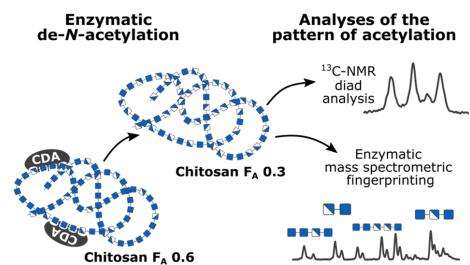


## Muster sind wichtig!

### Biotechnologisch und chemisch hergestellte Chitosane unterscheiden sich in Strukturen und Funktionen



Biotechnologisch mit Hilfe pilzlicher Enzyme hergestellte Chitosane haben - anders als konventionell chemisch hergestellt - definierte Acetylierungsmuster, d.h. die Essigsäurereste sind nicht zufällig, sondern z.B. in Blocks oder regelmäßigen Abständen auf die Zuckerkette verteilt. Das eröffnet neue Möglichkeiten für biomedizinische Anwendungen, z.B. für die gezielte Verabreichung von Medikamenten an Tumor-Metastasen durch Chitosan-Nanopartikel.

Chitosane sind vielleicht die vielversprechendsten funktionalen Biopolymere: Chitosan-Sprays können Pflanzen resistent machen gegen Krankheiten oder vor Hitze- und Trockenstress wie im letzten Sommer schützen. Unter Chitosan-Hydrogelen können selbst großflächige Wunden ohne Narben heilen. Chitosan-Nanopartikel können Krebsmedikamente gezielt zu Metastasen dirigieren. Durchsichtige Chitosan-Folien können Lebensmittel frischhalten und vor Fäulnis schützen. Und das sind nur ein paar Beispiele aus einer viel längeren Liste. Aber nicht jedes Chitosan kann alles: für jede Anwendung ist ein anderes Chitosan am besten geeignet. Und nur wenn man weiß, welches Chitosan was am besten kann, kann man zuverlässig wirkende Chitosan-basierte Produkte entwickeln. Forscher aus dem Team um Prof. Moerschbacher am Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen haben nun gezeigt, dass sich biotechnologisch hergestellte Chitosane von konventionellen, chemisch hergestellten in ihrer Struktur und in ihren Funktionen unterscheiden. Das eröffnet völlig neue Möglichkeiten zur Entwicklung neuartiger, Chitosan-basierter Produkte, vor allem für medizinische Anwendungen. Diese Arbeiten wurden gerade im renommierten Journal of the American Chemical Society - JACS veröffentlicht.

Chitosane werden aus Chitin hergestellt, einem der häufigsten Biopolymere überhaupt, das z.B. den Zellwänden von Pilzen und den Panzern von Krabben und Insekten ihre Stabilität verleiht. Im Gegensatz zu Chitin sind Chitosane in der Natur selten, sie kommen nur in einigen wenigen Pilzen vor. Kommerziell wird Chitosan daher aus Chitin hergestellt, das in großen Mengen aus Krabbenköpfen gewonnen wird, einem problematischen Abfallprodukt der Lebensmittelindustrie. Chitin ist also ein nachwachsender Rohstoff par excellence, der durch Umwandlung in Chitosan wertvoll gemacht werden kann. Chitin ist eine lange Zuckerkette (ein Polysaccharid), bei dem an jeder Zuckereinheit ein Essigsäure-Molekül angebunden ist. Entfernt man nun einige dieser Essigsäure-Moleküle, so entsteht ein Chitosan. Während Pilze dies mit Hilfe von Enzymen machen, werden Chitosane kommerziell durch chemische Entfernung der Essigsäure hergestellt. Unterschiedliche Chitosane unterscheiden sich dann in der Anzahl der aneinanderhängenden Zuckermoleküle (dem Polymerisationsgrad) und in der Menge an noch vorhandenen Essigsäure-Molekülen (dem Acetylierungsgrad).

Das Team von Prof. Moerschbacher hat in der Vergangenheit gezeigt, dass die Eigenschaften der Chitosane stark abhängig sind von diesen beiden Parametern. So sind z.B. Chitosane mit mittlerem Polymerisationsgrad und niedrigem Acetylierungsgrad besonders stark antimikrobiell, während Chitosane mit hohem Polymerisationsgrad und mittlerem Acetylierungsgrad die besten pflanzenstärkenden Eigenschaften haben. Solche Chitosane mit gut definiertem Polymerisations- und Acetylierungsgrad und daher gut bekannten Eigenschaften werden heute als "Chitosane der zweiten Generation" bezeichnet. Sie haben zu einer Renaissance von Chitosan-basierten Produkten geführt

und auch dazu, dass derzeit die Nachfrage erstmals die weltweite Produktion von Chitosanen übersteigt.

Schon lange vermuten die Forscher\*innen um Prof. Moerschbacher, dass neben dem Polymerisations- und Acetylierungsgrad auch das Acetylierungsmuster für die Eigenschaften eines Chitosans verantwortlich sein könnte, also die Verteilung der Essigsäuremoleküle entlang der Zuckerkette. Aber alle heutigen Chitosane werden durch chemische Entfernung mehr oder wenig vieler Essigsäure-Moleküle aus Chitin gewonnen, und das geschieht dann an zufälligen Stellen des Biopolymers, die entstehenden Chitosane haben daher alle ein zufälliges Acetylierungsmuster. Dem Team um Prof. Moerschbacher ist es in den vergangenen Jahren gelungen, die Chitosanproduzierenden Enzyme aus Pilzen zu gewinnen, mit deren Hilfe diese Essigsäuremoleküle aus Chitin-Polymeren entfernen und so natürliche Chitosane herstellen. In dem jetzt veröffentlichten Artikel beschreiben die Forscher\*innen, dass dabei Chitosane mit definierten Acetylierungsmustern entstehen, in denen die Essigsäuremoleküle nicht zufällig, sondern zum Beispiel in Blöcken oder sehr gleichmäßig verteilt sind. Um dies zu beweisen, mussten sie neue Analysemethoden entwickeln, mit deren Hilfe sie einen massenspektrometrischen „Fingerabdruck“ der Chitosane herstellen können, der Aufschluss über die Verteilung der Essigsäuremoleküle liefert.

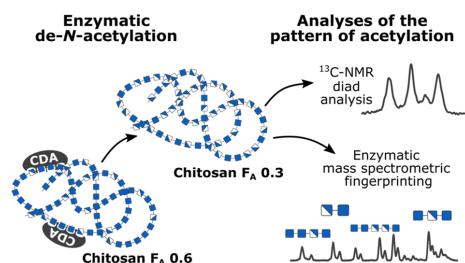
In ersten Versuchen zeigte sich schon, dass diese neuen, biotechnologisch hergestellten Chitosane nicht nur andere Strukturen aufweisen als konventionelle, chemisch hergestellte Chitosane. Sie unterscheiden sich auch in ihren physikochemischen Eigenschaften und in ihren biologischen Aktivitäten. So konnten die Autor\*innen zeigen, dass biotechnologische Chitosane mit blockweiser Verteilung der Essigsäuremoleküle von menschlichen Enzymen langsam abbaubar sind, während konventionelle Chitosane sich in menschlichen Geweben und Zellen anreichern, da sie stabil sind. Will man Chitosan-Nanopartikel oder -Nanokapseln zur gezielten Verabreichung von Medikamenten in Tumore verwenden oder für die nasale Gabe von Insulin bei Diabetikern, so ist die biologische Abbaubarkeit eine unbedingte Voraussetzung, damit das Chitosan sich eben nicht im Körper anreichert, mit unbekannten Folgen. Die neuen, biotechnologischen Chitosane, die - wie die Autor\*innen vermuten - natürlichen Chitosanen ähnlicher sind als konventionelle Chitosane und damit wohl die ersten „Chitosane der dritten Generation“, eröffnen somit neue Möglichkeiten der Anwendung insbesondere im biomedizinischen und pharmakologischen Bereich.

Originalpublikation: Jasper Wattjes, Anna Niehues, Stefan Cord-Landwehr, Janina Hoßbach, Laurent David, Thierry Delair, and Bruno M. Moerschbacher. Enzymatic Production and Enzymatic-Mass Spectrometric Fingerprinting Analysis of Chitosan Polymers with Different Nonrandom Patterns of Acetylation. *Journal of the American Chemical Society* (2019)

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.8b12561>

## Patterns Matter!

### Chitosans produced biotechnologically or chemically differ in structures and functions



Chitosans produced biotechnologically using fungal enzymes differ from chemically produced, conventional chitosans in having defined patterns of acetylation, i.e. the acetate residues are distributed in blocks or in a regular rather than in a random pattern. This opens up new opportunities for biomedical applications, e.g. for the targeted delivery of anti-tumour drugs to cancer metastases using chitosan nanoparticles.

Chitosans are perhaps the most promising functional biopolymers: chitosan sprays can protect plants from disease and stress caused e.g. by heat and drought as during last summer. Under chitosan hydrogels, even large scale wounds can heal without scar formation. Chitosan nanoparticles can target cancer drugs to metastases. Transparent chitosan sheets can keep food fresh and protect it from spoilage. And these are just some examples of a much longer list. But, not every chitosan can do everything: for each application, a different chitosan performs best. And only if we know which chitosan does what, we can develop reliable and efficient chitosan-based products. A research team around Prof. Moerschbacher at the Institute for Biology and Biotechnology of Plants has now shown that biotechnologically produced chitosans differ in structure and function from conventional, chemically produced ones. This opens up new possibilities for the development of chitosan-based products, particularly for biomedical applications. These results have just been published in the renowned *Journal of the American Chemical Society - JACS*.

Chitosans are produced from chitin, one of the most abundant biopolymers on Earth which e.g. gives strength to fungal cell walls and the exoskeletons of crabs and insects. In contrast to chitin, chitosans are rare in nature, occurring only in some fungi. Commercially, chitosan is therefore produced from chitin which is being extracted in large quantities from shrimp shells, i.e. from a problematic waste stream of the food industry. Thus, chitin is a renewable resource *par excellence* that can be made more valuable by the conversion to chitosan. Chitin is a long sugar chain (a polysaccharide) which carries an acetic acid 'vinegar' molecule at each sugar unit. Removing some of these acetic acid molecules yields chitosan. While fungi do this using enzymes, commercial chitosans are produced from chitin through chemical removal of acetic acid molecules. Different chitosans then differ in the number of sugar units building the chain (the degree of polymerisation) and in the amount of remaining acetic acid molecules (the degree of acetylation).

In the past, the team around Prof. Moerschbacher has shown that the properties of chitosans are strongly dependent on these two parameters. As an example, chitosans with medium degree of polymerisation and low degree of acetylation are the best antimicrobials, while chitosans with high degree of polymerisation and medium degree of acetylation are best for plant strengthening. Such chitosans with well-defined degrees of polymerisation and acetylation and, thus, well-known properties are now called 'second generation chitosans'. They have led to a renaissance of chitosan-based products and they are also responsible for a demand that today, for the first time, exceeds global production of chitosans.

Since long, the researchers around Prof. Moerschbacher have suspected that besides the degrees of polymerisation and acetylation, the pattern of acetylation, i.e. the distribution of acetic acid molecules along the sugar chain, may also crucially define the properties of chitosans. However, all

chitosans available today are produced from chitin by chemical removal of more or less of the acetic acid molecules, and this happens at random places of the biopolymer, thus yielding chitosans with random patterns of acetylation. Prof. Moerschbacher's team succeeded in the past few years to isolate the chitosan-producing enzymes from fungi which they use to remove acetic acid molecules from chitin when producing natural chitosans. In the current publication, they report that these enzymes yield chitosans with defined patterns of acetylation in which the acetic acid molecules are not distributed randomly, but appear rather in blocks or regularly spaced. To prove this, they had to develop new analytical methods allowing to generate mass spectrometric 'fingerprints' of the chitosans that reveal the distribution of acetic acid molecules.

First results already show that these novel, biotechnologically produced chitosans do not only differ in their structures from conventional, chemically produced chitosans. They also differ in their physico-chemical properties and in their biological activities. The authors were able to show that chitosans with block-wise distribution of acetic acid molecules are slowly degraded by human enzymes, while conventional chitosans accumulate in human tissues and cells, as they are stable. If chitosan nanoparticles or nanocapsules are to be used for the targeted delivery of drugs to tumors or for the nasal delivery of insulin to diabetic patients, biodegradability is an absolute must to avoid accumulation of chitosan in the body, with unknown consequences. The novel, biotechnological chitosans which - as assumed by the authors - are resembling natural chitosans more closely than conventional chitosans do and, thus, may be regarded as the first 'third generation chitosans', will open up new opportunities for applications, particularly in the fields of biomedicine and pharmacology.

Original publication: Jasper Wattjes, Anna Niehues, Stefan Cord-Landwehr, Janina Hoßbach, Laurent David, Thierry Delair, and Bruno M. Moerschbacher. Enzymatic Production and Enzymatic-Mass Spectrometric Fingerprinting Analysis of Chitosan Polymers with Different Nonrandom Patterns of Acetylation. *Journal of the American Chemical Society* (2019)

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.8b12561>