

Anna Kisiel^{1*}, Ewa Kępczyńska¹

¹ Katedra Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w styczniu 2017 r.
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Źródła chityny i jej struktura. 3. Chitynazy – budowa i działanie. 4. Bakterie produkujące chitynazy. 5. Rola chitynaz bakteryjnych w biotechnologii zielonej. 6. Wykorzystanie chitynaz w biotechnologii białej. 7. Wykorzystanie chitynaz w biotechnologii czerwonej. 8. Podsumowanie

Bacterial chitinases and their application in biotechnology

Abstract: Chitin, an insoluble linear β -1,4-linked polymer of *N*-acetylglucosamine, is the second most abundant polysaccharide in nature after cellulose. It is present in cell walls of several fungi, exoskeletons of insects and crustacean shells. Enzymatic hydrolysis of this polysaccharide is carried out in the presence of glycoside hydrolases-chitinases. They are produced by microorganisms, insects, plants, and animal, but it is the bacterial chitinases which play a fundamental role in degradation of the chitin. Chitinases and their products, chito-oligomers, have been of interest in recent years due to their wide range of applications in agriculture, medicine and industry. This review focuses on the enzymatic properties of the bacterial chitinases and their potential applications in various kinds of biotechnology.

1. Introduction. 2. Sources of chitin and its structure. 3. Chitinases – structure and function. 4. Chitinase – producing bacteria. 5. The role of bacterial chitinases in green biotechnology. 6. Application of chitinases in white biotechnology. 7. Application of chitinases in red biotechnology. 8. Summary

Słowa kluczowe: *N*-acetylglukozamina, bakterie chitynolityczne, biofungicydy, bioinsektycydy, chityna, chitynazy, zwalczanie biologiczne
Key words: *N*-acetylglucosamine, chitinolytic bacterial, biofungicides, bioinsecticides, chitin, chitinases, biological control

1. Wprowadzenie

Obecnie biotechnologia mikroorganizmów to główny komponent globalnego przemysłu głównie farmaceutycznego, spożywczego, chemicznego i rolniczego. Dzięki zdolnościom do przeprowadzania procesów syntezy i degradacji różnego rodzaju związków mikroorganizmy stały się obiektem zainteresowania między innymi biotechnologii zielonej, czerwonej i białej. Odgrywają kluczową rolę w degradacji biopolimerów odnawialnych, takich jak celuloza, hemiceluloza, lignina i chityna, do prostych oligomerów czy cukrów monomerycznych, które mogą zostać wykorzystane bezpośrednio w przemyśle ale mogą też być dalej metabolizowane przez mikroorganizmy. Spośród tych surowców odnawialnych chityna jest niezwykle wartościowym biopolimerem, drugim po celulozie pod względem występowania w przyrodzie (10^{10} – 10^{11} ton rocznie), stanowiącym bogate źródło węgla i azotu. Jest homopolimerem prostego cukru (*N*-acetylglukozaminy) i wymaga specyficznych enzymów, chitynaz, do jej hydrolizy. Produkty hydrolizy mogą znaleźć zastosowanie m.in. w rolnictwie, przemyśle spożywczym, farmacji, medycynie czy gospodarce odpadami. Głównym źródłem chitynaz są drobnoustroje, które chitynę wykorzystują jako źródło składników pokarmowych [11]. Enzymy

te występują również u roślin, gdzie pełnią różne funkcje podczas wzrostu i rozwoju [42]. Spełniają również funkcję obronną przed patogenami grzybowymi nie tylko u roślin [36], ale również u zwierząt [9], a podczas infekcji wywołanej przez wirusy, bakterie czy grzyby uznawane są za czynniki wirulencji [21, 52].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wiedzy na temat chitynaz produkowanych przez bakterie oraz ich wykorzystania w różnych działach biotechnologii.

2. Źródła chityny i jej struktura

Chityna razem z celulozą należy do najczęściej występujących w przyrodzie polimerów. Jest składnikiem ścian komórkowych grzybów, egzoszkieletów i osłonek jaj stawonogów (owadów i skorupiaków), powłok nicieni, a także muszli mięczaków. Występuje głównie w kompleksach z białkami lub innymi polisacharydami, jak np. β -1,3-glukanem, będącym również budulcem ścian komórkowych grzybów [36]. Skorupiaki stanowią potencjalnie największe źródło chityny, co warto podkreślić, uznawanej za odpad poprodukcyjny stanowiący nawet 75% całkowitej wagi skorupiaków takich jak kraby, krewetki i kryl. Sucha masa chityny w tych odpadach stanowi od 20% do 58%, a zatem

* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin; tel. (91) 444 15 55; e-mail: anna.kisiel@univ.szczecin.pl

jest wartym zainteresowania surowcem odnawialnym, który w porównaniu do celulozy, jest nie tylko bogatym źródłem węgla, ale także i azotu [25, 52].

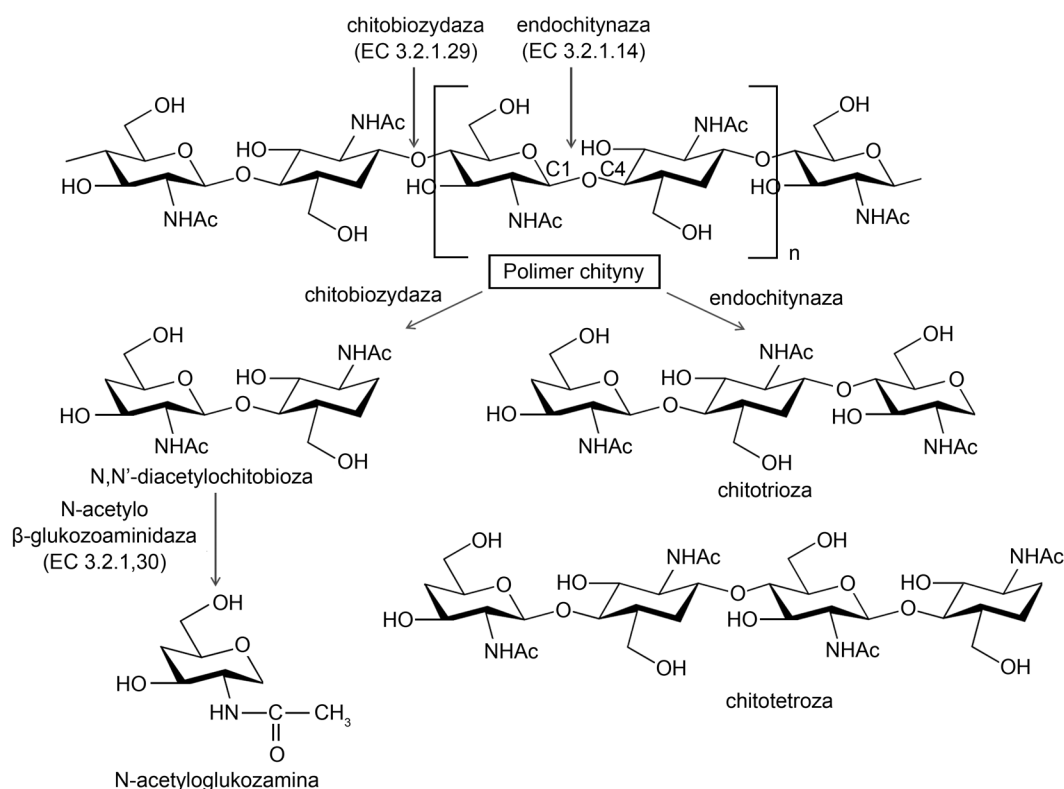
Chityna jest nierozgałęzionym polimerem β -1,4-*N*-acetylglukozaminy (GlcNAc), połączonej wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Jest ona swą budową zbliżona do celulozy jednak zamiast grupy hydroksylowej (-OH) przy C2 posiada grupę acetyloaminową (NH.CO.CH₃). Jest to polisacharyd krystaliczny występujący w naturze w trzech postaciach: α -chityny, β -chityny i γ -chityny [43]. α -Chityna jest najbardziej rozpowszechnioną, izomorficzną i zwartą formą ze względu na antyrównoległe rozmieszczenie łańcuchów chityny, co sprzyja tworzeniu silnych wiązań wodorowych. β -Chityna jest luźno upakowana, a łańcuchy ułożone są w sposób równoległy, w większej odległości od siebie, o słabszych siłach międzycząsteczkowych, które powodują, że jest to forma mniej stabilna [62]. Ponadto nie jest możliwa synteza β -chityny z roztworu w warunkach *in vitro* [88]. Mieszaniną obu tych form jest natomiast polimorficzna γ -chityna.

3. Chitynazy – budowa i działanie

Chitynazy, są szeroko rozpowszechnionymi białkami enzymatycznymi należącymi do większej grupy enzymatycznej – hydrolaz glikozydowych (GH). Do tej grupy należą wszystkie enzymy hydrolizujące wiązania glikozydowe w polisacharydach, oligosacharydach i glikozydach. Jest to bardzo liczna grupa i w oparciu

o sekwencje aminokwasowe ich domen katalitycznych podzielono je na ponad 115 rodzin. Chitynazy przyporządkowano do rodziny 18, 19, 20 i 48 hydrolaz glikozydowych [36, 42].

Chitynaza katalizuje hydrolizę wiązań β -glikozydowych pomiędzy węglem C1 i C4 dwóch sąsiednich *N*-acetylglukozamin w łańcuchu chityny – Rys. 1 [18, 57]. Ze względu na mechanizm działania wyodrębniono dwa rodzaje chitynaz: endochitynazy (EC 3.2.1.14) i egzochitynazy (EC 3.2.1.52) [65, 67]. Endochitynazy rozszczepiają wiązania losowo wewnątrz polimeru chityny, tworząc rozpuszczalne oligomery *N*-acetylglukozaminy (GlcNAc), o małej masie cząsteczkowej, takie jak chitotetroza, chitotrioza i dimer *N,N'*-diacetylchitobioza. Natomiast egzochitynazy możemy podzielić na dwie podkategorie: chitobiozydazy (EC 3.2.1.29), obecnie zwane też *N*-acetyloheksozoaminidazami (EC 3.2.1.52), które katalizują stopniowe uwalnianie *N,N'*-diacetylchitobiozy działając od niezredukowanego końca mikrofibryli chityny oraz 1-4- β -*N*-acetylglukozaaminidazy (EC 3.2.1.30), które rozszczepiają produkty oligomeryczne powstałe w wyniku działania endochitynaz i chitobiozozaz generując przy tym monomery GlcNAc bez mono- lub oligosacharydów [11, 55, 57] (Rys. 1). Bakterie mają zdolność do całkowitej degradacji chityny. Powstałe we wcześniejszych etapach hydrolizy chityny cząsteczki *N*-acetylglukozaminy są hydrolizowane przez transferazę acetylglukozaminy do glukozaminy, a następnie do



Rys. 1. Enzymatyczna hydroliza chityny

octanu, amoniaku i fruktozo-6-fosforanu dzięki obecności transferazy glukozamino-6-fosforanu [12, 37].

Wiele organizmów ma zdolność do syntezy enzymów chitynolitycznych. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowych chitynaz z różnych organizmów zostały podzielone na pięć podstawowych klas i przypisane do rodziny 18, 19 i 20 hydrolaz glikozyliwych. Bakterie wytwarzają chitynazy należące głównie do rodziny GH 18 a niektóre bakterie z rodzaju *Streptomyces* do GH 19 [44]. Do rodziny GH 18 zaliczane są również wszystkie chitynazy grzybowe [29], podobnie jak chitynazy wytwarzane przez owady [91]. Sekwencje kodujące chitynazy z tej rodziny są również szeroko rozpowszechnione u wirusów oraz u zwierząt i roślin wyższych. Natomiast chitynazy z rodziny GH 19 występują głównie u roślin wyższych i jak już wspomniano u niektórych bakterii [36, 42]. Uważa się, że różne jest pochodzenie tych 2 rodzin hydrolaz ponieważ różnią się sekwencją aminokwasową, strukturą trójwymiarową (3D), oraz mechanizmem molekularnym reakcji katalitycznych [56, 86]. Chitynazy zaklasyfikowano jako enzymy zachowujące (GH 18) lub inwertujące (GH 19) konfigurację na anomerycznym atomie węgla w powstałym produkcie [6]. Do rodziny 20 hydrolaz glikozydowych należą *N*-acetyloglukozaminidazy bakteryjne, grzybowe lub ludzkie [13, 57].

Struktura chitynaz bakteryjnych złożona jest z sekwencji sygnałnej, domeny katalitycznej, domeny wiążącej chitynę oraz domeny fibronektyny III lub regionu bogatego w serynę bądź treoninę [57]. Domeny katalityczne odgrywają główną rolę w procesie hydrolizy chityny, jednak w zależności od rodziny hydrolaz różnią się strukturą przestrzenną. Bakteryjne chitynazy z rodziny GH 18 posiadają domenę katalityczną (CatD-catalytic domain) w formie 8 fałdowań typu (β/α) TIM-barrel (beczułka) z resztami katalitycznymi na β -końcu nr 4; domeny wiążącej chitynę (CHBD -chitin-binding domain); a także domeny fibronektyny III (fibronectins III domain – FnIII) lub kadheryny. Z kolei domeny katalityczne chitynaz należących do GH 19 są bogate w struktury α -helikalne [38]. Obecność domeny wiążącej chitynę zwiększa powinowactwo do substratu i wydajność hydrolizy chityny, co wskazuje na kluczową rolę tych domen [51]. Domeny FnIII, natomiast nie wydają się być bezpośrednio zaangażowane w wiązanie chityny, ale mogą być istotne dla aktywności enzymu, prawdopodobnie wpływając na jego właściwości i strukturę oraz lokalizację przestrzenną domeny katalitycznej i domeny wiążącej chitynę [88].

W oparciu o homologię sekwencji oraz różnice w strukturze chitynazy z rodziny GH 18 zostały podzielone na trzy podrodziny A, B, i C. Podrodzina A posiada dodatkowy region fałdowania $\beta+\alpha$, który pogłębia szczelinę centrum aktywnego. Takiego dodatkowego regionu nie posiadają podrodziny B i C [75].

Chitynazy są bardzo zróżnicowaną grupą enzymów. Różnią się od siebie rozmiarem, od 20 kDa do około 120 kDa przy czym wielkość większości bakteryjnych chitynaz mieści się w zakresie od ~20 do 60 kDa. Dla porównania wielkość chitynaz roślinnych mieści się w zakresie ~25–40 kDa, natomiast owadzych w zakresie ~40–85 kDa. Również optimum temperaturowe i pH ich działania jest bardzo zróżnicowane i zależy głównie od źródła pozyskania bakterii. Optymalna temperatura działania chitynaz bakteryjnych waha się zwykle w przedziale 40–50°C, choć chitynazy z *Streptomyces* sp. M-20 działają w 30°C [40], a chitynazy termostabilne mogą działać nawet w 80°C, jak chitynaza z *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 [81]. Większość chitynaz optimum aktywności osiąga w pH kwaśnym lub obojętnym, ale wiele bakterii produkuje enzymy działające nawet w zakresie pH od 8 do 10, w tym wcześniej już wspomniany *S. thermoviolaceus* OPC-520 [81].

Tak szerokie spektrum temperatur i pH w ramach których chitynazy bakteryjne wykazują optimum aktywności stwarza duży problem z określeniem poziomu tej aktywności, ale przede wszystkim daje możliwość ich szerokiego aplikacyjnego zastosowania do różnych procesów zachodzących w odmiennych warunkach.

4. Pozyskanie chitynaz bakteryjnych, optymalizacja warunków hydrolizy i oznaczanie aktywności

Isolacja ze środowiska bakterii produkujących chitynazy nie jest procesem skomplikowanym, ponieważ polega głównie na dodaniu chityny koloidalnej do podłoża izolacyjnych. Najczęściej bakterie chitynolityczne izolowane są z gleby. Przy czym Gram-dodatnie promieniowce (*Actinomycetes*), w szczególności te należące do rodzaju *Streptomyces* są potencjalnie największym źródłem zewnątrzkomórkowych endo- i egzochitynaz. Oprócz promieniowców obecność chitynaz stwierdzono również u bakterii z rodzaju *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, a także *Vibrio* czy *Stenotrophomonas* [21, 52].

Wykazanie obecności chitynaz u bakterii jest pierwszym etapem w długotrwałym procesie jakim jest optymalizacja warunków działania enzymu, co jest konieczne do określenia jego potencjału aplikacyjnego. Jak już wspomniano jest to grupa enzymów bardzo zróżnicowania pod względem optimum działania. Dlatego konieczne jest dopracowanie warunków reakcji enzymatycznej w celu uzyskania jak największej wydajności. Zwiększenie aktywności chitynaz bakteryjnych uzyskuje się poprzez dodatek do pożywek substratów dla chitynazy, chityny koloidalnej, chito-oligosacharydów czy elementów ścian komórkowych grzybów, a nawet *N*-acetyloglukozaminy [24, 26]. Goma [24] wykazał, że na aktywność chitynaz u *Bacillus thuringiensis*

giensis i *Bacillus licheniformis* wpływ mają czas i temperatura inkubacji, pH pożywki, stężenie substratu. Najwyższą aktywność tego enzymu stwierdzono w 5 dniu inkubacji. Taką samą zależność zaobserwowano dla *Streptomyces* sp. NK1057 [54]. Opóźnienie takie może wynikać z faktu, że chityna jest związkiem o wysokiej masie cząsteczkowej i organizmy potrzebują dłuższego czasu do jego rozłożenia. Wielokrotnie również potwierdzono wpływ zastosowania różnych źródeł węgla czy azotu na aktywność chitynolityczną. Generalnie dodatek glukozy jest uznawany za represor syntezy chitynaz, w tym również ekspresji genów kodujących te enzymy [19]. Z kolei dodatek organicznego źródła azotu, jak np. kazeiny odbija się korzystniej na aktywności chitynaz niż zastosowanie związków nieorganicznych [24, 83]. Dopasowanie składu pożywek oraz warunków hodowli (temperatura i pH) może spowodować nawet 20-krotny wzrost aktywności chitynaz [24].

Aktywność chitynaz oznaczana jest różnymi metodami przy czym najczęściej wykorzystywana jest metoda kolorymetryczna, wiskozymetryczna i radiochemiczna. Metoda kolorymetryczna oparta jest na określaniu monomerów *N*-acetylo-*D*-glukozaminy, uwalnianych z koloidalnej chityny w warunkach utleniających. Najczęściej stosowanym sposobem mierzenia zawartości cukrów redukujących jest metoda Schales z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS) i żelazocyjankiem [68]. Następnie spektrofotometrycznie można oznaczyć zmianę zabarwienia wynikającą z redukcji żelazocyjanku. Jest to metoda stosunkowo prosta, ale posiada wiele wad, jak niewrażliwość przy niskich stężeniach, niska specyficzność, a ponadto długi czas reakcji, czy konieczność podgrzewania mieszaniny reakcyjnej, które z kolei utrudniają zastosowanie tej metody w badaniach wysokoprzepustowych [20]. W metodzie wiskozymetrycznej aktywność chitynazy ocenia się poprzez monitorowanie zmian lepkości rozpuszczonych pochodnych chityny, takich jak glikol etylenowy chityny, karboksymetylochityna i 6-*O*-hydroksypropylochityna. Metoda ta jest bardziej czuła do oznaczania aktywności endochitynaz niż inne metody, jednak jej skuteczność silnie zależy od stopnia polimeryzacji substratów jak i siły jonowej i pH roztworu [32]. Metoda radiochemiczna wykorzystuje znakowaną trytem chitynę. Aktywność chitynazy bada się przez ustalenie radioaktywności powstałych rozpuszczalnych w wodzie, chito-oligosacharydów. Jest to najbardziej czuły sposób jednak wymagający specjalistycznego sprzętu. Do oceny aktywności chitynaz możliwe jest również wykorzystanie detekcji substratu i produktów działania enzymu opartą o spektrometrię masową z jonizacją próbki (MALDI-TOFF MS). Jest to metoda najbardziej wydajna, ponieważ wymaga jedynie 2 µl próby, jest wysokoprzepustowa i w związku z tym można ją wykorzystać na skalę przemysłową [60].

5. Rola chitynaz bakteryjnych w biotechnologii zielonej

Bakterie zdolne do hydrolizy chityny mogą być wykorzystane w biotechnologii zielonej jako biopestycydy do zwalczania grzybów (biofungicydy) oraz owadów (bioinsektycydy).

Biofungicydy

Wiadomo, że grzyby należą do najgroźniejszych czynników chorobotwórczych powodujących ogromne straty w rolnictwie. W celu ograniczenia ich rozwoju stosuje się powszechnie syntetyczne związki chemiczne zwane fungicydami. Alternatywą dla nich są biofungicydy, do których zalicza się mikroorganizmy. Mogą one ograniczyć rozwój chorób grzybowych poprzez produkcję substancji biologicznie czynnych, w tym również enzymów trawiących ściany komórkowe grzybów. Do mikroorganizmów wykorzystujących ten mechanizm należy zaliczyć bakterie produkujące chitynazy zdolne do zwalczania grzybów [69, 76] należących do rodzajów: *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia* *Phytophthora*, *Pythium* czy *Colletotrichum*, powodujących duże straty w rolnictwie. Wśród bakterii najczęściej wykorzystywanych jako biofungicydy występują bakterie z rodzaju *Streptomyces*, *Bacillus* czy *Pseudomonas* (Tab. I).

Prapagdee i wsp. [59] wykazali ograniczenie rozwoju grzybów *Colletotrichum gloeosporioides* i *Sclerotium rolfsii* wykorzystując przesącz kultury wyizolowanego z ryzosfery szczepu *Streptomyces hygrosopicus* SRA14, głównie ze względu na obecność zewnątrzkomórkowej chitynazy. Nagpure i wsp. [53] potwierdzili, że szczep *Streptomyces* sp. MT7, zdolny do produkcji chitynaz był skuteczny w ograniczeniu rozwoju grzybów powodujących gnienie drewna. Choudhary i wsp. [10] wykazali, że szczep *S. exfoliatus* MT9 ogranicza rozwój wielu patogenów owoców. Również wiele bakterii z rodzaju *Bacillus* hamuje wzrost grzybów wykorzystując do tego celu chitynazy. Na przykład, *B. thuringiensis* spp. *colmeri* hamował wzrost wielu fitopatogenów m.in., *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium glaucum* i *Sclerotinia fuckeliana* [47]. Chitynazy z *Bacillus cereus* QQ 308 hamowały wzrost patogenicznych grzybów, takich jak *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* oraz *Pythium ultimum* [8]. Inny szczep *B. cereus* CH2 dzięki chitynazom hamował kiełkowanie zarodników *Verticillium dahliae*, co uniemożliwiło dalszy rozwój tego grzyba i zabezpieczyło bakłażana przed wędnięciem naczyniowym wywoływanym przez tego grzyba [45]. Inny szczep z tego samego gatunku *B. cereus* IO8, jak i *B. thuringiensis* UM96 hamował rozwój powszechnie występującego *B. cinerea* odpowiedzialnego za gnienie owoców i obumieranie kwiatów [28, 49]. Również szczepy należące do *B. circulans* czy *B. pumilus* mają

Tabela I
Bakterie produkujące chitynazy i ich wykorzystanie do zwalczania patogenów grzybowych (biofungicydy)

Bakterie	Patogen grzybowy	Piśmiennictwo
<i>Streptomyces</i> sp. M-20	<i>Botrytis cinerea</i>	[40]
<i>Streptomyces</i> sp. MT7	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Schizophyllum commune</i> , <i>Gleophyllum trabeum</i> , <i>Polyporus agaricans</i> , <i>Polyporus friabilis</i> , <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Postia placenta</i>	[53]
<i>Streptomyces</i> sp. NK1057	<i>Fusarium oxysporum</i>	[54]
<i>Streptomyces exfoliatus</i> MT9	m.in. grzyby z rodzajów <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botryodiplodia</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Rhizopus</i>	[10]
<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Colletotrichum dematium</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	[61]
<i>Streptomyces viridificans</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Colletotrichum dematium</i>	[26]
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> SRA14	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i>	[59]
<i>Bacillus thuringiensis</i> NM101-19	m.in. grzyby z rodzajów <i>Rhizoctonia</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pythium</i>	[24]
<i>Bacillus thuringiensis</i> spp. colmeri	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. piricola</i> , <i>P. glaucum</i> , <i>Sclerotinia fückeliana</i>	[47]
<i>Bacillus thuringiensis</i> UM96	<i>Botrytis cinerea</i>	[49]
<i>Bacillus licheniformis</i> NM120-17	m.in. grzyby z rodzajów <i>Rhizoctonia</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pythium</i>	[24]
<i>Bacillus circulans</i> GRS 243	<i>Phaeoisariopsis personata</i>	[41]
<i>Bacillus cereus</i> CH2	<i>Verticillium dahliae</i>	[45]
<i>Bacillus cereus</i> IO8	<i>Botrytis cinerea</i>	[28]
<i>Bacillus cereus</i> YQQ 308	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Pythium ultimum</i>	[8]
<i>Bacillus pumilus</i> SG2	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Bipolaris</i> sp.	[23]
Fluorescencyjne <i>Pseudomonas</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> fa. sp. <i>dianthi</i>	[2]
Fluorescencyjne <i>Pseudomonas</i>	<i>Phytophthora capsici</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	[3]
Fluorescencyjne <i>Pseudomonas</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Diaporthe phaseolorum</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	[30]
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	[70]
<i>Vibrio pacini</i>	<i>Mucor racemosus</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Zygorhynchus heterogynus</i> , <i>Candida albicans</i>	[4]
<i>Enterobacter</i> sp. NRG4	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor rouxi</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>	[14]
<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. udum</i>	[73]
<i>Aeromonas hydrophila</i> SBK1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	[27]
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	[33]
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	<i>Fusarium udum</i> , <i>Rhizoctonia bataticola</i>	[83]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	[74]
<i>Serratia marcescens</i> GPS 5	<i>Phaeoisariopsis personata</i>	[41]
<i>Serratia marcescens</i> B2	<i>Botrytis cinerea</i>	[72]

zdolność do hamowania rozwoju patogenów grzybowych wywołujących m.in. więdnienie czy zgnilizny [23, 41]. Innym bogatym źródłem chitynaz są bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, a w szczególności szczepy fluorescencyjne. Chitynazy z bakterii fluorescencyjnych z rodzaju *Pseudomonas* jak i same bakterie zapobiegały rozprzestrzenianiu *F. oxysporum* fa. sp. *dianthi*, grzyba powodującego więdnienie goździka [2] oraz grzybów *B. capsici cinerea*, *R. solani*, *Diaporthe phaseolorum* i *Colletotrichum lindemuthianum* wywołujących m.in.

zgnilizny, raki czy antraknozy [30]. Chitynazy produkowane przez szczepy *Pseudomonas* wyizolowane z ryzofery ciecierzycy (*Cicer arietinum* L.) i fasoli złotej (*Vigna radiata* L.) wykazały zdolność hamowania wzrostu grzybni *Pythium aphanidermatum* i *R. solani* w warunkach *in vitro* [70]. Stwierdzono również synergiczny efekt chitynaz oraz β -1,3-glukanaz wytwarzanych przez fluorescencyjne szczepy *Pseudomonas* na zahamowanie wzrostu grzybów *Phytophthora capsici* czy *R. solani* wywołujących zgnilizny [3]. Przeciwgrzybowe

działanie chitynaz wykazano również u szczepów bakterii należących do innych rodzajów, np. *Vibrio pacini* [4], *Enterobacter* sp. NRG4 [14], *Serratia marcescens* [41, 72], *Rhizobium* sp. [73], *Aeromonas hydrophila* SBK1 [27], *Stenotrophomonas maltophilia* [74] czy *Aeromonas caviae* [33].

Bioinsektycydy

Aktualnie do walki ze szkodliwymi owadami najpowszechniej stosowane są syntetyczne insektycydy o wysokiej klasie toksyczności (I, II, III klasa), co stwarza zagrożenie dla środowiska w tym roślin, zwierząt i ludzi. Istnieje zatem wielka potrzeba opracowania skutecznych ale bezpiecznych metod zwalczania owadów. Bakterie produkujące chitynazy mogą być przydatne w opracowaniu bezpiecznych bioinsektycydów, gdyż dzięki chitynazom, „hydrolizującym główny komponent ciała owadów, są w stanie uniemożliwić ich rozwój. Chociaż najczęściej wykorzystywane są w tym celu chitynazy produkowane przez grzyby, szczególnie te atakujące owady, to jednak istnieją doniesienia o wykorzystaniu chitynaz bakteryjnych (Tab. II).

Bakterie stanowią bardzo atrakcyjną alternatywę dla grzybów owadobójczych ze względu na ich szybsze tempo namnażania, a w konsekwencji zwiększenie szybkości zabijania owadów. Owadobójcze działanie chitynaz polega głównie na wspomaganie i synergistycznym działaniu z produkowanymi przez bakterie toksynami. Przykładem takiego działania może być *Bacillus sphaericus*, który z powodzeniem stosowany jest od lat do zwalczania komarów. Jego skuteczność w niszczeniu larw komarów jest związana z produkcją krystalicznych toksyn binarnych [58]. Chitynaza z *B. sphaericus* może wspomagać toksyczność toksyny binarnej przeciwko larwom szkodnika światłówki *Spodoptera exigua* [48]. Endochitynaza ChiAII z *S. marcescens* podobnie jak same bakterie w połączeniu z białkiem endotoksyny CryIC z *B. thuringiensis* również wykazują wysokie działanie owadobójcze wobec larw tego szkodnika [1, 63]. Białka o aktywności chitynolitycznej wyizolowano z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (outer membrane vesicles – OMV) produkowanych przez bakterie *Photorhabdus luminescens akhurstii* oraz *Xenorhab-*

dus nematophilus i wykazano ich aktywność bójczą przeciwko larwom słonecznicy orężówki po podaniu doustnym [39]. Skuteczne okazało się zastosowanie chitynaz produkowanych przez trzy szczepy promieniowców przeciwko *Drosophila melanogaster* w wyniku zakłócania tworzenia stadium poczwarki [22]. Badania przeprowadzone na entomopatogenicznych bakteriach *B. thuringiensis* skupiają się głównie na określaniu skuteczności pod względem dawki letalnej i wrażliwości poszczególnych stadiów rozwoju takich owadów jak tantniś krzyżowiaczek (*Plutella xylostella*), słonecznica orężówka (*Helicoverpa armigera*) czy *Compsilura concinnata* [16–17, 50].

Reasumując, bakterie chitynolityczne w charakterze biofungicydów czy bioinsektycydów w szeroko pojętym rolnictwie stanowią alternatywę dla chemicznych syntetycznych środków ochrony roślin. Co więcej, dzięki inżynierii genetycznej udało się uzyskać rośliny transgeniczne z przeniesionymi z bakterii genami kodującymi chitynazy, co zwiększyło ich odporność na patogeny grzybowe. Rośliny ryżu, do których wprowadzono gen *chiC* kodujący bakteryjną chitynazę z rodziny GH19 były morfologicznie normalne i płodne, a dodatkowo charakteryzowały się zwiększoną odpornością na *Magnaporthe grisea* powodującą choroby liści [34]. Wprowadzenie do pszenicy genu kodującego chitynazę z *Pseudomonas fluorescens* P5 spowodowało zwiększenie odporności tej rośliny na *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, a także ryżu i bawełny na *R. solani* [87]. W ostatnich latach zmieniło się jednak nastawienie do roślin transgenicznych dlatego ważniejsze wydaje się skupienie uwagi na możliwości zastosowania chitynaz jako biopestycydów do bezpośredniej ochrony roślin.

6. Wykorzystanie chitynaz w biotechnologii białej

Chitynazy mogą też znaleźć zastosowanie w biotechnologii przemysłowej nazywanej białą, zajmującej się przetwarzaniem surowców odnawialnych, między innymi takich jak chityna.

Źródłem chityny jak już wspomniano są owoce morza w postaci odpadów poprodukcyjnych. Na te

Tabela II
Bakterie chitynolityczne wykorzystywane do zwalczania owadów

Bakteria	Owady	Piśmiennictwo
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Drosophila melanogaster</i>	[22]
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Plutella xylostella</i> , <i>Compsilura concinnata</i> , <i>Helicoverpa armigera</i>	[16, 17, 50]
<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	[5]
<i>Bacillus sphaericus</i> DL5789	<i>Spodoptera exigua</i>	[48]
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	[63]
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	[1]

Tabela III
Bakterie chitynolityczne wykorzystywane w biotechnologii białej

Bakterie	Proces	Surowiec	Piśmiennictwo
<i>Bacillus subtilis</i>	biodegradacja odpadów	pancerzyki skorupiaków	[7]
<i>Bacillus cereus</i> TKU006	biodegradacja odpadów	pancerzyki skorupiaków	[85]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	biodegradacja odpadów	pancerzyki skorupiaków	[84]
<i>Streptomyces</i> sp.	uzyskiwanie protoplastów	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Fusarium solani</i>	[71]
<i>Streptomyces cyaneus</i> SP-27	uzyskiwanie protoplastów	<i>Schizophyllum commune</i>	[89]
<i>Bacillus circulans</i> WL-12	uzyskiwanie protoplastów	<i>Phaffia rhodozymba</i>	[35]
<i>Bacillus circulans</i> KA-304	uzyskiwanie protoplastów	<i>Schizophyllum commune</i>	[90]
<i>Enterobacter</i> sp. NRG4	uzyskiwanie protoplastów	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Pleurotus florida</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>A. niger</i>	[14]

odpady składają się głównie panczerzyki skorupiaków, takich jak krewetki czy kraby. Ich degradacja zmniejsza zanieczyszczenie środowiska wodnego przez przemysł związany z produkcją owoców morza [31, 77]. Źródłem bakterii chitynolitycznych utylizujących te odpady może być zarówno środowisko morskie, w tym odpady krewetkowe [78], a nawet gleba [79]. Wielokrotnie udowodniono skuteczność chitynaz produkowanych przez bakterie należące do rodzaju *Bacillus* czy *Pseudomonas* w degradacji panczerzy krewetek czy krabów [7, 84–85] (Tab. III).

Rekombinowane chitynazy wykorzystuje się do depolimeryzacji biomasy chityny, a bioaktywne mono czy oligosacharydy mają szerokie spektrum biotechnologicznych zastosowań, między innymi jako bionawozy [15, 66], lub substraty do produkcji kosmetyków [15]. Innym podejściem do efektywnego wykorzystania odpadów chityny jest wytwarzanie białka z pojedynczych komórek (single cell protein – SCP), kiedy to produkty degradacji chityny służą jako źródła węgla lub substancji odżywczych do produkcji biomasy [64].

Obiektem zainteresowań biotechnologii białej są także grzyby w tym drożdże, które są wykorzystywane do produkcji protoplastów służących do badań nad syntezą ścian komórkowych oraz syntezą i wydzielaniem enzymów. Dahiya i wsp. [13–14] wykazali, że chitynazy z *Enterobacter* sp. NRG4 są bardzo skuteczne w uzyskiwaniu protoplastów *Trichoderma reesei*, *Pleurotus florida*, *Agaricus bisporus* czy *A. niger*. Kompleks enzymatyczny z *Bacillus circulans* WL-12 o wysokiej aktywności chitynazy skutecznie generował protoplasty *Phaffia rhodozymba* [35], natomiast chitynaza ze *Streptomyces* była zdolna do wytworzenia protoplastów *Aspergillus oryzae* i *F. solani* [71]. Proces uzyskiwania protoplastów grzybowych jest bardziej wydajny gdy ma miejsce współdziałanie chitynaz z β -1,3-glukanazami w tym procesie, bo jednocześnie hydrolizowane są dwa polisacharydy będące komponentami ściany komórkowej grzybów tj. chityna i glukan [18]. Dodanie oczyszczonej chitynazy A pozyskanej z *Streptomyces cyaneus*

SP-27 do α -1,3-glukanazy z *B. circulans* KA-304 zwiększyło wydajność tworzenia protoplastów z *Schizophyllum commune* [89]. Mieszanina chitynazy I i α -1,3-glukanazy z *B. circulans* KA-304 zwiększyła wydajność uzyskiwania protoplastów *S. commune* [90].

7. Wykorzystanie chitynaz w biotechnologii czerwonej

Chitynazy są również w kręgu zainteresowań biotechnologii czerwonej wykorzystywanej w ochronie zdrowia, szczególnie w zakresie produkcji nowych biofarmaceutyków.

Produktem działania chitynaz są chitoooligosacharydy, które są badane pod kątem wykorzystania medycznego. Potwierdzono antynowotworowe działanie oligosacharydów polegające na zahamowaniu wzrostu lub ograniczeniu przerzutów nowotworów u myszy po podaniu *N*-acetylochitoheksozy [80, 82]. Chitynazy pochodzenia bakteryjnego również wykazują działanie antynowotworowe. Chitynazy z *Bacillus amyloliquefaciens* V656 użyto do zhydrolizowania chitozanu, a uzyskane hydrolizaty (GlcNAc)₆ hamowały proliferację linii CT26 komórek raka okrężnicy [46]. Enzymy te również stanowią doskonały marker wielu groźnych chorób powodowanych przez bakterie m.in. przez *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* czy *Pseudomonas aeruginosa* [21].

Wiele chorób zakaźnych przenoszonych jest przez owady, a chitynazy jak już wspomniano mogą zostać wykorzystane do zwalczania komarów. Chitynaza z *B. sphaericus* może wspomagać toksycność toksyny binarnej przeciwko *Culex quinquefasciatus* [5].

8. Podsumowanie

Kluczową rolę w rozwoju światowej gospodarki odgrywają biopolimery odnawialne. Chityna, drugi po celulozie najczęściej występujący biopolimer, jest nie

tylko bogatym źródłem węgla, ale również azotu. Skorupiaki stanowią potencjalnie największe źródło chityny, choć występuje ona również w ścianach komórkowych grzybów czy egzoszkielecie owadów. Degradacja chityny jest katalizowana w reakcji enzymatycznej przez chitynazy, które rozszczepiają wiązania β -glikozydowe pomiędzy węglem C1 i C4 dwóch sąsiednich *N*-acetylglukozamin. Są to enzymy powszechnie występujące w przyrodzie, jednak kluczową rolę w hydrolizie chityny odgrywają chitynazy bakteryjne, głównie ze względu na ich łatwiejsze pozyskiwanie, co stwarza ogromną możliwość wykorzystania ich w rolnictwie, przemyśle czy medycynie. Chitynazy bakteryjne jak i produkty ich działania, chitoooligomery mogą być wykorzystane w biotechnologii zielonej jako biopestycydy do zwalczania grzybów (biofungicydy) oraz owadów (bioinsektycydy), a także w biotechnologii białej, do degradacji odpadów, czy wreszcie w biotechnologii czerwonej głównie do produkcji biofarmaceutyków. Ze względu na szerokie spektrum wykorzystania chitynaz poznanie dokładnego mechanizmu ich działania może przyczynić się do powiększenia potencjału aplikacyjnego chitynaz.

Piśmiennictwo

- Aggarwal C., Paul S., Tripathi V., Paul B., Khan M.A.: Chitinolytic activity in *Serratia marcescens* (strain SEN) and potency against different larval instars of *Spodoptera litura* with effect of sublethal doses on insect development. *BioControl*, **60**, 631–640 (2015)
- Ajit N.S., Verma R., Shanmugam V.: Extracellular chitinases of fluorescent Pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causing carnation wilt. *Curr. Microbiol.* **52**, 310–316 (2006)
- Arora N.K., Kim M.J., Kang S.C., Maheshwari D.K.: Role of chitinase and β -1,3-glucanase activities produced by a fluorescent pseudomonad and *in vitro* inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* **53**, 207–212 (2007)
- Bao-qin H., Chang-ying Y., Wan-shun L., Ji-Xun D.: Purification and inhibition fungal growth of chitinases from *Vibrio pacini*. *Wuhan Univ. J. Nat. Sci.* **9**, 973–978 (2004)
- Cai Y., Yan J., Hu X., Han B., Yuan Z.: Improving the insecticidal activity against resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes by expression of chitinase gene chiAC in *Bacillus sphaericus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7744–7746 (2007)
- Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B.: The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, 233–238 (2009)
- Chang W.T., Chen M., Wang S.L.: An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 945–950 (2010)
- Chang W.T., Chen Y.C., Jao C.L.: Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Biores. Technol.* **98**, 1224–1230 (2007)
- Chen L., Shen Z., Wu J.: Expression, purification and *in vitro* antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. *Clin. Exp. Dermatol.* **34**, 55–60 (2009)
- Choudhary B., Nagpure A., Gupta R.K.: Fungal cell wall lytic enzymes, antifungal metabolite (s) production, and characterization from *Streptomyces exfoliates* MT9 for controlling fruit-rotting fungi. *J. Basic Microbiol.* **54**, 1295–1309 (2014)
- Cohen-Kupiec R., Chet I.: The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 270–277 (1998)
- Comb D.G., Roseman S.: Glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 193–194 (1956)
- Dahiya N., Tewari R., Hoondal G.S.: Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotech.* **25**, 1–10 (2006)
- Dahiya N., Tewari R., Tiwari R.P., Hoondal G.S.: Production of an antifungal chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4 and its application in protoplast production. *World J. Microbiol.* **21**, 1611–1616 (2005)
- Das S.N., Neeraja Ch., Sarma P.V.S.R.N., Madhu Prakash J., Purushotham P., Kaur M., Dutta S., Podile A.R.: Microbial chitinases for chitin waste management (w) Microorganism in Environmental Management, red. Satyanarayana T., Johri B.N., Prakash A., Springer, New York, 2012, s. 135–150
- Deilamy A., Abbasipour H.: Comparative bioassay of different isolates of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on the third larval instars of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep.: Plutellidae). *Arch. Phytopathol. Plant. Prot.* **46**, 1480–1487 (2013)
- Erb S.L., Bouchier R.S., Frankenhuysen K.V., Smith S.M.: Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the tachinid parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). *Environ. Entomol.* **30**, 1174–1181 (2001)
- Felse P.A., Panda T.: Production of microbial chitinases: a revisit. *Bioprocess. Eng.* **23**, 127–134 (2000)
- Felse P.A., Panda T.: Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 141–151 (1999)
- Ferrari A.R., Gaber Y., Fraaije M.W.: A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulose activity detection. *Biotechnol. Biofuels.* **7**, 37–44 (2014)
- Frederiksen R.F., Paspaliari D.K., Larsen T., Storgaard B.G., Larsen M.H., Ingmer H., Storgaard B.G., Larsen M.H., Ingmer H., Palcic M.M., Leisner J.J.: Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology*, **159**, 833–847 (2013)
- Gadelhak G.G., El-Tarabily K.A., Al-Kaabi F.K.: Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. *Int. J. Agr. Biol.* **7**, 627–633 (2005)
- Ghasemi S., Ahmadian G., Jelodar N.B., Rahimian H., Ghandili S., Dehestani A., Shariati P.: Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary report. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1437–1443 (2010)
- Gomaa E.Z.: Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *J. Microbiol.* **50**, 103–111 (2012)
- Gooday G.W.: The ecology of chitin degradation. *Adv. Microbiol. Ecol.* **11**, 387–430 (1990)
- Gupta R., Saxena R.K., Chaturvedi P., Viridi J.S.: Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 378–383 (1995)
- Halder S.K., Maity Ch., Jana A., Das A., Paul T., Mohapatra P.K.D., Pati B.R., Mondal K.Ch.: Proficient biodegradation of shrimp shell waste by *Aeromonas hydrophila* SBK1 for the concomitant production of antifungal chitinase and antioxidant chitosaccharides. *Int. Biodet. Biodeg.* **79**, 88–97 (2013)
- Hammami I., Siala R., Jridi M., Ktari N., Nasri M., Mohamedali T.: Partial purification and characterization of chiIO8, a novel antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* IO8. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 358–366 (2013)

29. Hartl L., Zach S., Seidl-Seiboth V.: Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 533–543 (2012)
30. Hernández-León R., Rojas-Solís D., Contreras-Pérez M., del Carmen Orozco-Mosqueda M., Macías-Rodríguez L.I., Reyes-de la Cruz H., Valencia-Cantero E., Santoyo G.: Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control*, **81**, 83–92 (2015)
31. Hoang K.C., Lai T.H., Lin C.S., Chen Y.T., Liao C.Y.: The chitinolytic activities of *Streptomyces* sp. TH-11. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 56–65 (2011)
32. Howard M.B., Ekborg N.A., Weiner R.M., Hutcheson S.W.: Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 627–635 (2003)
33. Inbar J., Che, I.: Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in biological control of soil borne plant pathogen by this bacterium. *Soil Biol. Biochem.* **23**, 973–978 (1991)
34. Itoh Y., Takahashi K., Takizawa H., Nikaidou N., Tanaka H., Nishihashi H., Watanabe T., Nishizawa Y.: Family 19 chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 847–855 (2003)
35. Johnson E.A., Villa T.G., Lewis M.J., Phaff H.J.: Lysis of cell wall of yeast *Phaffia rhodozyma* by a lytic complex from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Appl. Biochem.* **1**, 272–282 (1979)
36. Kasprzewska A.: Plant chitinases – regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**, 809–824 (2003)
37. Keyhani N.O., Roseman S.: Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 108–122 (1999)
38. Kezuka Y., Ohishi M., Itoh Y., Watanabe J., Mitsutomi M., Watanabe T., Nonaka T.: Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J. Mol. Biol.* **358**, 472–484 (2006)
39. Khandelwal P., Bhatnagar N.B.: Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2032–2037 (2003)
40. Kim K.J., Yang Y.J., Kim J.G.: Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 185–189 (2003)
41. Kishore G.K., Pande S., Podile A.R.: Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, **95**, 1157–1165 (2005)
42. Kisiel A., Jęckowska K., Kępczyńska E.: Rola chitynaz w rozwoju roślin. *Post. Biol. Kom.* **44**, 273–288 (2016)
43. Kurita K.: Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1921–1971 (2001)
44. Larsen T., Petersen B.O., Storgaard B.G., Duus J.O., Palcic M.M., Leisner J.J.: Characterization of a novel *Salmonella typhimurium* chitinase which hydrolyzes chitin, chitooligosaccharides and an N-acetylglucosamine conjugate. *Glycobiology*, **21**, 426–436 (2011)
45. Li J.G., Jiang Z.Q., Xu L.P., Sun F.F., Guo J.H.: Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium* wilt of eggplant. *Biocontrol*, **53**, 931–944 (2008)
46. Liang T.W., Chen Y.J., Yen Y.H., Wang S.L.: The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656. *Process. Biochem.* **42**, 527–534 (2007)
47. Liu D., Cai J., Xie Ch.-Ch., Liu Ch., Chen Y.-H.: Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* spp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme Microb. Technol.* **46**, 252–256 (2010)
48. Liu M., Cai Q.X., Liu H.Z., Zhang B.H., Yan J.P., Yuan Z.M.: Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 374–379 (2002)
49. Martínez-Absalón S., Rojas-Solís D., Hernández-León R., Orozco-Mosqueda Ma. del C., Peña-Cabriales J.J., Sakuda S., Valencia-Cantero E., Santoyo G.: Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the gray mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Sci. Technol.* **24**, 1349–1362 (2014)
50. Mohan M., Sushil S.N., Bhatt J.C., Gujar G.T., Gupta H.S.: Synergistic interaction between sublethal doses of *Bacillus thuringiensis* and *Campoletis chloridae* in managing *Helicoverpa armigera*. *BioControl*, **53**, 375–386 (2008)
51. Morimoto K., Karita S., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K.: Cloning, sequencing and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinases ChiB and analysis of the functions of novel cadherinlike domains and chitin-binding domain. *J. Bacteriol.* **179**, 7306–7314 (1997)
52. Nagpure A., Choudhary B., Gupta R.K.: Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Crit. Rev. Biotechnol.* **34**, 215–232 (2013)
53. Nagpure A., Choudhary B., Kumar S., Gupta R.K.: Isolation and characterization of chitinolytic *Streptomyces* sp. MT7 and its antagonism towards wood-rotting fungi. *Ann. Microbiol.* **64**, 531–541 (2013)
54. Nawani N.N., Kapadnis B.P.: Production dynamics and characterization of chitinolytic system of *Streptomyces* sp. NK 1057, a well equipped chitin degrader. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 487–494 (2004)
55. Novotna Z., Fliegerova K., Simunek J.: Characterization of chitinases of polycentric anaerobic rumen fungi. *Folia Microbiol.* **53**, 241–245 (2008)
56. Ohnuma T., Numata T., Osawa T., Mizuhara M., Lampela O., Juffer A.H., Skriver K., Fukamizo T.: A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta*, **234**, 123–137 (2011)
57. Patil R.S., Ghormade V., Deshpande M.V.: Chitinolytic enzymes: An exploration. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 473–483 (2000)
58. Payne J.M., Davidson E.W.: Insecticidal activity of crystalline parasporal inclusions and other components of the *Bacillus sphaericus* 1593 spore complex. *J. Invertebr. Pathol.* **43**, 383–388 (1984)
59. Prapagdee B., Kuekulvong C., Mongkolsuk S.: Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci.* **4**, 330–337 (2008)
60. Price N.P.J., Naumann T.A.: A high-throughput matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry-based assay of chitinase activity. *Anal. Biochem.* **411**, 94–99 (2011)
61. Rabeeth M., Anitha A., Srikanth G.: Purification of an antifungal endochitinase from a potential biocontrol agent *Streptomyces griseus*. *Pak. J. Biol. Sci.* **14**, 788–797 (2011)
62. Ramírez-Coutiño L., Marín-Cervantes M.D.C., Huerta S., Revah S., Shirai K.: Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*, **41**, 1106–1110 (2006)
63. Regev A., Keller M., Strizhov N., Sneh B., Prudovsky E., Chet I., Ginzberg I., Koncz-Kalman Z., Koncz C., Schell J., Zilberstein A.: Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3581–3586 (1996)
64. Revah-Moiseev S., Carroad P.A.: Conversion of enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to SCP. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1067–1078 (1981)

65. Sahai A.S., Manocha M.S.: Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**, 317–338 (1993)
66. Sakai K., Yokota A., Kurokawa H., Wakayama M., Moriguchi M.: Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3397–3402 (1998)
67. Saks E., Jankiewicz U.: Aktywność chitynolityczna bakterii. *Post. Biochem.* **56**, 427–434 (2010)
68. Schales O., Schales S.S.: Simple method for the determination of glucose in blood. *Proc. Am. Fed. Clin. Res.* **2**, 78 (1945)
69. Sharma N., Sharma K.P., Gaur R.K., Gupta V.K.: Role of chitinase in plant defense. *Asian J. Biochem.* **6**, 29–37 (2011)
70. Sindhu S.S., Dadarwal K.R.: Chitinolytic and cellulolytic pseudomonas antagonistic to fungal pathogens enhance nodulation by *Mesorhizobium* sp in chickpea. *Microbiol. Res.* **156**, 353–358 (2001)
71. Skujins J.J., Potgeiter H.J., Alexander M.: Dissolution of fungal cell walls by *Streptomyces* chitinase and β -1,3-glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 358–364 (1965)
72. Someya N., Nakajima M., Hirayae K., Hibi T., Akutsu K.: Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2 against the gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant. Pathol.* **67**, 312–317 (2001)
73. Sridevi M., Mallaiah K.V.: Factors effecting chitinase activity of *Rhizobium* sp. from *Sesbania sesban*. *Biologia*, **63**, 307–312 (2008)
74. Suma K., Podile A.R.: Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities. *Biores. Technol.* **133**, 213–220 (2013)
75. Suzuki K., Sugawara N., Suzuki M., Uchiyama T., Katouno F., Nikaidou N., Watanabe T.: Chitinases, A, B and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *E. coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1075–1083 (2002)
76. Swiontek-Brzezinska M., Jankiewicz U., Burkowska A., Walczak M.: Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Curr. Microbiol.* **68**, 71–81 (2014)
77. Swiontek-Brzezinska M., Lalke-Porczyk E., Donderski W.: Occurrence and activity of microorganisms in shrimp waste. *Curr. Microbiol.* **57**, 580–587 (2008)
78. Swiontek-Brzezinska M., Lalke-Porczyk E., Donderski W.: Chitinolytic activity of bacteria and fungi isolated from shrimp exoskeletons. *Ocean. Hydrob. Studies*, **36**, 101–111 (2007)
79. Swiontek-Brzezinska M., Lalke-Porczyk E., Donderski W.: The role of chitinolytic bacteria and fungi in biodegradation of crustacean remains in lacustrine habitats. *Pol. J. Ecol.* **56**, 335–342 (2008)
80. Tokoro A., Tatewaki N., Suzuki K., Mikami T., Suzuki S., Suzuki M.: Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 784–790 (1988)
81. Tsubiyo H., Minoura K., Miyamoto K., Moriwaki M., Inamori Y.: Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 620–622 (1993)
82. Tsukada K., Matsumoto T., Aizawa K., Tokoro A., Naruse R., Suzuki S., Suzuki M.: Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 259–265 (1990)
83. Vaidya R.J., Shah I.M., Vyas P.R., Chatpar H.S.: Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential antifungal biocontrol. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 62–69 (2001)
84. Wang S.L., Chang W.T.: Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in shrimp and crab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 380–386 (1997)
85. Wang S.L., Chao C.H., Liang T.W., Chen C.C.: Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. *Mar. Biotechnol.* **11**, 334–344 (2009)
86. Wiweger M., Farbos I., Ingouff M., Langercrantz U., Von Arnold S.: Expression of *Chia4-Pa* chitinase genes Turing somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. *J. Exp. Bot.* **54**, 2691–2699 (2003)
87. Xiao-Jing X., Li-Qun Z., You-Yong Z., Wen-Hua T.: Improving biocontrol effect of *Pseudomonas fluorescens* P5 on plant diseases by genetic modification with chitinase gene. *Chin. J. Agric. Biotechnol.* **2**, 23–27 (2005)
88. Yan Q., Fong S.S.: Bacterial chitinase: nature and perspectives for sustainable bioproduction. *Biores. Bioproc.* **2**, 31 (2015)
89. Yano S., Rattanakit N., Honda A., Noda Y., Wakayama M., Plikomol A., Tachiki T.: Purification and characterization of chitinase A of *Streptomyces cyaneus* SP-27: an enzyme participates in protoplast formation from *Schizophyllum commune* mycelia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 54–61 (2008)
90. Yano S., Rattanakit N., Wakayama M., Tachiki T.: A chitinase indispensable for formation of protoplast of *Schizophyllum commune* in basidiomycete-lytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1299–1305 (2004)
91. Zarandi H.S., Bagheri A., Baghizadeh A., Moshtaghi N.: Quantitative analysis of chitinase gene expression in chickpea. *Russ. J. Plant. Physiol.* **58**, 681–685 (2011)