

# Hitin

---

**Bošnjak, Leon**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:775786>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2022-07-03**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za Biologiju

Leon Bošnjak

**HITIN**

Završni rad

Split, 2021.

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za Biologiju

Leon Bošnjak

**HITIN**

Završni rad

Split, 2021.

Ovaj rad, izrađen u Splitu pod vodstvom doc. dr. sc. Sanje Puljas predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnika biologije i kemije.

*Ovom prilikom zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Sanji Puljas na pomoći pri izradi ovog rada te obitelji i prijateljima koji su mi pomogli pri ostvarenju mojih ciljeva. Posebno hvala Katarini, Kristijanu i Mateju.*

# Temeljna dokumentacijska kartica

Završni rad

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Odjel za Biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

## HITIN

Leon Bošnjak

### Sažetak:

Hitin je drugi najzastupljeniji biopolimer na planeti nakon celuloze. To je lančasta struktura načinjena od N-acetilglukozamidnih podjedinica spojenih  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidnim vezama. U prirodi ga nalazimo u različitim kristalnim strukturama koje u kombinacijama s ostalim makromolekulama rezultiraju u brojnim makroskopskim svojstvima. Iz tog razloga hitin je rasprostranjen gotovo u svim oblicima života izuzev biljaka. O važnosti hitina i njegovom porijeklu govore nam i fosilni nalazi koji datiraju iz srednjeg kambrija prije 505 milijuna godina. Ovim radom nastojati ću sagledati i sažeti dostupno znanje o hitinu. Od njegove strukture, rasprostranjenosti, biosinteze pa do evolucije i primjene u svakodnevnom životu.

**Ključne riječi:** Hitin, Hitosan, Hitin sinteza, Hitinaza, Hitin – vezujući proteini

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 21 stranicu, 7 slika, 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** doc. dr. sc. Sanja Puljas

**Neposredni voditelj:** doc. dr. sc. Sanja Puljas

**Ocjenjivači:** doc. dr. sc. Sanja Puljas,

doc. dr. sc. Antonela Paladin

prof. dr. sc. Mate Šantić

**Rad prihvaćen:** 27. Rujan 2021

# Basic documentation card

Thesis

University of Split

Faculty of Science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

## CHITIN

Leon Bošnjak

### Abstract:

Chitin is the second most abundant biopolymer on the planet after cellulose. It represents a chain structure made up of N-acetylglucosamine monomers connected with  $\beta(1\rightarrow4)$  glycoside linkages. In nature it occurs in different crystal structures which combine with other macromolecules and give rise to several macroscopic properties. Because of that chitin is distributed in almost all shapes of life except plants. About the importance and history of chitin we can look into the fossil record which dates back to the middle Cambrian, about 505 million years ago. With this work I want to revisit and summarize the available knowledge about chitin. From the structure, distribution, biosynthesis to evolution and applications in everyday life.

**Key words:** Chitin, Chitosan, Chitin synthase, Chitinase, Chitin – binding proteins

Thesis is deposited in the library of the Faculty of Science, University of Split

Thesis consists of: 21 pages, 7 figures, 19 references. Original language: Croatian.

**Supervisor:** Assist. Prof. Dr. Sanja Puljas

**Assistant supervisor:** Assist. Prof. Dr. Sanja Puljas

**Reviewers:** Assist. Prof. Dr. Sanja Puljas,

Assist. Prof. Dr. Antonela Paladin

Full Prof. Dr. Mate Šantić

**Thesis accepted:** September 27, 2021

---

# SADRŽAJ

---

1. UVOD .....	1
2. RAZRADA TEME.....	3
2.1. Povijest istraživanja hitina .....	3
2.2. Rasprostranjenost.....	4
2.3. Struktura i svojstva .....	5
2.4. Biosinteza i razgradnja hitina .....	7
2.4.1. Biosinteza.....	7
2.4.2. Hitosomi.....	8
2.4.3. Razlike i sličnosti u biosintezi hitina rakova i kukaca .....	9
2.4.4. Razgradnja hitina .....	11
2.5. Evolucija i filogenija hitin sintaza .....	12
2.6. Hitin - vezujući proteini.....	14
2.7. Primjene.....	16
2.7.1. Hitin i hitosan u medicini .....	16
2.7.2. Uklanjanje teških metala hitinom i njegovim derivatima .....	17
2.7.3. Nove metode suzbijanja kukaca nametnika u poljoprivredi.....	17
2.7.4. Hitin u oblicima i primjene.....	18
sažetak .....	19
LITERATURA .....	20



---

# 1. UVOD

---

Hitin je  $\beta(1\rightarrow4)$  polimer N-acetilglukozamina (GlcNAc) i nakon celuloze drugi je najzastupljeniji biopolimer na Zemlji. To je netopivi i slabo reaktivni spoj strukturno sličan celulozi, ali umjesto hidroksilne grupe na drugom ugljikovom atomu ima acetamidnu skupinu. U okolišu ga susrećemo u tri kristalne strukture:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  - hitin. Strukture se razlikuju po orijentacijama hitinskih lanaca, slaganjima u kristalne rešetke i broju ostvarenih vodikovih veza.

Sposobnost hitina da se kristalizira u različite strukture i da tvori interakcije s drugim makromolekulama rezultira u mnogobrojnim fizikalnim svojstvima poput elastičnosti, vodo otpornosti, krutosti, refleksivnosti, visokom talištu i slično. Radi tih mogućnosti hitin posjeduju raznoliki organizmi poput gljiva, člankonožaca, oblića, mekušaca, spužvi, žarnjaka, praživotinja i kralježnjaka. Evolucijska učinkovitost hitina može se utvrditi i preko fosilnih nalaza koji datiraju iz kambrija, gdje se prvi put hitin uočava kod prapovijesnih spužvi (Elieh-Ali-Komi i Hamblin 2016; Moussian, 2019).

Hitin su možda najbolje upotrijebili člankonošci, za koje se procjenjuje da zauzimaju najveću životinjsku biomasu na Zemlji. Njima hitin izgrađuje ne samo vanjske oklope, već i unutrašnje površine dišnog, sekrecijskog i probavnog sustava. Tako ih štiti od mehaničkih ozljeda, isušavanja te naglih temperaturnih razlika. Daje njihovim krilima čvrstoću i fleksibilnost, a štiti ih od nametničkih gljivica (Merzendorfer i Zimoch, 2003).

Gljive su hitin pak iskoristile tako da stvaraju mreže podzemnih hifa za kolonizaciju vlažnog tla u kojem se hitin ne razgrađuje. Hitin i njegovi derivati pronađeni su kod nekih kralježnjaka poput vodozemca aksolotla i riba, ali ne i kod biljaka. Kod njih su pronađeni proteini sa svojstvom vezanja za hitinske molekule. Ti proteini imaju obrambene i razgrađujuće svrhe. Takvi proteini su primjerice hitinaze i lektini (Shen i Jacobs-Lorena, 1998; Tang i sur., 2015).

Hitinaze su enzimi koji razgrađuju hitin i nalazimo ih u svim hitin sintetizirajućim organizmima. Isto tako sva bića koja upotrebljavaju hitin posjeduju hitin sintaze – transmembranske enzime koji polimeriziraju šećerne podjedinice u lance. Kako se hitin ne bi mogao stvarati bez hitin sintaza one ispisuju evolucijsku povijest hitina (Merzendorfer, 2011).

Hitin je slabo reaktivna i slabo topiva molekula, ali njegov deacetilirani oblik hitosan koji može varirati u stupnju deacetilacije topiv je u kiselim otopinama i vodenim medijima. K tome dobar je adsorbens i pouzdan u izradi koloidnog sustava za prijenos lijekova i genetskih materijala.

U zadnjih nekoliko desetljeća hitin i njegovi derivati postali su fokus za istraživanja zbog svojih biorazgradivih i antimikrobnih svojstava te lakoj dostupnosti. Istražene su njihove koristi u području poljoprivrede, biomedicine i ekologije s uspješnim rezultatima. Podupiranja za daljnja istraživanja o hitinu u budućnosti bi mogla otvoriti nove vidike u područjima industrije i tehnologije (Khoushab i Yamabhai, 2010).

O biosintezi i evoluciji hitina te njegovoj primjeni u živom svijetu nije posvećena dovoljna pažnja što je primjetljivo uvidom u dostupnu znanstvenu literaturu. Upravo zato se ovim radom nastoji pružiti prikaz o dosadašnjim spoznajama o hitinu, njegovim derivatima te važnost i mogućnostima primjene.

---

## 2. RAZRADA TEME

---

### 2.1. Povijest istraživanja hitina

1799. godine engleski kemičar i mineralog Charles Hatchett primijetio je da prilikom uranjanja ljuštura morskih i slatkovodnih rakova u razrijeđenu dušičnu kiselinu, ljuštore reagiraju s otopinom i gube svoju čvrstoću i krutost, ostavljajući žućkastu, mekanu i elastičnu ljušturu koja je zadržala prijašnji oblik, a podsjeća na hrskavicu. Hatchett je prvi zabilježio karakteristike hitina.

Dvanaest godina nakon Hatchettovog istraživanja, francuski kemičar Henri Braconnot je tijekom istraživanja na gljivama opazio spoj netopljiv u vrućim lužinama te mu dao naziv *fongine* (fungin). Braconnot je zabilježio neka fizikalna svojstva spoja te je zapisao kako je spoj mekan, hrskavičast i nalik na pluto. Također je napomenuo da spoj ne nalikuje na drvenaste materijale jer sadrži znatno više dušika, za razliku od celuloze koja ga uopće nema. Taj spoj je imao slična fizikalna svojstva kao i onaj koji je Hatchett pronašao u ljušturama rakova.

17. kolovoza 1821. godine, deset godina nakon otkrića fungina, Auguste Odier je prilikom eksperimentiranja s pokrilmem kukaca izolirao spoj svojstvima nalik na spoj kojeg je Braconnot našao u gljiva i Hatchett u rakova. Tom novootkrivenom spoju je dao naziv *chitine* prema grčkoj riječi “chiton” što znači pokrivati. Kasnijim istraživanjem na ljušturama rakova i paukova Odier je došao do sličnih zaključaka te pretpostavio da su vanjski oklopi svih kukaca, rakova i paukova izgrađeni od istog spoja.

Daljnja istraživanja hitina bila su usmjerena na njegovu strukturu, formulu i funkciju. U tim istraživanjima uočena je sličnost strukture hitina i celuloze, što je upućivalo na prisutnost šećerne osnovice u hitinu. Razvojem tehnologije X zraka u prvoj polovici 20. stoljeća, radovima Bergmanna, Hoffmana, Meyera i Zechmeistera konačno će se utvrditi struktura i kemijska formula hitina i njegovog derivata hitosana. Danas je uvriježeno mišljenje da je hitin polimer podjedinica N-acetilglukozamina kovalentno povezanih  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidnim vezama (Grégorio, 2019).

## 2.2. Rasprostranjenost

Hitin je glavna komponenta vanjskog kostura člankonožaca, staničnih stijenki gljiva i trenice mekušaca. Nalazimo ga i kod raznih ameba, trepetljikaša te alga kremenjašica. Nakon celuloze drugi je najčešći polisaharid na planeti s barem 10 Gt procjene reciklaže godišnje (Morozov i Likhoshway, 2016). Također je nađen u reflektivnim materijalima (iridofore), a postoji i jedan nalaz koji potvrđuje prisutnost hitina u kutikuli epiderme ribice *Paralipophrys trigloides* (slika 1).

U kukaca još oblaže i površine respiratornog, sekrecijskog i probavnog sustava gdje služi kao obrana od infekcija te kao zaštita od fizičkih ozljeda prilikom probave (Khoushab i Yamabhai, 2010). Ehrlich i suradnici (2013) su otkrili prisutnost hitina u morskih i slatkovodnih spužvi koji im služi prilikom vezivanja za podlogu. Isti autori navode prisutnost hitina u vrsti žarnjaka *Myriothele cocksi*. Njegova prisutnost je dokazana i u ljuskama jajeta oblića.

Hitin nije prisutan u viših biljaka, ali mnoge od njih sintetiziraju proteine koji imaju sposobnost vezivanja za hitin u svrhu obrane. Tako primjerice prilikom infekcije patogenim gljivicama, biljke sintetiziraju hitinaze koje imaju svojstvo vezivanja i hidrolize stranog hitina. Dok kod obrane od kukaca, biljka proizvodi lektine koji se vežu na probavni trakt nametnika stvarajući im probleme s probavom (Shen i Jacobs-Lorena, 1998).

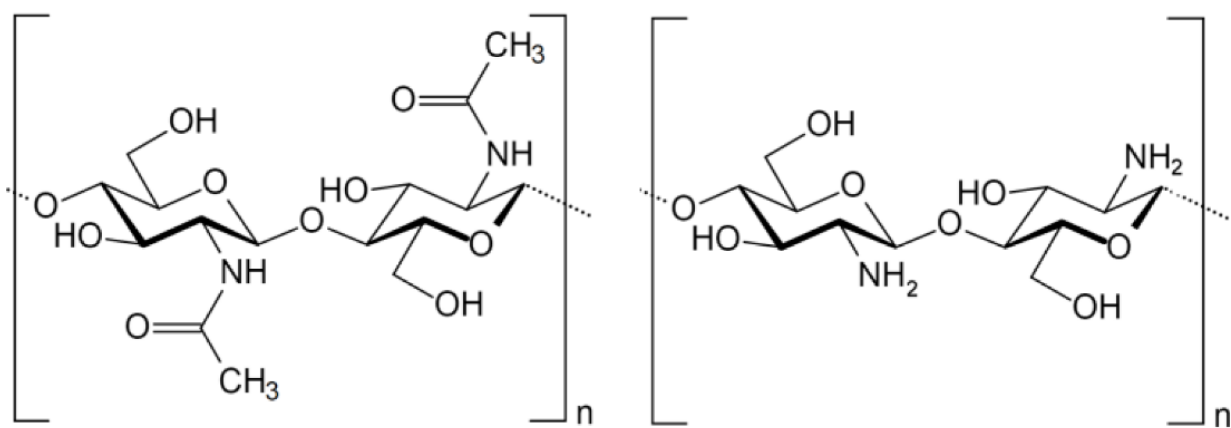


Slika 1. Ribica babica buljooka *Paralipophrys trigloides* (Valenciennes, 1836) (izvor: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Paralipophrys\\_trigloides\\_\(Stefano\\_Guerrieri\)-testa\\_1.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Paralipophrys_trigloides_(Stefano_Guerrieri)-testa_1.jpg))

### 2.3. Struktura i svojstva

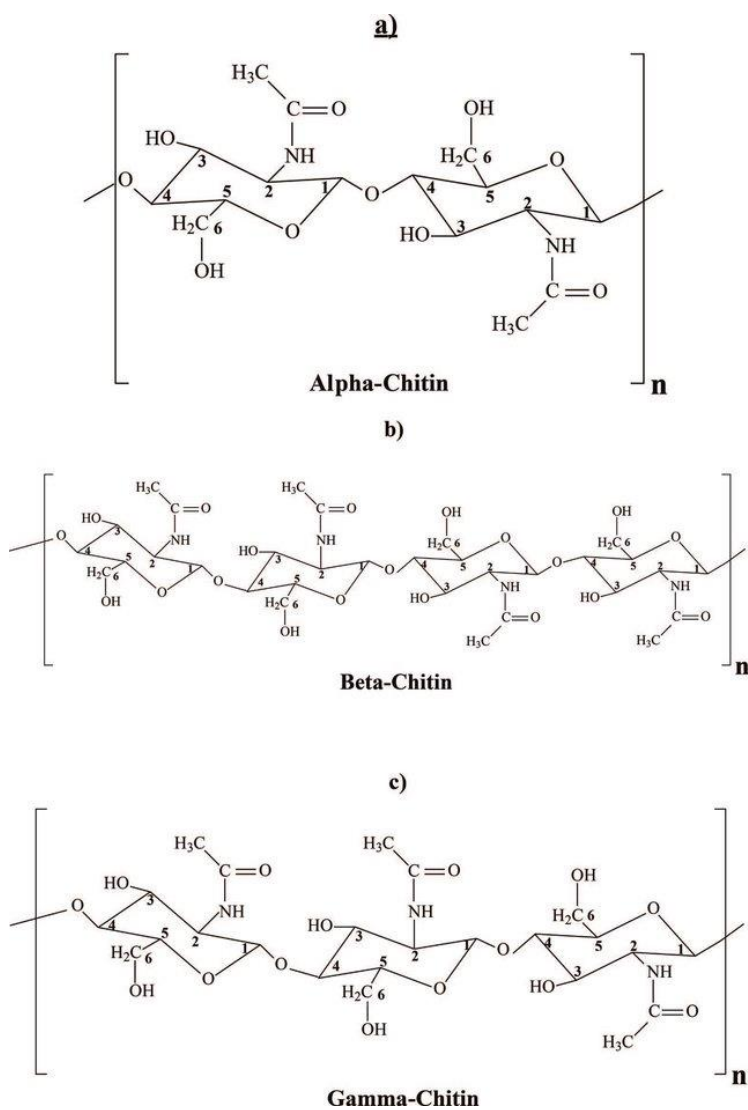
Hitin (slika 2) je polimorfna tvar koja se u prirodi javlja u tri oblika:  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -hitin (slika 3). Glavne razlike među tim oblicima su u stupnju hidratacije, orijentaciji hitinskih lanaca i gustoći pakiranja u kristalu. Unutar  $\alpha$  strukture svi su lanci gusto složeni u antiparalelnu orijentaciju tvoreći tako mikrofibrile stabilizirane vodikovim vezama. Takva forma rezultira većom čvrstoćom i izdržljivošću.  $\alpha$  struktura je najzastupljenija u oklopu člankonožaca. U  $\beta$  strukturi lanci su postavljeni paralelno dok  $\gamma$  struktura izmjenjuje dva seta paralelnih lanaca s jednim setom antiparalelnih lanaca. Za razliku od  $\alpha$  strukture,  $\beta$  i  $\gamma$  oblici imaju rjeđe pakiranje i manji broj ostvarenih vodikovih veza između podjedinica, a povećani broj vodikovih veza s okolnim molekulama vode. Visoki stupanj hidratacije i rjeđe slaganje hitinskih lanaca očituje se savitljivijom i mekanijom strukturom kao što je to u kokonu leptira.

Sve tri kristalne modifikacije možemo pronaći u kutikulama kukaca gdje je  $\alpha$  struktura najzastupljenija u oklopu člankonožaca, a  $\beta$  i  $\gamma$  u očima, probavnom sustavu i kokonima kukuljica (Merzendorfer i Zimoch, 2003).  $\gamma$  struktura je najzastupljenija u gljivama, ali pronalazimo je i u sipinoj kosti te tkivima mekušaca. S obzirom na raznolikost kristalnih struktura, hitin može imati različite temperature taljenja. One ovise o broju vodikovih veza. Najviša temperatura taljenja je za  $\alpha$  strukturu (330°C), dok je najniža za  $\beta$  strukturu (230°C).



Slika 2. Hitin (lijevo) i hitosan (desno) (Izvor: Younes i Rinaudo 2015)

Na stabilnost hitina ukazuju i fosilni nalazi. Najstariji nalaz datira iz srednjeg kambrija prije 505 milijuna godina. Pronađen je u škriljercu Burgess shale u Kanadi, a pripada izumrloj vrsti spužve *Vauxia gracilenta* (slika 4) (Bernard Moussian, 2019). Zbog ostvarenih vodikovih veza i načina pakiranja hitin nije topiv u vodi, ali njegov deacetilirani derivat hitosan (slika 3) ima sposobnost otapanja u vodenim otopinama. Unatoč strukturnoj sličnosti s celulozom glavna razlika je to što hitin i njegov derivat hitosan sadrže dušik. Hitosan sadrži nešto veći postotak dušika od hitina (Khoushab i Yamabhai, 2010).



Slika 3. Tri hitinske modifikacije;  $\alpha$   $\beta$  i  $\gamma$  (Izvor: Rufato i sur., 2018)



Slika 4. Fosilni nalaz spužve *Vauxia gracilentia* Walcott, 1920 (izvor: <https://burgess-shale.rom.on.ca/en/fossil-gallery/view-species.php?id=126&m=3&>)

## 2.4. Biosinteza i razgradnja hitina

### 2.4.1. Biosinteza

Iza svih organizama kojima je svojstveno stvaranje hitina stoji evolucijski očuvan stanični mehanizam koji pretvara šećere u linearne hitinske lance koji se potom izlučuju van stanice i slažu u mikrofibrile. Kod gljiva hitin sintetiziraju vegetativne i sporulativne stanice, a kod kukaca epidermalne, trahealne i stanice srednjeg crijeva. Novonastali hitin gljive izlučuju na mjestima rasta, a kukci na vanjsku površinu tijela ili unutrašnju površinu probavnog trakta. Šećerno gorivo za sintezu hitina je glukoza, uskladišteni glikogen ili trehaloza.

Biosinteza hitina u većine organizama koji ga proizvode može se podijeliti u tri koraka. Prvi korak obilježava reakcije koje dovode do nastajanja amino šećera GlcNAc, drugi korak završava nastankom aktivnog šećera UDP-N-acetilglukozamina (UDPGlcNAc) i konačno treći korak

uključuje polimerizaciju hitina koristeći UDP-GlcNAc kao aktivni šećerni donor. Prva dva koraka odvijaju se u citoplazmi dok se treći korak odvija na specijalnim domenama stanične membrane gdje se hitin taloži u izvanstanični prostor. Posljednji korak polimerizacije hitinskih lanaca predvode transmembranske hitin sintaze. Hitin sintaze pripadaju GT2 porodici polimerizirajućih glikoziltransferaza koji uporabljaju mehanizam inverzije anomerske konfiguracije šećera donora (Merzendorfer, 2011).

Ta skupina enzima se međusobno razlikuju po funkciji i katalitičkoj aktivnosti, a većina organizama sadrži više gena za hitin sintaze. Unatoč tome izgleda da sve hitin sintaze imaju neka zajednička svojstva. Sve upotrebljavaju UDPGlcNAc kao supstrat za proizvodnju hitinskih niti, ovisne su o prisutnosti divalentnih kationa  $Mg^{2+}$  ili  $Mn^{2+}$  te im je aktivnost povećana proteolizom. Aktivnost sintaza može se inhibirati strukturnim analogima UDPGlcNAc kao što su nikomicin ili polioksin (Merzendorfer i Zimoch 2003).

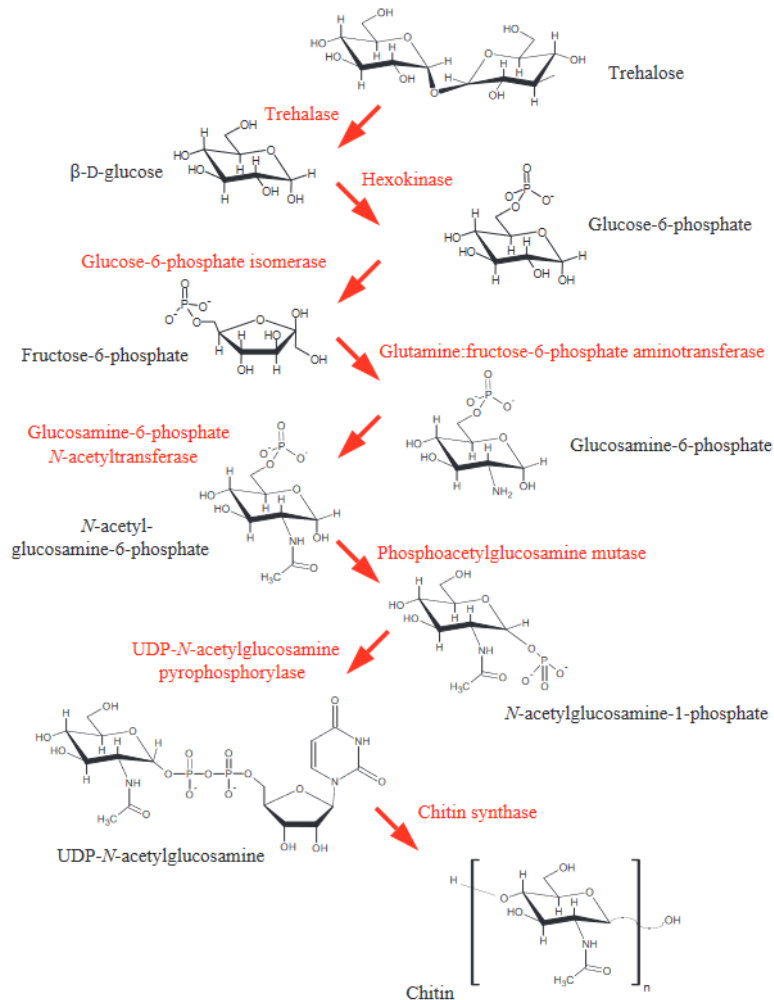
#### 2.4.2. Hitosomi

U gljiva su proučene citoplazmatske mikorvezikule s aktivnošću hitin sintaza koje zovemo hitosomi. Izgleda da su u tim vezikulama hitin sintaze usidrene i nakupljene s agregatima proteina ili ugljikohidrata kako bi se mogle lakše transportirati na mjesto gdje je potrebna sinteza hitina. Hitosomi nastaju na endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu, a regija hitin sintaze u hitosomu predstavlja zimogen, odnosno mora doći do biokemijske promjene kako bi se enzim aktivirao. Prilikom nekakvog signala hitosom se stapa s ciljanom regijom stanične membrane, a regija hitin sintaze se aktivira proteolizom. Insercija u membranu se odvija preko proteina posrednika, ali potpuni mehanizam još nije ustanovljen. Nakon insercije započinje sinteza. Iako su zabilježene strukture nalik hitosomima u kukaca, nije još potvrđeno imaju li one ulogu u sintezi hitina (Elieh-Ali-Komi i Hamblin, 2016).



### 2.4.3. Razlike i sličnosti u biosintezi hitina rakova i kukaca

Rakovi i kukci su sestrinske grupe koji dijele iste ključne enzime prilikom biosinteze hitina (slika 5). U te enzime ubrajamo trehalazu, heksokinazu, glukoza-6-fosfat izomerazu, glutamin-fruktoza-6-fosfat-aminotransferazu (GFAT), glukozamin-6-fosfat N-acetiltransferazu, pirofosforilazu i hitin sintazu. Također obje skupine koriste trehalazu kao početni materijal za sintezu. Moguće je da i glikogen bude početna sirovina za sintezu što bi objasnilo gene za glikogen fosforilaze i fosfoglukomutaze pronađene u rakova. Iako su navedeni enzimi pronađeni i u kukaca i u rakova, samo neke vrste rakova posjeduju svih osam očuvanih enzima.



Slika 5. Biosinteza hitina u kukaca (izvor: Merzendorfer i Zimoch, 2003)

Neki enzimi dijele metabolizam sinteze hitina kukaca s metabolizmom rakova. Prvi i početni enzim sinteze hitina i u kukaca i u rakova je trehalaza. To je enzim koji cijepa trehalozu - disaharid koji ima stabilizirajuća membranska svojstva, a prirodno ga nalazimo u biljkama i životinjama izuzev kralježnjaka. U kukaca i rakova trehalozu nalazimo u hemolimfi gdje ona služi kao gorivo za metaboličke puteve glukoze. Uz prisutnost trehalaze, trehaloza se hidrolizira na dvije molekule glukoze koje se potom dalje koriste ili kao energetska gorivo ili za daljnje pretvorbe.

Drugi važan enzim koji je ujedno i limitirajući enzim sinteze je GFAT. On limitira nastanak heksamina, a osim što sudjeluje u sintezi hitina sudjeluje i u drugim metaboličkim putevima ugljikohidrata. Iz tog razloga ovaj enzim je jako bitan za fiziološka svojstva člankonožaca jer doprinosi sintezi hitina te proizvodnji energije. GFAT je visoko očuvan enzim kojeg možemo pronaći u bakterijama, kvascima, kukcima i sisavcima. U ljudi, miševa, vinskih mušica i drugih organizama geni za sintezu GFAT1 i GFAT2 smješteni su na različitim kromosomima. U rakova GFAT je usko povezan s procesom presvlačenja.

Konačni enzim za sintezu hitina je svakako hitin sintaza koja je specifična za hitin sintetizirajuće organizme. Kukci posjeduju dva gena za hitin sintaze zvana CHS1 i CHS2 i oba su smještena na istom kromosomu. CHS1 je ekspresiran u ektodermalnim stanicama i uključen je u formaciju epiderme i trahealnog tkiva dok je CHS2 ekspresiran u tkivima probavila te zaslužan za sintezu peritrofne matrice. U nekih rakova poput *Daphnia magna* i *Lepeophtheirus salmonis* proučeno je više od tri gena za hitin sintaze dok većina deseteronožaca posjeduje samo jednu kopiju gena za hitin sintazu. Kukci mogu imati od 1 do 6 gena za hitin sintaze.

Takvi podaci dovode u pitanje sličnosti metaboličkog puta sinteze hitina u rakova i u kukaca. Kao dodatak tome, istraživanje na *Lepeophtheirus salmonis* gdje je RNA interferencijom utišan gen za hitin sintazu, rezultiralo je normalnim fenotipom čime se zaključuje da vrsta ima kompenzaciju za put sinteze hitina. S druge strane inhibitori hitin sintaze poput diflubenzurona i lufenurona koji djeluju kod kukaca djeluju i kod rakova. Dakle trenutni nalazi upućuju na to da bi sinteza hitina u rakova i kukaca trebala pratiti sličan metabolički put, ali daljnja istraživanja su potrebna kako bi se mogla dokazati ta pretpostavka (Zhang, Yuan i sur., 2021).

#### 2.4.4. Razgradnja hitina

U organizmima koji proizvode hitin, hitinolitički enzimi su od velike važnosti prilikom razvoja i održavanja životnih funkcija. Tako su oni zaslužni za pravilnu preobrazbu u kukaca ili diobu stanica i sporulaciju kod gljiva. Ti enzimi su pronađeni i u otrovima opnokrilaca te želučanim sokovima paukova. Za biljke i životinje koje sadrže hitinaze, uključujući i makrofage ljudi, predloženo je da služe u obrani od patogenih hitin sintetizirajućih organizama.

Enzimi koji obavljaju razgradnju hitina su hitinaze, glikanohidrolaze i  $\beta$ -N-acetilglukozaminidaze. Svi oni kataliziraju hidrolizu  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidne veze hitinskih polimera i oligomera. Kako je hitin teško razgradiv, njegov raspad nadgleda više enzima. Prvo hitinaze cijepaju hitinski lanac u velike hitinske - oligosaharide, a nakon toga  $\beta$ -N-acetilglukozaminidaza stvara monomere hitina tako što cijepa N-acetilglukozaminske jedinice od strane ne reducirajućeg kraja.

U kukaca hitinolitički enzimi su neophodni za razvoj, pogotovo za vrijeme presvlačenja i pupacije. Tada se hitinaze i proteaze sintetiziraju u epidermalnim stanicama i nakupljene u izlučevinama između epiderme i stare kutikule gdje počinju razgrađivati hitinski oklop kako bi napravili mjesta za novi. Većina razgrađenih produkata kroz tijelo je transportirana preko izlučevina putem usta ili analnog otvora do srednjeg crijeva gdje služi kao materijal za izradu nove kutikule i peritrofne membrane. Neki kukci uz to pojeduju i staru ljušturu ili adsorbiraju hitin preko epiderme (Merzendorfer i Zimoch, 2003).

Iako kod rakova nije proučena razgradnja hitina, prepoznati su geni za enzime metaboličkog puta. Slično kao i kod kukaca, hitinaze kod rakova imaju ulogu prilikom presvlačenja, razgradnje hrane te obrane od patogena. Uočeno je kod rakova kako neka tkiva proizvode samo jednu vrstu hitinaze dok druga tkiva mogu proizvesti više njih. Izgleda da su najveća žarišta sinteze ovog enzima crijeva i probavna žlijezda koje imaju ulogu u imunitetu i probavi.

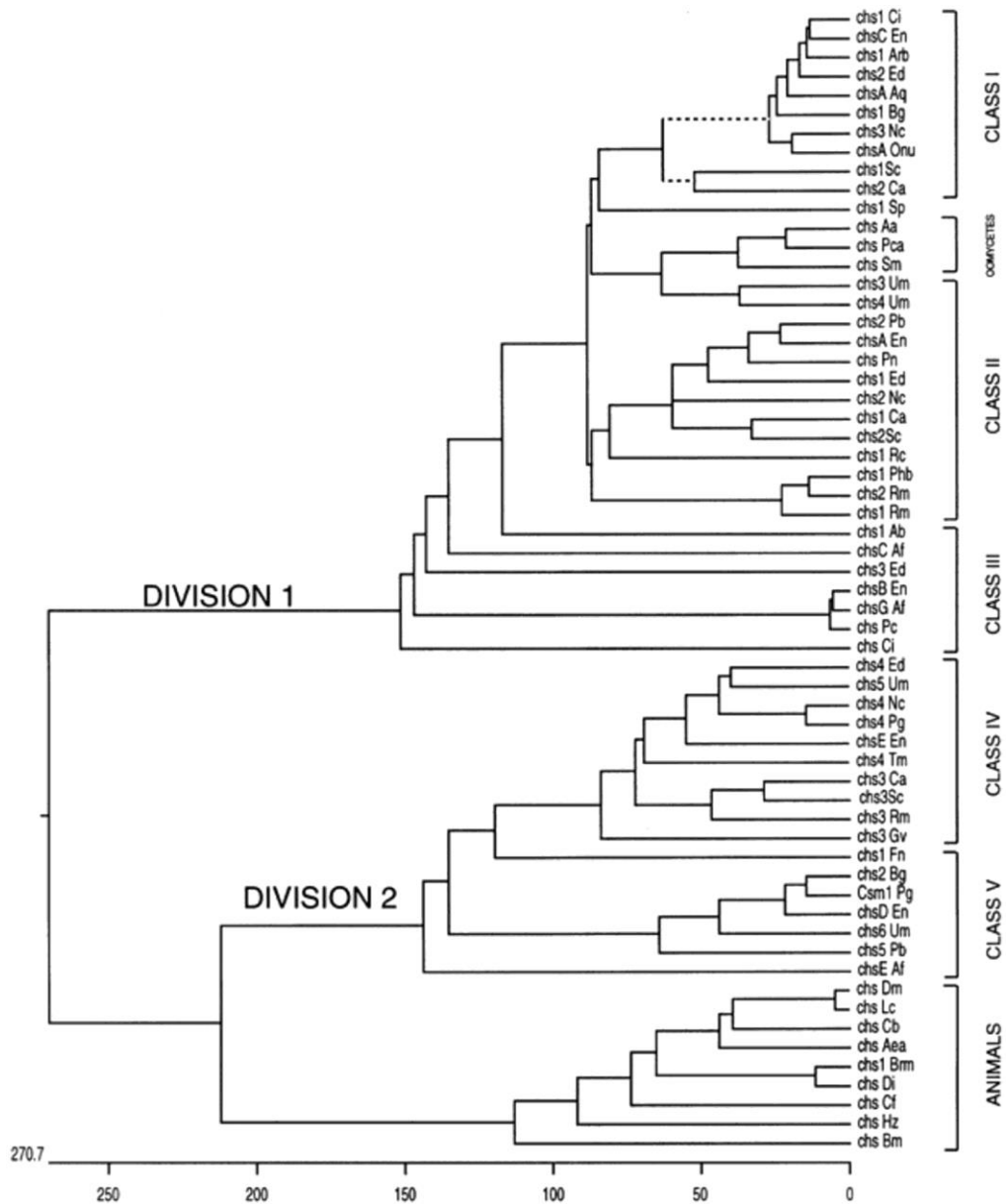
Postoji i drugi metabolički put razgradnje hitina koji uključuje hitin deacetilaze gdje se hitin prebaci u svoj deacetilirani oblik hitosan koji se potom razgradi do glukozamina pomoću hitosanaze i glukozamidaze. Ovakva razgradnja je karakteristična za mikroorganizme poput gljivica i bakterija koje su zaslužne za to da se hitin ne nakuplja u okolišu (Zhang, Yuan i sur., 2021).

## 2.5. Evolucija i filogenija hitin sintaza

Hitin je produkt hitin sintaze, enzima za kojeg znamo više o genima koji ga kodiraju nego za sami protein. Iz toga razloga prateći evoluciju hitin sintaze pratimo evoluciju hitina. Hitin sintaze su transmembranski enzimi iz GT-2 porodice glikoziltransferaza i međusobno se razlikuju po broju i poretku domena. Analizom sekvenci genoma raznih organizama ukazano je da gotovo sve gljive i kvasci imaju više od jedne kopije gena za hitin sintazu, životinje imaju od 1 do 6 dok alge posjeduju od 2 do 8 gena. Nedostatak ili štetne mutacija gena za hitin sintazu kod gljiva i većine člankonožaca je letalna. Evolucijska sila koja omogućuje toliku raznolikost u genima za hitin sintazu je mehanizam duplikacije i rekombinacije gena domene. Kako se hitin sintaze razlikuju po svojim domenama, svaka mutacija koja se zadrži i prenese na potomke daje mogućnost genu da divergira u novu vrstu. Iako razlika u domeni nije jedini parametar po kojemu se razlikuju hitin sintaze, ostali čimbenici poput načina ekspresije gena i rada domene nisu još dovoljno istraženi.

Usporedbom dostupnih gena za hitin sintazu različitih organizama uključujući gljive, životinje i oomycete (algašice), Ruiz-Herrera i suradnici (2002) su izradili evolucijsko, odnosno filogenetsko stablo gena za hitin sintazu (slika 6). Stablo je podijeljeno u dvije divizije koje su zatim podijeljene u 5 klasa (I, II, III, IV, V). Dobiveni rezultati ukazuju na ne poklapanja s taksonomskim grupama gljiva te da položaj gena za hitin sintazu algašica nije jasno ustanovljen. Štoviše razlike u klasama podupirane su razlikama u karakteristikama enzima. Tako je uočeno da su hitin sintaze u diviziji 1 fizički manje nego one u diviziji 2. K tome je ključna sekvenca enzima nešto više pomaknuta prema C-kraju kod hitin sintaza druge divizije.

Prilikom analiziranja evolucije hitin sintaza mora se uzeti u obzir da se geni za enzim ne nalaze samo u gljiva već i u beskralježnjaka, algašica, algi i nekih praživotinja. Treba uočiti i bitnu razliku u genima hitin sintaze kod gljiva za kojih generalno ima mnogo u vrsti nasuprot gena kod životinja, alga i algašica gdje se nalazi mali broj gena u jedinki, ali su slične strukture. Konačno, mora se sagledati činjenica da ne postoji podudaranje u evolucijskom stablu gena hitin sintaze s taksonomskim grupama gljiva.



Slika 6. Evolucijsko stablo gena za hitin sintazu napravljeno usporedbom genoma gljiva, životinja i algašica (izvor: Ruiz-Herrera I sur., 2002)

Prema podijeli eukariota na carstva Fungi, Plantae, Animalia, Alveolates i Stramenopiles, algašice više ne pripadaju carstvu Fungi već Stramenopiles. Takva podjela ukazuje na to da je zajednički predak algašica i gljiva vjerojatno imao gene za sintezu hitina. Štoviše kako su biljke jedina bića koja nemaju predstavnike s genima za hitin sintazu, pretka s mogućnošću sinteze hitina možemo

potražiti u organizmima koji su živjeli prije razdiobe i divergencije biljnog carstva. Ova ideja može se poduprijeti činjenicom da biljke imaju celulozu – strukturni analog hitinu. To bi značilo da je prije milijardu godina došlo do evolucijskog nastanka prvih hitin sintaza u nekih primordijalnih eukariotskih stanica dok se u drugih počela koristiti celuloza. Analizom ribosomske RNA dokazano je kako su životinje i gljive srodnije jedne drugima nego što je i jedno od ta dva carstva s biljkama. Također je uočeno kako su gljive brže evoluirale i divergirale od životinja i to je ojačano činjenicom kako gljive imaju više gena za hitin sintaze dok životinje imaju manje i strukturno sličnije (Ruiz-Herrera i sur., 2002; Morozov i Likhoshway, 2016).

## 2.6. Hitin - vezujući proteini

Za razliku od hitina, proteini koji imaju svojstvo vezivanja za hitin rašireni su kroz sva carstva živih bića. Karakteristika tih proteina je da imaju jednu ili više domena koje se vežu za hitinske strukture te omogućavaju enzimsku razgradnju, odstranjivanje ili uporabu hitina. Takvi proteini pronađeni su u krvi potkovičastih rakova, u cistama nekih praživotinja poput *Entamoeba histolytica*, u raznim insektima te podancima kopriva. Kod biljaka najčešći proteini sa svojstvima vezanja hitina su lektini, koje biljka izlučuje prilikom obrane od nametnika. Prilikom toga lektini ulaze s hranom u probavni sustav kukaca gdje se vežu za proteine koji oblažu unutrašnju šupljinu čime onemogućavaju daljnju probavu hrane. Zbog toga se kukac povlači s biljke i odustaje od daljnjeg hranjenja. Protein s hitin - vezujućim svojstvom pronađen je i kod bakterije *Streptomyces tendae* gdje je opaženo njegovo antifungalno djelovanje. Ovaj se protein prilikom dodira s klijajućim konidijama ili vrhovima hifa veže za hitin i mijenja smjer rasta gljive suprotno položaju bakterijske kolonije (Khoushab i Yamabhai, 2010).

Protein s hitin - vezujućim sposobnostima pronađen je i kod virusa nuklearne poliedroze. Taj virus parazitira na leptirima i moljcima, a njegovi proteini posjeduju jednu domenu za vezanje na hitin. Zanimljivo je da taj protein ima sličnu hitin - vezujuću domenu kao i oni proteini u ostalih beskralježnjaka. Izgleda da se posjedovanjem takvog proteina virus može lakše vezati za hitinske strukture domaćina. U hitin - vezujuće proteine ubrajamo i proteine peritrofne membrane beskralježnjaka koji imaju od 2 do 5 domena za vezanje hitina te sve postojeće hitinaze koje mogu imati jednu ili više domena za vezanje hitina. Interesantno je kako *tachycitin* u krvi potkovičastih

rakova (slika 7) ima jednu domenu vezanja za hitin, a ne spada u proteine peritrofne membrane ili u hitinaze.

Analize domena biljnih proteina sa svojstvima vezanja hitina ukazuju na sličnosti u strukturi. Biljne hitinaze sadrže jednu domenu za vezivanje hitina dok lektini imaju dvije ili više. Unatoč tome sve domene za vezanje hitina u biljnim proteinima imaju isti strukturni motiv. Svaka domena sadrži od 30 do 43 aminokiseline s osam očuvanih cisteina, tri aromatska ostatka i nekoliko očuvanih molekula glicina. Ti podaci upućuju na jednog zajedničkog genskog pretka svih biljnih hitin - vezujućih proteina. On je vjerojatno kodirao protein s jednom domenom za vezanje hitina iz kojeg su evolucijski divergirali i ostali biljni proteini.

Pronađen je protein *hevein* koji ima jednu domenu vezanja za hitin i za njega se smatra da je najbliži analog pretka svih biljnih proteina s hitin - vezujućim svojstvima.

S druge strane, domene iste funkcije kod beskralježnjaka također pokazuju međusobne sličnosti. Istraživanja peritrofnog proteina peritrofin - 44 vrste *Lucilia cuprina* koji se spaja s hitinom tvoreći tako peritrofnu matricu kukaca pronađeno je da posjeduje pet domena za vezanje hitina. Daljnjim izučavanjima ustanovljeno je da sve domene peritrofnih proteina i hitinaza imaju očuvanih šest cisteina i dva aromatska ostatka. Kao i kod biljnih proteina ovi podaci upućuju na zajedničkog pretka iz kojeg su divergirali ostali proteini s domenama za vezanje hitina.

Zbog takvih sličnosti dovodi se u pitanje jesu li biljni i životinjski hitin - vezujući proteini potekli od istog pretka. Uistinu, biljne i životinjske hitinaze posjeduju visoku strukturnu sličnost u domenama. Isto tako strukturni motivi lektina podsjećaju na strukturne motive proteina peritrofne matrice kukaca. Međutim, unatoč sličnosti u strukturi i funkciji domena, postoji značajna razlika u poretku aminokiselina. Beskralježnjaci imaju domene dugačke oko 65 aminokiselina dok biljke imaju od 30 do 43 aminokiseline. Također smještaj disulfidnih veza je drugačiji. Unatoč tim razlikama i životinjske i biljne domene proteina koje vezuju hitin ostvaraju prostornu strukturu preko cistein - disulfidnih veza i sve imaju očuvane aromatske ostatke koji omogućuju vezanje šećera. Zbog toga se čini da biljni i životinjski hitin - vezujući proteini nemaju zajedničkog pretka već prikazuju dvije proteinske obitelji s različitim postankom. Ovo je primjer konvergentne evolucije gdje različite molekule evoluiraju sličnu strukturu radi iste funkcije (Shen i Jacobs-Lorena, 1998).



Slika 7. Potkovičasti rak *Limulus polyphemus* Linnaeus, 1758 (izvor: <https://pixnio.com/hr/zivotinje/rak-jastog/potkovicasti-rakovi/potkovica-rakovica-pijesak>)

## 2.7. Primjene

### 2.7.1. Hitin i hitosan u medicini

Hitin i njegov derivat hitosan su zbog svojih antioksidativnih, biorazgradivih i neotrovnih svojstava pronašli široku primjenu u područjima medicine, farmacije i nutricionizma. Tako je primjerice dokazano da hitin i hitosan pomažu u regulaciji kolesterola i kontroli prekomjerne težine u ljudi. Lako se prerađuju u razne proizvode, uključujući hidrogelne membrane, mikro/nanočestice, spužve te preparate za regeneraciju i popravak tkiva. Takvi preparati imaju visoku poroznost, strukturni integritet, predvidivo vrijeme razgradnje i biokompatibilnost.

U farmaceutskoj industriji zbog svoje jeftine proizvodnje sve više se primjenjuju derivati hitina i sustavi koloidnog hitosana u izradi kapsula za lijekove. Hitin je uspješno korišten u genskoj terapiji kao prenositelj velikih dijelova DNA, dok hitosan može kondenzirati DNA i načiniti manje čestice u danim uvjetima. Zabilježeni su i nalazi gdje hitin pospješuje zacjeljivanju rana te sprječava inflamaciju tkiva, a hitosan je korišten u cjepivima protiv patogenih mikroorganizama kao pojačalo imunosnog odgovora.



Depolimerizirani hitosan izlučen iz sipinih kostiju zbog svojih antimikrobnih, elastičnih i polarizirajućih svojstava koristi se u optici pri izradi kontaktnih leća. Hitosan je također našao primjenu kao antimikrobni i antifungalni agens. Pomoću svoje kationske amino skupine veže se za površinu nekih mikroba poput *Escherichia coli* i *Fusarium oxysporum* sprječavajući tako njihovo daljnje razmnožavanje. Poluvodički nanokristali premazani hitosanom uspješno su korišteni čak prilikom dijagnosticiranja raka.

Svoju primjenu u području farmakologije pronašle su i hitinaze. Zbog mogućnosti da razgrade hitin staničnih stijenki gljiva i oklopa kukaca postale su kandidati za razne antimikrobne i insekticidne agense. Tako se hitinaza koristi u proizvodima protiv komaraca i nametnika stoke te prilikom izrade fungalnih preparata. K tome idealne su za pretvorbu hitina u farmakološki aktivne produkte kao što su N-acetilglukozamidi i hito - oligosaharide. Upotreba hitinaze za dobivanje derivata hitina više je prigodna za održavanje okoliša nego korištenje skupocjenih kemikalija (Elieh-Ali-Komi i Hamblin, 2016; Khoushab i Yamabhai, 2010).

### 2.7.2. Uklanjanje teških metala hitinom i njegovim derivatima

Industrijalizacijom se povećava koncentracija teških metala u okolišu čime se narušavaju ekosistemi. Studije ukazuju na sposobnost hitina i njegovih derivata pri uklanjanju teških metala i zagađivača okoliša. Dokazano je da hitin i hitosan imaju svojstvo adsorpcije bakrenih, kromovih, željeznih i olovnih iona u vodenim medijima. Štoviše istraženo je da u prisustvu vodene otopine natrijevog karbonata, hitin fosfat može uklanjati i uranij. S obzirom na cijenu, rasprostranjenost i efikasnost, hitin i njegovi derivati mogu otvoriti nove mogućnosti u detoksikaciji okoliša (Khoushab i Yamabhai, 2010).

### 2.7.3. Nove metode suzbijanja kukaca nametnika u poljoprivredi

Suzbijanje insekata nametnika u poljoprivredi postao je izazov zadnjih nekoliko desetljeća zbog sve veće otpornosti kukaca na insekticide. Opor kukaca na insekticide potiče potragu za novim rješenjima. Kako su dijelovi kukaca građeni od hitina, nove metode obrane od kukaca usmjerene su na sprječavanje njegova stvaranja. Biosinteza i razgradnja hitina u kukaca uključuje četiri velike

skupine enzima – hitin sintaze, hitin deacetilaze, hitinaze i N-acetilglukozamidaze. Inhibicija ovih metaboličkih enzima dovodi do preuranjene smrti kukaca, problema s rastom i razvojem, poteškoća s presvlačenjem, nemogućnosti izlaženja iz jajašca te deformacije odraslih jedinki. Istraženi su spojevi sa svojstvima inhibicije metaboličkih enzima kukaca i danas se koriste kao insekticidi. Primjena takvih insekticida nije još raširena (Tetreau i Wang, 2019).

#### 2.7.4. Hitin u oblicima i primjene

Oblici su koljeno crvolikih životinja od kojih mali udio parazitira na biljkama, životinjama ili gljivama. U središnjem sloju jajašaca nekih parazitskih oblića pronađeni su tragovi hitina. Sinteza hitina u jajašcu *Caenorhabditis elegans* je inicirana prilikom fertilizacije te je hitin uskladišten prije nego zigota napusti reproduktivni trakt. Hitinski sloj oko jajašca sprječava prodiranje više spermija u jednu jajnu stanicu te je neophodan za razvoj embrija. Tragovi hitina također su pronađeni u ždrijelu oblića koji parazitiraju na gljivama. Biljni i životinjski parazitski oblici čine veliku gospodarsku i ekonomsku štetu te njihovo odstranjivanje predstavlja izazov za budućnost poljoprivrede. Istraživanja su ukazala da navedeni oblici imaju gene za hitin sintaze i gene za hitinaze koji su aktivirani prilikom nastajanja ljuštore jajašaca te njihove razgradnje. Tretiranje nezrelih jajašaca hitinazom rezultiralo je razgradnjom hitinskog sloja te sprječavanjem razvoja embrija. Iz tog razloga kao novi način kontrole oblića biljnih nametnika u gospodarstvu započeto je korištenje hitina i hitosana. Posipanjem zemlje oko koje rastu biljke hitinom i hitosanom dolazi do razvijanja mikroorganizama koji razgrađuju hitin kao hranu. Prilikom razvijanja mikroorganizama napadnuta su i jajašca oblića koja se nalaze u zemlji blizu korijena. Uz navedenu korist, posipanje biljaka hitinom i hitosanom aktivira se biljni imunitet koji počinje stvarati hitinaze. One mogu biti fatalne za oblice koji su već probili biljnu koru i ućahurili se u korijenje (Chen i Peng 2019).

---

# SAŽETAK

---

Od Odierovog otkrića hitina prošla su dva stoljeća. U tom vremenskom rasponu hitin i hitinske tvorevine opažene su u gotovo svim oblicima života. Ispitana su strukturna, fizikalna i kemijska svojstva te postavljeni postulati njegove biosinteze i razgradnje u okolišu. Proučena je primjena hitina u živom svijetu, a njegova evolucijska povijest sagledana je kroz visoko očuvane antičke enzime zaslužne za njegovo svakidašnje stvaranje. Iza tih ispisanih činjenica stoji ljudski razum koji je nakon dugo izučavanja tek nedavno počeo upotrebljavati hitin u područjima medicine, gospodarstva i ekologije. Čini se da će proći još neko vrijeme dok se ovaj spoj u potpunosti ne realizira u korist čovječanstva.

---

# LITERATURA

---

Chen, Q., Peng, D. (2019). Nematode Chitin and Application. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1142, 209-219.

Crini, G. (2019). Historical landmarks in the discovery of chitin. *Sustainable Agriculture Reviews* 35, 1-47.

Ehrlich, H., Kaluzhnaya, O.V., Tsurkan, M.V., Ereskovsky, A., Tabachnick, K.R., Ilan, M., Stelling, A., Galli, R., Petrova, O.V., Nekipelov, S.V., Sivkov, V.N., Vyalikh, D., Born, R., Behm, T., Ehrlich, A., Chernogor, L.I., Belikov, S., Janussen, D., Bazhenov, V.V., Wörheide, G. (2013). First report on chitinous holdfast in sponges (Porifera). *Proc. Biol. Sci.* 280(1762), 339.

Elieh-Ali-Komi, D., Hamblin, M.R. (2016). Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int. J. Adv. Res. (Indore)*. 4(3), 411-427.

Khoushab, F., Yamabhai, M. (2010). Chitin research revisited. *Mar. Drugs* 8(7), 1988-2012.

Merzendorfer, H. (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur. J. Cell Biol.* 90(9), 759-769.

Merzendorfer, H., Zimoch, L., (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206(24), 4393-4412.

Morozov, A.A., Likhoshway, V.Y. (2016). Evolutionary history of the chitin synthases of eukaryotes. *Glycobiology* 26(6), 635-639.

Moussian, B. (2019). Chitin: Structure, Chemistry and Biology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1142, 5-18.

Shen, Z., Jacobs-Lorena, M. (1998). Evolution of chitin-binding proteins in invertebrates. *J. Mol. Evol.* 48(3), 341-347.

Rufato, K.B., Galdino, J.P., Ody, K.S., Pereira, A.G.B., Corradini, E., Martins, A.F., Paulino, A.T., Fajardo, A.R., Aouada, F.A., La Porta, F.A., Rubira, A.F., Muniz, E.C. (2018). Hydrogels Based on Chitosan and Chitosan Derivates for Biomedical Applications. *Hydrogels – Smart Materials for Biomedical Applications*. 1-40.

Ruiz-Herrera, J., González-Prieto, J.M., Ruiz-Medrano, R. (2002). Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 1(4), 247-256.

Tang, W.J., Fernandez, J., Sohm, J.J., Amemiya, C.T. (2015). Chitin is endogenously produced in vertebrates. *Curr. Biol.* 25(7), 897-900.

Tetreau, G., Wang, P. (2019). Chitinous Structures as Potential Targets for Insect Pest Control. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1142, 273-292.

Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar. Drugs* 13(3), 1133-1174.

Zhang, X., Yuan, J., Li, F., Xiang, J. (2021). Chitin Synthesis and Degradation in Crustaceans: A Genomic View and Application. *Mar. Drugs* 19(3), 153.

Web stranice:

<https://pixnio.com/hr/zivotinje/rak-jastog/potkovicasti-rakovi/potkovica-rakovica-pijesak>

<https://burgess-shale.rom.on.ca/en/fossil-gallery/view-species.php?id=126&m=3&>

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Paralipophrys\\_trigloides\\_\(Stefano\\_Guerrieri\)-testa\\_1.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Paralipophrys_trigloides_(Stefano_Guerrieri)-testa_1.jpg)