

Biopolimeri hitin i hitozan – svojstva i priprava

D. Skendrović,^a L. Terihaj,^a T. Rezić^b i A. Vrsalović Presečki^{a*}

^a Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Trg Marka Marulića 19, 10 000 Zagreb

^b Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierrotijeva 6, 10 000 Zagreb

Ovo djelo je dano na korištenje pod
Creative Commons Attribution 4.0
International License



Sažetak

S porastom svijesti o zaštiti okoliša sve se više okrećemo prirodnim izvorima energije i prirodnim materijalima. Veliku važnost u tome imaju biopolimeri koji su potpuno razgradivi u prirodi. Jedan od važnijih biopolimera su hitin i hitozan, koji su po zastupljenosti na drugom mjestu nakon celuloze. Velike količine hitina i hitozana nalaze se u biosferi kao važni sastojci egzoskeleta mnogih organizama i kao otpad tvrtki za proizvodnju morskih plodova. Stoga političari, ekolozi i industrija potiču upotrebu tih morskih polisaharida kao obnovljivih izvora. Cilj ovog rada je opisati fizikalno-kemijska i biološka svojstva i različite metode ekstrakcije hitina i hitozana ponajprije iz morskog otpada. Hitin se može ekstrahirati kemijskom i biološkom ekstrakcijom te je u ovom radu dana usporedba između te dvije metode s naglaskom na enzimsku deproteinizaciju, fermentaciju bakterija i metode enzimske deacetilacije. Zahvaljujući biorazgradljivosti, netoksičnosti, biokompatibilnosti i bioaktivnosti, ti morski polimeri naširoko se upotrebljavaju u suvremenoj proizvodnji biomedicinskih i farmaceutskih proizvoda.

Ključne riječi

Hitin, hitozan, biorazgradivost, biomaterijali, polisaharidi, zelena tehnologija, otpad, morski resursi

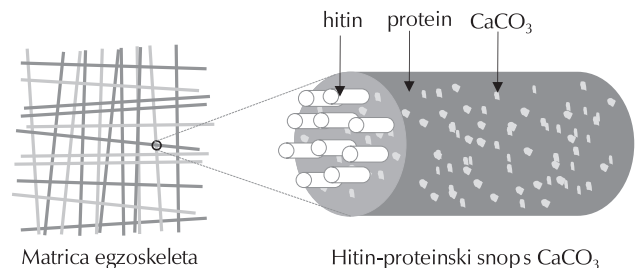
1. Uvod

Biopolimeri imaju široku primjenu u različitim područjima, kao što su biomedicina, prehrambena i kemijska industrija.^{1,2} Među biopolimerima dobivenim iz prirodnih izvora polisaharidi privlače veliku pozornost zahvaljujući biomedicinskim i fizikalno-kemijskim svojstvima, kao što su biorazgradivost, biokompatibilnost, netoksičnost, obnovljivost i raspoloživost. Zbog njihove niske cijene i sveprisutnosti u prirodnim živim organizmima poželjniji su za primjenu od sintetičkih polimera.³ Polisaharidi se prema svojoj prirodi mogu klasificirati na kisele (karagenan, alginska kiselina, hijaluronska kiselina, hondroitin sulfat), bazične (hitin i hitozan, polilizin) ili neutralne (dekstran, agaroz, pululan)⁴. Što se tiče osnovnih polisaharida, hitin i njegov glavni derivat hitozan su najvažniji i najzastupljeniji morski polimeri u svijetu, a njihova fizikalno-kemijska svojstva ovise o podrijetlu i načinu ekstrakcije.

1.1. Fizičke i kemijske karakteristika hitina i hitozana i njihova primjena

Prije više od 200 godina francuski botaničar Henri Braconnot je prilikom istraživanja jestivih gljiva otkrio novi polisaharid, koji je 1823. godine dobio ime hitin.⁵ Hitin je prirodni polisaharid koji se pretežno nalazi u staničnim stjenkama gljiva i egzoskeletima ljuskara i kukaca (slika 1).

To je drugi najzastupljeniji polisaharid u svijetu nakon celuloze, a svjetska godišnja proizvodnja iznosi $\sim 10^{11}$ t.⁶ Industrija morskih plodova godišnje proizvodi $\sim 10^7$ tona hitina



Matrica egzoskeleta

Hitin-proteinski snop s CaCO_3

Slika 1 – Hitin u biološkim matricama. Vlaknasti kompozit hitina, strukturnih proteina i CaCO_3 sastavlja matricu egzoskeleta ljuskara.

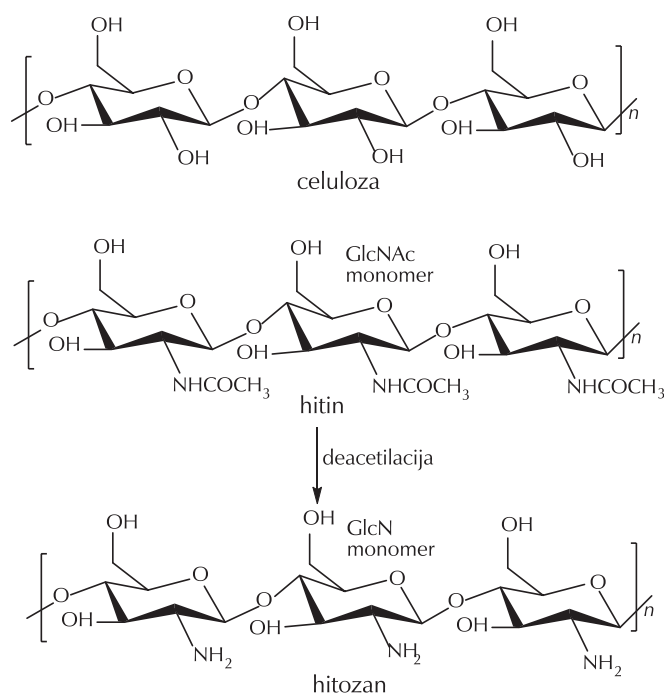
Fig. 1 – Chitin in biological matrices. The fibrous composite of chitin, structural proteins, and CaCO_3 makes up the matrix of crustacean exoskeletons.

kao otpada, od čega se većina kompostira ili pretvara u proizvode niske vrijednosti, kao što su gnojiva, hrana za kućne ljubimce i riblje brašno.⁷ Kemijska struktura hitina vrlo je slična celulozi, a razlikuju se po vezanim skupinama na atomu C2 (slika 2). Naime, kod hitina je ta skupina acetamidna (CH_3CONH), a kod celuloze hidroksilna.⁸ Kristalna struktura hitina sastoji se od poli(1,4)-N-acetil-2-amino-2-deoksi- β -D-glukoze (GlcNAc) uz postojanje ostataka 2-amino-2-deoksi- β -D-glukoze (GlcN) te je sam materijal bijele boje, neelastičan i tvrd.

Fizikalna i kemijska svojstva hitina i hitozana ovise o sirovinama iz kojih se dobivaju i o načinu pripreme. U prirodi postoje tri alomorfa hitina — α (najčešći), β i γ . α -hitin uglavnom se dobiva iz gljiva, kvasca, jastoga, rakova, škampa i kukaca; β -hitin nalazi se u lignjama, dok je γ -hitin prisutan u kukcima *Ptinus* i lignjama *Loligo*.⁹

* Autor za dopisivanje: prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
e-pošta: avrsalov@fkit.hr

Hitin je žilav, neelastičan i netopljiv u vodenom mediju, zbog velikog broja vodikovih veza koje se stvaraju između acetamidnih skupina u susjednim polimernim lancima. Hitin stoga nema značajnu industrijsku primjenu, iako se može upotrebljavati kao matrica za pročišćavanje enzima koji posjeduju domene koje se vežu za ugljikohidrate¹⁰ i kao materijal za izradu membrana za zadržavanje proteina¹¹ (slika 3). Dodatno, manji oligomeri hitina upotrebljavaju se u poljoprivrednoj industriji kao stimulatori rasta biljaka.^{12,13} Hitin je primarna sirovina za proizvodnju komercijalno važnijeg polimera hitozana (slika 2) kao i oligomera hitozana (engl. *chitosan oligomers*, COS). Hitozan je kao i hitin kopolimer jedinica GlcN i GlcNAc, uz razliku da monomeri GlcN prevladavaju u njegovoj strukturi.¹⁴ Hitozan se stoga smatra deacetiliranim derivatom hitina, često definiranim stupnjem acetilacije (DA) (slika 2). Hitin postaje hitozan kad DA dosegne 50 %, ali iz praktičnih razloga naziv hitozan i dalje se upotrebljava za molekule s nižim DA, a hitin je obično rezerviran za opisivanje polimera gdje je DA ~100 %. Osim o DA, svojstva hitina i hitozana također ovisi o stupnju polimerizacije (DP), koji ukazuje na duljinu lanca i proporcionalan je molekularnoj masi (M_w).¹⁵



Slika 2 – Kemijska struktura celuloze, hitina i njegovog potpuno deacetiliranog derivata hitozana. Celuloza je polimer glukoze, a hitin i hitozan su polimeri *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i glukozamina (GlcN).⁸

Fig. 2 – Chemical structure of cellulose, chitin and its fully deacetylated derivative chitosan. Cellulose is a polymer of glucose, and chitin and chitosan are polymers of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and glucosamine (GlcN).⁸

Hitozan je netopljiv u neutralnoj vodi, ali se otapa u kiselim otopinama kao što su otopine mliječne, octene, gluta-

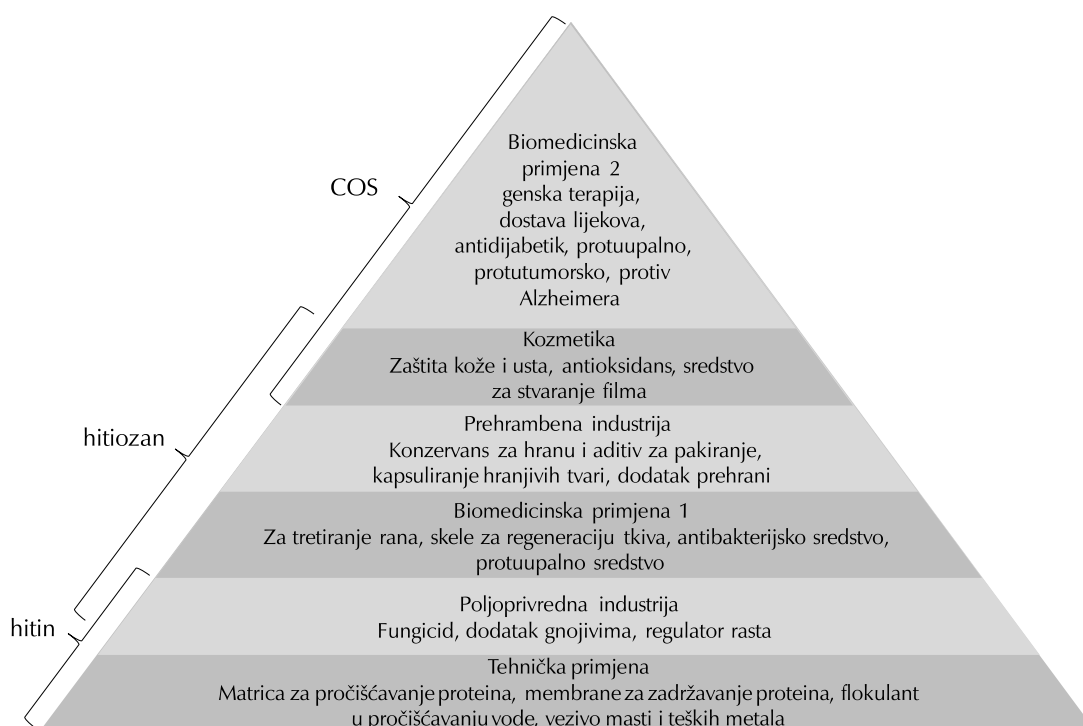
minske i klorovodične kiseline (pH do 6,5). Razlog navedenom je manji broj *N*-acetiliranih skupina te prisutnost primarnih aminoskupina (s pKa od 6,3) koji se protoniraju, što dovodi do pozitivno nabijenog polimera i daje karakteristike jake lužine. Na pH višem od 6,0, polisaharid postaje netopljiv i taloži se zbog deprotonacije amina. Na tržištu se danas mogu naći hitozani s visokim stupnjem deacetilacije u širokom rasponu M_w te u obliku baze i kao sol lako topljiva u vodi bez upotrebe kiselih otopina.¹⁶ Najčešća otapala za otapanje hitozana su: octena kiselina (1 % pH blizu 4); mravlja kiselina (0,2 – 100 %); 1 % klorovodična kiselina; mliječna kiselina; i razrijeđena dušična kiselina. Hitozan je netopljiv u sumpornoj i fosfornoj kiselini.¹⁷

Hitozan pokazuje širok raspon bioloških učinaka, uključujući antibakterijsko, antifungalno, protuupalno i antikarcinogeno djelovanje, kao i sposobnost vezanja masti, stvaranja filma, antioksidansa i keliranja, što dovodi do primjene u nekoliko industrijskih sektora (slika 3).^{18,19} U prehrambenoj industriji hitozan se upotrebljava kao konzervans, aditiv za pakiranje, dodatak prehrani i kao sustav za kapsuliranje hranjivih tvari.²⁰ U kozmetičkoj industriji hitozan se upotrebljava kao antioksidans i antibakterijski agens u proizvodima za zaštitu kože, pastama za zube i vodicama za ispiranje usta te kao sredstvo za stvaranje filma u šamponima i losionima.²¹ U poljoprivrednoj industriji hitozan se upotrebljava za zaštitu biljaka od bakterija, gljivica i virusa, kao regulator rasta biljaka i kao dodatak gnojivu.²² U industriji pročišćavanja otpadnih voda svojstvo hitozana za vezanje masti i keliranja primjenjuje se za uklanjanje masti, bojila i teških metala²³ (slika 3).

Čisti hitozan je biokompatibilan, biorazgradiv i netoksičan, pa su njegova antimikrobna i protuupalna svojstva također idealna za medicinsku primjenu.²⁴ Hitozan se stoga upotrebljava kao antibakterijski agens u zavojima za rane, kao nevirusni vektor za gensku terapiju, a hitozan hidrogelovi upotrebljavaju se kao sustavi za isporuku lijekova i za liječenje raka²⁵ (slika 3). Dodatno, skele na bazi hitozana upotrebljavaju se u regeneraciji tkiva²⁶ (slika 3). Međutim, medicinska i tehnička primjena hitozana ograničena je zbog njegove niske topljivosti pri fiziološkom pH, te se češće primjenjuju COS-ovi koji su topljiviji i stoga prikladniji za medicinsku i kozmetičku primjenu.²⁷ COS također ima bioaktivna svojstva koja nedostaju duljem polimeru hitozana, jer zbog svoje veličine mogu ući u stanične membrane i na taj način utjecati na ekspresiju gena i biološke procese.²⁸ Medicinske primjene COS-a stoga kombiniraju antimikrobna, protuupalna i antioksidativna svojstva hitozana s poboljšanom topljivošću i sposobnošću specifičnog vezanja nukleinskih kiselina i određenih lijekova²⁹ (slika 3).

2. Ekstrakcija hitina

Glavni izvori sirovine za proizvodnju hitina su kutikule raznih ljuskara, ponajprije rakova, škampa i kozica. U njima se hitin nalazi kao sastavni dio složene mreže s proteinima na koje je istaložen kalcijev karbonat koji formira čvrstu ljusku (slika 1). Interakcija između hitina i proteina vrlo je jaka, a također je mali dio proteina uključen u polisaharid-proteinski kompleks.³⁰ Stoga izolacija hitina iz ljuskara zahtijeva uklanjanje dvaju glavnih sastojaka ljuske: protei-



Slika 3 – Primjena hitina, hitozana i hitozanskih oligomera (COS) poredane prema područjima primjene, različiti tržišta i kvaliteti proizvoda. Biomedicinska primjena je podijeljena u dva segmenta: primjena za nedefiniranog hitozana i primjena za definirani COS.

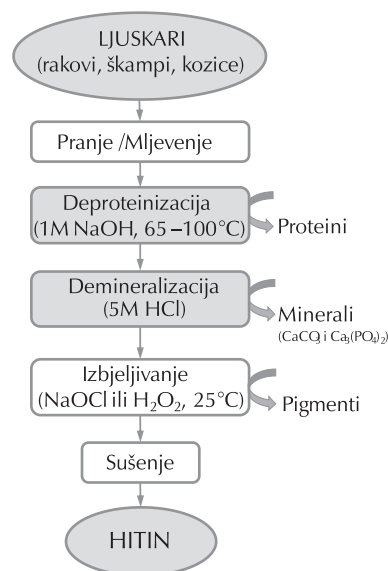
Fig. 3 – Application of chitin, chitosan, and chitosan oligomers (COS) sorted by application areas, market size, and product quality. Biomedical application is divided into two segments: application for undefined chitosan, and application for defined COS.

na – deproteinizacijom i anorganskog kalcijeva karbonata demineralizacijom, zajedno s malim količinama pigmenata i lipida koji se najčešće uklanjaju tijekom dva prethodna koraka. U nekim slučajevima primjenjuje se dodatni korak dekolorizacije da bi se uklonili ostatci pigmenata. Tijekom godina su primjenjivane različite metode za pripremu čistog hitina; međutim, nije usvojena standardna metoda. Deproteinizacija i demineralizacija mogu se provesti kemijskim ili enzimskim tretmanima. Redoslijed tih koraka može se obrnuti uz određenu korist, posebno kad se primjenjuje enzimatski tretman. Također se primjenjuje mikroba fermentacija, pri čemu se deproteinizacija i demineralizacija mogu provoditi istodobno.

Bez obzira na odabrani tretman, izolacija hitina počinje odabirom ljuski. Na primjer, za jastoge i rakove, odabir ima važan utjecaj na kasniju kvalitetu konačnog izoliranog materijala. U idealnom slučaju odabiru se ljuske iste veličine i vrste. Kod škampa i kozica stijenka ljuske je tanja, pa je izolacija hitina lakša nego kod drugih vrsta ljusaka. Odabrane ljuske se prije ekstrakcije čiste, suše i melju.

2.1. Kemijska ekstrakcija

Kemijske metode za pripremu hitina iz otpada ljuske rakova sastoje se od mehaničkog mljevenja, demineralizacije s jakim anorganskim kiselinama i deproteinizacije s lužinom na povišenoj temperaturi³¹ (slika 4).



Slika 4 – Shema proizvodnje hitina kemijskom metodom³¹

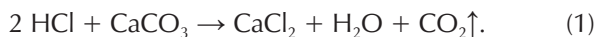
Fig. 4 – Scheme of chitin production following chemical methods³¹

Deproteinizacija je dosta zahtjevna, jer je potrebno prekinuti kemijske veze između hitina i proteina. Kemijski postupkom deproteinizacije također dolazi i do depolimeri-

zacije biopolimera. Potpuno uklanjanje proteina posebno je važno za biomedicinske primjene, budući da je oko 3 % ljudske populacije alergično na ljuske, a glavni krivac je proteinska komponenta.

Kemijske metode su ujedno i prvi pristup primijenjen u deproteinizaciji. Širok raspon kemikalija može se upotrijebiti za tu svrhu uključujući NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, CaHSO₃, Na₃PO₄ i Na₂S. NaOH je preferencijalni reagens i upotrebljava se u koncentraciji od 0,125 do 5,0 M, pri različitim temperaturama (do 160 °C) i trajanju tretmana (od nekoliko minuta do nekoliko dana). Uz deproteinizaciju, uporaba NaOH uvijek rezultira djelomičnom deacetilacijom hitina i hidrolizom biopolimera smanjujući njegovu molekularnu težinu.³²

Demineralizacija se sastoji u uklanjanju minerala, ponajprije kalcijeva karbonata. Demineralizacija se općenito provodi kiselinskim tretmanom pomoću HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH i HCOOH.³³ Među navedenim kiselinama preferencijalni reagens je razrijeđena klorovodična kiselina. Demineralizacija se lako postiže jer uključuje razgradnju kalcijeva karbonata na kalcijeve soli topljive u vodi uz oslobađanje ugljikova dioksida kao što je prikazano u jedn. (1).



Većina ostalih minerala prisutnih u kutikuli rakova reagiraju slično i daju topljive soli u prisutnosti kiseline. Soli se mogu lako odvojiti filtracijom čvrste faze hitina nakon čega slijedi pranje deioniziranom vodom.

Tretmani demineralizacije često su empirijski i variraju ovisno o stupnju mineralizacije svake ljuske, vremenu ekstrakcije, temperaturi, veličini čestica, koncentraciji kiseline i omjeru otopljene tvari/otapalo. Potonje ovisi o koncentraciji kiseline, budući da su potrebne dvije molekule HCl-a da bi se jedna molekula kalcijeva karbonata pretvorila u kalcijev klorid. Da bi reakcija bila potpuna, unos kiseline trebao bi biti jednak stehiometrijskoj količini minerala ili čak i veći.³⁴ Budući da je teško ukloniti sve minerale (zbog heterogenosti krutine), upotrebljava se veći volumen ili koncentrirana otopina kiseline. Demineralizacija se može pratiti acidimetrijskom titracijom.³⁵

Prije je primjenjivano nekoliko tretmana demineralizacije koji su uključivali različite reakcijske uvjete. Uobičajeno, demineralizacija se postiže uporabom razrijeđene klorovodične kiseline u različitim koncentracijama (do 10 % w/v) na sobnoj temperaturi, tijekom različitog vremena inkubacije.³⁶

Navedena metoda može uzrokovati modifikacije prirodnog hitina, kao što su depolimerizacija i deacetilacija. Da bi se to izbjeglo, razvijene su druge metode uporabom blagih kiselina (da bi se razgradnja svela na minimum), kao npr. etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) i octene kiseline. Međutim, ti tretmani rezultirali su hitinom s visokim udjelom zaostalog pepela.³²

Demineralizacija pomoću HCl obično se postiže za 2 do 3 h uz miješanje³⁷ s tim da vrijeme reakcije varira od 15 min³³ do 48 h. Dulje vrijeme demineralizacije, čak i do

nekoliko dana, rezultira blagim padom sadržaja pepela, ali također uzrokuje razgradnju polimera.³⁸

Optimirana ekstrakcijska metoda proizvodnje čistog hitina uz maksimalno očuvanje njegove strukture (M_w , DA) omogućuje dobivanje hitina koji odgovara prirodnom hitinu u strukturi kutikule. U studiji *Tolaimate i sur.*³⁵ predložen je novi pristup primjenom uzastopnih tretmana s nižim koncentracijama HCl (0,55 M) i NaOH (0,3 M). Broj tretmana ovisio je o ispitivanom podrijetlu hitina. Ta metoda pokazala je dobru učinkovitost u smanjenju proteina i minerala, kao i očuvanju prirodnog oblika hitina za 12 različitih vrsta rakova i glavonožaca. DA pripremljenih hitina varirao je između 96 i 100 % za sve vrste.

2.2. Biološka ekstrakcija hitina

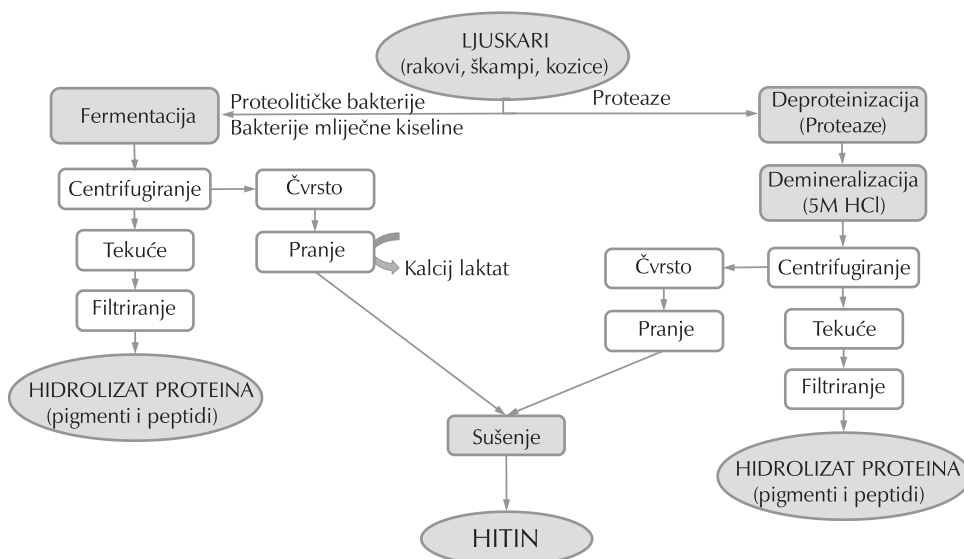
Ekstrakcija kemijskim tretmanima ima mnoge nedostatke: (i) šteti fizikalno-kemijskim svojstvima hitina i dovodi do smanjenja M_w i DA što negativno utječe na intrinzična svojstva pročišćenog hitina; (ii) utječe na efluent otpadnih voda i (iii) povećava cijenu procesa pročišćavanja hitinom. Nadalje, razvoj tehnika zelene ekstrakcije temeljenih na konceptu "zelene kemije" dobiva sve veću pozornost, favorizirajući primjenu enzima i mikroorganizama za ekstrakciju hitina. Komparativnom studijom ekstrakcije hitina iz ljuske škampa kemijskim i biološkim metodama pokazano je da je biološka metoda (uporabom mikroorganizama) bolja od kemijske jer čuva strukturu hitina.³⁹ Pored navedenog, biološka ekstrakcija hitina relativno je jednostavna te je odlikuje manja potrošnja otapala i energije. Međutim, biološka metoda još uvijek je ograničena na laboratorijske studije.

Biološke metode koje se primjenjuju za ekstrakciju hitina uključuju uporabu proteolitičkih enzima za razgradnju proteina ili proces fermentacije pomoću mikroorganizama koji omogućuje razgradnju i proteina i minerala (slika 5).^{40,41}

2.3. Enzimatska deproteinizacija

U svrhu ekstrakcije hitina iz ljuski rakova upotrebljavaju se enzimi proteaze. Proteolitički enzimi uglavnom se dobivaju iz biljnih, mikrobnih i životinjskih izvora. Mnoge proteaze kao što su alkalaza, pepsin, papain, pankreatin, devolvaza i tripsin uklanjaju proteine iz ljuski rakova i minimiziraju deacetilaciju i depolimerizaciju tijekom izolacije hitina. Ta se obrada može izvesti nakon ili prije koraka demineralizacije čvrstog materijala.

Proteaze koje se upotrebljavaju u koraku deproteinizacije mogu biti pročišćene i sirove. Komercijalno pročišćeni enzimi su skupi za razliku od sirovih proteaza, koje su ne samo jeftinije nego i učinkovitije zbog prisutnosti koegzistirajućih proteaza. Sirove proteaze uglavnom potječu od bakterija i iznutrica ribe, a najčešće su bakterijske proteaze. Morske životinje imaju iste funkcionalne klase enzima, koji su prisutni u životinjskim tkivima i mogu se dobiti u aktivnim i stabilnim oblicima za komercijalnu upotrebu. U nekoliko zemalja koje su najveći proizvođači ribe, nusproizvodi čine oko 50 % plodova mora.⁴² Ti se materijali uglav-

Slika 5 – Shema proizvodnje hitina biološkom metodom⁴¹Fig. 5 – Scheme of chitin and chitosan production following biological methods⁴¹

nom nedovoljno upotrebljavaju i odlažu se kao otpad. Stoga bi uporaba sirovih enzima iz tih izvora u procesu ekstrakcije hitina mogla biti zanimljiva u smanjenju troškova tog procesa kao i u očuvanju okoliša. Mora se napomenuti da je učinkovitost enzimskih metoda nešto manja u odnosu na kemijske metode s otprilike 5 – 10 % zaostalog proteina vezanog za izolirani hitin. Konačni izolirani hitin se stoga dodatno treba tretirati s NaOH (u blažim uvjetima i za kraće vrijeme), da bi se povećala njegova čistoća i očuvala struktura hitina.

Mnoga izvješća pokazala su uporabu bakterijskih proteaza u koraku deproteinizacije. Na primjer, *Synowiecki i Al-Khateeb*⁴³ primijenili su enzimsku deproteinizaciju na prethodno demineraliziranom otpadu škampa, da bi proizveli hitin i nutritivno vrijedan hidrolizat proteina. Upotrijebljena je alkalaza 2,4 I (Novo Nordisk A/S), serinska endopeptidaza dobivena iz *B. licheniformis*. Taj enzim odabran je zbog svoje specifičnosti za terminalne hidrofobne aminokiseline, što općenito dovodi do proizvodnje negorkog hidrolizata i omogućuje jednostavnu kontrolu stupnja hidrolize. Dobiveni hidrolizat dobar je izvor esencijalnih aminokiselina te ima dodatnu vrijednost. Međutim, učinkovitost deproteinizacije bila je ograničena prisutnošću zaostalih malih peptida i aminokiselina vezanih za molekule hitina, koje perzistiraju nakon enzimske hidrolize. Ta metoda omogućuje izolaciju hitina koji sadrži oko 4 % proteinskih nečistoća. Takva čistoća dovoljna je za mnoge nemedicinske primjene hitina. *Gildberg i Stenberg*⁴⁴ također su upotrijebili alkalazu 2,4 I za ekstrakciju hitina, uporabu proteinskog hidrolizata i astaksantina.

*Manni i sur.*⁴⁵ usporedili su izolaciju hitina iz otpada škampa uporabom *B. cereus* SV1 sirovih alkalnih proteaza s upotrebom 1,25 M NaOH. Ljuske škampa su demineralizirane nakon deproteinizacije uporabom razrijeđene HCl. Sadržaj zaostalog proteina bio je nešto veći u hitinu izoliranom enzimskom deproteinizacijom od onog dobivenog alkalnom obradom (10 % u usporedbi sa 6 %).

U drugoj studiji *Younes i sur.*⁴⁶ optimirali su enzimsku deproteinizaciju prije demineralizacije. U toj studiji uspoređene su mnoge mikrobne proteaze na temelju njihove učinkovitosti u deproteinizaciji ljuske škampa. Upotrijebljeno je šest alkalnih sirovih mikrobnih proteaza iz *B. mojavensis* A21, *B. subtilis* A26, *B. licheniformis* NH1, *B. licheniformis* MP1, *Vibrio metschnikovii* J1 i *Aspergillus clavatus* ES1. Najveći stupanj deproteinizacije postignut je uz proteaze iz *B. mojavensis* A21, koji je iznosio oko 76 %. Optimiranjem utjecaja reakcijskih uvjeta: omjera enzim/supstrat, temperature i vremena inkubacije, na stupanj deproteinizacije, uz primjenu metodologije odzivne površine, postignuta je 88 %-tna deproteinizacija.

U posljednje vrijeme mnoge su alkalne sirove proteaze riba i morskih beskralježnjaka upotrijebljene za deproteinizaciju ljuske škampa. *Mukhin i Novikov*⁴⁷ proučavali su mogućnost uporabe otpada rakova i kao supstrata i kao izvora proteaza. Proteini iz ljuske razgrađivani su sirovim proteazama izoliranim iz hepatopankreasa rakova. Pri optimiranim uvjetima stupanj hidrolize bio je 80 %.

*Younes i sur.*⁴⁸ upotrijebili su alkalne proteaze iz crvene škarpine *Scorpaena scrofa* za deproteinizaciju otpada od škampa te je postignut učinak od 85 %.

Kad se ekstrakcija provodi kemijskim postupkom, redoslijed dvaju koraka (deproteinizacija i demineralizacija) nema znatan utjecaj na kvalitetu i prinos konačnog hitina.⁴⁹ Međutim, ako se primjenjuje enzimsku deproteinizaciju, minerali prisutni u kutikulama mogu smanjiti dostupnost proteaza i utjecati na učinkovitost deproteinizacije ljuske škampa, te je stoga najprije potrebno napraviti demineralizaciju.

2.3. Fermentacija

Trošak uporabe enzima može se smanjiti provođenjem deproteinizacije postupkom fermentacije, što se može

postići endogenim mikroorganizmima (auto-fermentacija) ili dodavanjem odabranih sojeva mikroorganizama. Ovo posljednje može se postići fermentacijom u jednom stupnju, fermentacijom u dvije faze, kofermentacijom ili uzastopnom fermentacijom.³²

Metode fermentacije mogu se podijeliti u dvije kategorije: fermentaciju bakterijama mliječne kiseline i fermentaciju proteolitičkim bakterijama.

(a) Fermentacija bakterijama mliječne kiseline

Fermentacija ljuske rakova provodi se uz soj *Lactobacillus* sp. koji proizvodi mliječnu kiselinu i proteaze. Mliječna kiselina dobiva se pretvorbom glukoze, što rezultira nižim pH potiskujući rast mikroorganizama. Mliječna kiselina reagira s kalcijevim karbonatom, što dovodi do stvaranja taloga kalcijeva laktata. Taj se proces može provesti ili na očišćenim ljuskama rakova ili na potpunom otpadu škampa (uključujući glave i utrobu). Do deproteinizacije i istodobne hidrolize proteina može doći djelovanjem proteaza koje proizvode dodani sojevi, ili crijevnih bakterija prisutnih u crijevnom sustavu tretiranih škampa, ili proteaza prisutnih u samom biootpadu. Učinkovitost mliječnokiselinske fermentacije ovisi o mnogim čimbenicima, uglavnom o vrsti i količini inokuluma, izvoru ugljika i njegovoj koncentraciji, početnom pH i promjeni pH tijekom fermentacije, temperaturi i trajanju fermentacije.⁵⁰

*Choorit i sur.*⁵¹ su metodologijom odzivnih površina optimirali učinkovitosti demineralizacije u fermentiranim ljuskama škampa. Ispitivane su sljedeće varijable: koncentracija saharoze, početna pH vrijednost i vrijeme namakanja, uporabom *Pediococcus* sp. L1/2. Rezultati su pokazali povećanje stupnja demineralizacije s većom koncentracijom saharoze i vremenom namakanja kao i važan učinak početnog pH. Stupanj demineralizacije dosegao je oko 83 % pri pH 7, u usporedbi sa 68 % pri pH 6 (koncentracija saharoze 50 g l⁻¹ i vrijeme namakanja 36 h).

*Rao i sur.*⁵² proučavali su učinak različitih parametara fermentacije (početni pH, početna koncentracija glukoze i inokulacija s različitim količinama *Lactobacillus*) na stupanj deproteinizacije i demineralizacije. Kombinirano tretiranje s *Lactobacillusom* i smanjenje početnog pH otpada dodatkom octene kiseline rezultiralo je nižim stupnjem deproteinizacije i višim stupnjevima demineralizacije od tretmana *Lactobacillusom* ili kiselinom pojedinačno. Osim toga, inokulacija s *Lactobacillusom* rezultirala je visokokvalitetnim proteinskim ekstraktom, dok je autofermentirani otpad (zbog prisutnosti mikroflora škampa) dao onečišćenu proteinsku frakciju. U fermentaciji s bakterijama mliječne kiseline, učinkovitost demineralizacije i kvaliteta dobivenog proizvoda su visoki, a dodatak komercijalnih proteaza može povećati deproteinizaciju.

(b) Fermentacija proteolitičkim bakterijama

U fermentaciji bez mliječne kiseline za fermentaciju ljuske rakova upotrijebljene su i bakterije i gljive poput *Bacillus* sp.,^{53,54} *Pseudomonas* sp.⁵⁵ i *Aspergillus* sp.⁵⁶

*Chorbel-Bellaaj i sur.*⁵⁴ usporedili su šest proteolitičkih sojeva *Bacillus* na fermentaciji otpada od škampa: *B. pumilus* A1, *B. mojavensis* A21, *B. licheniformis* RP1, *B. cereus* SV1, *B. amyloliquefaciens* An6 i *B. subtilis* A26. Rezultati su pokazali da su svi sojevi *Bacillus* uspjeli deproteinizirati otpad od škampa. Najveći stupanj deproteinizacije postignut je uporabom *B. cereus* SV1. Ovi autori su također testirali ulogu dodatne količine glukoze u fermentaciji i zaključili da glukoza nema znatan utjecaj na stupanj deproteinizacije i poboljšanje demineralizacije.

*Sini i sur.*⁵³ proučavali su fermentaciju ljuski škampa uz *B. subtilis* upotrebljavajući kao podlogu nerafinirani šećer od trske. Uklonjeno je oko 84 % proteina i 72 % minerala; nakon tog koraka ostatak je obrađen s 0,8 N HCl i 0,6 N NaOH da se reducira zaostali protein i mineral na zadovoljavajuću razinu od oko 0,8 % proteina i 0,8 % minerala.

Zabilježeno je da mnogi čimbenici utječu na proces fermentacije i posljedično na učinkovitost deproteinizacije i demineralizacije.⁵¹ *Chorbel-Bellaaj i sur.*⁵⁵ primijenili su Plackett-Burmanov faktorski dizajn za ispitivanje glavnih čimbenika koji utječu na učinkovitost fermentacije *P. aeruginosa* A2. Rezultati su pokazali da četiri varijable imaju utjecaj na stupanj deproteinizacije i demineralizacije: koncentracija ljuske škampa, koncentracija glukoze, veličina inokuluma i vrijeme inkubacije. pH početnog medija, temperatura, brzina miješanja i volumen kulture ne utječu na učinkovitost fermentacije. U optimalnim uvjetima za fermentirane ljuske škampa maksimalna demineralizacija bila je 96 %, a deproteinizacija 89 %.⁵⁵

Ekstracelularni proteolitički enzimi iz gljive *A. niger* također su testirani na njihovu učinkovitost deproteinizacije i demineralizacije ljuski rakova. *Teng i sur.*⁵⁷ procijenili su istodobnu proizvodnju hitina iz ljuske škampa i gljivica u procesu fermentacije u jednom reaktoru gdje proteaze iz gljiva hidroliziraju proteine u aminokiseline koje zauzvrat djeluju kao izvor dušika za rast gljivica. Rezultati su pokazali da su zaostali proteini u izoliranom hitinu iz ljuski škampa bili ispod 5 %. Sadržaj proteina u gljivičnom hitinu bio je veći (10 – 15 %). Zaključeno je da dodatak glukoze dovodi do oslobađanja proteaze od gljiva i pojačava deproteinizaciju ljuske škampa. Hidrolizirani proteini upotrebljavaju se za rast gljivica, što uzrokuje niži pH medija i daljnju demineralizaciju ljuski škampa.

Različite biološke metode ekstrakcije hitina pomoću mikroorganizama jednostavne su, produktivnije i ekološki prihvatljivije u usporedbi s kemijskim procesima. Međutim, mikroba fermentacija ima svoje nedostatke, kao što su dulje vrijeme obrade u usporedbi s kemijskim metodama i lošija dostupnost proteaza (uzrokovana prisutnošću minerala koji dovode do visokih rezidualnih proteina). Stupanj deproteinizacije mogao bi se poboljšati ovisno o zahtjevima krajnje uporabe, posebno za biomedicinske primjene. To se može postići primjenom simultanih ili uzastopnih procesa kao što su fermentacije u dva koraka ili kofermentacija mikroorganizama. Da bi se dobio visoko pročišćeni hitin, biotehnološki proces mora biti dovršen daljnjim blagim kemijskim tretmanom da bi se uklonili zaostali proteini i minerali.³²

3. Priprema hitozana

Pojam hitozan obično se odnosi na polimere dobivene nakon deacetilacije hitina u različitim stupnjevima. Zapravo, stupanj acetilacije, koji odražava ravnotežu između dvije vrste ostataka (slika 1), razlikuje hitin od hitozana. Kad je DA (izražen kao molarni postotak) niži od 50 mol%, proizvod se naziva hitozan i postaje topljiv u kiselim vodenim otopinama.⁵⁸ Tijekom deacetilacije, acetilne skupine se uklanjaju, ali također dolazi do reakcije depolimerizacije, što se uočava promjenama molekulske mase hitozana.

Hitin se može pretvoriti u hitozan enzimskim⁵⁹ ili kemijskim postupkom.⁶⁰ Kemijske metode se intenzivno primjenjuju u komercijalne svrhe pripreme hitozana zbog njihovih niske cijene i prikladnosti za masovnu proizvodnju.⁶⁰

3.1. Kemijska deacetilacija

S kemijskog stajališta, za deacetiliranje hitina mogu se upotrebljavati ili kiseline ili lužine. Međutim, glikozidne veze vrlo su osjetljive na kiselinu. Stoga se alkalna deacetilacija češće primjenjuje.⁶¹

N-deacetilacija hitina provodi se heterogeno⁶² ili homogeno.⁶³ Uobičajeno, u heterogenoj metodi hitin se tretira vrućom koncentriranom otopinom NaOH tijekom nekoliko sati, a hitozan se proizvodi kao netopljivi ostatak deacetiliran do ~85 – 99 %. U homogenoj metodi alkalni hitin se priprema nakon disperzije hitina u koncentriranom NaOH (30 g NaOH/45 g H₂O/3 g hitina) pri 25 °C tijekom 3 h ili više, nakon čega slijedi hlađenje pri 0 °C. Ta metoda rezultira topljivim hitozanom s prosječnim stupnjem acetilacije od 48 – 55 % s acetilnim skupinama jednoliko raspoređenim duž lanaca.⁶³ Nasuprot tome reakcija deacetilacije izvedena u heterogenim uvjetima daje nepravilnu raspodjelu ostataka N-acetil-D-glukozamina i D-glukozamina s određenom raspodjelom acetilnih skupina u blokovima duž polimernih lanaca.⁶⁴ Topljivost hitozana je definirana ne samo frakcijom jedinica 2-acetamido-2-deoksi-D-glukoze u molekuli već i raspodjelom N-acetilne skupine. Nadalje, varijacije u pripremi hitozana kao što su koncentracija NaOH, vrijeme reakcije, temperatura i ponavljanje alkalnih koraka mogu rezultirati promjenama DA, raspodjele acetilnih skupina duž lanaca, M_w i viskozi-teta u otopini.^{65,66}

3.2. Enzimska deacetilacija

Kemijska deacetilacija također ima nedostatke kao što su potrošnja energije; otpad koncentrirane alkalne otopine čime se povećava zagađenje okoliša, širok i heterogen raspon topljivih i netopljivih proizvoda.

Da bi se prevladali ti nedostaci, u pripravku hitozana istražena je alternativna enzimska metoda u kojoj se upotrebljava hitin deacetilaze. Upotreba hitin deacetilaze za pretvorbu hitina u hitozan, za razliku od trenutno primijenjene kemijske procedure, nudi mogućnost kontroliranog procesa, što rezultira proizvodnjom novog, dobro definiranog hitozana.⁶⁷ Ta se metoda posebno primjenjuje za pripremu oligomera hitozana.

Hitin deacetilaza (EC 3.5.1.41) katalizira hidrolizu N-acetamido veza u hitinu da bi se dobio hitozan. Taj enzim može se naći u nekoliko vrsta gljiva^{68,69,70,71} i kukaca.⁷² Uglavnom, dobro proučavani enzimi su oni ekstrahirani iz gljiva *Mucor rouxii*,⁶⁸ *Absidia coerulea*,⁶⁹ *Aspergillus nidulans*⁷⁰ i *Colletotrichum lindemuthianum*.⁷¹ Svi enzimi su glikoproteini i izlučuju se ili u periplazmatskom prostoru ili izvanstanično. Nadalje, svi enzimi su termostabilni na svojoj optimalnoj temperaturi (50 °C) i pokazuju vrlo visoku specifičnost za β-(1,4)-povezane N-acetil-D-glukozamin polimere. Međutim, enzimi se znatno razlikuju u svojoj M_w i pokazuju širok raspon pH optimuma. Hitin deacetilaze, koje proizvode *C. lindemuthianum* i *A. nidulans*, nisu inhibirane acetatom (proizvodom deacetilacije), što ih čini prikladnima za potencijalne biotehnološke primjene.^{70,71}

Učinkovitost hitin deacetilaze, izolirane iz gljive *M. rouxii*, ispitana je uporabom hitina kao supstrata (i u njegovoj kristalnoj i amorfnoj morfologiji).⁷³ Stupanj deacetilacije ostaje vrlo nizak (< 10 %), što ukazuje na to da enzim zapravo nije učinkovit na netopljive hitine. Slični rezultati također su dobiveni uporabom hitin deacetilaze izolirane iz drugih izvora.⁶⁹ Stoga se čini da je prethodna obrada hitinskih supstrata prije dodavanja enzima nužna da bi se poboljšala dostupnost acetilnih skupina enzimu i stoga povećao prinos deacetilacije. U tu svrhu provedeni su pokusi u homogenim uvjetima pomoću hitin deacetilaze iz *M. rouxii* s djelomično deacetiliranim hitozanima topljivim u vodi.⁷⁴ U odabranim uvjetima enzim je u stanju deacetilirati hitozan do 97 % (deacetilacija iz početnog hitozana s DA = 0,32 i brojčano-prosječnim stupnjem polimerizacije od 30).⁷⁴

Na osnovi navedenog može se zaključiti da je razvoj kontroliranog procesa primjenom enzimске deacetilacije na hitinskim supstratima atraktivan alternativni proces koji može rezultirati pripremom novih hitozanskih polimera i, još zanimljivije, oligomera.

4. Zaključak

Kako raste svijest o zaštiti okoliša tako se sve više okrećemo prema upotrebi biopolimera i biomaterijala koji ne zagađuju okoliš – jedan od takvih materijala je hitin. Ekstrakcija hitina iz otpada rakova provodi se ili biološki ili kemijski. Iako je trenutno zastupljenija kemijska priprema hitina, ona za sobom ostavlja velike količine otpadne vode nastale uslijed tretmana jakim kiselinama i lužinama, što podiže cijenu proizvodnje. Biološki proces je, s druge strane, inovativan i čistiji, no nakon njega je dio proteina i dalje vezan na hitin i potrebno je provesti kemijski tretman da bi se uklonio. Druga mana tog procesa je što još nije dovoljno istražen i ne primjenjuje se u industriji. No rezultati laboratorijskih istraživanja pokazuju da ekstrakcija hitina mikrobiološkim ko-kulturama ima velik potencijal postati ekološka alternativa kemijskoj metodi proizvodnje hitina. Pročišćeni hitin i njegovi derivati, bez obzira kojim procesom nastali, mogu se primijeniti u različitim sektorima, kao što su prehrambena industrija, poljoprivreda, biomedicina, kozmetika, tekstilna industrija i drugi. Iako primjena i priprema hitina još nije postigla svoj puni potencijal, s napretkom istraživanja to bi se moglo postići u bliskoj budućnosti.

Popis kratica**List of abbreviations**

COS	– oligomeri hitozana – oligomer of chitosan
DA	– stupanj acetilacije hitina – degree of acetylation of chitin
DP	– stupanj polimerizacije hitina i hitozana – degree of polymerization of chitin/chitosan
EDTA	– etilendiamintetraoctena kiselina – ethylenediaminetetraacetic acid
GlcN	– 2-amino-2-deoksi-β-D-glukoza – 2-amino-2-deoxy-β-D-glucose
GlcNAc	– (1,4)-N-acetil-2-amino-2-deoksi-β-D-glukoza – (1,4)-N-acetyl-2-amino-2-deoxy-β-D-glucose
M _w	– molekulska masa – molecular weight

Literatura**References**

1. J. Baranwal, B. Barse, A. Fais, G. L. Delogu, A. Kumar, Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications, *Polymers* **14** (2022) 983, doi: <https://doi.org/10.3390/polym14050983>.
2. C. Casadidio, M. E. Butini, A. Trampuz, M. Di Luca, R. Censi, P. Di Martino, Daptomycin-loaded biodegradable thermosensitive hydrogels enhance drug stability and foster bactericidal activity against staphylococcus aureus, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **130** (2018) 260–271, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.001>.
3. T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi, F. Alhaique, Polysaccharide hydrogels for modified release formulations, *J. Control. Release* **119** (2007) 5–24, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.01.004>.
4. A. S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64** (2012) 18–23, doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00239-3).
5. R. A. A. Muzzarelli, J. Boudrant, D. Meyer, N. Manno, M. DeMarchis, M. G. Paoletti, Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial, *Carbohydr. Polym.* **87** (2012) 995–1012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.063>.
6. R. N. Tharanathan, F. S. Kittur, Chitin—the undisputed biomolecule of great potential, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **43** (2003.) 61–87, doi: <https://doi.org/10.1080/10408690390826455>.
7. W. Brück, J. Slater, B. Carney, Chitin and Chitosan from Marine Organisms, u S.-K. Kim (ur.), *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, CRC Press, Boca Raton, 2010., str. 11–23, doi: <https://doi.org/10.1201/ebk1439816035-c2>.
8. P. K. Dutta, J. Dutta, V. Tripathi, Chitin and Chitosan: Chemistry, Properties and Applications, *J. Sci. Ind. Res.* **63** (2004) 20–31.
9. M.-K. Jang, B.-G. Kong, Y.-I. Jeong, C. H. Lee, J.-W. Nah, Physicochemical characterization of α-chitin, β-chitin, and γ-chitin separated from natural resources, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **42** (2004) 3423–3432, doi: <https://doi.org/10.1002/pola.20176>.
10. M. S. Brzezinska, U. Jankiewicz, Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control, *Curr. Microbiol.* **65** (6) (2012) 666–672, doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0208-2>.
11. B. Krajewska, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme Microb. Technol.* **35** (2-3) (2004) 126–139, doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>.
12. A. J. Winkler, J. A. Dominguez-Nunez, I. Aranaz, C. Poza-Carrion, K. Ramonell, S. Somerville, M. Berrocal-Lobo, Short-Chain Chitin Oligomers: Promoters of Plant Growth, *Mar. Drugs* **15** (2017) 40, doi: <https://doi.org/10.3390/md15020040>.
13. K. Li, R. Xing, S. Liu, P. Li, Chitin and Chitosan Fragments Responsible for Plant Elicitor and Growth Stimulator, *J. Agric. Food Chem.* **68** (2020) 12203–12211, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05316>.
14. M. Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* **31** (7) (2006) 603–632, doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
15. H. K. No, N. Y. Park, S. H. Lee, S. P. Meyer, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *Int. J. Food Microbiol.* **74** (2002) 65–72, doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00717-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00717-6).
16. C. Prego, D. Torres, M. J. Alonso, The potential of chitosan for the oral administration of peptides, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2** (2005) 843–854, doi: <https://doi.org/10.1517/17425247.2.5.843>.
17. V. Zargar, M. Asghari, A. Dashti, A review on chitin and chitosan polymers: Structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *Chem. Bio. Eng. Rev.* **2** (2015) 204–226, doi: <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>.
18. Z. Shariatnia, Pharmaceutical applications of chitosan, *Adv. Colloid Interface Sci.* **263** (2019) 131–194, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.008>.
19. M. S. Riaz Rajoka, L. Zhao, H. M. Mehwish, Y. Wu, S. Mahmood, Chitosan and its derivatives: synthesis, biotechnological applications, and future challenges, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103** (2019) 1557–1571, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9550-z>.
20. T. J. Gutiérrez, Chitosan Applications for the Food Industry, u S. Ahmed, S. Ikram (ur.) *Chitosan: Derivatives, Composites and Applications*, Wiley-Scrivener, Beverly, MA, 2017., str. 183–232, doi: <https://doi.org/10.1002/9781119364849.ch8>.
21. I. Aranaz, N. Acosta, C. Civera, B. Elorza, J. Mingo, C. Castro, M. L. L. Gandía, A. Heras Caballero, Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives, *Polymers* **10** (2018) 213, doi: <https://doi.org/10.3390/polym10020213>.
22. M. Malerba, R. Cerana, Recent Advances of Chitosan Applications in Plants, *Polymers* **10** (2018) 118, doi: <https://doi.org/10.3390/polym10020118>.
23. P. S. Bakshi, D. Selvakumar, K. Kadirvelu, N. S. Kumar, Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications, *Int. J. Biol. Macromol.* **150** (2020) 1072–1083, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113>.
24. K. Azuma, R. Izumi, T. Osaki, S. Ifuku, M. Morimoto, H. Saimoto, S. Minami, Y. Okamoto, Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials. *J. Funct. Biomater.* **6** (2015) 104–142, doi: <https://doi.org/10.3390/2Fjfb6010104>.
25. H. Hamedi, S. Moradi, S. M. Hudson, A. E. Tonelli, Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review, *Carbohydr. Polym.* **199** (2018) 445–460, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.114>.
26. R. C. Cheung, T. B. Ng, J. H. Wong, W. Y. Chan, Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications, *Mar. Drugs* **13** (2015) 5156–5186, doi: <https://doi.org/10.3390/md13085156>.
27. Y. Wu, Q. L. Lin, Z. X. Chen, W. Wu, H. X. Xiao, Prepara-

- tion of chitosan oligomers COS and their effect on the retrogradation of intermediate amylose rice starch, *J. Food Sci. Technol.* **49** (2012) 695–703, doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0210-2>.
28. S. Naqvi, B. M. Moerschbacher, The cell factory approach toward biotechnological production of high-value chitosan oligomers and their derivatives: an update, *Crit. Rev. Biotechnol.* **37** (2017) 11–25, doi: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1104289>.
 29. C. Muanprasat, V. Chatsudthipong, Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications, *Pharmacol. Ther.* **170** (2017) 80–97, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.013>.
 30. N. Suryawanshi, S. E. Jujjavarapu, S. Ayothiraman, Marine shell industrial wastes—an abundant source of chitin and its derivatives: constituents, pretreatment, fermentation, and pleiotropic applications—a revisit, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **16** (2019) 3877–3898, doi: <https://doi.org/10.1007/s13762-018-02204-3>.
 31. Y. Kim, R. D. Park, Progress in bioextraction processes of chitin from crustacean biowastes, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **58** (2015) 545–554, doi: <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0080-4>.
 32. I. Younes, M. Rinaudo, Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications, *Mar. Drugs.* **13** (2015) 1133–1174, doi: <https://doi.org/10.3390/md13031133>.
 33. A. Percot, C. Viton, A. Domard, Characterization of shrimp shell deproteinization, *Biomacromolecules* **4** (2003) 1380–1385, doi: <https://doi.org/10.1021/bm034115h>.
 34. F. Shahidi, J. Synowiecki, Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards, *J. Agric. Food Chem.* **39** (1991) 1527–1532, doi: <https://doi.org/10.1021/jf00008a032>.
 35. A. Tolaimate, J. Desbrieres, M. Rhazi, A. Alagui, Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties, *Polymer* **44** (2003) 7939–7952, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2003.10.025>.
 36. M. M. Naim, H. E. M. Abdel Razek, Chelation and permeation of heavy metals using affinity membranes from cellulose acetate–chitosan blends, *Desalin. Water Treat.* **51** (2012) 644–657, doi: <https://doi.org/10.1080/19443994.2012.700035>.
 37. E. L. Johnson, Q. P. Peniston, Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production, u R. E. Martin, G. J. Flick, C. E. Hebard, D. R. Ward, (ur.), *Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products*, AVI Publishing Co., Westport, 1982., str 415.
 38. G. A. F Roberts, Preparation of Chitin and Chitosan, u G. A. F Roberts (ur.), *Chitin Chemistry*, Macmillan Press, London, 1992, str. 56.
 39. A. Khanafari, M. Marandi, S. Sanatei, Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods, *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.* **5** (2008) 19–24.
 40. W. Arbia, L. Arbia, L. Adour, A. Amrane, Chitin extraction from crustacean shells using biological methods – A review, *Food Technol. Biotech.* **51** (2013) 12–25.
 41. C. Casadidio, D. V. Peregrina, M.R. Gigliobianco, S. Deng, R. Censi, P. Di Martino, Chitin and Chitosans: Characteristics, Eco-Friendly Processes, and Applications in Cosmetic Science, *Mar. Drugs.* **17** (2019) 369, doi: <https://doi.org/10.3390/md17060369>.
 42. M. B. Rao, A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, V. V. Deshpande, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** (1998) 597–635, doi: <https://doi.org/10.1128/2Fmmb.62.3.597-635.1998>.
 43. J. Synowiecki, N. A. A. Q. Al-Khateeb, The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp Crangon crangon processing discards, *Food Chem.* **68** (2000) 147–152, doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00165-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00165-X).
 44. A. Gildberg, E. Stenberg, A new process for advanced utilisation of shrimp waste, *Process Biochem.* **36** (2001) 809–812, doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00278-8).
 45. L. Manni, O. Ghorbel-Bellaaj, K. Jellouli, I. Younes, M. Nasri, Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162** (2010) 345–357, doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8846-y>.
 46. I. Younes, O. Ghorbel-Bellaaj, R. Nasri, M. Chaabouni, M. Rinaudo, M. Nasri, Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization, *Process Biochem.* **47** (2012) 2032–2039, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.017>.
 47. V. A. Mukhin, V. Y. Novikov, Enzymatic hydrolysis of proteins from crustaceans of the Barents Sea, *Appl. Biochem. Micro.* **37** (2001) 538–542, doi: <https://doi.org/10.1023/A:1010218712622>.
 48. I. Younes, R. Nasri, I. Bkahiria, K. Jellouli, M. Nasri, New proteases extracted from red scorpionfish (*Scorpaena scrofa*) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization, *Food Bioprod. Process.* **94** (2014) 453–462, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.06.003>.
 49. S. Kaur, G. S. Dhillon, Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: A review, *Crit. Rev. Biotechnol.* **35** (2015) 44–61, doi: <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.798256>.
 50. K. Prameela, C. Murali Mohan, P.V Smitha, K. P. J. Hemab-latha, Bioremediation of shrimp biowaste by using natural probiotic for chitin and carotenoid production an alternative method to hazardous chemical method, *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* **1** (2010) 903–910.
 51. W. Choorit, W. Patthanamane, S. Manurakchinakorn, Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 6168–6173, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.032>.
 52. M. S. Rao, J. Muñoz, W. F. Stevens, Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54** (2000) 808–813, doi: <https://doi.org/10.1007/s002530000449>.
 53. T. K. Sini, S. Santhosh, P. T. Mathew, Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation, *Carbohydr. Res.* **342** (2007) 2423–2429, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.06.028>.
 54. O. Ghorbel-Bellaaj, I. Younes, H. Maalej, S. Hajji, M. Nasri, Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria, *Int. J. Biol. Macromol.* **51** (2012) 1196–1201, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.034>.
 55. O. Ghorbel-Bellaaj, N. Hmidet, K. Jellouli, I. Younes, H. Maâlej, R. Hachicha, M. Nasri, Shrimp waste fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* A2: Optimization of chitin extraction conditions through Plackett–Burman and response surface methodology approaches, *Int. J. Biol. Macromol.* **48** (2011) 596–602, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.01.024>.
 56. N. S. Mahmoud, A. E. Ghaly, F. Arab, Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **3** (2007) 1–9, doi: <https://doi.org/10.3844/ajbb.2007.1.9>.
 57. W. L. Teng, E. Khor, T. K. Tan, L. Y. Lim, S. C. Tan, Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi, *Carbohydr. Res.* **332** (2001) 305–316, doi: <https://doi.org/10.1016/>

- S0008-6215(01)00084-2.
58. G. A. F. Roberts, Structure of chitin and chitosan, u G. A. E. Roberts (ur.). Chitin Chemistry, Macmillan Press, London, 1992, str. 85–91, doi: https://doi.org/10.1007/978-1-349-11545-7_1.
 59. K. Tokuyasu, M. Mitsutomi, I. Yamaguchi, K. Hayashi, Y. Mori, Recognition of chitoooligosaccharides and their N-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*, Biochemistry **39** (2000) 8837–8843, doi: <https://doi.org/10.1021/bi0005355>.
 60. H. K. No, S. P. Meyers, Preparation and characterization of chitin and chitosan—A review, J. Aquat. Food Prod. Technol. **2** (1995) 27–52, doi: https://doi.org/10.1300/J030v04n02_03.
 61. S. Hajji, I. Younes, O. Ghorbel-Bellaaj, R. Hajji, M. Rinaudo, M. Nasri, K. Jellouli, Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources, Int. J. Biol. Macromol. **65** (2014) 298–306, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.045>.
 62. K. L. B. Chang, G. Tsai, J. Lee, W. R. Fu, Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution, Carbohydr. Res. **303** (1997) 327–332, doi: [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00179-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00179-1).
 63. T. Sannan, K. Kurita, Y. Iwakura, Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility, Makromol. Chem. **177** (1976) 3589–3600, doi: <https://doi.org/10.1002/macp.1976.021771210>.
 64. S. I. Aiba, Studies on chitosan: 3. evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans, Int. J. Biol. Macromol. **13** (1991) 40–44, doi: [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(91\)90008-1](https://doi.org/10.1016/0141-8130(91)90008-1).
 65. J. Berger, M. Reist, A. Chenite, O. Felt-Baeyens, J. M. Mayer, R. Gurny, Erratum to Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application, Int. J. Pharm. **28** (2005) 197–206, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.037>.
 66. M. L. Tsaih, R. H. Chen, The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan, J. Appl. Polym. Sci. **88** (2003) 2917–2923, doi: <https://doi.org/10.1002/app.11986>.
 67. I. Tsigos, A. Martinou, D. Kafetzopoulos, V. Bouriotis, Chitin deacetylases: New, versatile tools in biotechnology, Trends Biotechnol. **18** (2000) 305–312, doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01462-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01462-1).
 68. D. Kafetzopoulos, A. Martinou, V. Bouriotis, Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** (1993) 2564–2568, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.2564>.
 69. X. D. Gao, T. Katsumoto, K. Onodera, Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*, J. Biochem. **117** (1995) 257–263, doi: <https://doi.org/10.1093/jb/117.2.257>.
 70. C. Alfonso, O. M. Nuero, F. Santamaría, F. Reyes, Purification of a heat stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation, Curr. Microbiol. **30** (1995) 49–54, doi: <https://doi.org/10.1007/BF00294524>.
 71. K. Tokuyasu, M. O. Kameyama, K. Hiyashi, Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*, Biosci. Biotechnol. Biochem. **60** (1996) 1598–1603, doi: <https://doi.org/10.1271/bbb.60.1598>.
 72. Y. Li, L. Liu, J. Yang, Q. Yang, An overall look at insect chitin deacetylases: Promising molecular targets for developing green pesticides, J. Pestic. Sci. **46** (2021) 43–52, doi: <https://doi.org/10.1584/jpestics.d20-085>.
 73. A. Martinou, D. Kafetzopoulos, V. Bouriotis, Chitin deacetylation by enzymatic means: Monitoring of deacetylation processes, Carbohydr. Res. **273** (1995) 235–242, doi: [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00111-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00111-6).
 74. A. Martinou, V. Bouriotis, B. T. Stokke, K. M. Vårum, Mode of action of chitin deacetylase from *M. rouxii* on partially N-acetylated chitosans, Carbohydr. Res. **311** (1998) 71–78, doi: [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00183-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00183-9).

SUMMARY

Biopolymers Chitin and Chitosan – Properties and Preparation

Dino Skendrović,^a Lucija Terihaj,^a Tonči Rezić,^b and Ana Vrsalović Presečki^{a*}

With the growing awareness of environmental protection, we are increasingly turning to natural energy sources and natural materials. Of great importance in this regard are biopolymers, which are completely degradable in nature. Among the most important biopolymers are chitin and chitosan, which are second only to cellulose. Large amounts of chitin and chitosan are found in the biosphere as important components of the exoskeleton of many organisms, and as waste from global fishing companies. Therefore, policymakers, environmentalists, and industry are promoting the use of these marine polysaccharides as renewable sources. This paper describes the physico-chemical and biological properties, and the different methods used to extract chitin and chitosan mainly from marine wastes. Chitin can be obtained by chemical and biological extraction, and this paper compares these two methods with emphasis on enzymatic deproteinisation, bacterial fermentation, and enzymatic deacetylation. Due to their biodegradability, non-toxicity, biocompatibility, and bioactivity, these marine polymers are widely used in the modern production of biomedical and pharmaceutical products.

Keywords

Chitin, chitosan, biodegradability, biomaterials, polysaccharides, green technology, waste, marine resources

^a Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb, Trg Marka Marulića 19, 10 000 Zagreb, Croatia

^b Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Pierrotijeva 6, 10 000 Zagreb, Croatia