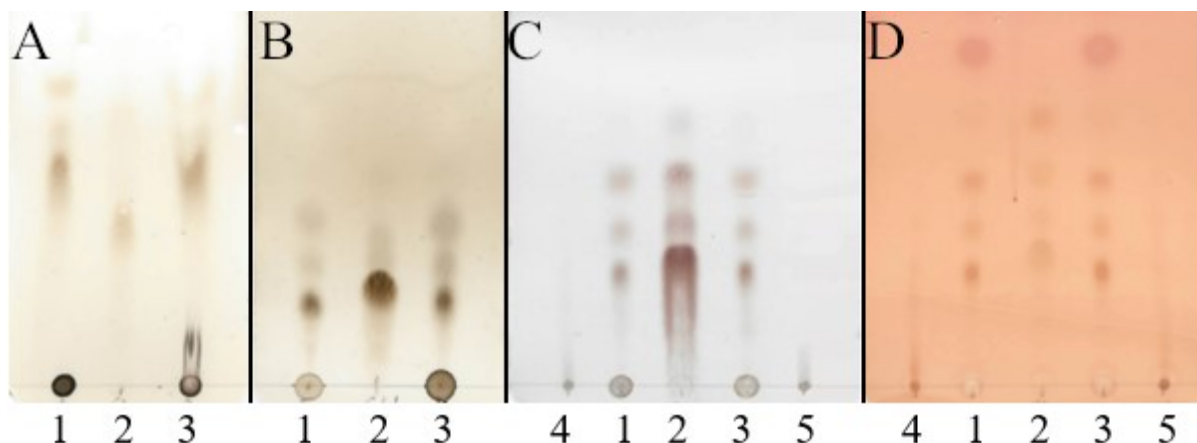
směsi po 24 h reakce. Vzorky: (1) Reakční směs obsahující směs FPLC frakcí 1–8 z purifikace na katexu. (2) 50mM standard (GlcNAc)₄. (3) Reakční směs obsahující koncentrované produkční médium před purifikací. Detekováno namočením v 50% ethanolovém roztoku H₂SO₄ a zahřátím horkovzdušnou pistolí.

Optimalizace TLC detekce

Metoda tenkovrstvé chromatografie představuje jednoduchý, ale účinný způsob zkoumání složení reakčních směsí. Pro optimalizaci podmínek detekce pomocí TLC bylo testováno několik mobilních fází a detekčních metod. Detekce spočívala v namáčení TLC destiček v roztocích H₂SO₄ (10 % v EtOH), ninhydrinu (2 mg/ml EtOH) a difenylaminu/anilinu (roztok připraven dle kapitoly 3.1.4.) a následném zahřátí pomocí horkovzdušné pistole. Testované mobilní fáze měly následující složení:

- I. *i*-PrOH : 25% NH₄OH aq. : H₂O v poměru 7 : 2 : 1 (v/v/v)
- II. *n*-BuOH : MeOH : 25% NH₄OH aq. : H₂O v poměru 5 : 4 : 2 : 1 (v/v/v/v)
- III. *n*-BuOH : HCOOH : H₂O v poměru 4 : 8 : 1 (v/v/v)

Po prvním použití fáze III. bylo zřejmé, že není vhodná pro separaci COS. Skvrny na desce vyvinuté v této fázi a detekované (Obr. 19A) jsou rozmazané, špatně definované a špatně separované. V počátečních reakcích byla použita výhradně fáze I. (Obr. 19B), protože vytváří relativně ostré a definované skvrny. Fáze II. se prokázala jako nejlepší volba (Obr. 19C, 19D). Vytváří ostré a definované skvrny a nejúčinněji odděluje jednotlivé složky reakčních směsí. V porovnání s fází I. je vývoj destiček v této fázi mnohem rychlejší, i když je nutné destičky vyvolat dvakrát. Detekce pomocí roztoku H₂SO₄ (Obr. 19A, 19B) a roztokem difenylaminu/anilinu (Obr. 19C) poskytuje velmi podobné zbarvení skvrn. Naproti tomu detekce roztokem ninhydrinu zviditelní i skvrny s vysokým retenčním faktorem, které nejsou pozorovatelné na destičkách obarvených jinými roztoky. Nejvhodnější je tedy paralelní detekce alespoň ve dvou mobilních fázích a jejich porovnání.



Obrázek 19. TLC detekce. Mobilní fáze: (A) *n*-BuOH : HCOOH : H₂O v poměru 4 : 8 : 1 (v/v/v). (B) *i*-PrOH : 25% NH₄OH aq. : H₂O v poměru 7 : 2 : 1 (v/v/v). (C, D) *n*-BuOH : MeOH : 25% NH₄OH aq. : H₂O v poměru 5 : 4 : 2 : 1 (v/v/v/v). Vzorky: (1) Reakční směs obsahující (GlcNAc)₄. (2) Standard 50mM (GlcNAc)₄. (3) Reakční směs obsahující *p*-NP-glykosid (GlcNAc)₄. (4) Směs plně deacetylovaných COS s DP 1-7 označená "10". (5) Směs plně deacetylovaných COS s DP 1-7 označená "11". Detekce spočívala v namáčení destiček v roztocích (A, B) H₂SO₄ (10 % v EtOH), (C) difenylaminu/anilinu (D) ninhydrinu (2 mg/ml EtOH) a zahřátí horkovzdušnou pistolí.

Vliv kationtů kovů na aktivitu AfCDA

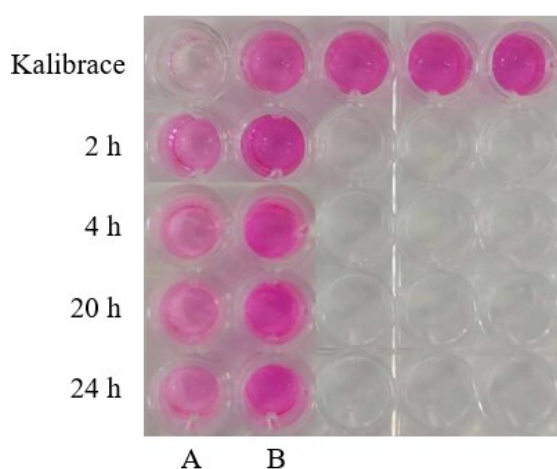
V dalším experimentu byl zkoumán vliv směsi kationtů kovů na aktivitu AfCDA. V jedné ze dvou paralelních reakcí byla část objemu pufru nahrazena 10mM roztokem kationtů kovů Co²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ a Ni²⁺. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC po 1, 2, 4 a 20 h reakce a navíc pomocí komerční soupravy pro stanovení koncentrace acetátu po 2, 4, 20 a 24 h reakce. Reakční směsi měly následující složení:

A: 100 µl 50mM (GlcNAc)₄, 52 µl konc. média (1 µg enzymu/ 50 µl směsi), 298 µl 50mM pufru Tris-HCl (pH 7,5), 50 µl 10mM roztoku kationtů kovů.

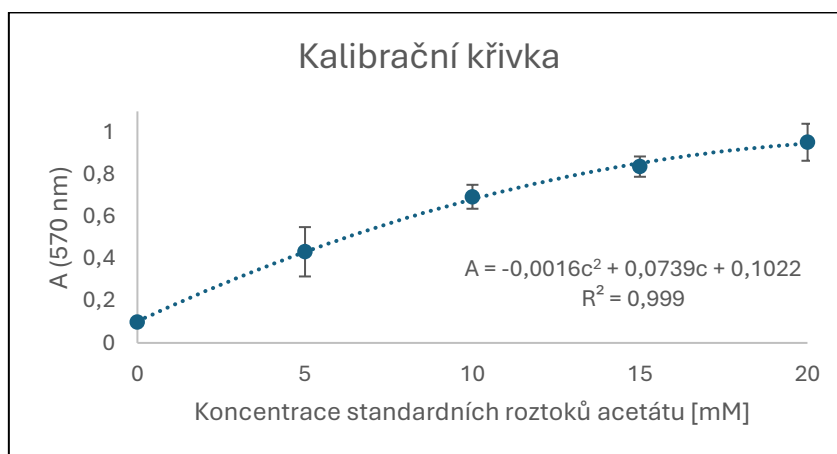
B: 100 µl 50mM (GlcNAc)₄, 52 µl konc. média (1 µg enzymu/ 50 µl směsi), 348 µl 50mM Tris-HCl pufru (pH 7,5).

Očekávali jsme, že přidavek kationtů kovů bude mít pozitivní vliv na aktivitu AfCDA, protože tento enzym ke své funkci vyžaduje dvojmocný kationt kovu. Podle TLC detekce byl mezi složením reakčních směsí však pouze nepatrný rozdíl. Stanovení koncentrace acetátu kolorimetricky pomocí komerční soupravy EnzyChrom™ Acetate Assay Kit (Universal Biologicals Ltd., UK) poskytlo průkaznější výsledek (Obr. 20, Tabulka 13). Koncentrace acetátu, tedy míra konverze reakce, je úměrná intenzitě zbarvení, tj. hodnotě absorbance při vlnové délce 570 nm. Pomocí standardních roztoků acetátu o koncentraci 0, 5, 10, 15 a 20 mM

byla sestrojena kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci acetátu (Obr. 21) a hodnota koncentrace byla přiřazena vzorkům po 2, 4, 20 a 24 h reakce metodou nelineární regrese z kvadratické rovnice kalibrační křivky (Obr. 21), jelikož závislost absorbance na koncentraci při použití této soupravy není lineární. Tato komerční souprava má chráněný obsah a je založena na kaskádě následných reakcí. V reakční směsi bez přídavku roztoku kovů byly hodnoty koncentrace acetátu několikanásobně vyšší a blížily se 10 mM, což je maximální dosažitelná koncentrace acetátu ve vzorcích, protože počáteční koncentrace substrátu substrátu (GlcNAc)₄ ve vzorcích byla 10 mM a z každé molekuly substrátu lze odštěpit maximálně čtyři molekuly acetátu. Zdá se tedy, že 1mM směs kationtů kovů měla na průběh reakce negativní vliv a spíše reakci zpomalila.



Obrázek 20. Stanovení koncentrace acetátu pomocí komerční soupravy EnzyChrom™ Acetate Assay Kit. V první řadě mikrotitrační destičky jsou standardní roztoky acetátu o koncentracích 0, 5, 10, 15 a 20 mM. Ve druhé až páté řadě jsou vzorky reakčních směsí A nebo B po 2, 4, 20 a 24 hodinách reakce. Intenzita zbarvení roztoků v jamkách mikrotitrační destičky, tedy hodnota absorbance při vlnové délce 570 nm, je úměrná koncentraci acetátu, a tedy konverzi reakce.



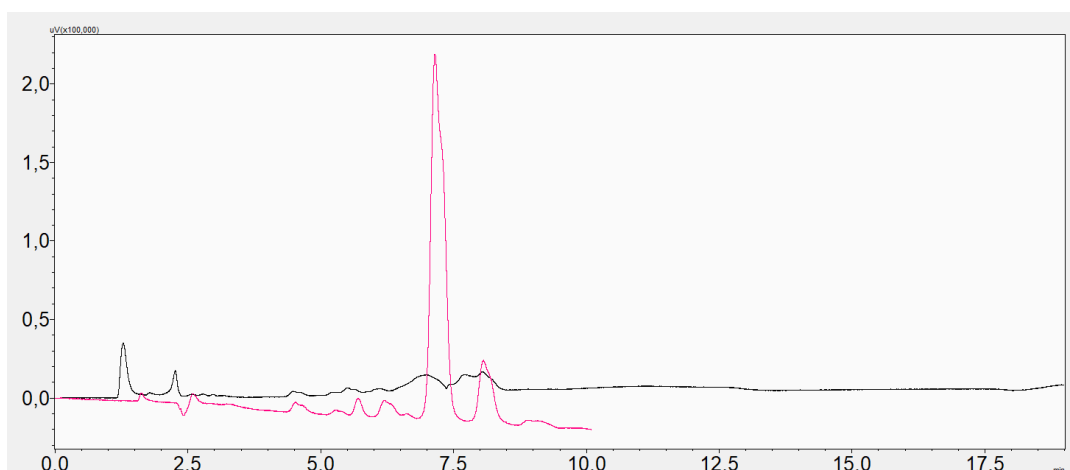
Obrázek 21. Kalibrační křivka závislosti absorbance standardních roztoků acetátu při vlnové délce 570 nm na koncentraci acetátu.

Tabulka 13. Hodnoty absorbancí reakčních směsí v průběhu reakce s odpovídající koncentrací acetátu vypočtenou nelineární regresí z kalibrační křivky.

Reakční doba [h]	Hodnota A (570 nm) Směs A	c (acetát) [mM]	Hodnota A (570 nm) Směs B	c (acetát) [mM]
2	0,25	2,14	0,53	6,84
4	0,27	2,39	0,66	9,55
20	0,30	2,9	0,69	10,31
24	0,30	2,9	0,62	8,59

4.4. HPLC-MS analýzy složení reakčních směsí

Na základě neurčitosti dosud získaných poznatků o aktivitě *A/CDA* byly připraveny reakční směsi pro analýzu pomocí HPLC-MS za účelem získání konkrétnější představy o složení deacetylovaných produktů. Reakce byly nastaveny podobně jako v předchozích experimentech, obsahovaly 10mM substráty (chitooligosacharidy s DP 4 a vyšším), 100mM Tris-HCl pufr (pH 7,5) a 10 μ g *A/CDA* z koncentrovaného produkčního média před purifikací. Použité chitooligosacharidy jsou připravovány v Laboratoři biotransformací kombinací chemických a enzymových metod; mohou obsahovat maximálně 10 % COS s jiným DP jako kontaminant. Množství chitooligosacharidů v reakčních směsích bylo však překvapivě po separaci na koloně HILIC při detekci HPLC-MS velmi nízké ve srovnání s čistým roztokem (GlcNAc)₄ o stejné koncentraci (Obr. 22). Proto byl také zkoumán vliv složení pufru na výsledek HPLC-MS analýzy.

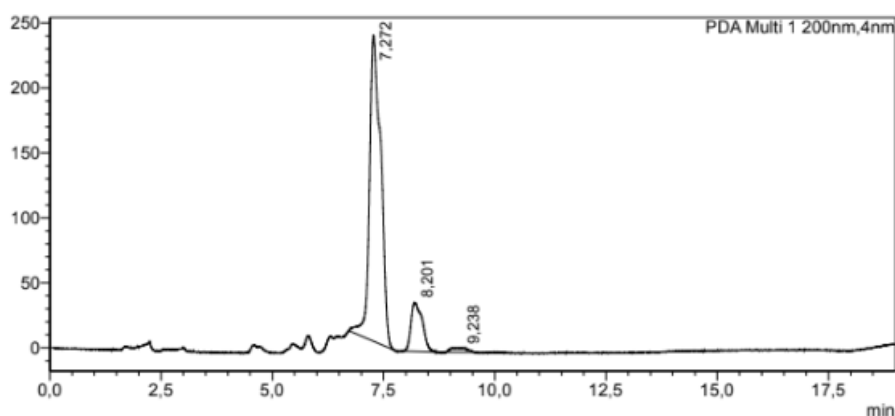


Obrázek 22. Srovnání HPLC chromatogramů (Kolona HILICpak VN-50 4D). Růžová křivka odpovídá složení roztoku substrátu 10mM (GlcNAc)₄ rozpuštěné v 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5). Černá křivka odpovídá složení reakční směsi se stejnou koncentrací (GlcNAc)₄.

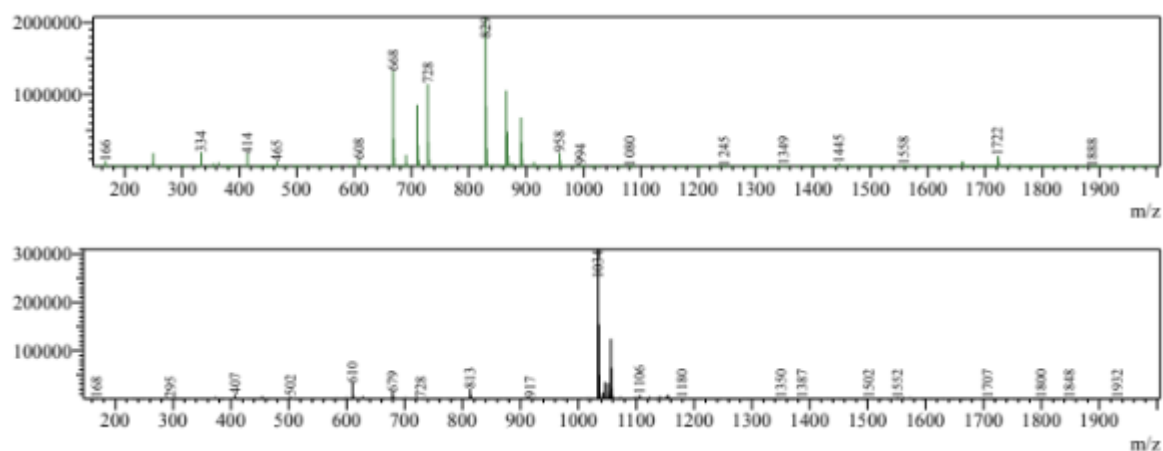
Vliv složení pufru na detekci

V 50mM roztoku (GlcNAc)₄ ve 100mM pufru Tris-HCl (pH 7,5) byly UV detektorem detekovány dva píky s elučními časy 7,272 a 8,201 min (Obr. 23). V prvním, majoritním píku je hlavní složkou (GlcNAc)₄ s relativní intenzitou píku 2×10^6 (Obr. 24). Ve druhém píku je hlavní složkou (GlcNAc)₅ s relativní intenzitou píku 3×10^5 . HILIC chromatogramy a MS

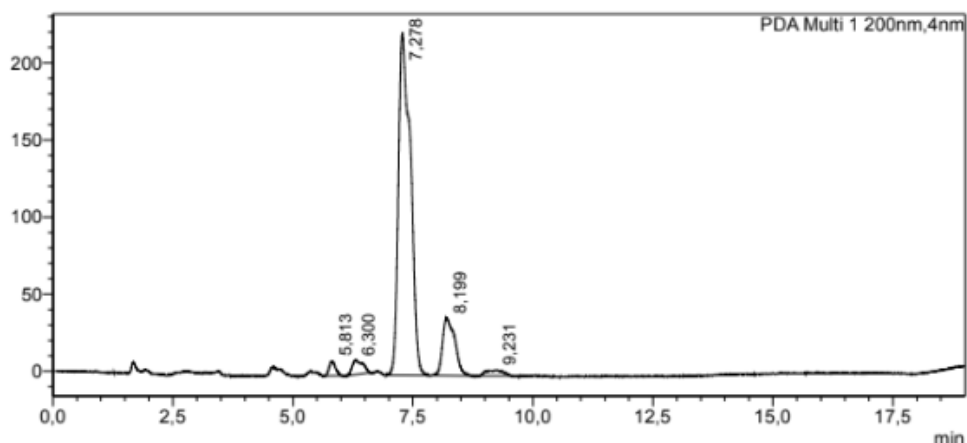
spektra měly prakticky totožné hodnoty a intenzity píků (Obr. 25, 26) ve směsích s Tris-HCl i C-P pufrům. Ukázalo se tedy, že složení pufru nemá vliv na schopnost detekce COS pomocí HPLC-MS, zatímco schopnost detekce COS byla značně potlačena v reakčních směsích s enzymem (Obr. 22), jelikož reakcemi vznikaly částečně deacetylované COS, kterým chybí acetamidová skupina odpovědná za spektrofotometrickou detekci v UV oblasti.



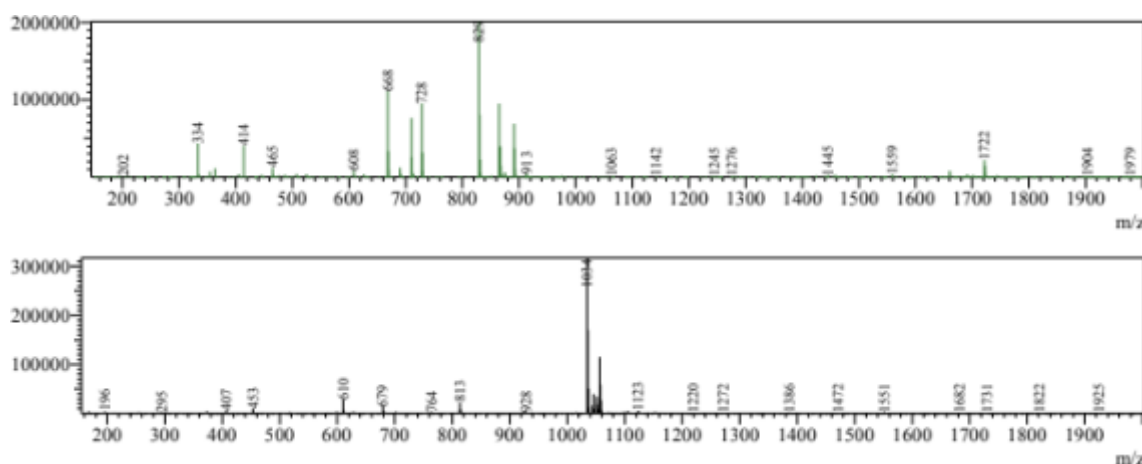
Obrázek 23. HPLC chromatogram 50mM (GlcNAc)₄ v Tris-HCl pufru (pH 7,5).



Obrázek 24. MS spektrum 50mM (GlcNAc)₄ v Tris-HCl pufru (pH 7,5). Horní spektrum: Typ ionizace ESI⁻. Eluční čas 7,215 - 7,281 min. Detekovaný ion [M-H]⁻, m/z 829. Spodní spektrum: Typ ionizace ESI⁺. Eluční čas 8,167 - 8,233 min. Detekovaný ion [M+H]⁺, m/z 1 034.



Obrázek 25. HPLC chromatogram 50mM (GlcNAc)₄ v C-P pufru (pH 7,5).



Obrázek 26. MS spektrum 50mM (GlcNAc)₄ v C-P pufru (pH 7,5). Horní spektrum: Typ ionizace ESI⁻. Eluční čas 7,215 - 7,281 min. Detekovaný ion [M-H]⁻, *m/z* 829. Spodní spektrum: Typ ionizace ESI⁺. Eluční čas 8,167 - 8,233 min. Detekovaný ion [M+H]⁺, *m/z* 1 034.

Reakce AfCDA s COS o vyšším DP

Jedním z cílů této práce bylo zjistit, zda může AfCDA deacetylovat chitoooligosacharidy s vysokým DP (> 6), včetně těch, které nejsou rozpustné ve vodě. Vzhledem k tomu, že vzorky obsahující enzym nebyly separovatelné na koloně HILIC, byla detekce přítomných látek ve vzorcích provedena pouze pomocí hmotnostního detektoru. Byly připraveny 4 reakční směsi obsahující COS s DP 4 (A), DP 5 (B), DP 6 (C) a DP 6-11 (D). Po 0, 1, 2 a 4 hodinách byly odebrány vzorky z těchto reakčních směsí pro MS analýzu a stanovení koncentrace acetátu komerční soupravou EnzyChrom™. Reakční směsi měly následující složení:

A: 250 μ l 20mM (GlcNAc)₄, 1 μ g enzymu/ 50 μ l směsi, 198 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

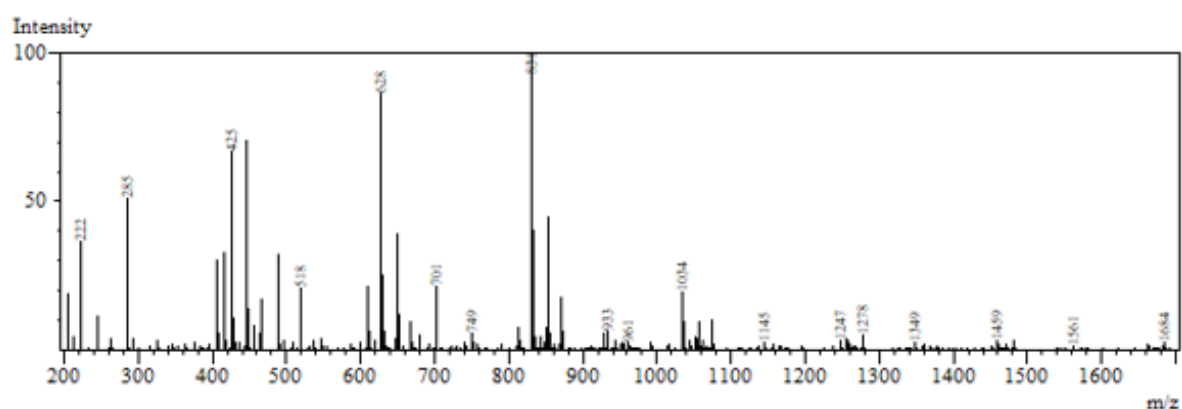
B: 250 μ l 20mM (GlcNAc)₅, 1 μ g enzymu/ 50 μ l směsi, 198 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

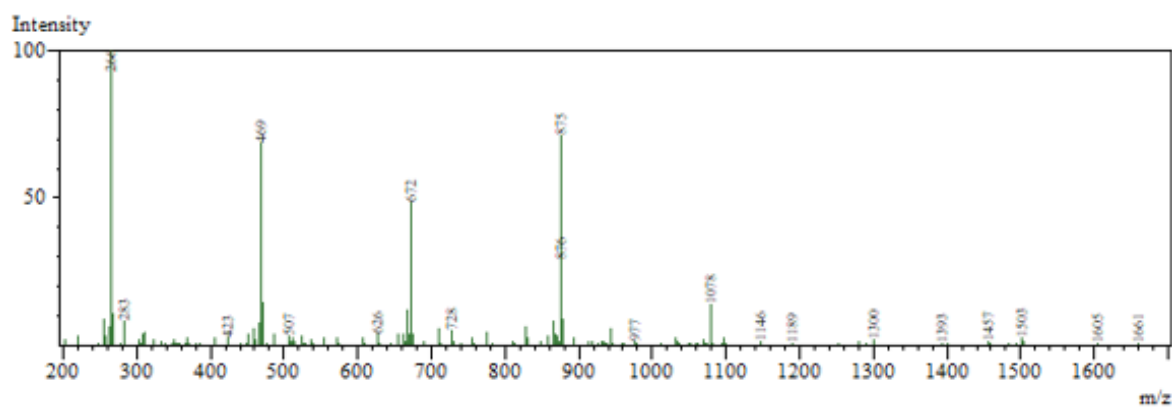
C: 250 μ l 20mM (GlcNAc)₆, 1 μ g enzymu/ 50 μ l směsi, 198 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

D: 250 μ l 20mM COS o DP 6-11, 1 μ g enzymu/ 50 μ l směsi, 198 μ l 100mM Tris-HCl pufru (pH 7,5)

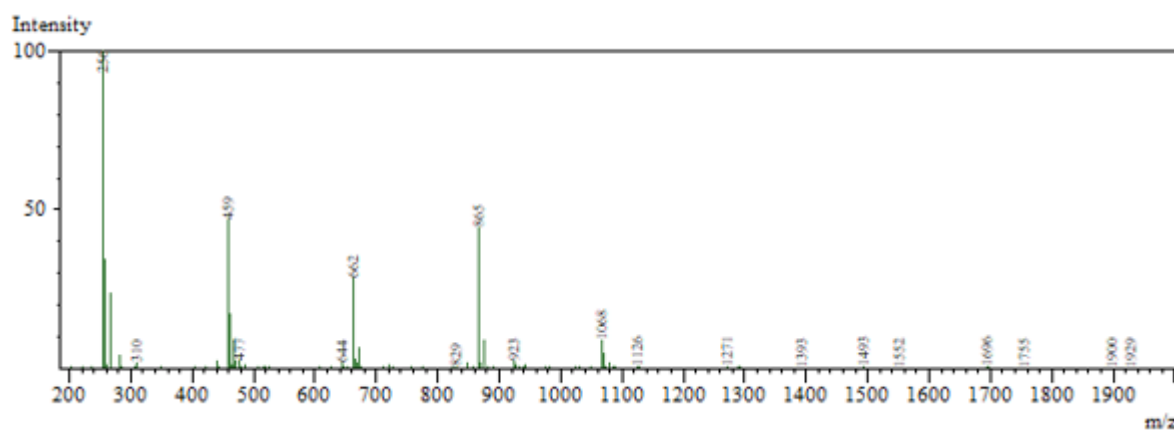
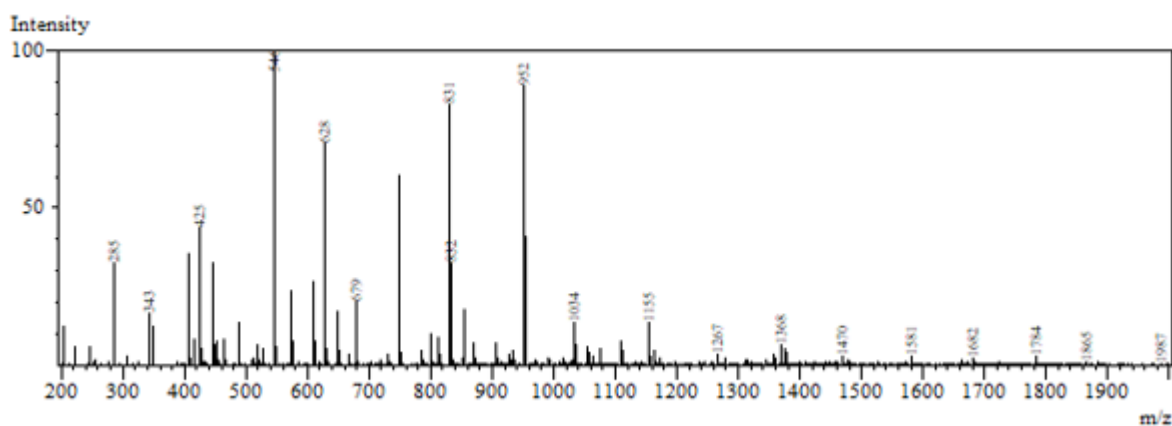
Pro interpretaci hmotnostních spekter byla zhotovena tabulka (Příloha 2) s hodnotami m/z chitooligosacharidů s DP 1-10 a všemi možnými stupněmi deacetylce, kromě jedné acetylované jednotky, protože dosavadní výsledky LC-MS analýzy prokázaly, že *Af*CDA ponechává na substrátech alespoň jednu GlcNAc jednotku. Všem látkám byla přiřazena hodnota m/z pro každý možný asociovaný ion po ionizaci.

Z reakčních směsí byla vybrána vzorová hmotnostní spektra po 1 hodině reakce (Obr. 29, 32, 35, 38). Pro porovnání byly také měřena hmotnostní spektra všech substrátů (tj. DP 4, DP 5, DP 6 a směsi COS s DP 6-11) o stejné koncentraci jako v reakčních směších rozpuštěných ve vodě a v 100mM Tris-HCl pufru (Obr. 27, 28, 30, 31, 33, 34, 36, 37). Detekce chitooligosacharidů UV detektorem je založena na přítomnosti acetamidové skupiny, která je v těchto látkách jedinou skupinou absorbující UV záření, a částečně deacetylované COS, tj. produkty reakcí s *Af*CDA, nemohou tak být tímto způsobem detekce snadno sledovány. Kvůli obtížnosti detekce *pa*COS UV detektorem byly vzorky těchto reakčních směsí nastříknuty přímo do detektoru MS (bez použití chromatografické kolony), čímž se výrazně vylepšila jejich detekce, ačkoliv za cenu nemožnosti kvantitativní analýzy složení směsí.

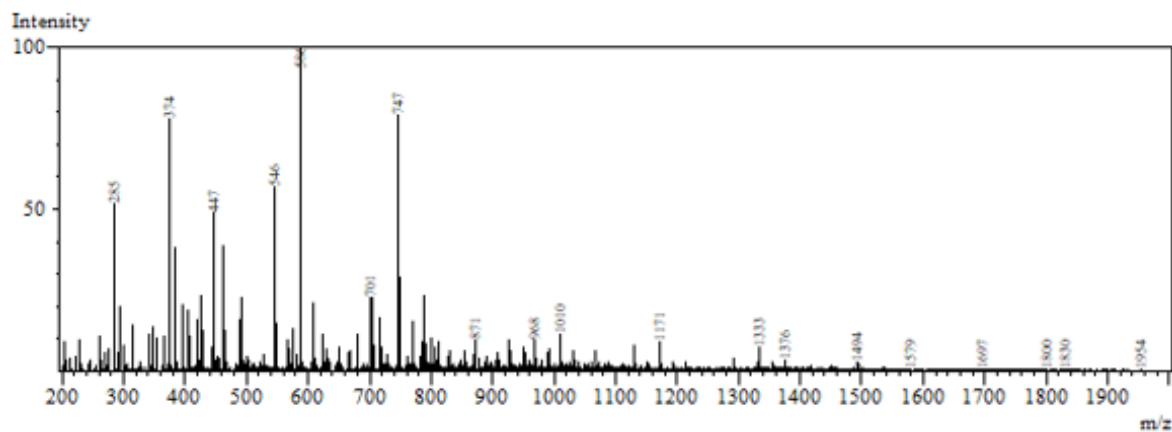


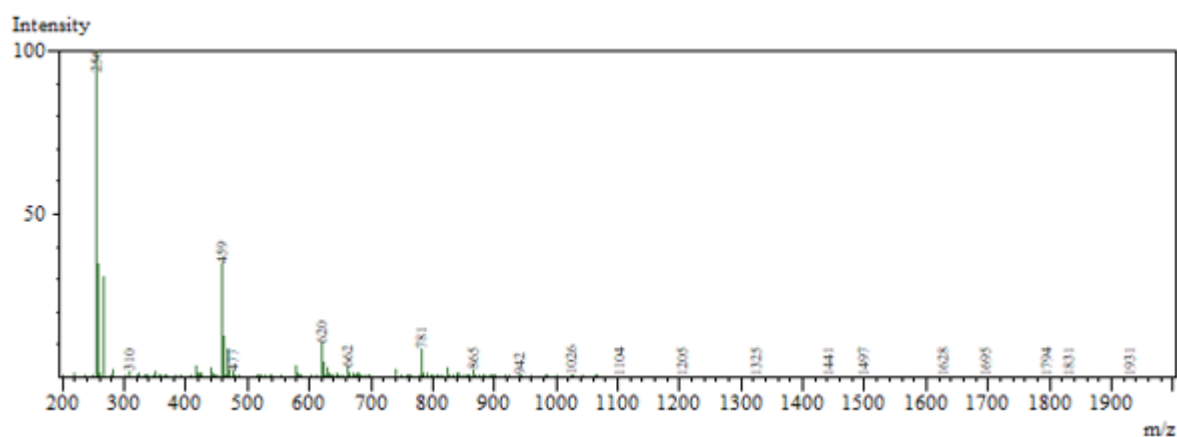


Obrázek 27. MS spektrum 20mM (GlcNAc)₄ ve vodě. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.

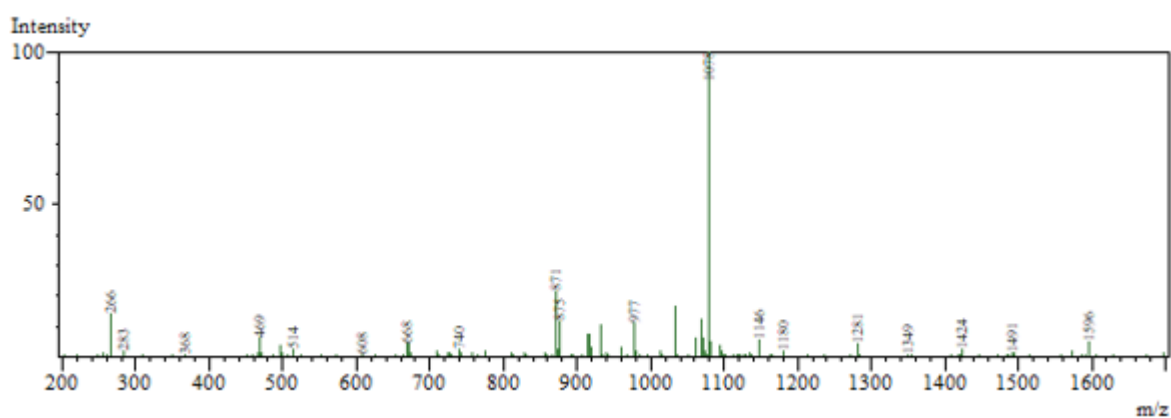
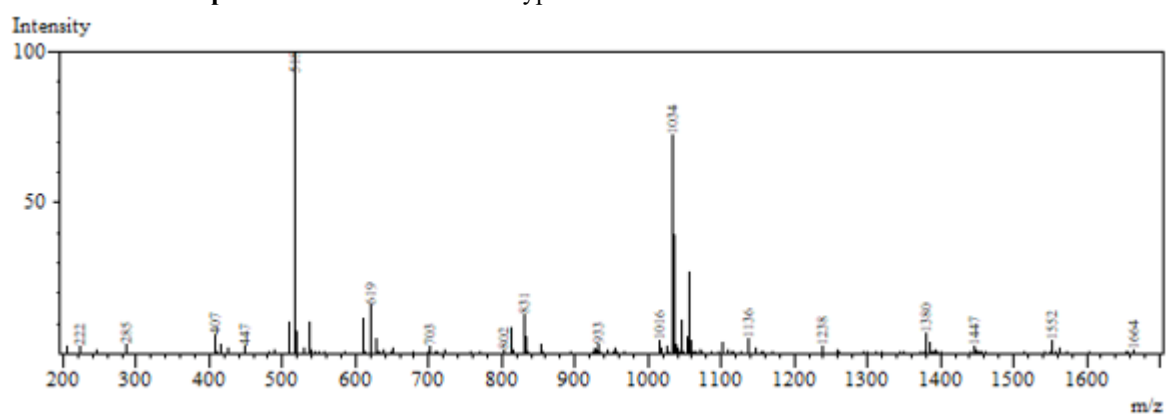


Obrázek 28. MS spektrum 20mM (GlcNAc)₄ v Tris-HCl pufru. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.

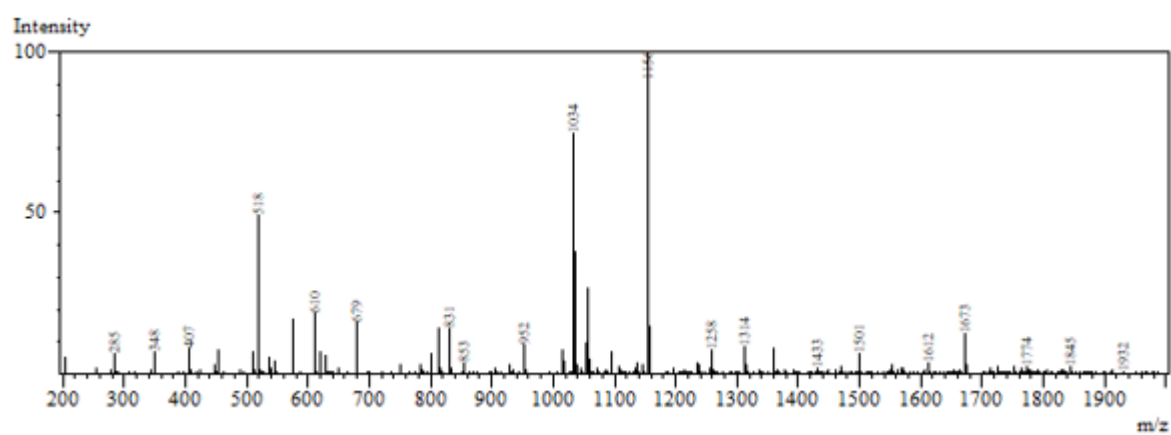


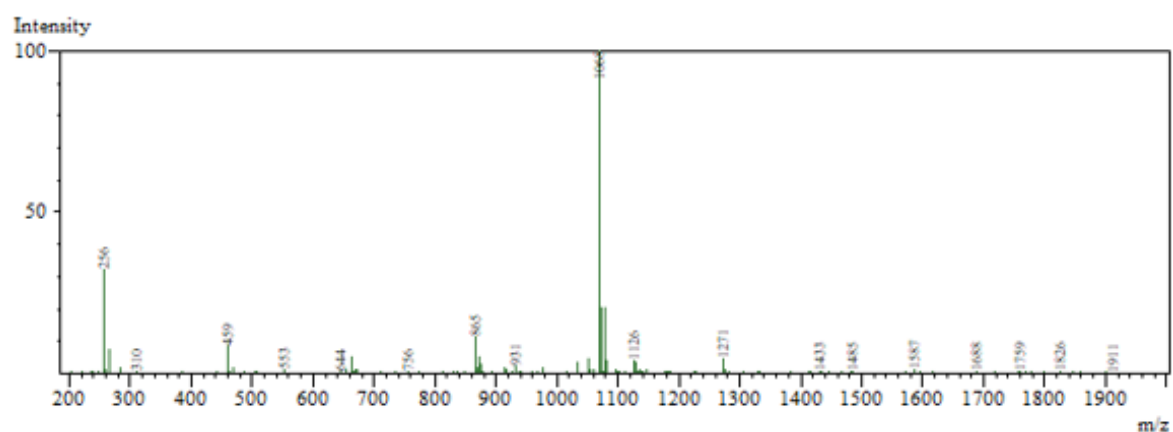


Obrázek 29. MS spektrum reakční směsi A. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.

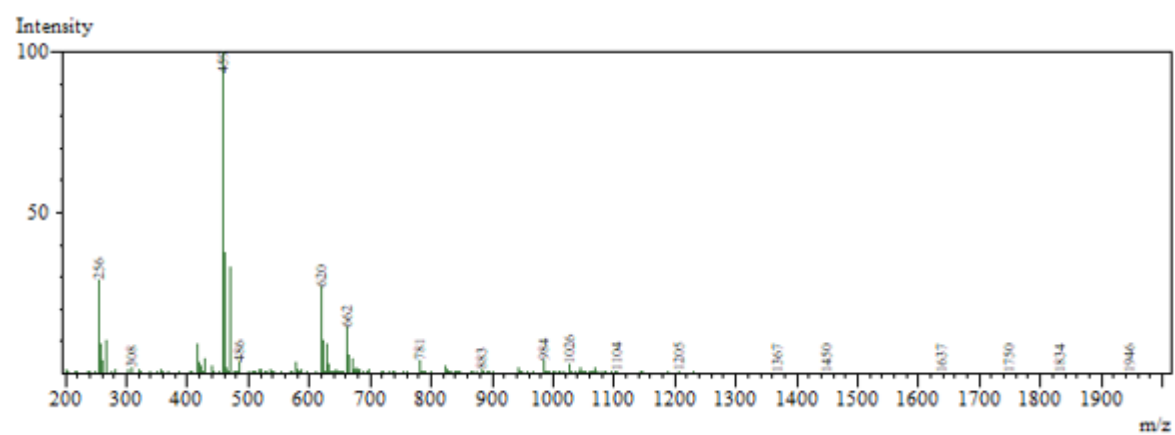
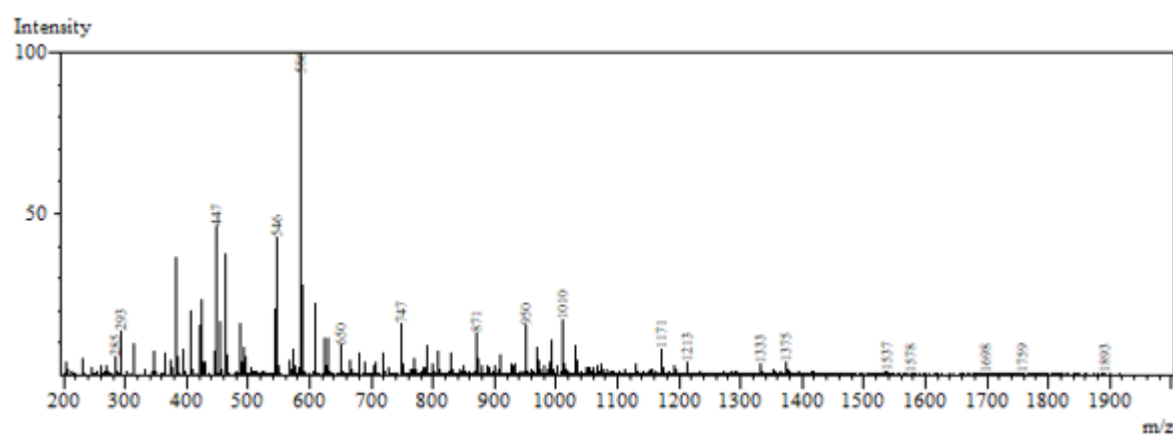


Obrázek 30. MS spektrum 20mM (GlcNAc)₅ ve vodě. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.

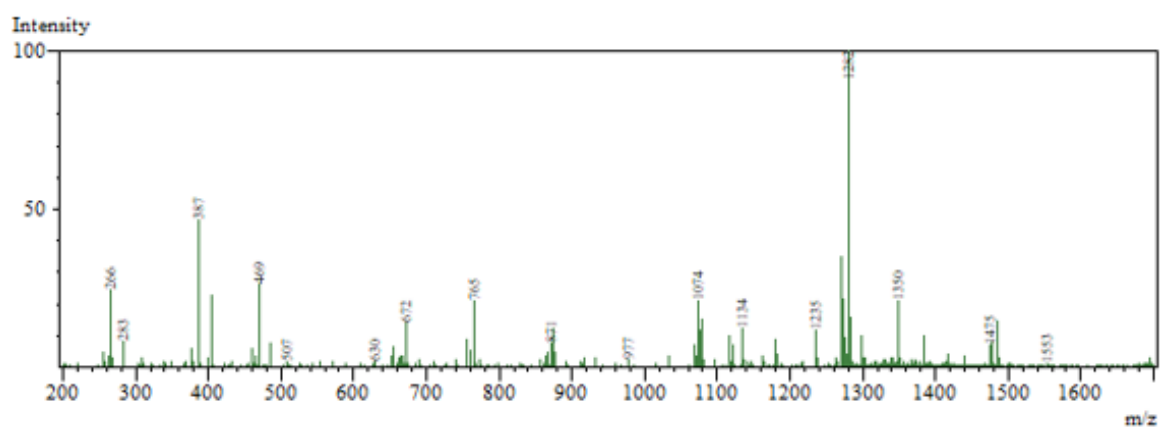
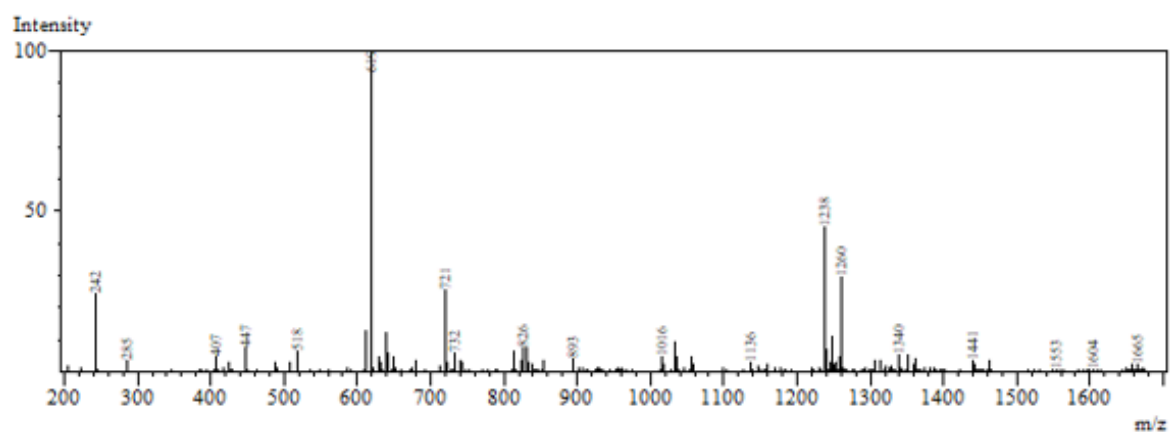




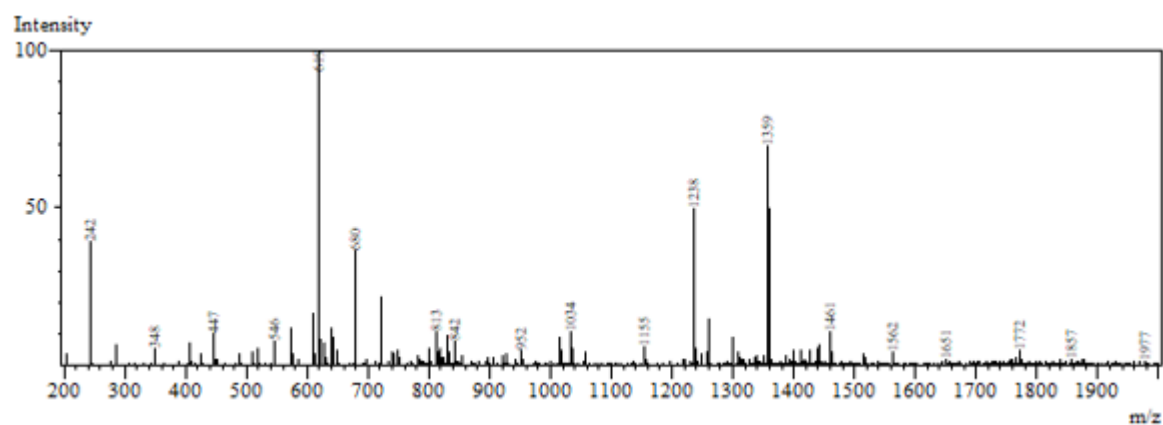
Obrázek 31. MS spektrum 20mM (GlcNAc)₅ v Tris-HCl pufru. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.

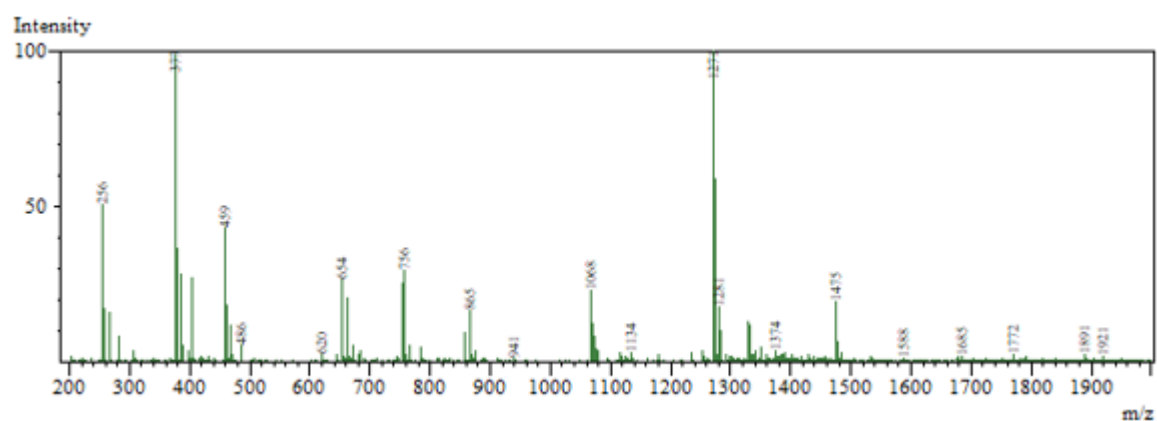


Obrázek 32. MS spektrum reakční směsi B. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.

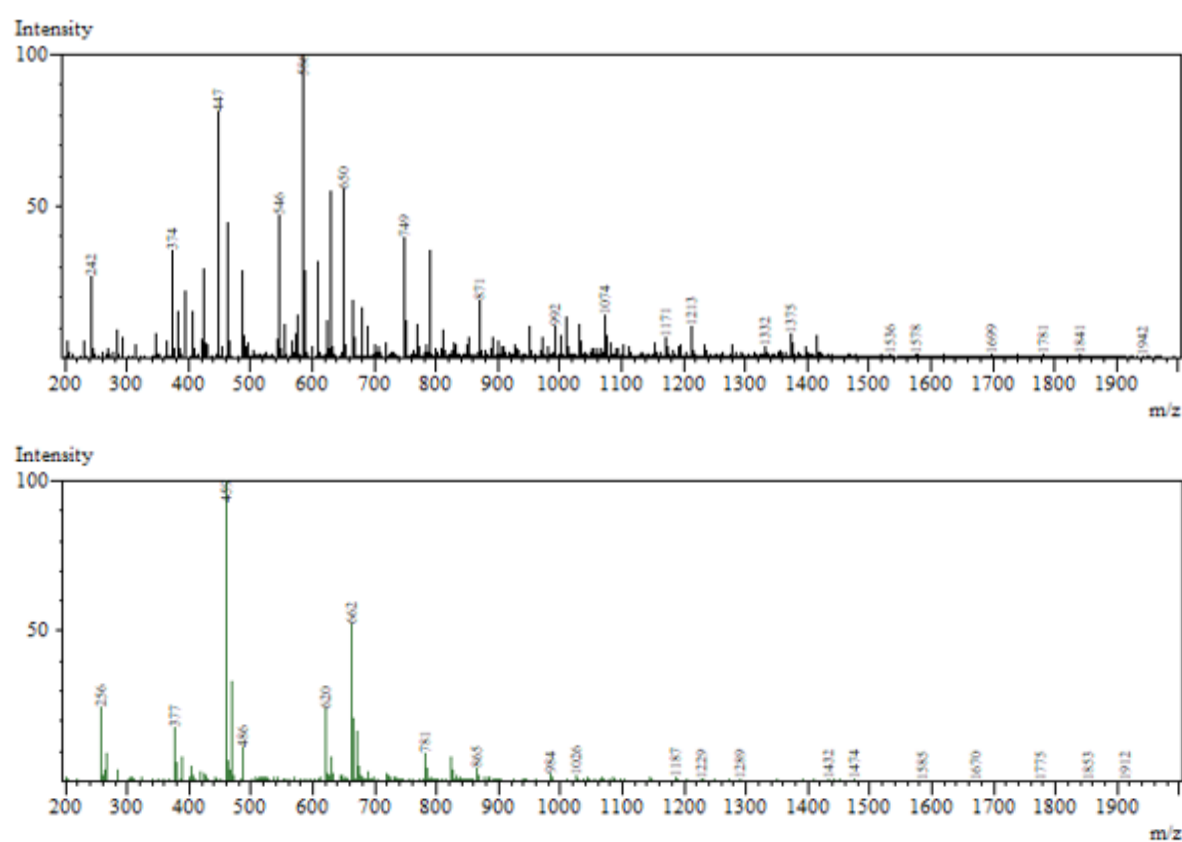


Obrázek 33. MS spektrum 20mM (GlcNAc)₆ ve vodě. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.

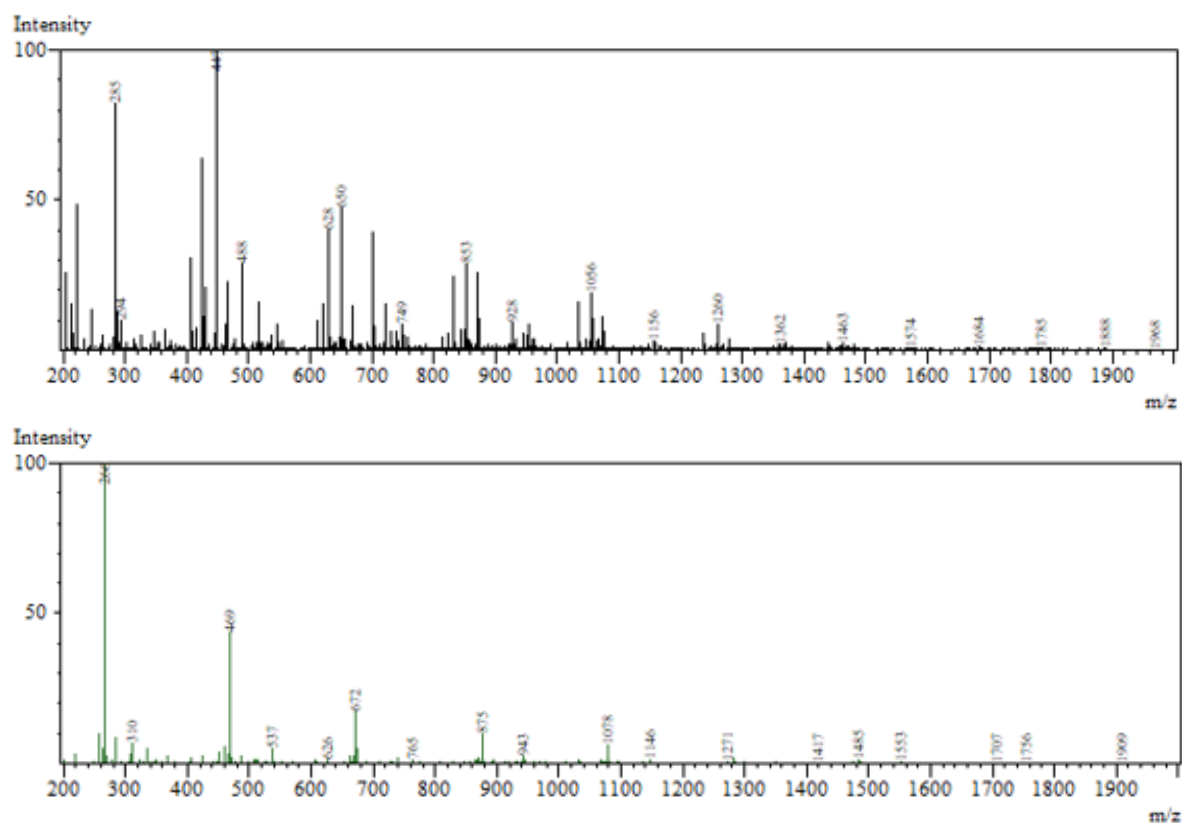




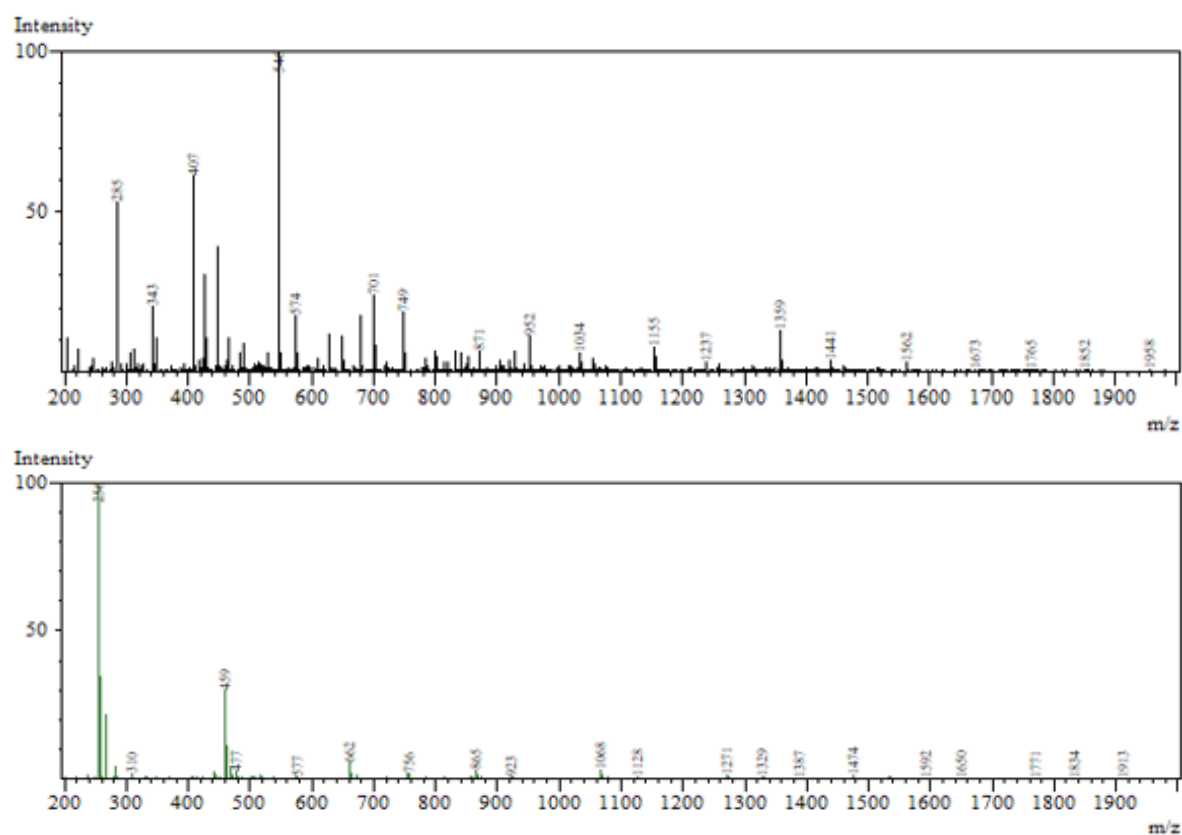
Obrázek 34. MS spektrum 20mM (GlcNAc)₆ v Tris-HCl pufru. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.



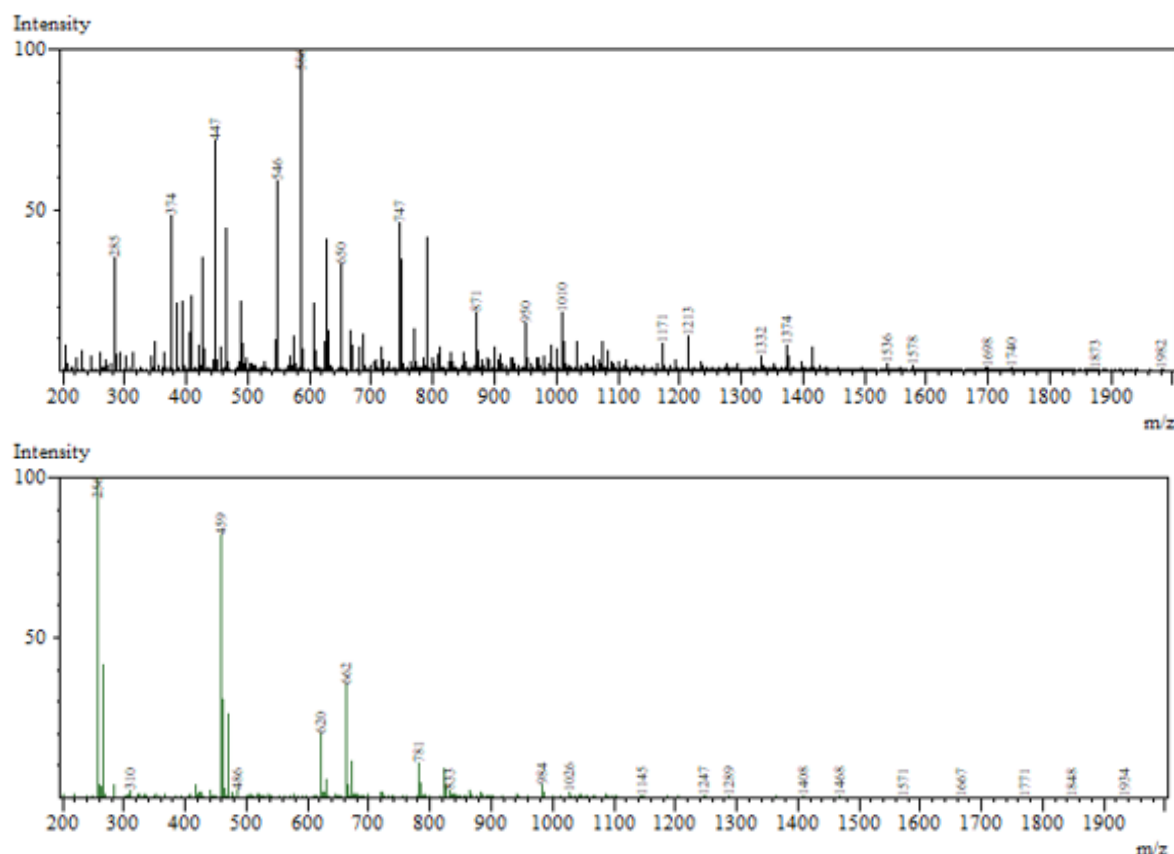
Obrázek 35. MS spektrum reakční směsi C. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.



Obrázek 36. MS spektrum 20mM COS o DP 6–11 ve vodě. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.



Obrázek 37. MS spektrum 20mM COS o DP 6–11 v Tris-HCl pufru. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.



Obrázek 38. MS spektrum reakční směsi D. Typ ionizace ESI⁺ a ESI⁻.

Pomocí hodnot m/z z tabulky možných ionizací chitooligosacharidů o DP 1–10 a DA od jedné acetylované jednotky až po všechny acetylované jednotky (Příloha 2) byly v hmotnostních spektrech identifikovány produkty s různým DA a DP. Produkty reakční směsi A jsou shrnuty v Tabulce 14, směsi B v Tabulce 15, směsi C v Tabulce 16 a směsi D v Tabulce 17. Ve směsích se objevují COS s DP 1 až 8 s různými DA. Složení reakčních směsí se s rostoucí dobou reakce mění jen málo. Značení v tabulkách: (GlcNAc)_n = chitooligosacharid o DP rovno n; A = acetylovaná jednotka, N-acetylglukosamin; D = deacetylovaná jednotka, glukosamin.

Tabulka 14. Chitooligosacharidy detekované v reakční směsi A se substrátem 10mM (GlcNAc)₄ ve vodě nebo v pufru.

voda	pufr	0,08 h	1 h	2 h	4 h
GlcNAc	GlcNAc	A1	A1	A1	A1
(GlcNAc) ₂	(GlcNAc) ₂	A2	A2	A2	A2
(GlcNAc) ₃	(GlcNAc) ₃	A3	A3	A3	A3
		A2D1	A2D1	A2D1	A2D1
(GlcNAc) ₄	(GlcNAc) ₄	A4	A4	A4	A4
		A2D2	A2D2	A2D2	/
		A1D3	A1D3	/	A1D3

(GlcNAc) ₅	(GlcNAc) ₅	/	/	/	/
		A4D1	A4D1	/	A4D1
		A3D2	A3D2	A3D2	A3D2

Tabulka 15. Chitooligosacharidy detekované v reakční směsi B se substrátem 10mM (GlcNAc)₅ ve vodě nebo v pufru.

voda	pufr	0,08 h	1 h	2 h	4 h
GlcNAc	GlcNAc	A1	A1	A1	A1
(GlcNAc) ₂	(GlcNAc) ₂	A2	A2	A2	A2
(GlcNAc) ₃	(GlcNAc) ₃	A3	A3	/	A3
		A2D1	A2D1	A2D1	A2D1
/	(GlcNAc) ₄	/	/	/	/
		A2D2	A2D2	A2D2	A2D2
(GlcNAc) ₅	(GlcNAc) ₅	/	A5	/	/
		A4D1	A4D1	A4D1	A4D1
		A3D2	A3D2	A3D2	A3D2
		/	/	A1D4	A1D4
(GlcNAc) ₆	(GlcNAc) ₆	/	/	/	/
		A4D2	A4D2	A4D2	A4D2
/	(GlcNAc) ₇	/	/	A7	/
		/	A6D1	/	/
		/	/	A4D3	/
		A3D4	/	/	/

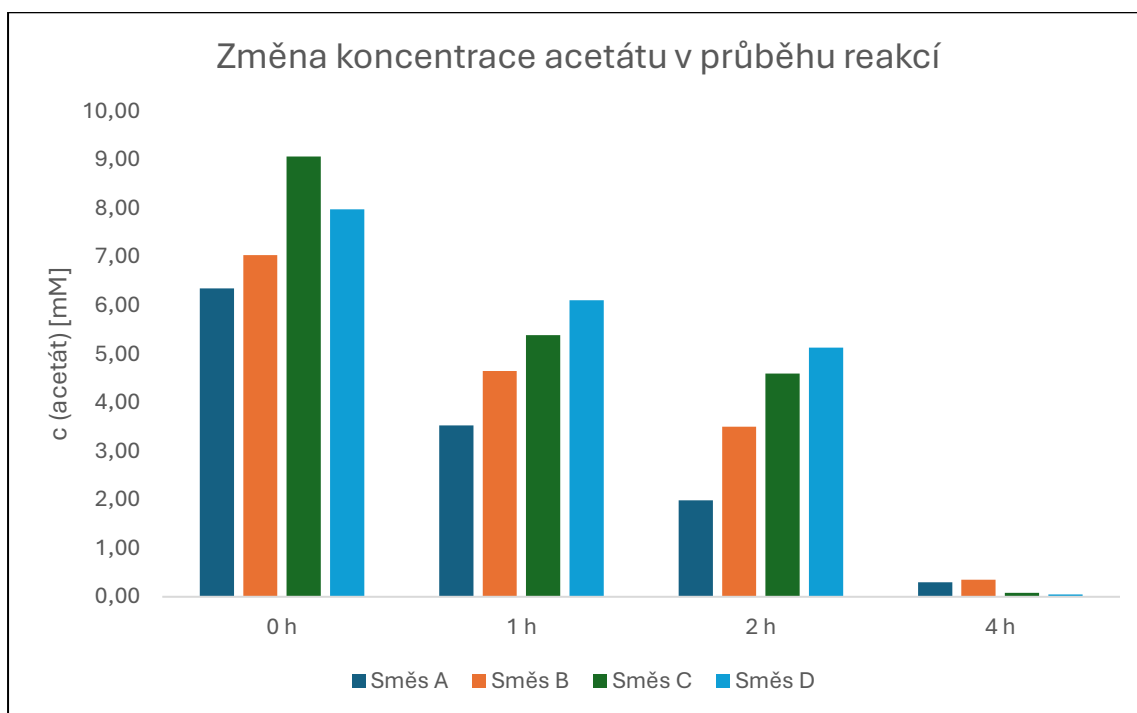
Tabulka 16. Chitooligosacharidy detekované v reakční směsi C se substrátem 10mM (GlcNAc)₆ ve vodě nebo v pufru.

voda	pufr	0,08 h	1 h	2 h	4 h
/	GlcNAc	A1	A1	A1	A1
(GlcNAc) ₂	(GlcNAc) ₂	A2	A2	A2	A2
(GlcNAc) ₃	(GlcNAc) ₃	A3	A3	A3	A3
		A2D1	A2D1	A2D1	A2D1
(GlcNAc) ₄	(GlcNAc) ₄	A4	A4	A4	A4
		/	/	A3D1	/
		A2D2	A2D2	/	A2D2
/	(GlcNAc) ₅	/	/	/	/
		A4D1	A4D1	A4D1	A4D1
		A3D2	A3D2	A3D2	A3D2
(GlcNAc) ₆	(GlcNAc) ₆	/	A6	A6	/
		A5D1	A5D1	A5D1	/
		/	/	A4D2	A4D2
		A3D3	/	A3D3	A3D3
		/	/	/	A2D4
(GlcNAc) ₇	/	/	A7	A7	/
		A6D1	A6D1	A6D1	A6D1
		/	/	A5D2	A5D2

Tabulka 17. Chitooligosacharidy detekované v reakční směsi D se substrátem 10mM COS o DP 6–11 ve vodě nebo v pufru.

voda	pufr	0,08 h	1 h	2 h	4 h
GlcNAc	GlcNAc	A1	A1	A1	A1
(GlcNAc)₂	(GlcNAc)₂	A2	A2	A2	A2
(GlcNAc)₃	(GlcNAc)₃	A3	A3	A3	A3
		A2D1	A2D1	A2D1	A2D1
(GlcNAc)₄	(GlcNAc)₄	A4	A4	A4	A4
		A3D1	/	A3D1	/
		A2D2	A2D2	/	A2D2
(GlcNAc)₅	(GlcNAc)₅	/	/	/	/
		A4D1	A4D1	A4D1	A4D1
		A3D2	A3D2	A3D2	/
		/	/	/	A2D3
(GlcNAc)₆	(GlcNAc)₆	/	/	/	/
		A4D2	A4D2	A4D2	A4D2
		A3D3	A3D3	/	A3D3
		A2D4	A2D4	A2D4	/
(GlcNAc)₇	(GlcNAc)₇	/	/	/	/
		/	/	/	A6D1
		/	A5D2	A5D2	A5D2
(GlcNAc)₈	/	/	/	/	/
		A3D5	/	/	/

Stanovením koncentrace acetátu v reakčních směsích (Obr. 39) bylo prokázáno, že nejvyšší konverze reakce byla dosažena ve vzorcích reakčních směsí označené jako 0,08 h reakce. V době mezi smícháním reakčních komponentů a následné okamžité tepelné inaktivaci směsí při 99 °C po dobu 5 min tedy evidentně došlo k velmi rychlé deacetylaci substrátů, zřejmě je CDA velmi termostabilní enzym. Zajímavé je, že ve všech reakčních směsích s COS substráty s různým DP docházelo k postupnému úbytku detekovaného acetátu. Při vyloučení možnosti nesprávného použití analytické soupravy (kalibrace vyšla dobře) je možným vysvětlením reverzibilita deacetylační reakce, jelikož některé chitindeacetylasy jsou naopak využívány ke specifické acetylaci deacetylovaných chitooligosacharidů. Této teorii by mohlo odpovídat i měnící se složení produktů v reakčních směsích v různém čase. Pro potvrzení tohoto komplexního průběhu deacetylační/acetylační reakce je ovšem nutná analýza na moderním HPLC-MS přístroji s podstatně lepším MS detektorem, který dokáže stanovit obsah jednotlivých látek ve směsi kvantitativně, nikoliv pouze kvalitativně jako v našem případě.



Obrázek 39. Stanovení koncentrace acetátu v reakčních směsích A–D po 0, 1, 2 a 4 hodinách reakce pomocí komerční soupravy EnzyChrom™ Acetate Assay kit. Hodnoty koncentrací byly vypočteny metodou nelineární regrese z kalibrační křivky závislosti A při 570 nm na koncentraci acetátu (Obr. 21). Měření absorbance každého vzorku bylo provedeno v triplicátu.

5. Diskuze

Chitoooligomery jsou oligosacharidy složené z jednotek glukosaminu a *N*-acetylglukosaminu s významnými biologickými aktivitami a zajímavými možnostmi aplikací v medicíně, farmacii a zemědělství [7-9]. Přestože se jedná o velmi žádané látky, jejich syntéza, ať už chemickou nebo enzymovou cestou, je poměrně složitá a příprava jednotlivých chitoooligomerů s přesně definovaným stupněm polymerace, stupněm acetylace a dokonce definovaným acetylačním vzorcem je velmi technicky náročná [5,14,15]. V této bakalářské práci bylo cílem přispět k možnostem enzymové syntézy definovaných částečně acetylovaných chitoooligomerů heterologní expresí a charakterizací nové chitindeacetylasy z vláknité houby *Aspergillus flavus* (*AfCDA*), která byla vybrána v databázi genových sekvencí na základě podobnosti s dobře charakterizovanou chitindeacetylasou z *Aspergillus nidulans* [104].

Expresní plasmid pPICZ α A-*AfCDA* nesoucí gen kódující *AfCDA* byl komerčně syntetizován, zároveň byla nukleotidová sekvence *AfCDA* optimalizována pro lepší expresní výtěžky v kvasinkovém systému *Pichia pastoris* (Generay, Čína). Expresní systém methylotrofní kvasinky *P. pastoris* byl zvolen z důvodu velmi dobrých zkušeností s heterologní expresí zejména fungálních enzymů, ale i jiných eukaryotických proteinů v Laboratoři biotransformací [90]. Kompetentní buňky *P. pastoris* KM71H byly úspěšně transformovány vektorem pPICZ α A-*AfCDA* elektroporací, což bylo ověřeno kultivací na agarovém médiu obsahujícím zeocin. Po elektroforetické separaci proteinů z prvotních produkčních médií byla prokázána schopnost transformovaných buněk produkovat cílový rekombinantní enzym *AfCDA*. Pomocí elektroforézy a stanovení koncentrace acetátu v reakčních směsích byla vybrána buněčná kolonie s nejvyšší produkční schopností. Transformované buňky *P. pastoris* produkovaly rekombinantní *AfCDA* v měřítku cca 1 g/l média, přičemž tento enzym byl majoritně exprimovaným proteinem.

Velkoobjemová produkce *AfCDA* byla úspěšná pouze tehdy, když byl do produkčního média přidán roztok kationtů kovů Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} a Ni^{2+} . Přídavek směsi dvojmocných kationtů kovů byl zvolen kvůli tomu, že aktivní místo takový kation obsahuje a enzym ho potřebuje pro svou aktivitu. Vzhledem k tomu, že zatím není známo, který z běžně se vyskytujících kationtů váže *AfCDA* (např. CDA z *A. nidulans* obsahuje Co^{2+} [104]), byla zvolena směs těchto iontů v ekvimolárním poměru. Zásadní důležitost dostupnosti těchto kovových kationtů byla prokázána nepřítomností *AfCDA* v produkčním médiu bez přídavku

směsi kationtů. Zajímavé však je, že přidavek roztoku kovů přímo do reakční směsi ve finální koncentraci 1 mM způsobil výrazné snížení enzymové aktivity *AfCDA*. Studie, která zkoumala vliv několika kationtů kovů na aktivitu CDA ze *Streptomyces bacillaris*, ukázala, že enzymová aktivita se zvýšila po přidání Co^{2+} a Ni^{2+} , výrazně se zvýšila po přidavku Mn^{2+} , ale byla mnohem výrazněji inhibována přidavkem Zn^{2+} [114]. Protože použitá směs kationtů kovů obsahovala kovy s pozitivním vlivem na aktivitu, ale také Zn^{2+} , jehož negativní vliv je zřejmě mnohem silnější, výsledným efektem mohlo být i snížení enzymové aktivity.

Purifikace enzymu z produkčního media pomocí FPLC nebyla příliš úspěšná, přestože čistota produkovaného enzymu v mediu byla již v surovém stavu poměrně vysoká (Obr. 15). Z aminokyselinové sekvence *AfCDA* bylo vypočítáno teoretické pI 4,9 enzymu; pH pufrů pro purifikaci enzymu pomocí iontoměničové chromatografie bylo zvoleno tak, aby se lišilo minimálně o 1 od pI. Pro první purifikaci byla použita katexová kolona Fractogel a pH pufru bylo 3,5. *AfCDA* se na kolonu nezachytila a byla nalezena v mediu, které přes tuto kolonu prošlo. Pro druhou purifikaci byla použita anexová kolona a pH pufrů bylo 7. I přes pH vhodné pro purifikaci proteinu o izoelektrickém bodu 4,9 se opět nepodařilo *AfCDA* navázat na kolonu a poté uvolnit gradientem NaCl. Enzym byl po průchodu kolonou zachycen a po koncentrování se na SDS-PAGE gelu jevil jako čistý (Obr. 16). Není zřejmé, proč nedošlo v ani jednom případě k efektivnímu navázání *AfCDA* na nosič v koloně. Pravděpodobně byla příliš vysoká iontová síla nanášeného roztoku, i když byl mnohonásobně zředěn vodou a jeho konduktivita byla nižší než 10 mS/cm, což pro purifikace na iontoměničových kolonách obvykle postačuje. Místo purifikovaného enzymu bylo vzhledem k časovým možnostem v reakcích použito koncentrované nepurifikované médium.

Katalytická aktivita připravené chitindeacetylasy byla stanovena reakcemi s chitooligomery o DP 4 a vyšším, které jsou připravovány v Laboratoři biotransformací kombinací chemických a enzymových metod a purifikovány gelovou permeační chromatografií. Analýza těchto reakčních směsí a případných produktů je komplikovaná, jelikož žádná jednoduchá metoda pro přímé stanovení chitindeacetylasy aktivy dosud nebyla popsána. Vznik deacetylovaných chitooligomerů byl sledován dostupnými metodami; v této práci byly použity metody tenkovrstvé chromatografie (TLC), vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV a hmotnostním detektorem (HPLC-MS), hmotnostní spektrometrie a sledování vzniku acetátového iontu pomocí komerční soupravy s chromogenním substrátem a spektrofotometrickou detekcí.

Tenkovrstvá chromatografie se ukázala jako ne úplně nejvhodnější metoda pro separaci plně a částečně acetylovaných chitooligomerů. Byly vyzkoušeny tři mobilní fáze a tři metody vizualizace skvrn. Nejlepší mobilní fází pro separaci chitooligosacharidů pomocí TLC v reakčních směsích byla MF se složením *n*-BuOH : MeOH : 25% NH₄OH aq. : H₂O v poměru 5 : 4 : 2 : 1 (v/v/v/v), která vytvářela ostré, definované a dobře separované skvrny, ale po použití plně deacetylovaných standardů COS s DP 1-7 se ukázalo, že není schopna separovat COS s nízkým DA. Metoda TLC byla za účelem sledování složení reakčních směsí nahrazena HPLC-MS.

Analýza reakčních směsí pomocí hmotnostní spektrometrie poskytla klíčové informace o aktivitě *Af*CDA. Nejprve byly testovány možnosti separace vzorků reakčních směsí pomocí HPLC s UV a MS detekcí, bohužel se i tato metoda ukázala jako nevhodná. U vzorků obsahujících velkou část deacetylovaných COS nebylo možné tyto látky detekovat UV detektorem (Obr. 22) a i odezva z MS detektoru byla velmi slabá, přestože analogická analýza čistých substrátů byla v pořádku (Obr. 22-26). Vzhledem k tomu, že za detekci COS v UV spektru je zodpovědná acetamidová skupina GlcNAc, je pochopitelné, že detekce UV detektorem byla náročná.

Kvůli praktické nemožnosti detekce *pa*COS UV detektorem byly při poslední analýze nastříknuty vzorky reakčních směsí přímo do detektoru MS, čímž se výrazně zlepšila jejich detekce, ale tímto postupem byla znemožněna kvantifikace složení směsí. Častými detekovanými reakčními produkty byly téměř plně deacetylované COS obsahující pouze jednu acetylovanou jednotku GlcNAc. Podle výsledků LC-MS analýzy je *Af*CDA schopna deacetylovat chitooligosacharidy s DP 3–8. COS s DP ≥ 6 jsou málo, nebo úplně nerozpustné ve vodě, ale *Af*CDA je schopna deacetylovat i tyto oligosacharidy, ve směsi produktů byly detekovány deriváty COS s DP až 8. Vzor acetylace většiny COS produkovaných reakcí s *Af*CDA je pravděpodobně AD_n nebo D_nA, tj. redukující nebo neredukující konec řetězce zůstává vždy acetylovaný. V hmotnostních spektrech byly pozorovány pravidelné poklesy hodnoty intenzity píků konečných produktů, které byly úměrné reakční době. Toto pozorování bylo potvrzeno stanovením koncentrace acetátu ve stejných vzorcích z reakčních směsí komerční soupravou EnzyChrom™ (Obr. 39). Rychlost enzymové deacetylase COS byla evidentně dosti vysoká a konečné produkty se ve vzorcích objevovaly již prakticky okamžitě po zahájení reakce. Enzym *Af*CDA má pravděpodobně vysokou termostabilitu a během pětiminutové inkubace v termomixeru byl schopen deacetylovat relativně velké množství substrátů předtím, než byl denaturován. Už po 1 hodině reakce začala postupně klesat

koncentrace acetátu ve vzorcích reakčních směsí. Tuto pozorovanou skutečnost si vysvětlují tak, že chitindeacetylasy mohou katalyzovat taktéž zpětnou acetylaci chitosanu a *pa*COS, ale obecně při jiných reakčních podmínkách, hlavně při nadbytku acetátu ve směsi [113]. Domnívám se, že zpětná acetylace produktů je jediným vysvětlením pro pokles koncentrace acetátu s rostoucí reakční dobou; složení reakční směsi a poměr acetylovaných skupin v COS se evidentně dynamicky mění v průběhu reakce.

V souhrnu lze tedy konstatovat, že *Af*CDA připravená a charakterizovaná v této bakalářské práci je aktivní chitindeacetylasy, která je pravděpodobně termostabilní a schopná deacetylovat a zpětně acetylovat chitooligomery s DP 3-8. V budoucích experimentech s *Af*CDA by bylo vhodné upravit podmínky purifikace FPLC a HPLC-MS detekce. V případě analýz pomocí HPLC-MS by bylo potřeba použít modernější přístroj HPLC-MS² s Q-TOF detektorem, který by byl schopen identifikovat jednotlivé produkty a dokonce je kvantifikovat. S pomocí takového přístroje by bylo možné snadno optimalizovat reakční podmínky tak, aby bylo možné získat konkrétní deacetylované COS s co nejvyšším výtěžkem. Alternativní metodou pro sledování kinetického průběhu reakcí by mohlo být fluorimetrické stanovení volných aminoskupin pomocí fluoreskaminu. Jedná se o fluorogen, který při reakci s primárními aminoskupinami emituje záření o vlnové délce 470 nm a intenzita zbarvení, tj. absorbance, je přímo úměrná množství volných aminoskupin, tj. množství deacetylovaných jednotek COS [115]. Vzhledem k časovým možnostem vypracování této práce nebyla metoda s fluoreskaminem zatím testována.

6. Závěr

Chitindeacetylase z *Aspergillus flavus* (AfCDA) byla úspěšně produkována v expresním systému *Pichia pastoris*. Purifikace enzymu pomocí FPLC nebyla úspěšná a v reakčních směsích byl používán surový enzym z koncentrovaného produkčního média. AfCDA je podle výsledků HPLC-MS schopna velmi rychle a účinně deacetylovat chitooligosacharidy se stupněm polymerizace 3–8 s výsledným vzorem acetylace pravděpodobně AD_n nebo D_nA. AfCDA je vysoce termostabilní a za stejných reakčních podmínek pravděpodobně katalyzuje i zpětnou acetylaci produktů. Tento jev bude ještě dále studován mimo rozsah této práce.

Literatura

- [1] A. B. Boraston, A. Lammerts van Bueren, E. Ficko-Blean, D. W. Abbott, „3.29 - Carbohydrate–Protein Interactions: Carbohydrate-Binding Modules", *Comprehensive Glycoscience*, Oxford: Elsevier, 2007, s. 661–696. doi: 10.1016/B978-044451967-2/00069-6.
- [2] G. M. Mathew, D. C. Matthew, R. Sukumar, R. Sindhu, C. Huang, „Sustainable and eco-friendly strategies for shrimp shell valorization", *Environ. Pollut.*, roč. 267, s. 656, 2020, doi: 10.1016/j.envpol.2020.115656.
- [3] B. Moussian, Q. Yang, T. Fukamizo, „Chitin: Structure, Chemistry and Biology", *Targeting Chitin-containing Organisms*, Springer, 2019, s. 5–18. doi: 10.1007/978-981-13-7318-3_2.
- [4] M. V. Tsurkan, A. Voronkina, Y. Khrunyk, M. Wysokowski, I. Petrenko, H. Ehrlich, „Progress in chitin analytics", *Carbohydr. Polym.*, roč. 252, s. 117204, 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117204.
- [5] C. Schmitz, L. González Auza, D. Koberidze, S. Rasche, R. Fischer, L. Bortesi, „Conversion of Chitin to Defined Chitosan Oligomers: Current Status and Future Prospects", *Mar. Drugs*, roč. 17, 2019, doi: 10.3390/md17080452.
- [6] A. Domard, „A perspective on 30 years research on chitin and chitosan", *Carbohydr. Polym.*, roč. 84, s. 696–703, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.083.
- [7] I. Hamed, F. Özogul, J. M. Regenstein, „Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review", *Trends Food Sci. Technol.*, roč. 48, s. 40–50, 2016, doi: 10.1016/j.tifs.2015.11.007.
- [8] C. Peniche, W. Argüelles-Monal, F. M. Goycoolea, „Chapter 25 - Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications", *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Elsevier, 2008, s. 517–542. doi: 10.1016/B978-0-08-045316-3.00025-9.
- [9] I. Younes, M. Rinaudo, „Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications", *Mar. Drugs*, roč. 13, 2015, doi: 10.3390/md13031133.
- [10] H. K. No, E. Y. Hur, „Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Preparation of Chitin", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 46, s. 3844–3846, 1998, doi: 10.1021/jf9802676.
- [11] M. Bajaj, J. Winter, C. Gallert, „Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from *Crangon crangon* shrimp waste", *Biochem. Eng. J.*, roč. 56, s. 51–62, 2011, doi: 10.1016/j.bej.2011.05.006.
- [12] Y. M. Lv, P. Laborda, K. Huang, Z. P. Cai, M. Wang, „Highly efficient and selective biocatalytic production of glucosamine from chitin", *Green Chem.*, roč. 19, s. 527–535, 2017, doi: 10.1039/C6GC02910H.
- [13] Z. Huang, X. Lv, G. Sun, X. Mao, W. Lu, „Chitin deacetylase: from molecular structure to practical applications", *Syst. Microbiol. Biomanufacturing*, roč. 2, s. 271–284, 2022, doi: 10.1007/s43393-022-00077-9.
- [14] S. N. Hamer, S. Cord, X. Biarnés, A. Planas, H. Waagem, B. Moerschbacher, „Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases", *Sci. Rep.*, roč. 5, s. 8716, 2015, doi: 10.1038/srep08716.
- [15] P. Santos-Moriano, P. Kidibule, N. Míguez, L. Fernández, A. O. Ballesteros, M. Fernández, F. J. Plou, „Tailored Enzymatic Synthesis of Chitooligosaccharides with Different Deacetylation Degrees and Their Anti-Inflammatory Activity", *Catalysts*, roč. 9, 2019, doi: 10.3390/catal9050405.

- [16] N. Miguez, P. Kidibule, P. Santos-Moriano, A. O. Ballesteros, „Enzymatic Synthesis and Characterization of Different Families of Chitooligosaccharides and Their Bioactive Properties", *Appl. Sci.*, roč. 9, 2019, doi: 2076-3417/11/7/3212.
- [17] E.-K. Kim, Z. P. Cai, „Chitooligosaccharides induce apoptosis in human myeloid leukemia HL-60 cells", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, roč. 22, s. 6136–6138, 2012, doi: 10.1016/j.bmcl.2012.08.030.
- [18] B. K. Park, M.-M. Kim, „Applications of Chitin and Its Derivatives in Biological Medicine", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 11, 2010, doi: 10.3390/ijms11125152.
- [19] C. F. de Assis, N. K. Araújo, M. G. B. Pagnoncelli, M. R. da Silva Pedrini, G. R. de Macedo, E. S. dos Santos, „Chitooligosaccharides enzymatic production by *Metarhizium anisopliae*", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, roč. 33, s. 893–899, 2010, doi: 10.1007/s00449-010-0412-z.
- [20] B. B. Aam, E. B. Heggset, A. L. Norberg, M. Sørle, K. M. Vårum, V. G. H. Eijsink, „Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine", *Mar. Drugs*, roč. 8, 2010, doi: 10.3390/md8051482.
- [21] G. Lodhi, Y. S. Kim, J. W. Hwang, S. K. Kim, „Chitooligosaccharide and Its Derivatives: Preparation and Biological Applications", *BioMed Res. Int.*, roč. 2014, doi: 10.1155/2014/654913.
- [22] A. V. Il'ina, V. P. Varlamov, „In vitro antitumor activity of heterochitooligosaccharides (Review)", *Appl. Biochem. Microbiol.*, roč. 51, s. 1–10, 2015, doi: 10.1134/S0003683815010068.
- [23] S. Bahrke, „Mass spectrometric analysis of chitooligosaccharides and their interaction with proteins", Universität Potsdam, 2008. <https://publishup.uni-potsdam.de/frontdoor/index/index/docId/2182>
- [24] K. V. Harish Prashanth, R. N. Tharanathan, „Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview.", *Trends Food Sci. Technol.*, roč. 18, 2007.
- [25] V. K. Mourya, N. N. Inamdar, Y. M. Choudhari, „Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications", *Polym. Sci. Ser. A*, roč. 53, s. 583–612, 2011, doi: 10.1134/S0965545X11070066.
- [26] C. R. Allan, L. A. Hadwiger, „The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition", *Exp. Mycol.*, roč. 3, s. 285–287, 1979, doi: 10.1016/S0147-5975(79)80054-7.
- [27] B.-K. Choi, K.-Y. Kim, Y.-J. Yoo, S.-J. Oh, J.-H. Choi, C.-Y. Kim, „In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*", *Int. J. Antimicrob. Agents*, roč. 18, s. 553–557, 2001, doi: 10.1016/S0924-8579(01)00434-4.
- [28] J. C. Fernandes, F. K. Tavaría, J. C. Soares, O. S. Ramos, M. Pintado, „Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems", *Food Microbiol.*, roč. 25, s. 922–928, 2008, doi: 10.1016/j.fm.2008.05.003.
- [29] E. N. Oliveira, N. E. El Gueddari, B. M. Moerschbacher, M. G. Peter, T. T. Franco, „Growth of Phytopathogenic Fungi in the Presence of Partially Acetylated Chitooligosaccharides", *Mycopathologia*, roč. 166, s. 163–174, 2008, doi: 10.1007/s11046-008-9125-0.
- [30] M. Artan, F. Karadeniz, M. Z. Karagozlu, M.-M. Kim, S.-K. Kim, „Anti-HIV-1 activity of low molecular weight sulfated chitooligosaccharides", *Carbohydr. Res.*, roč. 345, s. 656–662, 2010, doi: 10.1016/j.carres.2009.12.017.

- [31] F. Liaqat, R. Eltem, „Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review", *Carbohydr. Polym.*, roč. 184, s. 243–259, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.12.067.
- [32] D. Zhao, J. Wang, L. Tan, C. Sun, J. Dong, „Synthesis of N-furoyl chitosan and chito-oligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity in vitro", *Int. J. Biol. Macromol.*, roč. 59, s. 391–395, 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.072.
- [33] N. Rajapakse, M.-M. Kim, E. Mendis, S.-K. Kim, „Inhibition of free radical-mediated oxidation of cellular biomolecules by carboxylated chitooligosaccharides", *Bioorg. Med. Chem.*, roč. 15, s. 997–1003, 2007, doi: 10.1016/j.bmc.2006.10.030.
- [34] A. L. W. dos Santos, N. E. El Gueddari, S. Trombotto, B. M. Moerschbacher, „Partially Acetylated Chitosan Oligo- and Polymers Induce an Oxidative Burst in Suspension Cultured Cells of the Gymnosperm *Araucaria angustifolia*", *Biomacromolecules*, roč. 9, s. 3411–3415, 2008, doi: 10.1021/bm801025g.
- [35] H.-T. Liu, W.-M. Li, G. Xu, X.-Y. Li, „Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells", *Pharmacol. Res.*, roč. 59, s. 167–175, 2009, doi: 10.1016/j.phrs.2008.12.001.
- [36] Q. Xu, P. Ma, W. Yu, C. Tan, H. Liu, „Chitooligosaccharides Protect Human Embryonic Hepatocytes Against Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide", *Mar. Biotechnol.*, roč. 12, s. 292–298, 2010, doi: 10.1007/s10126-009-9222-1.
- [37] M. Mengibar, I. Mateos-Aparicio, B. Miralles, Á. Heras, „Influence of the physico-chemical characteristics of chito-oligosaccharides (COS) on antioxidant activity", *Carbohydr. Polym.*, roč. 97, s. 776–782, 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.05.035.
- [38] Y. Qiao, X.-F. Bai, Y.-G. Du, „Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress", *Int. Immunopharmacol.*, roč. 11, s. 121–127, 2011, doi: 10.1016/j.intimp.2010.10.016.
- [39] M. Yousef, R. Pichyangkura, S. Soodvilai, V. Chatsudthipong, C. Muanprasat, „Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: Therapeutic efficacy and possible mechanisms of action", *Pharmacol. Res.*, roč. 66, s. 66–79, 2012, doi: 10.1016/j.phrs.2012.03.013.
- [40] T.-S. Vo, C.-S. Kong, S.-K. Kim, „Inhibitory effects of chitooligosaccharides on degranulation and cytokine generation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells", *Carbohydr. Polym.*, roč. 84, s. 649–655, 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.12.046.
- [41] T.-S. Vo, D.-H. Ngo, L. G. Bach, D.-N. Ngo, S.-K. Kim, „The free radical scavenging and anti-inflammatory activities of gallate-chitooligosaccharides in human lung epithelial A549 cells", *Process Biochem.*, roč. 54, s. 188–194, 2017, doi: 10.1016/j.procbio.2017.01.001.
- [42] T.-W. Liang, W.-T. Chen, Z.-H. Lin, Y.-H. Kuo, A. D. Nguyen, P.-S. Pan, S.-L. Wang, „An Amphiprotic Novel Chitosanase from *Bacillus mycoides* and Its Application in the Production of Chitoooligomers with Their Antioxidant and Anti-Inflammatory Evaluation", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 17, 2016, doi: 10.3390/ijms17081302.
- [43] K. Azuma, T. Osaki, S. Kurozumi, M. Kiyose, T. Tsuka, „Anti-inflammatory effects of orally administered glucosamine oligomer in an experimental model of inflammatory bowel disease", *Carbohydr. Polym.*, roč. 115, s. 448–456, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.09.012.
- [44] J. Wan, F. Jiang, Q. Xu, D. Chen, B. Yu, „New insights into the role of chitosan oligosaccharide in enhancing growth performance, antioxidant capacity, immunity and intestinal development of weaned pigs", *RSC Adv.*, roč. 7, s. 9669–9679, 2017, doi: 10.1039/C7RA00142H.

- [45] R. Huang, E. Mendis, N. Rajapakse, S.-K. Kim, „Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS)", *Life Sci.*, roč. 78, s. 2399–2408, 2006, doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.039.
- [46] W. Xu, C. Jiang, X. Kong, Y. Liang, M. Rong, W. Liu, „Chitooligosaccharides and N-acetyl-D-glucosamine stimulate peripheral blood mononuclear cell-mediated antitumor immune responses", *Mol. Med. Rep.*, roč. 6, s. 385–390, 2012, doi: 10.3892/mmr.2012.918.
- [47] A. Tokoro, N. Takewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki, M. Suzuki, „Growth-Inhibitory Effect of Hexa-N-acetylchitohexanase and Chitohexanase against Meth-A Solid Tumor", *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, roč. 36, s. 784–790, 1988, doi: 10.1248/cpb.36.784.
- [48] K. V. Harish Prashanth, R. N. Tharanathan, „Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, roč. 1722, s. 22–29, 2005, doi: 10.1016/j.bbagen.2004.11.009.
- [49] Q. Van Ta, M.-M. Kim, S.-K. Kim, „Inhibitory Effect of Chitooligosaccharides on Matrix Metalloproteinase-9 in Human Fibrosarcoma Cells (HT1080)", *Mar. Biotechnol.*, roč. 8, s. 593–599, 2006, doi: 10.1007/s10126-006-6031-7.
- [50] K.-T. Shen, M.-H. Chen, H.-Y. Chan, J.-H. Jeng, Y.-J. Wang, „Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis", *Food Chem. Toxicol.*, roč. 47, s. 1864–1871, 2009, doi: 10.1016/j.fct.2009.04.044.
- [51] B. Ryu, S.-Y. Kim, T.-S. Vo, W.-S. Kim, D. Gyu Kim, S.-K. Kim, „Characterization of the in vitro effects of gallic acid-grafted-chitooligosaccharides in the suppression of AGS human gastric cancer cell proliferation", *RSC Adv.*, roč. 7, s. 24561–24568, 2017, doi: 10.1039/C7RA02487H.
- [52] B. Bahar, J. V. O'Doherty, S. Maher, J. McMorro, T. Sweeney, „Chitooligosaccharide elicits acute inflammatory cytokine response through AP-1 pathway in human intestinal epithelial-like (Caco-2) cells", *Mol. Immunol.*, roč. 51, s. 283–291, 2012, doi: 10.1016/j.molimm.2012.03.027.
- [53] P. Zhang, W. Liu, Y. Peng, B. Han, Y. Yang, „Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages", *Int. Immunopharmacol.*, roč. 23, s. 254–261, 2014, doi: 10.1016/j.intimp.2014.09.007.
- [54] B. Zheng, Z.-S. Wen, Y.-J. Huang, M.-S. Xia, X.-W. Xiang, Y.-L. Qu, „Molecular Weight-Dependent Immunostimulative Activity of Low Molecular Weight Chitosan via Regulating NF- κ B and AP-1 Signaling Pathways in RAW264.7 Macrophages", *Mar. Drugs*, roč. 14, 2016, doi: 10.3390/md14090169.
- [55] G. I. Howling, P. W. Dettmar, P. A. Goddard, F. C. Hampson, M. Dornish, E. J. Wood, „The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro", *Biomaterials*, roč. 22, s. 2959–2966, 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(01)00042-4.
- [56] C. Luo, W. Liu, B. Luo, J. Tian, W. Wen, M. Liu, C. Zhou, „Antibacterial activity and cytocompatibility of chitooligosaccharide-modified polyurethane membrane via polydopamine adhesive layer", *Carbohydr. Polym.*, roč. 156, s. 235–243, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.036.
- [57] R. LogithKumar, A. KeshavNarayan, S. Dhivya, A. Chawla, S. Saravanan, N. Selvamurugan, „A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering", *Carbohydr. Polym.*, roč. 151, s. 172–188, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.05.049.
- [58] J. Ratanavaraporn, S. Kanokpanont, Y. Tabata, S. Damrongsakkul, „Growth and osteogenic differentiation of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells on chitosan and chitooligosaccharide films", *Carbohydr. Polym.*, roč. 78, s. 873–878, 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.07.006.

- [59] R. de Jonge, H. Peter, A. Kombrink, T. Shinya, Y. Desaki, „Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants", *Science*, roč. 329, s. 953–955, 2010, doi: 10.1126/science.1190859.
- [60] T. Liu, Z. Liu, C. Song, Y. Hu, Z. Han, „Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor", *Science*, roč. 336, s. 1160–1164, 2012, doi: 10.1126/science.1218867.
- [61] R. B. Day, N. Shibuya, E. Minami, „Identification and characterization of two new members of the *GRAS* gene family in rice responsive to *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.*, roč. 1625, s. 261–268, 2003, doi: 10.1016/S0167-4781(02)00626-7.
- [62] H. Yin, X. Zhao, Y. Du, „Oligochitosan: A plant diseases vaccine—A review", *Carbohydr. Polym.*, roč. 82, s. 1–8, 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.03.066.
- [63] A. Yamada, N. Shibuya, O. Kodama, T. Akatsuka, „Induction of Phytoalexin Formation in Suspension-cultured Rice Cells by *N*-Acetylchitooligosaccharides", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, roč. 57, s. 405–409, 1993, doi: 10.1271/bbb.57.405.
- [64] H. Yin, Y. Du, Z. Dong, „Chitin Oligosaccharide and Chitosan Oligosaccharide: Two Similar but Different Plant Elicitors", *Front. Plant Sci.*, roč. 7, 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00522.
- [65] W. Lan, W. Wang, Z. Yu, Y. Qin, J. Luan, X. Li, „Enhanced germination of barley (*Hordeum vulgare* L.) using chitooligosaccharide as an elicitor in seed priming to improve malt quality", *Biotechnol. Lett.*, roč. 38, s. 1935–1940, 2016, doi: 10.1007/s10529-016-2181-5.
- [66] G. van Aubel, P. Cambier, M. Dieu, P. Van Cutsem, „Plant immunity induced by COS-OGA elicitor is a cumulative process that involves salicylic acid", *Plant Sci.*, roč. 247, s. 60–70, 2016, doi: 10.1016/j.plantsci.2016.03.005.
- [67] X. Zhang, K. Li, S. Liu, R. Xing, H. Yu, X. Chen, P. Li, „Size effects of chitooligomers on the growth and photosynthetic characteristics of wheat seedlings", *Carbohydr. Polym.*, roč. 138, s. 27–33, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.11.050.
- [68] P. Zou, K. Li, S. Liu, R. Xing, Y. Qin, „Effect of chitooligosaccharides with different degrees of acetylation on wheat seedlings under salt stress", *Carbohydr. Polym.*, roč. 126, s. 62–69, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.03.028.
- [69] H. Zong, K. Li, S. Liu, X. Chen, „Improvement in cadmium tolerance of edible rape (*Brassica rapa* L.) with exogenous application of chitooligosaccharide", *Chemosphere*, roč. 181, s. 92–100, 2017, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.024.
- [70] Q. Luo, J. Zhao, X. Zhang, W. Pan, „Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with Chitosan Oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system", *Int. J. Pharm.*, roč. 403, s. 185–191, 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.013.
- [71] J. Zhang, J. Han, X. Zhang, J. Jiang, M. Xu, „Polymeric nanoparticles based on chitooligosaccharide as drug carriers for co-delivery of all-*trans*-retinoic acid and paclitaxel", *Carbohydr. Polym.*, roč. 129, s. 25–34, 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.036.
- [72] L. Fernández-de Castro, M. Mengíbar, Á. Sánchez, L. Arroyo, M. C. Villarán, „Films of chitosan and chitosan-oligosaccharide neutralized and thermally treated: Effects on its antibacterial and other activities", *LWT*, roč. 73, s. 368–374, 2016, doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.038.
- [73] M. S. Rao, R. Chander, A. Sharma, „Synergistic effect of chitooligosaccharides and lysozyme for meat preservation", *LWT - Food Sci. Technol.*, roč. 41, s. 1995–2001, 2008, doi: 10.1016/j.lwt.2008.01.013.

- [74] X. Zhao, Z. Yu, T. Wang, „The use of chitooligosaccharide in beer brewing for protection against beer-spoilage bacteria and its influence on beer performance", *Biotechnol. Lett.*, roč. 38, s. 629–635, 2016, doi: 10.1007/s10529-015-2013-z.
- [75] H.-W. Lee, Y.-S. Park, J.-S. Jung, W.-S. Shin, „Chitosan oligosaccharides, dp 2–8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp.", *Anaerobe*, roč. 8, s. 319–324, 2002, doi: 10.1016/S1075-9964(03)00030-1.
- [76] N. Pacheco, M. Garnica, M. Gimeno, E. Bárzana, S. Trombotto, „Structural Characterization of Chitin and Chitosan Obtained by Biological and Chemical Methods", *Biomacromolecules*, roč. 12, s. 3285–3290, 2011, doi: 10.1021/bm200750t.
- [77] M. S. Rao, J. Muñoz, W. F. Stevens, „Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, roč. 54, s. 808–813, 2000, doi: 10.1007/s002530000449.
- [78] Z. Mészáros, P. Nekvasilová, P. Bojarová, V. Křen, K. Slámová, „Advanced glycosidases as ingenious biosynthetic instruments", *Biotechnol. Adv.*, roč. 49, s. 107733, 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107733.
- [79] I. Cuxart, J. Coines, O. Esquivias, M. Faijes, „Enzymatic Hydrolysis of Human Milk Oligosaccharides. The Molecular Mechanism of *Bifidobacterium Bifidum* Lacto-N-biosidase", *ACS Catal.*, roč. 12, s. 4737–4743, 2022, doi: 10.1021/acscatal.2c00309.
- [80] R. S. Patil, V. Ghormade, M. V. Deshpande, „Chitinolytic enzymes: an exploration", *Enzyme Microb. Technol.*, roč. 26, s. 473–483, 2000, doi: 10.1016/S0141-0229(00)00134-4.
- [81] F. Liaqat, P. Sözer Bahadır, M. Elibol, R. Eltem, „Optimization of chitosanase production by *Bacillus mojavensis* EGE-B-5.2i", *J. Basic Microbiol.*, roč. 58, s. 836–847, 2018, doi: 10.1002/jobm.201800132.
- [82] M. Kohlhoff, A. Niehues, J. Wattjes, J. Bénétteau, S. Cord, „Chitinase: A fungal chitosan hydrolyzing enzyme with a new and unusually specific cleavage pattern", *Carbohydr. Polym.*, roč. 174, s. 1121–1128, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.07.001.
- [83] S. Aiba, „Preparation of *N*-acetylchitooligosaccharides from lysozymic hydrolysates of partially *N*-acetylated chitosans", *Carbohydr. Res.*, roč. 261, č. 2, s. 297–306, srp. 1994, doi: 10.1016/0008-6215(94)84025-3.
- [84] T. R. G. Gray, P. Baxby, „Chitin decomposition in soil: II. The ecology of chitinoclastic micro-organisms in forest soil", *Trans. Br. Mycol. Soc.*, roč. 51, s. 293–309, 1968, doi: 10.1016/S0007-1536(68)80064-6.
- [85] J.-K. Chen, C.-R. Shen, C.-L. Liu, „N-Acetylglucosamine: Production and Applications", *Mar. Drugs*, roč. 8, 2010, doi: 10.3390/md8092493.
- [86] F. Liaqat, R. Eltem, „Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review", *Carbohydr. Polym.*, roč. 184, s. 243–259, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.12.067.
- [87] S. N. Hamer, S. Cord, X. Biarnés, A. Planas, H. Waagem, B. Moerschbacher, „Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases", *Sci. Rep.*, roč. 5, s. 8716, 2015, doi: 10.1038/srep08716.
- [88] B. García-Fraga, A. F. da Silva, J. López-Seijas, C. Sieiro, „Optimized expression conditions for enhancing production of two recombinant chitinolytic enzymes from different prokaryote domains", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, roč. 38, s. 2477–2486, 2015, doi: 10.1007/s00449-015-1485-5.
- [89] Z. Mészáros, N. Kulik, L. Petrásková, P. Bojarová, M. Texidó, „Three-Step Enzymatic Remodeling of Chitin into Bioactive Chitooligomers", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 72, s. 15613–15623, 2024, doi: 10.1021/acs.jafc.4c03077.

- [90] V. Lombard, H. Golaconda Ramulu, E. Drula, P. M. Coutinho, B. Henrissat, „The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013", *Nucleic Acids Res.*, roč. 42, s. 490–495, 2014, doi: 10.1093/nar/gkt1178.
- [91] M. John, H. Röhrig, J. Schmidt, U. Wieneke, J. Schell, „Rhizobium NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase.", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 90, s. 625–629, 1993, doi: 10.1073/pnas.90.2.625.
- [92] Y. Araki, E. Ito, „A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: Enzymatic deacetylation of chitin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, roč. 56, s. 669–675, 1974, doi: 10.1016/0006-291X(74)90657-3.
- [93] Y. Zhao, R.-D. Park, R. A. A. Muzzarelli, „Chitin Deacetylases: Properties and Applications", *Mar. Drugs*, roč. 8, 2010, doi: 10.3390/md8010024.
- [94] C. Schmitz, L. González Auza, D. Koberidze, S. Rasche, R. Fischer, L. Bortesi, „Conversion of Chitin to Defined Chitosan Oligomers: Current Status and Future Prospects", *Mar. Drugs*, roč. 17, 2019, doi: 10.3390/md17080452.
- [95] Y. Zhao *et al.*, „Perspectives of Chitin Deacetylase Research", in *Biotechnology of Biopolymers*, IntechOpen, 2011. doi: 10.5772/18966.
- [96] A. Aranda-Martinez, L. Griffol-Romero, H. Aragunde, „Expression and specificity of a chitin deacetylase from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* potentially involved in pathogenicity", *Sci. Rep.*, roč. 8, s. 2170, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-19902-0.
- [97] T. R. Tuveng, U. Rothweiler, G. Udatha, G. Vaaje-Kolstad, A. Smalås, V. G. H. Eijsink, „Structure and function of a CE4 deacetylase isolated from a marine environment", *PLoS ONE*, roč. 12, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0187544.
- [98] C. Mishra, C. E. Semino, K. J. McCreath, H. de la Vega, B. J. Jones, „Cloning and expression of two chitin deacetylase genes of *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast Chichester Engl.*, roč. 13, s. 327–336, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(19970330)13:4
- [99] A. Martinou, D. Koutsoulis, V. Bouriotis, „Cloning and expression of a chitin deacetylase gene (*CDA2*) from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*", *Enzyme Microb. Technol.*, roč. 32, s. 757–763, 2003, doi: 10.1016/S0141-0229(03)00048-6.
- [100] M. Yamada, M. Kurano, S. Inatomi, G. Taguchi, M. Okazaki, M. Shimosaka, „Isolation and characterization of a gene coding for chitin deacetylase specifically expressed during fruiting body development in the basidiomycete *Flammulina velutipes* and its expression in the yeast *Pichia pastoris*", *FEMS Microbiol. Lett.*, roč. 289, s. 130–137, 2008, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01361.x.
- [101] C. Gauthier, F. Clerisse, J. Dommes, M.-F. Jaspar-Versali, „Characterization and cloning of chitin deacetylases from *Rhizopus circinans*", *Protein Expr. Purif.*, roč. 59, s. 127–137, 2008, doi: 10.1016/j.pep.2008.01.013.
- [102] J. Hoßbach, F. Bußwinkel, A. Kranz, J. Wattjes, S. Cord-Landwehr, B. M. Moerschbacher, „A chitin deacetylase of *Podospora anserina* has two functional chitin binding domains and a unique mode of action", *Carbohydr. Polym.*, roč. 183, s. 1–10, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.11.015.
- [103] X. Li, L.-X. Wang, X. Wang, S. Roseman, „The Chitin Catabolic Cascade in the Marine Bacterium *Vibrio Cholerae*: Characterization of a Unique Chitin Oligosaccharide Deacetylase", *Glycobiology*, roč. 17, s. 1377–1387, 2007, doi: 10.1093/glycob/cwm096.
- [104] Y. Wang, J.-Z. Song, Q. Yang, Z.-H. Liu, X.-M. Huang, Y. Chen, „Cloning of a Heat-Stable Chitin Deacetylase Gene from *Aspergillus nidulans* and its Functional Expression in *Escherichia coli*", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, roč. 162, s. 843–854, 2010, doi: 10.1007/s12010-009-8772-z.

- [105] L. Grifoll-Romero, S. Pascual, H. Aragunde, X. Biarnés, A. Planas, „Chitin Deacetylases: Structures, Specificities, and Biotech Applications", *Polymers*, roč. 10, 2018, doi: 10.3390/polym10040352.
- [106] S. Naqvi, S. Cord, R. Singh, F. Bernard, B. Moerschbacher, „A Recombinant Fungal Chitin Deacetylase Produces Fully Defined Chitosan Oligomers with Novel Patterns of Acetylation", *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 82, s. 6645–6655, 2016, doi: 10.1128/AEM.01961-16.
- [107] T. Hirano, H. Shiraishi, M. Ikejima, R. Uehara, W. Hakamata, T. Nishio, „Chitin oligosaccharide deacetylase from *Shewanella baltica* ATCC BAA-1091", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, roč. 81, s. 547–550, 2017, doi: 10.1080/09168451.2016.1254529.
- [108] S. N. Hamer, S. Cord, X. Biarnés, A. Planas, H. Waagem, „Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases", *Sci. Rep.*, roč. 5, s. 8716, 2015, doi: 10.1038/srep08716.
- [109] I. Tsigos, N. Zydwicz, A. Martinou, A. Domard, V. Bouriotis, „Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides", *Eur. J. Biochem.*, roč. 261, s. 698–705, 1999, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00311.x.
- [110] T. Hirano, R. Uehara, H. Shiraishi, W. Hakamata, T. Nishio, „Chitin Oligosaccharide Deacetylase from *Shewanella woodyi* ATCC51908", *J. Appl. Glycosci.*, roč. 62, s. 153–157, 2015, doi: 10.5458/jag.jag.JAG-2015_014.
- [111] K. Tokuyasu, M. Mitsutomi, I. Yamaguchi, K. Hayashi, Y. Mori, „Recognition of Chitooligosaccharides and Their N-Acetyl Groups by Putative Subsites of Chitin Deacetylase from a Deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*", *Biochemistry*, roč. 39, s. 8837–8843, 2000, doi: 10.1021/bi0005355.
- [112] E. Andrés, D. Albesa-Jové, X. Biarnés, B. M. Moerschbacher, M. E. Guerin, A. Planas, „Structural basis of chitin oligosaccharide deacetylation", *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, roč. 53, s. 6882–6887, 2014, doi: 10.1002/anie.201400220.
- [113] M. Bonin, S. Sreekumar, S. Cord-Landwehr, B. M. Moerschbacher, „Preparation of Defined Chitosan Oligosaccharides Using Chitin Deacetylases", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 21, 2020, doi: 10.3390/ijms21217835.
- [114] L. Yin, Q. Wang, J. Sun, X. Mao, „Expression and Molecular Modification of Chitin Deacetylase from *Streptomyces bacillaris*", *Molecules*, roč. 28, s. 113, 2022, doi: 10.3390/molecules28010113.
- [115] J. Motoyoshiya, S. Tomioka, D. Kobayashi, T. Fujimoto, „A new cyano-substituted fluorecamine superior to its original form as a fluorescent probe for amino acid detection", *Tetrahedron Lett.*, roč. 59, s. 1104–1107, 2018, doi: 10.1016/j.tetlet.2018.02.011.

Přílohy

Příloha 1. Sekvence AfCDA

(A) Aminokyselinová sekvence (222 ak):

aplInnaittvptgqiirscttpntvaltfddgpsytpqlldllneygakatffimigegsqeyptirrmrseghqvgshlehaslpsl
syeqivqqmtklegilqsamgdiptymrppyfevneqvlaamnelgykviqssidtkdyenndvsridisyekfvdelnaggsi
vlahdiheqtvvslarrmmeeikargfkmttvgeclgeaeawyrkgr

(B) Nukleotidová sekvence optimalizovaná pro expresi v *P. pastoris* (Generay, Čína):

GCTCCATTGAACAACGCTATCACTACTGTTCCAACCGGTCAGATCATCAGATCCTG
TACTACTCCAAACACCGTCGCTTTGACTTTTCGATGATGGTCCATCTGGTTACACCC
CACAGTTGTTGGACTTGTGAACGAGTACGGTGCTAAGGCCACCTTCTTCATGATT
GGTGAAGGTTCCCAAGAGTACCCAGACACCATCAGAAGAATGAGATCTGAGGGT
CACCAAGTTGGTTCCACACTTTGGAACATGCTTCTCTGCCATCTTTGTCCTACGA
GCAAATCGTTCAGCAGATGACTAAGTTGGAGGGTATCTTGCAATCCGCCATGGGTG
ACATTCCAACCTTACATGAGGCCACCATACTTCGAGGTTAACGAGCAAGTTTTGGCT
GCCATGAACGAGTTGGGTACAAAGGTTATTCAGTCCTCCATCGACACCAAGGACT
ACGAGAACAACGACGTTTCCAGAATCGACATCTCCTACGAGAAGTTCGTTGACGA
GTTGAACGCTGGTGGTTCCATCGTTTTGGCTCACGACATTCACGAGCAGACTGTT
GTCTCTTTGGCCAGACGTATGATGGAAGAGATCAAGGCCAGAGGTTTCAAGATGA
CTACCGTTGGTGAGTGTTTGGGTGAAGCTGAAGCTGAGTGGTACAGAAAGGGTAG
A

Příloha 2. Tabulky molekulových hmotností a hodnot m/z pro acetylované a deacetylované chitooligosacharidy

Typy ionizace v pozitivním spektru:

	M_w	M+H	M+NH ₄	M+H+H ₂ O	M+Na	M+H+CH ₃ CN	M+K
GlcNAc	221,21	222	239,21	240,21	244,21	254,21	260,21
(GlcNAc) ₂	424	425	442	443	447	457	463
(GlcNAc) ₃	627	628	645	646	650	660	666
(GlcNAc) ₄	830	831	848	849	853	863	869
(GlcNAc) ₅	1033	1034	1051	1052	1056	1066	1072
(GlcNAc) ₆	1236	1237	1254	1255	1259	1269	1275
(GlcNAc) ₇	1439	1440	1457	1458	1462	1472	1478
(GlcNAc) ₈	1642	1643	1660	1661	1665	1675	1681
(GlcNAc) ₉	1845	1846	1863	1864	1868	1878	1884
(GlcNAc) ₁₀	2048	2049	2066	2067	2071	2081	2087
A1D1	382	383	400	401	405	415	421
A1D2	543	544	561	562	566	576	582
A2D1	585	586	603	604	608	618	624
A1D3	704	705	722	723	727	737	743
A2D2	746	747	764	765	769	779	785
A3D1	788	789	806	807	811	821	827
A1D4	865	866	883	884	888	898	904
A2D3	907	908	925	926	930	940	946
A3D2	949	950	967	968	972	982	988
A4D1	991	992	1009	1010	1014	1024	1030
A1D5	1026	1027	1044	1045	1049	1059	1065
A2D4	1168	1169	1186	1187	1191	1201	1207
A3D3	1110	1111	1128	1129	1133	1143	1149
A4D2	1152	1153	1170	1171	1175	1185	1191
A5D1	1194	1195	1212	1213	1217	1227	1233
A1D6	1187	1188	1205	1206	1210	1220	1226
A2D5	1229	1230	1247	1248	1252	1262	1268
A3D4	1271	1272	1289	1290	1294	1304	1310
A4D3	1313	1314	1331	1332	1336	1346	1352
A5D2	1355	1356	1373	1374	1378	1388	1394
A6D1	1397	1398	1415	1416	1420	1430	1436
A1D7	1348	1349	1366	1367	1371	1381	1387
A2D6	1390	1391	1408	1409	1413	1423	1429
A3D5	1432	1433	1450	1451	1455	1465	1471
A4D4	1474	1475	1492	1493	1497	1507	1513
A5D3	1516	1517	1534	1535	1539	1549	1555
A6D2	1558	1559	1576	1577	1581	1591	1597
A7D1	1600	1601	1618	1619	1623	1633	1639
A1D8	1509	1510	1527	1528	1532	1542	1548

A2D7	1551	1552	1569	1570	1574	1584	1590
A3D6	1593	1594	1611	1612	1616	1626	1632
A4D5	1635	1636	1653	1654	1658	1668	1674
A5D4	1677	1678	1695	1696	1700	1710	1716
A6D3	1719	1720	1737	1738	1742	1752	1758
A7D2	1761	1762	1779	1780	1784	1794	1800
A8D1	1803	1804	1821	1822	1826	1836	1842
A1D9	1670	1671	1688	1689	1693	1703	1709
A2D8	1712	1713	1730	1731	1735	1745	1751
A3D7	1754	1755	1772	1773	1777	1787	1793
A4D6	1796	1797	1814	1815	1819	1829	1835
A5D5	1838	1839	1856	1857	1861	1871	1877
A6D4	1880	1881	1898	1899	1903	1913	1919
A7D3	1922	1923	1940	1941	1945	1955	1961
A8D2	1964	1965	1982	1983	1987	1997	2003
A9D1	2006	2007	2024	2025	2029	2039	2045

	<i>M_w</i>	M+H+CH ₃ CN	M+H+H ₂ O+CH ₃ OH	M+Na+CH ₃ CN
GlcNAc	221,21	263,21	272,21	285,21
(GlcNAc) ₂	424	466	475	488
(GlcNAc) ₃	627	669	678	691
(GlcNAc) ₄	830	872	881	894
(GlcNAc) ₅	1033	1075	1084	1097
(GlcNAc) ₆	1236	1278	1287	1300
(GlcNAc) ₇	1439	1481	1490	1503
(GlcNAc) ₈	1642	1684	1693	1706
(GlcNAc) ₉	1845	1887	1896	1909
(GlcNAc) ₁₀	2048	2090	2099	2112
A1D1	382	424	433	446
A1D2	543	585	594	607
A2D1	585	627	636	649
A1D3	704	746	755	768
A2D2	746	788	797	810
A3D1	788	830	839	852
A1D4	865	907	916	929
A2D3	907	949	958	971
A3D2	949	991	1000	1013
A4D1	991	1033	1042	1055
A1D5	1026	1068	1077	1090
A2D4	1168	1210	1219	1232
A3D3	1110	1152	1161	1174
A4D2	1152	1194	1203	1216
A5D1	1194	1236	1245	1258
A1D6	1187	1229	1238	1251

A2D5	1229	1271	1280	1293
A3D4	1271	1313	1322	1335
A4D3	1313	1355	1364	1377
A5D2	1355	1397	1406	1419
A6D1	1397	1439	1448	1461
A1D7	1348	1390	1399	1412
A2D6	1390	1432	1441	1454
A3D5	1432	1474	1483	1496
A4D4	1474	1516	1525	1538
A5D3	1516	1558	1567	1580
A6D2	1558	1600	1609	1622
A7D1	1600	1642	1651	1664
A1D8	1509	1551	1560	1573
A2D7	1551	1593	1602	1615
A3D6	1593	1635	1644	1657
A4D5	1635	1677	1686	1699
A5D4	1677	1719	1728	1741
A6D3	1719	1761	1770	1783
A7D2	1761	1803	1812	1825
A8D1	1803	1845	1854	1867
A1D9	1670	1712	1721	1734
A2D8	1712	1754	1763	1776
A3D7	1754	1796	1805	1818
A4D6	1796	1838	1847	1860
A5D5	1838	1880	1889	1902
A6D4	1880	1922	1931	1944
A7D3	1922	1964	1973	1986
A8D2	1964	2006	2015	2028
A9D1	2006	2048	2057	2070

Typy ionizace v negativním spektru:

	M_w	M-H+H ₂ O	M+F	M-H+CH ₃ OH	M+Cl	M+HCOO H	M+NO ₂
GlcNAc	221,21	238,21	240,21	252,21	256,21	266,21	267,21
(GlcNAc) ₂	424	441	443	455	459	469	470
(GlcNAc) ₃	627	644	646	658	662	672	673
(GlcNAc) ₄	830	847	849	861	865	875	876
(GlcNAc) ₅	1033	1050	1052	1064	1068	1078	1079
(GlcNAc) ₆	1236	1253	1255	1267	1271	1281	1282
(GlcNAc) ₇	1439	1456	1458	1470	1474	1484	1485
(GlcNAc) ₈	1642	1659	1661	1673	1677	1687	1688
(GlcNAc) ₉	1845	1862	1864	1876	1880	1890	1891
(GlcNAc) ₁₀	2048	2065	2067	2079	2083	2093	2094
A1D1	382	399	401	413	417	427	428

A1D2	543	560	562	574	578	588	589
A2D1	585	602	604	616	620	630	631
A1D3	704	721	723	735	739	749	750
A2D2	746	763	765	777	781	791	792
A3D1	788	805	807	819	823	833	834
A1D4	865	882	884	896	900	910	911
A2D3	907	924	926	938	942	952	953
A3D2	949	966	968	980	984	994	995
A4D1	991	1008	1010	1022	1026	1036	1037
A1D5	1026	1043	1045	1057	1061	1071	1072
A2D4	1168	1185	1187	1199	1203	1213	1214
A3D3	1110	1127	1129	1141	1145	1155	1156
A4D2	1152	1169	1171	1183	1187	1197	1198
A5D1	1194	1211	1213	1225	1229	1239	1240
A1D6	1187	1204	1206	1218	1222	1232	1233
A2D5	1229	1246	1248	1260	1264	1274	1275
A3D4	1271	1288	1290	1302	1306	1316	1317
A4D3	1313	1330	1332	1344	1348	1358	1359
A5D2	1355	1372	1374	1386	1390	1400	1401
A6D1	1397	1414	1416	1428	1432	1442	1443
A1D7	1348	1365	1367	1379	1383	1393	1394
A2D6	1390	1407	1409	1421	1425	1435	1436
A3D5	1432	1449	1451	1463	1467	1477	1478
A4D4	1474	1491	1493	1505	1509	1519	1520
A5D3	1516	1533	1535	1547	1551	1561	1562
A6D2	1558	1575	1577	1589	1593	1603	1604
A7D1	1600	1617	1619	1631	1635	1645	1646
A1D8	1509	1526	1528	1540	1544	1554	1555
A2D7	1551	1568	1570	1582	1586	1596	1597
A3D6	1593	1610	1612	1624	1628	1638	1639
A4D5	1635	1652	1654	1666	1670	1680	1681
A5D4	1677	1694	1696	1708	1712	1722	1723
A6D3	1719	1736	1738	1750	1754	1764	1765
A7D2	1761	1778	1780	1792	1796	1806	1807
A8D1	1803	1820	1822	1834	1838	1848	1849
A1D9	1670	1687	1689	1701	1705	1715	1716
A2D8	1712	1729	1731	1743	1747	1757	1758
A3D7	1754	1771	1773	1785	1789	1799	1800
A4D6	1796	1813	1815	1827	1831	1841	1842
A5D5	1838	1855	1857	1869	1873	1883	1884
A6D4	1880	1897	1899	1911	1915	1925	1926
A7D3	1922	1939	1941	1953	1957	1967	1968
A8D2	1964	1981	1983	1995	1999	2009	2010
A9D1	2006	2023	2025	2037	2041	2051	2052

M+CH ₃ COO H	M+NO ₃	M+Br	M+HSO ₄	M+H ₂ PO ₄	M+CF ₃ CO O	M+I	M-H
280,21	283,21	300,21	318,21	318,21	334,21	348,21	220,21
483	486	503	521	521	537	551	423
686	689	706	724	724	740	754	626
889	892	909	927	927	943	957	829
1092	1095	1112	1130	1130	1146	1160	1032
1295	1298	1315	1333	1333	1349	1363	1235
1498	1501	1518	1536	1536	1552	1566	1438
1701	1704	1721	1739	1739	1755	1769	1641
1904	1907	1924	1942	1942	1958	1972	1844
2107	2110	2127	2145	2145	2161	2175	2047
441	444	461	479	479	495	509	381
602	605	622	640	640	656	670	542
644	647	664	682	682	698	712	584
763	766	783	801	801	817	831	703
805	808	825	843	843	859	873	745
847	850	867	885	885	901	915	787
924	927	944	962	962	978	992	864
966	969	986	1004	1004	1020	1034	906
1008	1011	1028	1046	1046	1062	1076	948
1050	1053	1070	1088	1088	1104	1118	990
1085	1088	1105	1123	1123	1139	1153	1025
1227	1230	1247	1265	1265	1281	1295	1167
1169	1172	1189	1207	1207	1223	1237	1109
1211	1214	1231	1249	1249	1265	1279	1151
1253	1256	1273	1291	1291	1307	1321	1193
1246	1249	1266	1284	1284	1300	1314	1186
1288	1291	1308	1326	1326	1342	1356	1228
1330	1333	1350	1368	1368	1384	1398	1270
1372	1375	1392	1410	1410	1426	1440	1312
1414	1417	1434	1452	1452	1468	1482	1354
1456	1459	1476	1494	1494	1510	1524	1396
1407	1410	1427	1445	1445	1461	1475	1347
1449	1452	1469	1487	1487	1503	1517	1389
1491	1494	1511	1529	1529	1545	1559	1431
1533	1536	1553	1571	1571	1587	1601	1473
1575	1578	1595	1613	1613	1629	1643	1515
1617	1620	1637	1655	1655	1671	1685	1557
1659	1662	1679	1697	1697	1713	1727	1599
1568	1571	1588	1606	1606	1622	1636	1508
1610	1613	1630	1648	1648	1664	1678	1550
1652	1655	1672	1690	1690	1706	1720	1592
1694	1697	1714	1732	1732	1748	1762	1634
1736	1739	1756	1774	1774	1790	1804	1676

1778	1781	1798	1816	1816	1832	1846	1718
1820	1823	1840	1858	1858	1874	1888	1760
1862	1865	1882	1900	1900	1916	1930	1802
1729	1732	1749	1767	1767	1783	1797	1669
1771	1774	1791	1809	1809	1825	1839	1711
1813	1816	1833	1851	1851	1867	1881	1753
1855	1858	1875	1893	1893	1909	1923	1795
1897	1900	1917	1935	1935	1951	1965	1837
1939	1942	1959	1977	1977	1993	2007	1879
1981	1984	2001	2019	2019	2035	2049	1921
2023	2026	2043	2061	2061	2077	2091	1963
2065	2068	2085	2103	2103	2119	2133	2005