

## ХИТИН/ХИТОЗАН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

©2020 г. В. П. ВАРЛАМОВ<sup>1\*</sup>, А. В. ИЛЬИНА<sup>1</sup>,  
Б. Ц. ШАГДАРОВА<sup>1</sup>, А. П. ЛУНЬКОВ<sup>1</sup>,  
И. С. МЫСЯКИНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

<sup>2</sup> *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Хитин/хитозан: структура и физико-химические характеристики. III. Распространение в природе и функции. IV. Хитозан и его производные как ингибиторы фитопатогенных грибов. V. Антибактериальная активность хитозана и его производных. VI. Антиоксидантная активность хитозана и его производных по аминокруппе. VII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Настоящий обзор посвящен хитозану – уникальному биополимеру, получаемому дезацетилированием природного биополимера – хитина, основными источниками которого являются ракообразные, грибы и насекомые [1–7]. В последние годы немецкими учеными был выделен

---

*Принятые сокращения:* ММ – молекулярная масса; СД – степень дезацетилирования;  $I_p$  – индекс полидисперсности; СА – степень ацетилирования; СЗ – степень замещения;  $EC_{50}$  – минимальная эффективная концентрация, вызывающая 50%-е ингибирование роста мицелия; ИП – индекс прорастания; ТМХ – N,N,N-триметил хитозан; МФК, МФС – минимальная противогрибная концентрация; МИК, МИС – минимальная ингибирующая концентрация; ЧАГ – четвертичные аммониевые группы; КвХ – кватернизированный хитозан; ГТМАХ – глицидилтриметиламмоний хлорид; DQ – степень кватернизации; АФК – активные формы кислорода; ДФПГ – 2-дифенил-1-пикрилгидразил; АБТС – 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты); АБАП – 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлорид.

\* *Адрес для корреспонденции:* varlamov@biengi.ac.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ и гранта РФФИ № 18-015-00402\_a

и изучен хитин из морских губок [8]. В целом углеводные биополимеры в живой клетке выполняют роль конструкционного материала (целлюлоза, хитин) и энергетического резерва (крахмал, гликоген), а также осуществляют многочисленные биологические функции с высокой специфичностью. Сюда следует отнести участие этих биополимеров в процессах, связанных с взаимодействием клетки с внешней средой, другими клетками, различными внеклеточными соединениями и комплексами. К настоящему времени доказана и широко изучается роль углеводсодержащих биополимеров в межклеточных взаимодействиях, в дифференциации клеток, в формировании многоклеточных систем, в развитии злокачественных новообразований, в процессах оплодотворения и т.д. Следует подчеркнуть, что и практическое использование природных полисахаридов неуклонно растет, и особо следует отметить простейшее производное хитина – хитозан, а также его разнообразные модификации и композиты. Несомненное значение имеет также все возрастающая роль этих уникальных аминополисахаридов для современной медицины. Высокая ранозаживляющая и сорбционная способность, противоопухолевая и противовирусная активности, отсутствие хронической и острой токсичности способствуют широкому использованию этих биополимеров в разработке новых перспективных лекарственных препаратов, средств доставки лекарств, раневых покрытий и шовных материалов для медицины, радиопротекторов [9]. Препараты на основе хитозана нашли также применение в ветеринарии, косметологии, лечебном питании, производстве БАДов, биопестицидов, биосенсоров, хроматографических материалов т.д. [3–5].

В настоящем обзоре будут рассмотрены некоторые аспекты распространения хитина и хитозана в природе, способы модификации хитозана и перспективы использования хитозана и его производных, обладающих бактерицидной, фунгицидной и антиоксидантной активностью.

## **II. ХИТИН/ХИТОЗАН: СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Хитин и хитозан являются линейными полисахаридами, состоящими из различного количества 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозы (глюкозамин) и его N-ацетилированного производного в пиранозной форме и связанных 1–4 гликозидными связями. В выделенном из природных источников хитине, как правило, содержится 5–10% остатков 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозы.

Дальнейшее дезацетилирование хитина обычно осуществляют в жестких щелочных условиях, при этом происходит его частичная деполимеризация. Проведение дезацетилирования в мягких условиях (с помощью ферментов или при низких температурах) позволяет получать хитозан с более высокой молекулярной массой. В настоящее время отсутствует общепринятое определение хитозана и хитина в зависимости от содержания N-ацетильных групп. При практическом использовании производных хитозана, вне зависимости от направления (доставка лекарств, биоматериалы, биопестициды, иммунология и т.д.), важным моментом является знание их основных характеристик и контроль этих параметров в ходе использования. К таким характеристикам относятся три основные: молекулярная масса (ММ), степень дезацетилирования (СД), индекс полидисперсности ( $I_p$ ), который представляет собой отношение средневесового молекулярного веса ( $M_w$ ) к среднечисловому молекулярному весу ( $M_n$ ). При использовании производных хитозана в медицине необходимо контролировать еще ряд параметров: содержание тяжелых металлов, радионуклидов, остаточного белка, наличие бактерий и дрожжей, эндотоксинов, аллергенов и других примесей [10, 11].

ММ хитозана обычно варьирует от 100 кДа до 2000 кДа. Наиболее распространенным методом определения т.н. характеристической (средневязкостной) ММ является вискозиметрия. Эксперименты проводятся с помощью набора вискозиметров, с последующим расчетом ММ по уравнению Марка–Куна–Хаувинка [12, 13]. Одним из эффективных методов определения среднечисловой ( $M_n$ ) и средневесовой ММ ( $M_w$ ) и, соответственно, степени полидисперсности хитозана ( $I_p = M_w/M_n$ ) является гель-проникающая хроматография [13]. Этот метод особенно удобен для анализа низкомолекулярных хитозанов с ММ менее 200 кДа. Следует упомянуть также MALDI-TOF масс-спектрометрию, которая дает наиболее точные данные по молекулярным массам хитозана, особенно в случае низкомолекулярных образцов от 700 до 20000 Да [14].

Второй важной характеристикой хитозана является СД, показывающая процент свободных аминогрупп в полимере. Обычно этот анализ проводится кондуктометрическим титрованием или потенциометрическим титрованием [15, 16], а также с использованием ИК-спектроскопии [17] и ЯМР-спектроскопии [18].

К сожалению, в настоящее время отсутствуют общепринятые определенные стандарты и валидированные методики определения основных характеристик хитозана, что приводит к большим ошибкам при сопоставлении результатов, полученных в различных лаборато-

риях. Решение этих проблем позволит расширить применения хитозана во многих сферах человеческой деятельности, включая медицину. Как правило, в практике используют низкомолекулярные производные хитозана, полученные путем химического или ферментативного гидролиза. В первом случае применяют различные кислоты: соляная, азотная, азотистая и др. [18–20], во втором – как специфические ферменты (хитиназы и хитозаназы), так и неспецифические (лизоцим, амилаза, целлюлаза, липаза, папаин и др.) [21–23]. Следует упомянуть также метод окислительной деполимеризации хитозана с помощью перекиси водорода [24, 25] и гидролиз хитина и хитозана в низкотемпературной плазме [26]. Все эти методы имеют определенные преимущества и недостатки, поэтому при выборе конкретного способа деполимеризации следует исходить из свойств требуемого продукта и сферы его предполагаемого использования [3]. Следует также отметить широкие перспективы для практического применения хитозана в медицине, связанного с возможностью образования наночастиц различного строения [27, 28].

### III. РАСПРОСТРАНЕНИЕ В ПРИРОДЕ И ФУНКЦИИ

Хитин и хитозан, как и другие углерод- и азотсодержащие соединения, вовлечены в глобальные циклы этих элементов в природе. Выше упоминалось, что хитин в природе имеет три основных источника: панцирь ракообразных, кутикула насекомых и клеточная стенка мицелиальных грибов, где выполняет, в основном, опорную функцию. Обычно он встречается в комплексе с другими веществами и является вторым по распространенности биополимером после целлюлозы [29, 30]. В панцире ракообразных он связан с белками и кальцием [31, 32], кутикула насекомых состоит из хитин-меланинового комплекса [33]. В клеточной стенке грибов хитин находится, в основном, в комплексе с  $\beta$ -1–3 глюканом и является основным структурным полисахаридом гиф мицелия [34–40]. Клеточные стенки зигомических грибов содержат как хитин, так и хитозан, который образуется под действием хитиндеацетилаз (КФ 3.2.1.52).

Хитин выполняет у живых организмов главным образом структурную функцию, формируя наружные экзоскелеты членистоногих, внутренние опорные пластины некоторых головоногих, сетчатые структуры в трубках погонофор, створки диатомовых водорослей и клеточные стенки грибов, обеспечивая целостность клеток [31, 37–38, 41–43], а также играет важную трофическую роль в микробных сообществах, представляя собой источник углерода и азота. Кроме

того, хитин и хитозан (и его производные) являются сигнальными веществами, вовлеченными во взаимодействия «хозяин–патоген» между растениями и грибами, а также участвуют в формировании иммунитета и симбиотических связей [44–47]. У патогенных грибов клеточная стенка играет важную роль во время инвазии, являясь первой структурой, вступающей в физический контакт с клетками хозяина, которые могут распознавать некоторые из ее компонентов как связанные с микробами молекулярные структуры (microbe-associated molecular patterns, МАР), чтобы активировать иммунные ответы хозяина [44, 45, 48]. Многие потенциальные хозяева секретируют гидролитические ферменты, такие как хитиназы и глюканазы, для нацеливания на компоненты клеточной стенки грибов и, следовательно, направленные на нарушение ее целостности.

#### МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ ХИТИНА

Синтезу хитина у мицелиальных грибов и дрожжей посвящено много работ, в том числе обзорных [35, 49–52]. Синтез хитина *de novo* катализируется ассоциированными с мембранами синтазами [46, 53]. Число генов хитинсинтазы в грибах может варьировать от одного у *Schizosaccharomyces pombe* до восьми у мицелиальных аскомицетов *Aspergillus fumigatus* и *A. nidulans* или у базидиомицетов *Cryptococcus neoformans* и *Ustilago maydis* [46].

Некоторые хитинсинтазы функционально охарактеризованы. Они участвуют в осуществлении таких процессов, как образование клеточной перегородки, деление клеток, поляризованный (апикальный) рост, реакция на стресс или в отношениях «хозяин–патоген» [47, 54–59]. Многие хитинсинтазы имеют зимогенную природу и локализуются на плазматической мембране в местах апикального роста, где они далее преобразуются в свою активную форму [60–63]. Будучи связанными с плазматической мембраной, хитинсинтазы катализируют векторный синтез хитиновых цепей из активированных мономеров UDP-GlcNAc, высвобождая образующийся полимер во внеклеточное пространство. Там отдельные хитиновые цепи связываются друг с другом посредством внутримолекулярных взаимодействий, образуя хитиновые микрофибриллы, и происходит ковалентное сшивание с глюканами клеточной стенки [64, 65, 50]. Это сшивание поддерживается трансглюкозилазами или внутренней трансглюкозилирующей активностью хитиназ, как описано для Chit42 и Chit33 из *Trichoderma harzianum* или ChiB1 из *Aspergillus fumigatus*, а также для бактериальных хитиназ [66, 67].

У зигомицетовых грибов, в частности у *Benjaminiella poitrasii*, идентифицировано восемь различных генов хитинсинтаз CHS,

которые по-разному экспрессируются во время морфогенеза и в различных условиях роста, и два из этих генов, *VpCHS2* и *VpCHS3*, специфичны для мицелиальной формы роста [68]. У другого диморфного зигомицета, *Mucor circinelloides*, также показано существование семейства мультигенных хитинсинтаз и установлено, что различные активности хитинсинтазы могут играть разные роли в диморфном росте – мицелиальном или дрожжеподобном, обуславливая реализацию различных стратегий морфогенеза [69]. Кроме того, зигомицетовые грибы способны к синтезу хитозана, и его значительные количества в клеточной стенке позволяют использовать представителей зигомицетов, в частности, *Mucor indicus*, для получения этого ценного производного хитина в различных сферах биотехнологии [40].

#### ДЕСТРУКЦИЯ ХИТИНА У МИКРООРГАНИЗМОВ

Деструкция хитина осуществляется посредством хитинолитических ферментов хитиназ, которые распространены у представителей всех царств жизни [51, 70–77]. Хитиназы или 1,4-β-поли-*N*-ацетилглюкозаминидазы (КФ 3.2.1.14) – эндо-гликозил-гидролазы, катализирующие расщепление хитина и хитодекстринов. Ферменты с этой активностью широко распространены в природе и отнесены в базе данных CAZy к четырем семействам: GH18, GH19, GH23 и GH48 [78]. Различия в составе источников хитина водных (главным образом, экзоскелеты членистоногих) и наземных (в основном, клеточные стенки грибов) сред могут привести к адаптации систем микробных хитинолитических ферментов к преобладающему источнику.

В целом, микробная деградация хитина включает активность секретлируемых хитиновых деполимераз (КФ 3.2.1.14), которые высвобождает GlcNAc, хитобиозу и хитоолигосахариды из полимера [79]. Известно, что многие микроорганизмы, обитающие в различных экологических нишах – почве, пресных, ультрапресных, соленых и щелочных водоемах, способны к деструкции природных полимеров животного, растительного и грибного происхождения и обладают различным хитинолитическим потенциалом [71]. В частности, недавно из природных многолетнемерзлых отложений Антарктиды методом реактивирования с применением хитина в качестве источника углерода и азота был выделен прокариотный комплекс с доминирующим штаммом *Brevibacillus brevis* с высокой хитинолитической активностью [80].

Актинобактерии – многочисленная группа грамположительных бактерий, признаны особенно активными хитинолитиками, и некото-

рые члены этого таксона несут большие наборы генов, предназначенных для деградации хитина и хитозана [72, 77]. Разложение этих полимеров у актинобактерий зависит от функционирования эндо- и экзогидролаз, а также от литических полисахаридных монооксигеназ. Актинобактериальные хитиназы и хитозаназы принадлежат к девяти основным семействам гликозилгидролаз, которые не имеют сходства последовательностей. По результатам скрининга геномов наземных и водных хитиназосодержащих бактерий, в составе их хитиназ показаны существенные различия [72, 77]. Наземные актинобактерии, по-видимому, лучше всего приспособлены для использования широкого спектра источников хитина, поскольку они имеют наибольшее количество генов хитиназы, наибольшее разнообразие ассоциированных углеводов-связывающих модулей и наибольшее количество литических полисахаридных монооксигеназ типа СВМ33. Кроме того, актинобактерии также имеют самую высокую долю геномов, содержащих  $\beta$ -1,3-глюканазы, – ферменты, которые могут усиливать потенциал разрушения клеточных стенок грибов. Доля бактериальных хитиназосодержащих геномов, кодирующих поликетидсинтазы, гораздо выше у наземных бактерий, чем у водных, что подтверждает идею о том, что совместное производство антибиотиков и разрушающих клеточную стенку хитиназ может быть важной стратегией в антагонистических взаимодействиях с грибами [72, 77].

#### НОВЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЕ ДЕГРАДАЦИЮ ХИТИНА В ПРИРОДНЫХ СООБЩЕСТВАХ

В последние годы широкое применение молекулярно-биологических методов позволило выявить, описать и определить функциональную роль множества неизвестных ранее представителей микроорганизмов, способных к деградации хитина в природных сообществах и обитающих в условиях, близких к экстремальным. Применение методов метагеномики позволяет быстро определить и существенно сузить круг поиска перспективных продуцентов гидролитических ферментов, представляющих практический интерес. Тем не менее, основываясь исключительно на данных метагеномики, нельзя с полной уверенностью судить о гидролитическом потенциале микроорганизмов, обитающих в самых разнообразных (в том числе экстремальных) природных условиях. Наиболее интересные примеры исследований последних лет, посвященных открытию и описанию новых хитинолитических микроорганизмов, представлены в этом разделе.

*Бактериальная и архейная деградация хитина  
в гиперсоленых содовых озерах*

В гиперсоленых содовых озерах Кулундинской степи Алтайского края (Россия) обнаружено 2 группы экстремофильных бактерий-бройдильщиков, растущих исключительно на полимерном хитине в содовых рассолах с рН до 10.5. Согласно филогенетическому анализу, обе группы имеют таксономический уровень новых классов *Chitinivibrionia* и *Chitinispirillia* и представляют первые примеры культивируемых членов бактериального филума TG3, до сих пор содержащего только клоны рибосомального гена. Детальный анализ генома типового штамма *Chitinivibrionia* подтвердил хитинотрофный метаболизм, а также показал наличие и многих других типов гидролаз. Однако, несмотря на наличие генов и их экспрессию, попытки вырастить организм на других полимерах, кроме хитина, оказались безуспешными. Это позволяет утверждать, что только имея в работе культивируемый живой организм, а не метагеном или даже протеом, можно с уверенностью определить его функцию в природном микробном сообществе [81, 82]. Из отложений гиперщелочных озер в Вади-эль-Натрун (Египет) выделен галоалкалифильный штамм AChit6-1, описанный как *Chitinispirillum alkaliphilum* gen. nov., sp. nov., растущий исключительно с нерастворимым хитином в качестве субстрата в среде на основе карбоната натрия при рН 8.5–10.5 и общей концентрации  $\text{Na}^+$  от 0.4 до 1.75 М. Хитинолитическая активность бактерии была связана с клетками; анализ проекта генома выявил пути утилизации хитина, в частности, секретируемые хитиназы, связанные с поверхностью клетки, а также гены для гидролиза других полисахаридов и ферментации сахаров [83].

Археи-хитинолитики, наряду с бактериями, являются обитателями водоемов с экстремальными условиями. Из гиперсоленых щелочных озер Центральной Азии, Египта и Северной Америки выделены в чистой культуре с использованием хитина в качестве субстрата для роста две группы алкалифильных галоархей [84]. Изоляты являются облигатными аэробными сахаролитическими археями, использующими хитин и хитозан (менее активно) в качестве единственных полисахаридов, а также несколько гексоз в качестве источника углерода и энергии. Колонии хитин-утилизирующих натроноархей синтезировали красный пигмент и были окружены большими зонами гидролиза хитина. Свободные клетки обеих групп были в основном плоскими неподвижными палочками, тогда как клетки, которые прикреплялись к хитину или образовывали колонии на пластинах хитина, были в основном кокковидными. На основании

уникальных фенотипических свойств и различной филогении авторы классифицировали их как *Natrarchaeobius chitinivorans* gen. nov., sp. nov. и *Natrarchaeobius halalkaliphilus* sp. nov. [84].

*Бактериальная деградация хитина  
в ультрапресных природных водоемах, кислых почвах и болотах*

Известно, что круг пресноводных микроорганизмов, способных к деградации хитина, весьма широк и, в частности, включает представителей семейств *Aeromonadaceae*, *Paenibacillaceae*, *Enterobacteriaceae* и *Neisseriaceae* [85]. Представители порядка *Planctomycetales* также способны расти на *N*-ацетилглюкозамине [86], однако о наличии хитиназ у планктомицетов ранее известно не было. Недавно получены первые экспериментальные доказательства способности представителей филогенетической группы *Planctomycetes* – обитателей ультрапресных водоемов, к деструкции хитина. Ген, кодирующий гипотетическую хитиназу у *Fimbriiglobus ruber* SP5<sup>T</sup>, болотного представителя семейства *Gemmataceae*, был клонирован и экспрессирован в *E. coli* с последующим успешным подтверждением хитинолитической активности рекомбинантного фермента [87]. Анализ генома этого планктомицета выявил наличие ряда генов, обуславливающих рост на хитине, в том числе кодирующих хитиназу из семейства GH18 гликозил-гидролаз,  $\beta$ -*N*-ацетилглюкозаминидазу из семейства GH20, а также полный набор ферментов, ответственных за дальнейшее использование *N*-ацетилглюкозамина как источника углерода и энергии. Рост *F. ruber* SP5<sup>T</sup> на аморфном хитине был подтвержден экспериментально, однако он наблюдался только в том случае, когда этот биополимер использовался в качестве единственного источника азота, а не углерода. Такое целевое использование хитина в качестве источника азота обусловлено специфическими особенностями экосистемы, из которой выделен этот планктомицет – ультрапресных сфагновых болот, в которых имеется множество потенциальных источников углерода, но не источников минерального азота. Авторы исследования считают, что, поскольку хитин и хитозан входят в состав клеточных стенок микромицетов, а также панцирей беспозвоночных, обильно представленных в кислых торфяниках, получение азота путем гидролиза хитина может являться одной из возможных стратегий выживания болотных планктомицетов [87]. Филогенетический анализ хитиназы из *Fimbriiglobus* показал, что ее близкий гомолог имеется и у другого планктомицета, *Planctomicrobium piriforme* P3<sup>T</sup> [88]. Экспериментальная проверка типового штамма P3<sup>T</sup>, а также нового изолята этого вида, штамма PX70,

выявила их способность к росту на аморфном хитине в качестве источника углерода и азота. Активности ферментов цепи деструкции хитина, определенные с использованием флуоресцентно меченых хитоолигосахаридов, были ассоциированы с клетками планктомицетов, но не с культуральной жидкостью. Скрининг базы данных аминокислотных последовательностей выявил наличие близких гомологов хитиназ *F. ruber* и *P. piriforme* у ряда других планктомицетов, представляющих различные таксономические группы. Более того, филогенетический анализ указал на планктомицеты как на вероятный источник множественных горизонтальных переносов гена хитиназы в бактерии других фил и даже в эукариоты [88].

Представители *Acidobacteria* являются одними из наиболее эффективных колонизаторов кислых наземных мест обитания, в частности, покрытой лишайником кислой почвы (рН 4.1) лесной тундры. Выделенные недавно члены нового рода *Acidisarcina polymorpha* gen. nov., sp. nov., штаммы SBC82T и CCO287 [89], колонизируют кислые почвы и торфяники и специализируются на деградации сложных полисахаридов. Показано, что штамм SBC82T использует аморфный хитин в качестве источника углерода и азота, а его геном кодирует широкий спектр ферментов, участвующих в деградации хитина, целлюлозы и ксилана, среди которых были идентифицированы четыре секретируемые хитиназы, связанные с семейством гликозидгидролаз GH18. Хитинолитическая способность была также подтверждена у другой филогенетически связанной ацидобактерии (шт. CCO287), выделенной из торфяника *Sphagnum* [89].

#### О МЕХАНИЗМАХ ГИДРОЛИЗА ПОЛИМЕРОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Механизм деградации хитина в природе в экологическом и физиологическом аспектах отражает пути и способы превращений хитина в границах экосистем и сообществ микроорганизмов, а в биохимическом и молекулярном аспектах – на уровне индивидуальных организмов как ключевых модельных объектов различных местообитаний [70]. Для поглощения микроорганизмами высокомолекулярные полисахариды должны быть первоначально гидролизованы до молекул меньших размеров внеклеточными ферментами [79]. Хитин в кристаллической форме не всегда обладает достаточной биодоступностью. В аморфной форме, а также в виде частично поврежденных клеточных стенок грибов, хитин, по всей видимости, из-за увеличения площади поверхности частиц, доступен более широкому кругу микроорганизмов, так как критическая фаза его разложения связана с адсорбцией клеток или внеклеточных хитиназ на поверхности частиц полимера [70, 88].

Исследования гидролиза полисахаридов представителями бактериальных типов *Bacteroidetes* и *Planctomycetes* и рода *Catenovulum* ( $\gamma$ -Proteobacteria) из морских сообществ показали, что флуоресцентно меченые полисахариды (FLA-PS) обнаруживались в клетках, но не в цитоплазме [90]. Характер окрашивания, наблюдаемый в образцах окружающей среды и в чистой культуре, согласуется с «эгоистичными» механизмами поглощения более крупных олигосахаридов (>600 Да). Экологически этот альтернативный механизм поглощения полисахаридов обеспечивает существенные количества субстрата в периплазматическом пространстве клеток, где дальнейшая обработка может происходить без диффузионных потерь. Авторы исследования считают, что такой механизм бросает вызов парадигме, согласно которой гидролиз субстратов с высокой молекулярной массой (HMW) неизбежно приводит к появлению фрагментов с низкой молекулярной массой, доступных для окружающего сообщества (т.н. «альтруистический» механизм), и демонстрирует важность альтернативного механизма поглощения полисахаридов морскими бактериями. Ранее принятые представления о механизмах гидролиза полимеров бактериями, по всей видимости, не вполне применимы для планктомицетов. Как показали исследования последнего времени, у ряда планктомицетов имеет место необычный механизм транспорта высокомолекулярных полимеров в клетку, в котором предположительно задействованы кратероформные структуры и фимбрии, являющиеся типичными поверхностными структурами клеток планктомицетов [90, 91]. Такой механизм позволяет аккумулировать макромолекулы полимерного субстрата в периплазматическом пространстве клеток и помогает планктомицетам конкурировать за полимерные субстраты с быстрорастущими гидролитиками [90].

Таким образом, современные исследования природных микробных сообществ и составляющих их микроорганизмов позволяют не только существенно пополнить наши представления об их разнообразии, экологии и эволюции, но и дают возможность значительно ускорить поиск и расширить круг потенциальных продуцентов ферментов метаболизма хитина, перспективных для дальнейшего практического использования в различных биотехнологиях, или агентов биоконтроля. В настоящее время применение хитозана и его разнообразных производных и композитов включает медицину, питание, сельское хозяйство, микробиологию, фармакологию, косметику и т.д. [5, 92–99]. Кроме того, выше уже упоминалось о том, что одним из источников для получения хитина и хитозана являются мицелиальные грибы. Многочисленные применения хитозана

обусловлены его достаточно низкой ценой. Например, стоимость технического хитозана, применяемого для очистки воды, начинается с 5–10 долл. США за 1 кг; лучшие по качеству образцы со степенью деацетилирования 90% можно купить за 30–40 долл. США, а стоимость хитозана медицинского назначения может достигать 25000 долл. США [99]. В настоящее время выделение хитина и хитозана из грибов пока не может конкурировать с общепринятой схемой их получения из панциря ракообразных, однако с появлением новых биотехнологий этот метод, несомненно, будет использоваться в будущем.

#### IV. ХИТОЗАН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ КАК ИНГИБИТОРЫ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Настоящий раздел посвящен обзору научных исследований последних лет по использованию хитозана в качестве перспективного фунгицида, безопасного для окружающей среды.

Фитопатогены составляют огромную группу микроорганизмов, вызывающих серьезные заболевания растений, снижающих урожайность, а также качество получаемой продукции. Они могут выделять некоторые виды токсинов и метаболитов, которые представляют большую угрозу для безопасности сельскохозяйственной продукции, наносят значительный экономический ущерб: ежегодные потери оцениваются более чем в 200 млрд. долл. США [100].

В результате опроса международного экспертного сообщества по грибным патологиям, связанного с журналом «Molecular Plant Pathology» (495 голосов), был составлен список Топ-10 основных (по научному и экономическому значению) растительных патогенов в ранговом порядке: (1) *Magnaporthe oryzae*, (2) *Botrytis cinerea*, (3) *Puccinia* spp., (4) *Fusarium graminearum*, (5) *Fusarium oxysporum*, (6) *Blumeria graminis*, (7) *Mycosphaerella graminicola*, (8) *Colletotrichum* spp., (9) *Ustilago maydis*, (10) *Melampsora lini*; к этому списку были еще дополнительно добавлены два гриба – *Phakopsora pachyrhizi* и *Rhizoctonia solani* [101, 102].

В настоящее время синтетические фунгициды являются основным средством борьбы с патогенами растений. Использование их постоянно растет и сопровождается появлением ряда проблем экологического характера, таким как негативное влияние на среду обитания человека и животных, загрязнение сельскохозяйственных продуктов остаточными количествами фунгицидов, выработка резистентности у растений к их действию. В связи с этим необходимо

минимизировать применение синтетических фунгицидов путем повышения их эффективности или уделить большее внимание поиску альтернативных биологически активных соединений.

Использование биоразлагаемых материалов, деградация которых связана с процессами в биосфере, где микроорганизмы играют основную роль – один из способов преодоления негативного действия синтетических фунгицидов. Примером такого биоразлагаемого материала может служить хитин/хитозан [103, 104].

Использование хитозана в агрохимических целях обусловлено его биоразлагаемостью в почве, низкой токсичностью относительно живых организмов, доступностью сырья и наличием биологической активности. Противогрибная активность, присущая хитозану, обеспечивает возрастающий интерес к биополимеру. В последние десятилетия многие научные группы исследовали потенциал применения хитозана, его производных и композитов в качестве фунгицидов. Проанализировано влияние основных физико-химических характеристик хитозана и его производных на проявляемую активность относительно экономически важных грибных патогенов, поражающих растения. Коммерческое использование хитозана обусловлено его доступностью и свойствами.

Следует отметить, что на проявление активности хитозаном влияет ряд параметров: молекулярная масса (ММ), степень деацетилирования (СД), полидисперсность, порядок расположения ацетильных и аминогрупп в полимерной цепи, источник выделения [102, 105–107].

Полимер с противогрибным действием должен обладать следующими характеристиками: (1) быть легко и недорого синтезируемым; (2) растворяться в воде, желательно в нейтральной среде; (3) характеризоваться низкой токсичностью, не выделять токсичных продуктов при разложении; (4) обладать противомикробным действием относительно широкого спектра патогенных микроорганизмов в краткие сроки контакта. Биополимер хитозан и его производные в основном соответствуют этим требованиям.

ПРОТИВОГРИБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ХИТОЗАНА  
ОТНОСИТЕЛЬНО ФИТОПАТОГЕНОВ В ЗАВИСИМОСТИ  
ОТ ОСНОВНЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

*Влияние молекулярной массы*

ММ хитозана является одной из основных характеристик, которые влияют на активность, проявляемую полимером по отношению к патогенам растений. Так, в работе Badawy et al. [102] исследовали противогрибное действие 11 образцов хитозана из панцирей креветок

с ММ (весовая) в диапазоне 22–387 и 846 кДа относительно шести патогенов, включая *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum* и *Rhizoctonia solani*, и сравнивали их по величине эффективной ингибирующей концентрации с синтетическим фунгицидом металаксиллом (в качестве эталона). Противогрибную активность хитозана тестировали, используя метод радиального роста мицелия, согласно методике, изложенной в работе [108]. Ингибирование роста грибов выражали в процентах подавления радиального роста мицелия относительно контроля, с использованием формулы:

$$\text{Индекс прорастания (ИП) (\%)} = (1 - Da / Db) \times 100, \quad (1)$$

где Da – диаметр зоны роста в тесте, Db – диаметр зоны роста в контроле.

Хитозан с ММ 846 кДа (СД 89%) проявлял самую низкую активность: минимальная эффективная концентрация ( $EC_{50}$ ), при которой имело место 50%-е ингибирование роста мицелия, составляла 3037, 2922, и 2853 мг/л относительно *F. graminearum*, *F. oxysporum* и *R. solani* соответственно [102]. Образцы хитозанов с ММ в диапазоне от 32 до 276 кДа (СД 86–94%) проявляли активность при  $EC_{50}$  менее 1000 мг/л. Хитозан с ММ 22 кДа (СД 86%) характеризовался более низкой активностью –  $EC_{50}$  составляла 2659, 2697 и 2412 мг/л относительно указанных культур. Хитозан с ММ 203 кДа (СД 94%) проявлял наибольшую противогрибную активность против *F. graminearum* –  $EC_{50}$  1527 мг/л, полное ингибирование мицелия – через 5 дней (при концентрации 2000 мг/л). Значение  $EC_{50}$  против *F. graminearum* снижалось с 2659 до 1527 мг/л при увеличении ММ от 22 до 203 кДа, и изменялось от 1527 до 3037 мг/л при увеличении ММ с 203 до 846 кДа. Относительно *F. oxysporum* самым эффективным оказался хитозан с ММ 387 кДа (СД 84%), который ингибировал рост мицелия более 50% через 5 дней при  $EC_{50}$  987 мг/л. Из результатов, полученных в работе, следует, что эффективность действия хитозанов зависит от ММ, а также состава клеточной стенки тестируемого патогена. Авторы подтвердили, что хитозан при концентрации 1000 мг/л замедлял рост некоторых грибов, кроме тех, которые содержали молекулы хитозана в клеточной стенке (представители класса *Zygomycetes*) [102].

Этой же группой было проведено исследование влияния ММ (вязкостная) хитозана (5, 37, 57 и 290 кДа) *in vitro* и *in vivo* на рост мицелия *Botrytis cinerea* (Pers.) на спелых плодах томатов (*Solanum lycopersicum* L. var. *lycopersicum*) [109]. Образцы хитозана были получены в результате окислительной деградации с  $NaNO_2$ . Было показано, что хитозан с ММ 290 кДа проявлял самый низкий ингибирующий эффект относительно патогена. Минимальная эффек-

тивная концентрация хитозанов (50%-е ингибирование роста мицелия) снижалась с уменьшением ММ в опытах *in vitro*. Так, для хитозана с ММ 5 кДа она составляла 1392 мг/л, а с ММ 290 кДа – 2407 мг/л. При оценке *in vivo* на томатах противогрибковый эффект в той или иной мере оказывали все испытываемые образцы хитозана, причем он характеризовался концентрационной зависимостью: наилучшие результаты были получены при 2000 и 4000 мг/л. Хитозан с ММ 57 кДа обеспечивал наилучшую защиту при инокуляции *B. cinerea* во всех концентрациях (500, 1000, 2000 и 4000 мг/л) при хранении в течение 21 дня при 2°C. Хитозан ММ 5 кДа наименее активен в низких концентрациях 500 и 1000 мг/л [109].

Хитозан низкомолекулярный 5.2 кДа и высокомолекулярный 560 кДа (СД 80%; ММ вязкостная) исследовали на ингибирующую активность против *Botrytis cinerea* – оценивали рост и морфологию гиф при концентрациях 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 и 4.0 мг/мл [110]. Ингибирующая активность хитозана с ММ 5.2 и 560 кДа во временном интервале 24–144 ч при 26°C составляла 26–80 и 21–80%, соответственно, при увеличении концентрации от 0.5 до 4 мг/мл. При максимальной тестируемой концентрации ММ хитозана не влияла на мицелиальный рост *B. cinerea*, полного подавления роста патогена (100%) не наблюдали. Исследования показали, что хитозан способен ингибировать рост и вызывать серьезные повреждения клеточной структуры *B. cinerea*, а также образовывать непроницаемый слой вокруг клетки. По мнению авторов, хитозан может рассматриваться в качестве потенциальной альтернативы синтетическим фунгицидам [110].

В работе [111] изучали механизм действия низкомолекулярного водорастворимого хитозана с ММ (вязкостная) 1, 3, 5 и 10 кДа (СД 93%) на грибные клетки и везикулы (модель), содержащие различные композиции липидов. Противогрибную активность хитозана определяли с привлечением МТТ теста относительно фитопатогенов, в том числе *B. cinerea* КАСС 40573 и *F. oxysporum* ATCC 16909. Минимальная ингибирующая концентрация при использовании хитозана с ММ 1, 3, 5 и 10 кДа для обоих патогенов составляла 0.08, <0.04, <0.04 и <0.04 мг/мл соответственно. С использованием световой микроскопии показано, что хитозан с ММ 10 кДа сильно задерживал рост *B. cinerea* и *F. oxysporum*. Методом конфокальной микроскопии было показано, что низкомолекулярный хитозан с флуоресцентной меткой при взаимодействии с клетками *F. oxysporum* был локализован в цитоплазматической мембране, а результаты сканирующей электронной микроскопии показали, что патоген вызывал значительные морфологические изменения на поверхности клетки [111].

### Влияние степени полимеризации

В настоящее время число работ по исследованию противогрибного действия олигомеров хитозана непрерывно возрастает. Авторы одной из таких работ [112] изучали активность олигомеров хитозана со степенью полимеризации (СП) 3–9, полученных в результате ферментативной деполимеризации, относительно девяти фитопатогенов *in vitro*, в том числе *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium graminearum* и *F. oxysporum*, и определили противогрибной эффект олигомеров хитозана (0, 250, 500, 1000, 2000 мкг/мл) по ингибированию радиального роста мицелия. Эффективная концентрация  $EC_{50}$  (мкг/мл) и минимальная ингибирующая концентрация (МИК, мкг/мл) более 90% показаны для: *B. cinerea* 580 и 1640; *Colletotrichum orbiculare* >2000 и >2000; *F. graminearum* 1086 и >2000; *F. oxysporum* >2000 и >2000. На основании полученных результатов исследователи предположили, что поликатионный характер олигомеров хитозана только частично способствовал проявлению противогрибного действия [112].

В работе Rahman et al. [113] было проведено исследование влияния СП хитозана (СД 85%; СП = 206–9, что соответствует вязкостной ММ  $\approx$  34.4–1.5 кДа), на прорастание конидий двух штаммов *B. cinerea* (BC 101 и BCBD). Хитозаны с разной СП были получены в результате ферментативной деполимеризации с использованием хитозаназы (ScCsn46A) [114]. Для первоначальной оценки действия хитозана на патоген *in vitro* использовали фракции со СП = 206 и (3–10). При концентрации 80 мкг/мл никаких различий во влиянии на прорастание конидий не было отмечено. Однако при концентрации 1300 мкг/мл эффект ингибирования при использовании хитозана со СП = (3–10) увеличивался в 2–3 раза, по сравнению с хитозаном со СП = 206, через 24 ч после инокуляции. Было показано, что при инокуляции штаммов *B. cinerea* BC 101 и BCBD наибольшим ингибирующим эффектом обладали фракции хитозана со СП = 23 (ММ  $\approx$  4.7 кДа) и 40 (ММ  $\approx$  6.0 кДа) относительно первого и со СП (15–40) – второго фитопатогена. Были получены результаты *in vivo* по заражению цветков клубники штаммами *B. cinerea* BC 101 и BCBD (по 18 цветков). Противогрибной эффект от действия хитозана СП = 206 и СП = 9, 23, 40 и 48 (500 мкг/мл) оценивали через 6 дней после заражения. Наибольший индекс ингибирования – 85 и 59%, соответствовал фракциям со СП = 23 и 40 относительно *B. cinerea* BC 101 и 84 и 66% относительно *B. cinerea* BCBD [113].

В большинстве статей, рассмотренных выше, противогрибной эффект рассматривался, главным образом, в зависимости от ММ

хитозана. Однако в статьях обычно не уточняется, какая молекулярная масса образца хитозана приведена (весовая, числовая или вязкостная), и насколько он полидисперсный; в отдельных случаях указывали только СП. Поэтому результаты исследования противогрибной активности хитозана с близкими по значению ММ зачастую не сопоставимы, даже относительно одного и того же патогена.

#### Влияние степени деацетилирования

Важной характеристикой, влияющей на проявление противогрибной активности хитозана, является не только ММ, но и СД [115–117].

В работе Allan, Nadwiger, посвященной исследованию антигрибного действия хитозана (СД > 50%) на 46 видов грибов с различным составом клеточной стенки, было показано, что хитозан при концентрациях 125–1000 мг/л подавлял рост 32 видов грибов, в то время как хитин (СД < 50%) при концентрации 1000 мг/л – только 6 [118]. При этом эти 6 видов в равной или даже большей степени были чувствительными к хитозану, чем к хитину. Авторы предположили, что катионная форма первичных аминогрупп звеньев глюкозамина в полимерной цепи в результате электростатического взаимодействия с анионными группами на поверхности клеточной стенки приводит к ее дестабилизации и формированию пор, что, в конечном итоге, приводит к гибели патогена. К сходным выводам пришли также авторы исследования о влиянии хитоолигосахаридов (СД 91.5%) на клеточные мембраны актинобактерий [119].

В обзоре Verlee et al. [120] обсуждается влияние хитозана с различной СД (90–94.9%) на активность в отношении некоторых грибов, среди которых *B. cinerea* и *F. oxysporum*. В статье Peng et al. [121] определили, что при действии против *F. oxysporum* олигохитозана с ММ 5.5–9.0 кДа (при рН 7) его МИК составляла 1.0 мг/мл. Авторами был сделан вывод о том, что относительно более низкая СД и более высокое значение ММ способствуют усилению противогрибковой активности производных хитозана. Однако относительно *B. cinerea* не было приведено никаких конкретных результатов.

В работе Карповой и др. [122] изучалось влияние ММ, СД и полидисперсности хитозана на прорастание конидий *B. cinerea*, а также ионов кальция и меди, используемых в растворе с хитозаном, на противогрибную активность. В работе использовали хитозан с ММ (весовая) 100 кДа, СД 90, 60% и 60 кДа, СД 90, 60% и 2, 5, 13 кДа, СД 85, 85 и 98% соответственно. Индекс прорастания (ИП) конидий менее 50% отмечали для хитозана ММ 5 кДа, СД 85% в диапазоне концентраций 0.117–1.875 мг/мл. При максимальной концентрации

образцы хитозана ММ 5 и 2 кДа, со СД 85% полностью ингибировали прорастание конидий *B. cinerea*. Оба образца, близкие по значению ММ, с одной и той же СД и одинаковой полидисперсностью проявляли противогрибное действие при концентрациях, различающихся на порядок. Авторы предположили, что это связано с потерей активной составляющей в структуре хитозана (ММ 2 кДа, СД 85%), отвечающей за проявляемую активность [123]. Также в работе [122] был определен ИП конидий *B. cinerea* менее 50% для хитозана с ММ 2–13 кДа, СД 85–98% и полидисперсностью 2–2.5 при концентрации 0.117–1.875 мг/мл. Метаболическая активность гриба при действии хитозана ММ 13 кДа, СД 98% (0.938 мг/мл) соответствовала 20%, что определяли колориметрическим методом согласно методике, описанной ранее [124].

Таким образом, результаты по определению противогрибной активности хитозана без учета степени дезацетилирования, молекулярной массы, структурно-молекулярной неоднородности (полидисперсности), которая связана со способом получения, а также источником выделения, носят несопоставимый характер, и поэтому механизм противогрибного действия биополимера относительно фитопатогенов до сих пор остается малопонятным.

#### ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТОЗАНА ПО АМИНОГРУППЕ С ПРОТИВОГРИБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Наличие многочисленных аминогрупп в полимерной цепи хитозана позволяет получать на его основе производные с улучшенными физико-химическими характеристиками, например, растворимостью в широком диапазоне значений рН и увеличенной биологической активностью [125].

Функционализацию хитозана проводят по аминогруппе при С2 атоме, а также по гидроксильным группам при С6 и С3 атомах звена глюкозамина. Далее будут рассмотрены производные хитозана, синтезированные в результате модификации по аминогруппе как более реакционноспособной.

Одним из требований, предъявляемых к полимерам с противогрибным действием, является растворимость в воде в нейтральных условиях. Хитозан растворим в водных растворах при  $\text{pH} \leq 6.0$ , с увеличением концентрации растворов ощутимо проявляются вязкостные свойства биополимера. Плохая растворимость хитозана в воде может быть одной из причин различий в результатах при определении противогрибной активности, при прочих равных условиях.

Наличие аминогруппы при С2 атоме звена глюкозамина позволяет синтезировать N-модифицированные производные хитозана. Функ-

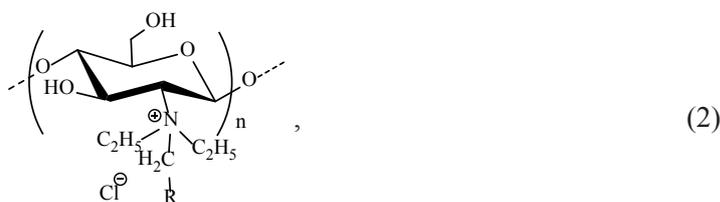
ционализацию хитозана осуществляют преимущественно с целью улучшения его свойств – растворимости в широком диапазоне значений рН, увеличения биологической активности – антимикробной, антиоксидантной, фунгицидной [97, 126].

Антигрибная активность синтетических фунгицидов обусловлена, главным образом, наличием нитро-групп или атомом галогена в их структуре. Ряд исследователей приняли во внимание этот факт при получении производных хитозана [127, 128]. Для синтеза производных использовали хитозан с ММ (вязкостная) 200 кДа, СД 97%, из которого первоначально получали водорастворимое производное (О-карбоксиметилхитозан, заместитель в положении С6) и далее с использованием 5-хлор-2-гидроксibenзальдегида и 2-гидрокси-5-нитробензальдегида синтезировали основания Шиффа (по аминогруппам). Противогрибную активность оценивали *in vitro* по радиальному росту мицелия, согласно методике, изложенной в работе [129], т.е. в стерильный картофельный агар добавляли производные хитозана в концентрации 5, 50 и 500 мкг/мл. Результаты исследований показали, что активные группы в сочетании с функциональными группами оснований Шиффа могут эффективно усиливать противогрибную активность относительно трех тестируемых патогенов, в том числе против *Fusarium oxysporium* f. sp. *vasinfectum*. Ингибирующий эффект хитозана при концентрации 500 мкг/мл составлял 14.3%, карбоксиметилхитозана – 9.1%, производных с нитро-группой и атомом хлора оснований Шиффа – 31.2 и 43.0% соответственно. Исследования показали, что производные хитозана по аминогруппе в сочетании с функциональными группами оснований Шиффа могут усиливать противогрибную активность в 2–3 раза.

Авторы исследования [108] предположили, если активность хитозана обусловлена его поликатионными свойствами, то введение четвертичных аммониевых групп (катионные группы) в структуру молекулы должно усиливать противогрибную активность. Из низкомолекулярного хитозана с ММ (вязкостная) 7.6 кДа и СД 97% в несколько стадий были синтезированы производные хитозана: основания Шиффа с бензальдегидом, салициловым альдегидом, соответствующие N-замещенные, и кватернизированные. Противогрибную активность производных тестировали относительно *Botrytis cinerea* Pers и *Colletotrichum lagenarium* (Pass) Ell. et Halst. Ингибирующая активность хитозана по отношению к *B. cinerea* и *C. lagenarium* при максимальной тестируемой концентрации 1 мг/мл составила, соответственно, 45 и 40%, тогда как для производных основания Шиффа и N-замещенных  $\leq 40\%$ , и только для кватернизированных – 59–81 и

56–72% (оценивали согласно методике изложенной в работе [108]).

С использованием хитозана с ММ 360 кДа и СД 91% синтезировали ряд N-бензил- (степень замещения 15–52%) и кватернизированных N-бензил-производных хитозана (степень кватернизации 8–22%) [130] с общей формулой, представленной ниже:



где R = фенил, *para*-метил-фенил, *para*-циан-фенил, *para*-фтор-фенил, *para*-нитро-фенил, *орто*-фтор-фенил, *орто,para*-диэтокси-фенил, *орто,para*-дихлор-фенил, 2-хлор,6-фтор-фенил.

Результаты исследований показали, что введение бензильного заместителя или кватернизация молекулы хитозана способствовали увеличению ингибирующей активности производных относительно *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*. Кроме того, повышение водорастворимости производных путем кватернизации значительно повышало активность в отношении грибов. Противогрибную активность производных оценивали по радиальному росту мицелия относительно контроля, согласно методике изложенной в работе [131]. Все N-бензильные производные хитозана показали большую противогрибную активность, чем немодифицированный хитозан. Для производных хитозана – N-(*n*-нитро-бензил)хитозан, N-(*o*-фтор-бензил)хитозан, N-(*o,n*-дихлор-бензил)хитозан и N-(2-хлор,6-фтор-бензил)хитозан – противогрибная активность против *B. cinerea* оценена как  $EC_{50} = 820, 989, 520$  и  $951$  мг/л соответственно. Относительно *F. oxysporum*  $EC_{50}$  для всех производных ниже 1000 мг/л, кроме N-(*o*-фтор-бензил)хитозана, N-(2-хлор,6-фтор-бензил)хитозана составила 1194 и 1480 мг/л соответственно [130].

В работе Wei et al. [132] было показано, что серия кватернизированных производных, отличающихся длиной N-алкильной цепи (C1–C4), полученных на основе 6-О-хлорацетилированного хитозана, характеризовались высоким ингибирующим индексом (при 1 мг/мл) относительно растительных патогенов, в том числе *B. cinerea*. Для получения производных использовали хитозан ММ 100–200 кДа, СД 81.5%. Активность кватернизированных производных хитозана уменьшалась по мере увеличение длины N-алкильных заместителей:

Таблица 1. Влияние длины заместителя хитозана, кватернизированного N-алкилхитозана, на противогрибное действие относительно патогенов растений *in vitro*

Соединение	Кватернизированное N-алкильное производное	СД, %	СЗ, %	EC <sub>50</sub> , мг/л	
				<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>
Хитозан	–	90	–	>3000	>3000
1	CH <sub>3</sub>	–	–	1467	875
2	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	75	14	1472	1184
3	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	64	26	908	871
4	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	64	24	1006	952
5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	70	18	2161	1485
6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	73	18	383	812

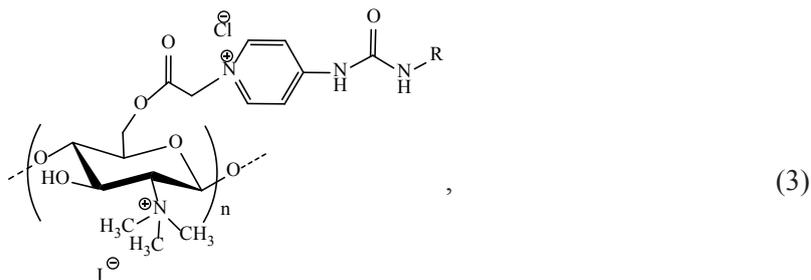
триметил > триэтил > трипропил > трибутил и составляла 100, 96,8, 91,6, 91,5% соответственно.

На основе хитозана с ММ 360 кДа, СД 90% осуществлен последовательный синтез кватернизированных N-алкильных производных (-бутил, -пентил, -гексил, -гептил и -октил) по аминогруппам хитозана через основание Шиффа (первая стадия), с последующим восстановлением иминной группы (C=N-) (вторая стадия) и последующим взаимодействием с иодистым метилом (третья стадия) [116]. Противогрибная активность хитозана и его производных была изучена *in vitro* относительно *B. cinerea*, *F. oxysporum* в диапазоне концентраций 250, 500, 1000, 1500 и 2000 мг/л. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Из результатов, полученных исследователями, можно сделать вывод, что кватернизированное производное хитозана (1) обладает в 2–3 раза большей противогрибной активностью, по сравнению с исходным хитозаном. Наибольшей активностью характеризовались соединения (3) и (6), и чем больше была длина заместителя, тем при меньшей концентрации достигалось 50%-е ингибирование патогенов. Если сравнивать оба эти соединения по СД, то вклад амногрупп соединения (6) в ингибирование роста *B. cinerea* очевиден.

В работе Zhang et al. [133] на основе хитозана с ММ 200 кДа и СД 83% были синтезированы четыре его производных в результате взаимодействия производного хлорацетилхитозана с четвертичной

аммониевой солью и группами мочевины, несущими 4-амино-пиридин, с общей формулой, представленной ниже:



где R = фенил, *орто*-хлор-фенил, *мета*-хлор-фенил, *пара*-хлор-фенил.

Мочевина с рядом заместителей  $R_1R_2NCONR_3R_4$  является привлекательной функциональной группой, которая проявляет широкий спектр биологической активности [134], в том числе противогрибную и антибактериальную [135]. Синтезированные производные хитозана (формула 3) имели разные со степени замещения в ряду (R) = фенил, *орто*-хлор-фенил, *мета*-хлор-фенил и *пара*-хлор-фенил – 61, 39, 43 и 51% соответственно. В результате проведенных исследований авторы [133] полагают, что положение атома хлора в заместителе мочевины может непосредственно влиять на противогрибную активность производных хитозана в соответствии с фунгистатическим правилом – *пара*-хлор-фенил > *мета*-хлор-фенил > *орто*-хлор-фенил. Заместители в структуре мочевины являются значимым фактором, влияющим на противогрибную активность образцов, поэтому изучение взаимосвязи между структурой и активностью очевидно. Авторы отметили, что растворимость производных хитозана значительно улучшилась по сравнению с хитозаном. Активность производных изучали на фитопатогенных грибах *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumebrium* Owen и *B. cinerea* при концентрациях 0.1, 0.5 и 1.0 мг/мл. Полученные результаты по активности сопоставимы и составляли от 76 до 88% для производных хитозана с заместителем (R) = фенил < *орто*-хлор-фенил < *мета*-хлор-фенил < *пара*-хлор-фенил, тогда как для хитозана ≤ 20% (при концентрации 1.0 мг/мл). Относительно *B. cinerea* уровень ингибирования роста составлял 72–89% и 66–82% при концентрации 1.0 и 0.5 мг/мл соответственно.

На основе хитозана с ММ (вязкостная) 70 кДа, СД 97% была синтезирована группа новых водорастворимых производных хитозана, содержащих 1,3,4-тиадиазоловую группу, (включая 1,3,4-тиадиазол,

2-метил-1,3,4-тиадиазол и 2-фенил-1,3,4-тиадиазол хитозан), предварительно были синтезированы основание Шиффа в результате взаимодействия аминогруппы с 3-пиридинкарбоксихальдегидом [136]. Их противогрибную активность в отношении трех видов фитопатогенов, в том числе против *Colletotrichum lagenarium* (Pass) Ell. et Halst, оценивали согласно методу, изложенному в работе [108]. Все производные хитозана, содержащие 1,3,4-тиадиазоловую группу, обладали хорошей растворимостью и противогрибной активностью в отношении протестированных грибов при концентрации 1 мг/мл. Производное хитозана с заместителем 2-метил-1,3,4-тиадиазол наиболее эффективно ингибировало рост патогена – на 82.5%, тогда как исходный хитозан – только на 31.3% [136].

На основе хитозана с ММ 230 кДа, СД 87% синтезировали хорошо растворимые, благодаря введению дитиокарбоматной группы ( $-NC(=S)SH$ ), производные аммоний дитиокарбамат хитозана со СЗ 18% и триэтилендитиокарбамат диамин хитозана со СЗ 13.5%; структура полученных производных была подтверждена [137]. Противогрибную активность против *F. oxysporum* определяли согласно методу, описанному в статье [108]. Авторы исследования отметили, что она возрастала по мере увеличения концентрации и составляла 16.2, 16.5% (13.25 мг/л) и 44.1, 69.4% (500 мг/л) для производных аммоний дитиокарбамат хитозана и триэтилендитиокарбамат диамин хитозана соответственно, тогда как для хитозана – 26.3% при максимальной испытываемой концентрации (500 мг/л). Синтезированные производные сравнивали с действием коммерческого фунгицида группы триазолов – триадимефона, и полиоксина (микробный фунгицид). Исследованные соединения по противогрибному действию представлены в последовательности: триэтилендитиокарбамат диамин хитозан > аммоний дитиокарбамат хитозан > триадимефон > полиоксин > хитозан [137].

При использовании хитозана с ММ (вязкостная) 200 кДа, СД 97% синтезировали ряд хитозан аммониевых солей с галоген замещенными кислотами (со степенью замещения 74–97%) [100]. Хитозан и полученные производные во всех концентрациях – 0.1, 0.5 и 1.0 мг/мл проявляли противогрибную активность относительно *F. oxysporum* и *Colletotrichum lagenarium*. Однако индекс ингибирования более 70% наблюдали только при концентрации 1.0 мг/мл, он оказался значительно выше, чем у исходного хитозана. В порядке возрастания противогрибной активности производные располагались в следующем порядке: немодифицированный хитозан, хитозан-бромацетат, хитозан-хлорацетат, хитозан-дихлорацетат, хитозан-

трихлорацетат и хитозан-трифторацетат – 11.8, 55.8, 69.6, 71.0, 73.9 и 78.5% соответственно против *F. oxysporum* и 25, 69.1, 73.5, 76.5, 77.9 и 82.4% соответственно против *C. lagenarium*. Активность определяли согласно методике, изложенной в работе [138]. Порядок расположения производных по противогрибной активности коррелировал с электроотрицательностью замещающих групп – галогенами, которые увеличивали положительную плотность заряда на атоме азота аммониевой соли хитозана за счет смещения электронной плотности. Аммониевые соли хитозана с более сильными группами электроотрицательности в ряду ( $-\text{CF}_3 > -\text{CCl}_3 > -\text{CHCl}_2 > -\text{CH}_2\text{Cl} > -\text{CH}_2\text{Br}$ ) характеризовались и более сильной противогрибной активностью.

В работе Yang et al. [139] были синтезированы производные с кумарином на основе хитозана с ММ 240 кДа, СД 85%. Среди многих перспективных гетероарилазосоединений кумарины – это класс природных органических соединений, содержащих ядро бензопирена. Наличие его в молекуле хитозана (СЗ от 40 до 60%) усиливает противогрибную активность против распространенных патогенных грибов, в частности, *F. oxysporum* и *F. moniliforme*, наносящих ущерб урожаю. Противогрибную активность *in vitro* определяли по скорости роста мицелия, как изложено в работе [140] при концентрации 0.1, 0.5, и 1.0 мг/мл. Производные хитозана при концентрации 1.0 мг/мл характеризовались более высоким индексом ингибирования – 58.1, 47.3% (при отсутствии заместителей в ядре бензопирена) и 77.2, 66.12% (при наличии заместителей хлора в ядре бензопирена) против *F. oxysporum* и *F. moniliforme* соответственно, по сравнению с немодифицированным хитозаном (9.7%). Отмечено, что введение атомов хлора в структуру бензопирена в *мета*-положение относительно друг друга вызывало дальнейшее повышение противогрибной активности [139].

Пиридин – это часто используемая общая гетероароматическая группа в качестве заместителя для агрохимикатов [141], была введена в хитозан последовательно: обработкой 4-хлорбутирилхлоридом с получением хлорбутирилхитозана (реакция алкилирования), далее с использованием пиридина в качестве растворителя с получением четвертичной соли – N-(1-карбоксивбутил-4-пиридиний) хлорид хитозана. В работе авторы исследовали противогрибную активность производных хитозана со СД 95.6%, вязкостью 423 мПа, и оценивали ингибирование роста мицелия и прорастание спор согласно методикам, изложенным в статье [142]. Ингибирование роста мицелия при использовании четвертичной соли пиридин хитозана (СЗ 38%) относительно *B. cinerea* составило 75% (для хитозана 58.9%) [141].

Изучение морфологии грибных гиф с использованием сканирующей электронной микроскопии подтвердило повреждение и деформацию структуры (аномальные формы, набухание мицелия), что, по мнению авторов, способствовало блокированию роста микроорганизма. Было показано, что четвертичная соль пиридин хитозан проявляла больший противогрибной эффект относительно *B. cinerea*, по сравнению с исходным хитозаном:  $EC_{50}$  – 1.98 (3.42), минимальная ингибирующая концентрация (МИК, MIC) – 0.13 (0.25), минимальная противогрибная концентрация (МФК, MFC) – 4.00 (8.00) мг/мл. Отсутствие токсичности у производного хитозана при определении острой токсичности на мышах позволило сделать исследователям предположение об использовании четвертичной соли пиридин хитозана в сельском хозяйстве и пищевой промышленности [141].

Таким образом, на основании результатов, полученных исследователями, противогрибное действие хитозана и его производных связано с различными формами атомов азота молекулы полимера. Многие исследования показали, что некоторые формы атомов азота, такие как первичные амины [117], имины [127], вторичные амины [108], четвертичные соли аммония [100] могут значительно повышать противогрибную активность. Из полученных результатов исследований следовало, что четвертичные аммониевые соли производных хитозана характеризовались повышенной противогрибной активностью [132]. Большую противогрибковую активность можно отнести к положительному заряду аммониевой соли хитозана [143]. Поэтому положительный заряд катионных аминогрупп в аммониевых солях хитозана, как считают исследователи, может быть направленно усилен введением в структуру галогенов [100]. Катионные аминогруппы с более высокой плотностью положительного заряда были более склонны к взаимодействию с анионными компонентами клеточной стенки, поэтому соли аммония хитозана с более сильными электроотрицательными группами проявляли более выраженный противогрибной эффект. Несмотря на множество опубликованных результатов, касающихся противогрибного действия хитозана и его производных, трудно адекватно оценить степень их влияния на подавление роста фитопатогенов из-за различий в способах определения основных характеристик хитозана – ММ, СД и СЗ производных.

## V. АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Одним из привлекательных свойств хитозана является его антибактериальная активность, которая обусловлена наличием положительно заряженных аминогрупп в растворах кислот. Аминогруппы можно легко модифицировать с целью увеличения растворимости и усиления антибактериальных свойств хитозана. Данный раздел посвящен исследованиям влияния основных характеристик хитозана – ММ, СД/СА и его производных с различными заместителями на проявление антибактериальных свойств.

Mellegård et al. [144] изучали антибактериальную активность ряда образцов хитозанов в форме гидрохлоридов с ММ 2.3, 28.4 и 98.3 кДа (со СА 16%) и ММ 11.9, 42.5, 163 и 224 кДа (со СА 48%). Активность образцов оценивали по ингибированию роста и целостности мембран на примере *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и трех липополисахаридных мутантов *E. coli* и *S. typhimurium*. По результатам исследования тестируемых хитозанов наиболее активным оказался хитозан 28.4 кДа, СА 16%; низкой активностью обладали образцы с ММ 2.3 и 11.9 кДа, СА (16 и 48% соответственно). Авторы пришли к выводу, что хитозаны с более низкой СА проявляют повышенную антибактериальную активность [144].

В работе Younes et al. [145] использовали пятнадцать образцов хитозанов с различными СА и ММ, полученных в результате полного дезацетилирования хитина с последующим реацетилированием в однородной среде. Антимикробную активность против грамотрицательных (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *S. typhimurium*) и грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* и *Micrococcus luteus*) изучали при различных значениях рН. Хитозан заметно угнетал рост большинства бактерий, хотя ингибирующее действие зависело не только от величины ММ и СА хитозана, но и от вида микроорганизма. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) варьировали от 0.001 до 0.1% (весовых). Было показано, что хитозаны с низкой СА и при меньшем значении рН обладали большей эффективностью. Антибактериальную активность относительно грамотрицательных бактерий дополнительно повышали снижением ММ, тогда как для грамположительных бактерий наблюдался обратный эффект [145].

Chang et al. [146] определяли корреляцию между антибактериальной активностью и ММ хитозана при различных значениях рН. В работе использовали хитозаны с ММ 156, 72.1, 29.2, 7.1 и 3.3 кДа со СД 95%, выделенных из гидролизатов после расщепления целлюлазой

креветочного хитозана с ММ 300 кДа. В области низких значений pH активность хитозана увеличивалась с увеличением ММ, независимо от температуры и тестируемых бактерий. Однако при нейтральном значении pH активность хитозана возрастала с уменьшением ММ, тогда как для хитозанов с ММ > 29.2 кДа авторы отметили небольшую активность, что, вероятно, было связано со снижением растворимости и суммарного положительного заряда хитозана в растворе при pH 7.0 и привело к потере антибактериальной активности [146].

Из рассмотренных выше публикаций следует, что у хитозана с низкой ММ и высокой СД антибактериальная активность выше, что, вероятно, связано с большей растворимостью биополимера. Для ее увеличения обычно применяют два подхода: либо снижают ММ деполимеризацией, используя ферментативный, физический или химический методы, либо вводят дополнительные заряженные группы в молекулу полимера, получая карбоксиметилированные, сукцинилированные, сульфатированные, гликозилированные, тиолированные, кватернизированные производные [147–154].

Следует отметить, что из всего разнообразия водорастворимых производных хитозана, наибольшей антибактериальной активностью обладают кватернизированные производные хитозана, содержащие в своей структуре четвертичные аммониевые группы (ЧАГ) [155–166] с большим положительным зарядом, который взаимодействует с отрицательно заряженными клеточными стенками бактерий.

Для получения кватернизированного хитозана (КвХ) исследователи обычно используют два основных способа: (1) восстановительное алкилирование иодистым метилом в щелочных условиях [155], либо (2) исчерпывающее алкилирование глицидилтриметиламмоний хлоридом (ГТМАХ) в водной среде [156]. Недостатком первого способа является частичная деградация хитозана и получение на выходе смеси N- и 6-O-метил-производных хитозана. Синтез N,N,N-триметил хитозана (ТМХ) в отсутствие O-метил-производных осуществляют в две стадии. Сначала получают производное диметилхитозана в муравьиной кислоте с формальдегидом, далее при избытке йодистого метила получают ТМХ [157].

В работе авторы синтезировали широкую линейку N,N,N-три-, N,N-ди-, N-монометил- и O-метил-хитозанов с различной степенью замещения (СЗ), которая в зависимости от условий реакции колебалась от 0 до 74%, на основе хитозанов с ММ 8.1, 7.75, 7.75 кДа и СА 5, 52, 18% соответственно. Антибактериальную активность изучали относительно *S. aureus* при pH 5.5 и 7.2. МИК полученных препаратов при pH 5.5 варьировала от 16 до 512 мкг/мл. При pH 7.2

N-кватернизированные производные с высокой СЗ показали МИК менее 8 мкг/мл [158].

В работе Lim et al. исчерпывающим алкилированием с использованием ГТМАХ в водной среде были синтезированы кватернизированные производные хитозана [156]. В результате алкилирования в зависимости от рН реакционной смеси были получены различные продукты. В кислой и нейтральной среде реакция по аминогруппам протекала с образованием N-алкилированного производного. СЗ зависела от условий реакции: мольного соотношения алкилирующего реагента по отношению к аминогруппам хитозана, температуры и продолжительности реакции. В щелочных условиях реагент – ГТМАХ, взаимодействовал, как с амино-, так и гидроксильными группами хитозана при С6 атоме, и, таким образом, были получены N,O-алкилированные производные [159].

В работе Шагдаровой и др. [125] исследовали антибактериальную активность N-кватернизированных производных на основе хитозана (КвХ) с ММ 24 кДа, СД 98%. С использованием реагента ГТМАХ авторы синтезировали линейку КвХ со СЗ от 10 до 98%. Было показано, что с увеличением СЗ антибактериальная активность увеличивалась.

Введением различных заместителей в четвертичную аммониевую группу исследователи пытаются усилить антибактериальное действие кватернизированных производных хитозана. Например, в работе Wadawu et al. [130] вводили в структуру хлор-, фтор-, циано- и нитро-бензильные группы. В результате МИК таких производных в отношении *Agrobacterium tumefaciens* и *Erwinia carotovora* незначительно увеличилась, по сравнению с производными, несущими только ЧАГ. Антибактериальная активность соединений, имеющих несколько функциональных групп, была повышена примерно в два раза, по сравнению с производными N-(бензил) хитозана (С1–С9). МИК С1–С9 варьировали от 800 до 1780 мг/л относительно *A. tumefaciens* и от 700 до 1550 мг/л против *E. carotovora*. Однако МИК четвертичных производных N-(бензил) хитозана (QC1–QC9) колебались от 500 до 875 мг/л для *A. tumefaciens* и от 600 до 975 мг/л для *E. carotovora*. N-(n-нитробензил) хитозан (С5) показал самую высокую антибактериальную активность среди N-(бензил) хитозановых производных с МИК 800 и 700 мг/л для *A. tumefaciens* и *E. carotovora* соответственно. *E. carotovora* оказался более чувствителен к соединениям С1–С9, чем *A. tumefaciens*. Напротив, *A. tumefaciens* был более чувствителен к соединениям QC1–QC9, чем *E. carotovora* [130].

В работе Шагдаровой и др. [148] сообщается, что в структуре хитозана (ММ 20, СД 98%) вместе с четвертичными аммониевыми группами присутствовали ацильные (С2, С4, С6), С3 которых составляла 10%. Авторы предположили, что введение гидрофобных заместителей со сродством к клеточной мембране микроорганизма могли бы усилить антибактериальную активность. Однако из полученных результатов следовало, что наибольшей антибактериальной активностью обладал КвХ с максимальной С3. МИК производного в отношении *S. epidermidis* составила 0.48 мкг/мл, в отношении *E. coli* – 3.90 мкг/мл, а введение ацильных радикалов различной длины не оказало заметного влияния [148].

В работе Sajomsang et al. [160] метилированный хитозан, содержащий различные ароматические фрагменты, такие как N-(4-N,N-диметиламиноцинамил) хитозан хлорид (MDMCMCh), метилированный N-(4-пиридилметил) хитозан хлорид (MPyMeCh) и N,N,N-триметил хитозан хлорид (TMChC), были синтезированы в два этапа: восстановительное аминирование и метилирование на основе хитозана с ММ 276 кДа, СД 94%. Степень N-замещения (DS) и степень кватернизации (DQ) в диапазоне от 50 до 76% и от 28 до 82% соответственно. МИК и МБК были определены для *S. aureus* ATCC 6538 и *E. coli* ATCC 25922. Производное MDMCMCh характеризовалось более высокой антибактериальной активностью. МИК и МБК для *S. aureus* и *E. coli* – 62 и 500 мкг/мл соответственно, в то время как производное MPyMeCh проявляло пониженную антибактериальную активность против обоих штаммов при равной С3. При сравнении химической структуры исследуемых соединений было обнаружено, что антибактериальная активность зависит от DQ, а также от местоположения положительного заряда и молекулярной массы [160].

Эта же научная группа синтезировала ряд различных N-арильных производных хитозана, содержащих либо электронодонорные, либо электроноакцепторные группы (N-н-октил-, N-бензил-, N-(4-гидроксибензил-, N-(2-метоксибензил-, N-(4-метоксибензил-, N-(3,4-диметоксибензил-, N-(4-фторбензил-, N-(3-бромбензил-, N-(4-бромбензил-, N-(4-трифторбензил-, N-(4-нитробензил-, N-(4-карбокисбензил-, N-(4-пиридинметил-, N-(2-тиофенилметил-) с различными степенями N-замещения. Далее эти производные были кватернизированы с использованием 3-хлор-2-гидроксипропил-триметиламмоний хлорида (ХГПТМАХ). Все производные были получены на основе хитозана с ММ 276 кДа, СД 94%. Антибактериальная активность производных была изучена относительно *S. aureus* и *E. coli*. Резуль-

таты по определению МИК показали, что при СЗ арильными заместителями более чем на 20% антибактериальная активность снижалась из-за уменьшения степени кватернизации (суммарного положительного заряда) молекулы полимера. Все производные КвХ характеризовались МИК в диапазоне 8–64 мкг/мл против обоих штаммов бактерий [161].

В работе Xu et al. [162] производное N,N,N-триметил-О-(2-гидрокси-3-триметиламмоний пропил) хитозана (ТМГТМАПХ) с различной степенью О-замещения синтезировали взаимодействием N,N,N-триметил хитозана (ТМХ) с ХГПТМАХ. Производные были получены на основе хитозана с ММ 100 кДа, СД 95.6%. Антибактериальную активность против *S. aureus* и *E. coli* изучали при рН 5.5 и 7.2, используя каждый образец в концентрации от 0.1 до 0.00079% (в/в). Производное ТМГТМАПХ со степенью N-триметилирования 68.9%, степенью N-диметилирования 22.6% и степенью О-карбоксиметилирования 61.5% проявляло большую антимикробную активность в при рН 5.5 (МИК для *S. aureus* 0.00157%, для *E. coli* 0.00313%), по сравнению с исходным ТМХ (МИК для *S. aureus* 0.0125%, для *E. coli* 0.025%) [162]. Антибактериальная активность кватернизированных производных хитозана представлена в табл. 2.

Механизм антибактериальной активности самого хитозана, а также его КвХ на сегодняшний день до конца не изучен. Исследователи считают, что электростатическое взаимодействие между положительно заряженным полимером с отрицательно заряженными компонентами поверхности бактериальной клетки играет важную роль в проявлении активности [163]. Катионная плотность заряда КвХ превышает плотность немодифицированного хитозана, за счет чего, вероятно, и наблюдается больший антибактериальный эффект [161]. Хелатирующая способность КвХ при нейтральных значениях рН, возможно, также дополняет электростатический эффект [164]. Выше уже упоминалось о том, что молекулярная масса влияет на активность полимера, однако высокомолекулярные образцы не могут пройти через клеточные мембраны и взаимодействуют только с поверхностью клетки, изменяя ее проницаемость или образуя пленку, которая препятствует переносу питательных веществ через мембраны микробной клетки [165]. Тем не менее, низкомолекулярные водорастворимые производные хитозана или их наночастицы могут проникать сквозь клеточные стенки бактерий и взаимодействовать с ДНК, блокируя ее транскрипцию и синтез мРНК [166].

Таблица 2. Антибактериальная активность  
кватернизированных производных хитозана (рН 7.2)

Кватернизированное производное хитозана	МИК для <i>S. aureus</i> , мкг/мл	МИК для <i>E. coli</i> , мкг/мл	Ссылка
N-метил хитозан	32	–	[158]
N,N,N-триметил хитозан	64	–	[158]
O,N-пентаметил хитозан	16	–	[158]
N-[(2-гидрокси-3-триметиламмоний)пропил]хитозан хлорид	0.48*	3.9	[125]
Метилированный N-(4-N,N-диметиламиноцинамил) хитозан хлорид	62	62	[160]
Метилированный N-(4-пиридилметил) хитозан хлорид	125	250	[160]
N-(3-хлоро-2-гидроксипропил)триметиламмоний хитозан хлорид	64	64	[161]
N-n-октил хитозан кватернизированный	16	32	[161]
N-бензил хитозан кватернизированный	8	32	[161]
N-(4-гидроксибензил) хитозан кватернизированный	16	32	[161]
N-(2-метоксибензил) хитозан кватернизированный	32	32	[161]
N-(4-флуоробензил) хитозан кватернизированный	16	32	[161]
N-(4-хлоробензил) хитозан кватернизированный	16	32	[161]
N-(3-бромобензил) хитозан кватернизированный	32	32	[161]
N-(4-нитробензил) хитозан кватернизированный	16	32	[161]
N-(4-карбоксибензил) хитозан кватернизированный	16	32	[161]
N-(4-пиридинилметил) хитозан кватернизированный	8	32	[161]
N-(2-тиофенилметил) хитозан кватернизированный	8	16	[161]

\* – модельный объект *S. epidermidis*.

## VI. АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ ПО АМИНОГРУППЕ

### АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА

Свободные радикалы, образующиеся в результате окислительного стресса, могут запускать сигнальные процессы в клетках и тканях организма, приводящие к развитию различных патологий. Развитие ряда хронических заболеваний, таких как диабет второго типа и рак, связывают с воздействием окислительного стресса [167]. Белки, мембранные липиды и ДНК являются мишенями для окислительного стресса, поскольку легко реагируют с активными радикалами. Стоит отметить, что активные формы кислорода (АФК) являются не только агентами окислительного повреждения при патологиях, но и играют важную роль в регуляции основных функций клетки [168]. Формирование определенных количеств АФК необходимо для поддержания гомеостаза. Живые организмы достигают этого с помощью системы антиоксидантной защиты, позволяющей им поддерживать баланс между окислительным воздействием и защитой [169]. Тем не менее, нарушение равновесия в функционировании этой системы и накопление свободных радикалов приводит к серьезным последствиям.

В последнее десятилетие значительно расширились области применения хитозана. В частности, опубликованы подробные исследования антиоксидантных и способствующих ингибированию свободных радикалов свойств хитозана и его производных [170–176]. Антиоксидантная активность – это способность химических соединений ингибировать образование свободных радикалов и препятствовать повреждению ими живых клеток. Проявляемая хитозаном антиоксидантная активность связана с наличием протонированной аминогруппы, а также хелатированием ионов металлов, индуцирующих образование свободных радикалов в клетках, и запуском опосредованных клеточных механизмов защиты от окислительного стресса. Имеются данные об антиоксидантных свойствах хитозана с  $M_w$  20 кДа, СД 95%, которые продемонстрированы в исследованиях *in vivo* [170]. Авторами были рассмотрены антиоксидантное действие хитозана, как на модельных радикалах, так и при взаимодействии с человеческим альбумином. Изучены показатели крови добровольцев, указывающие на проявление антиоксидантного эффекта: соотношение неокисленного и окисленного альбумина, содержание липидов низкой и высокой плотности. Показано снижение содержания окисленной формы альбумина (18.6% за 4 недели), увеличение общей

антиоксидантной активности плазмы (ОААП) при лечении хитозаном через 2 недели (12.6%) с дальнейшим снижением (44.2%) через 4 недели, что свидетельствует о положительном влиянии хитозана на ход окислительного стресса у пациентов [170].

Опубликован ряд работ, в которых были изучены хитозаны с различной ММ (весовой,  $M_w$ ) и СД на предмет антиоксидантной активности [171–174]. Так при исследовании антиоксидантной и антимуtagenной активности хитозанов с  $M_w$  2.2, 3.3, 7.1, 29.2, 72.1, 156 и 300 кДа [171] показано, что снижение молекулярной массы значительно увеличивало ингибирующую активность против модельных радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ). Хитозан с  $M_w$  300 кДа имел ингибирующую активность 38.2% в тесте с ДФПГ-радикалами, а хитозан  $M_w$  2.2 кДа ингибировал более 80% радикалов. Кроме того, со снижением молекулярной массы наблюдался значительный рост концентрационной зависимости активности. Снижение молекулярной массы также способствовало хелатированию ионов железа и ингибированию пероксида водорода.  $EC_{50}$  для хитозана  $M_w$  2.2 кДа в тесте ингибирования ДФПГ, пероксида водорода и хелатирования железа составила 0.51, <0.5 и 7.3 мг/мл соответственно. Также все образцы хитозанов продемонстрировали антимуtagenный эффект в тестах с 4-нитрохинолин-N-оксидом (4-NQO) и бензо[ $\alpha$ ]пиренами в присутствии смеси ферментов печени S9 на модели *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100 [171].

В работе Tomida et al. [172] также были исследованы образцы хитозана с  $M_w$  2.8, 17.0, 33.5, 62.6, 87.7, 604, 931 кДа. Среди них хитозан с  $M_w$  2.8 кДа показал более выраженный антиоксидантный эффект на модельных радикалах ДФПГ и 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) (АБТС). Хитозан также ингибировал окисление белков в плазме крови в тесте с 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлоридом (АБАП). Наибольшей активностью также обладали образцы с меньшей молекулярной массой. Наименьшую ингибирующую концентрацию ( $IC_{50}$ ) 0.87 мг/мл в тесте с ДФПГ имел образец с  $M_w$  2.8 кДа. В тестах с реагентами АБАП и АБТС тот же образец хитозана обладал наибольшей антиокислительной активностью [172].

В последнее десятилетие наибольшее внимание исследователей уделяется изучению биологических и антиоксидантных свойств олигомеров хитозана [173, 174]. В работе Liu et al. [175] на модели эндотелиальных клеток пупочной вены человека (ECV304) показаны защитные эффекты хитоолигосахаридов против окислительного повреждения, вызванного перекисью водорода. Механизм действия

олигомеров хитозана частично связан с ингибированием внутриклеточных АФК и восстановлением активности эндогенных антиоксидантов, наряду со способностью подавлять апоптоз эндотелиальных клеток.

В работе Li et al. [176] была изучена антиоксидантная активность хитоолигомеров (тример, пентамер и гексамер), для разделения которых был использован метод ионообменной колоночной хроматографии. Оказалось, что с уменьшением СП олигомеров увеличивался эффект поглощения ОН·радикалов и восстанавливающая способность, однако ингибирование  $O_2^-$  радикалов у всех протестированных хитоолигомеров возрастало с увеличением СП.

В исследованиях Subhargadha et al. [177] на крысах был изучен гепатопротекторный эффект  $\beta$ -хитозана из гладиуса кальмара *Sepioteuthis lessoniana* в отношении окислительного стресса, вызванного четыреххлористым углеродом ( $CCl_4$ ). В эксперименте крысы получали  $CCl_4$  в количестве 1 мл/кг массы тела. Хитозан вводили в количестве 200 мг/кг массы тела в день через желудочный зонд. Индуцированные  $CCl_4$  изменения в системе антиоксидантной защиты, кровообращения и печени были нормализованы  $\beta$ -хитозаном, из чего авторы делают вывод, что гепатопротекторное действие хитозана может быть обусловлено его антиоксидантными и антилипидемическими свойствами [177].

#### ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТОЗАНА С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Наличие реакционноспособной аминогруппы позволяет легко осуществлять химические превращения хитозана. Кватернизирование и сукцинирование являются широко известными подходами для улучшения растворимости хитозана. В результате, благодаря увеличению доступности функциональных групп при протекании восстановительных реакций и хелатировании ионов металлов, усиливаются антиоксидантные свойства полимера. Так, в исследованиях Rajapakse et al. [178] впервые было показано наличие антиоксидантной активности сукцинированных производных на клеточной модели. Авторами продемонстрирован защитный эффект сукцинированных хитоолигосахаридов ( $M_w$  6–7 кДа, СД 73%) от радикально-инициированного перекисного окисления мембранных липидов клеточных линий мышинных макрофагов RAW264.7, а также показано ингибирование активности миелопероксидазы (МПО) в миелоидных клетках человека HL60 до 43%. Также есть данные о наличии антиоксидантных свойств у кватернизированного хитозана [125, 179].

В последнее время все большее внимание уделяется химической модификации хитозана, в результате которой молекулы полифенольных антиоксидантов ковалентно сшиваются с полимерной цепью хитозана [180]. Ковалентная сшивка с полисахаридом является одним из способов стабилизации антиоксидантов и улучшения их биодоступности. Такие полисахариды обладают повышенной антиоксидантной активностью. Имеется множество экспериментальных данных, как *in vitro*, так и *in vivo*, свидетельствующих о значительной биологической активности модифицированного хитозана. Исходя из результатов исследований антиоксидантной активности хитозана, наиболее целесообразно получать производные на основе низкомолекулярных образцов [171–175]. Снижение молекулярной массы и ковалентная пришивка антиоксиданта значительно увеличивают антиокислительные свойства конечного соединения.

Одни из первых исследований синтеза конъюгата хитозана ( $M_w$  950 кДа, СД 95%) с галловой кислотой позволили установить его ингибирующую активность в экспериментах на модельных радикалах –ДФПГ,  $OH\cdot$  и  $R\cdot$  [181]. Эффективные концентрации ингибирования 50% радикалов ( $EC_{50}$ ) составили 0.14, 0.067 и 0.023 мг/мл соответственно.

В экспериментах Ngo et al. [182] на клеточной линии SW1353 было показано, что олигохитозан  $M_w$  3–5 кДа с галловой кислотой препятствовал окислительному повреждению ДНК, белков и липидов. Модифицированный олигосахарид в концентрации 100 мкг/мл на 90% ингибировал повреждения ДНК в сравнении с контролем. Доля ингибирования окисления внутриклеточных белков и липидов составила 80% в аналогичной концентрации. Также была рассмотрена ингибирующая активность соединения на ДФПГ,  $OH\cdot$ ,  $O_2\cdot^-$  и  $R\cdot$  радикалах. Кроме того, конъюгат с галловой кислотой увеличивал уровень внутриклеточных антиоксидантных ферментов (SOD и GSH) и подавлял активацию и экспрессию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B в  $H_2O_2$ -индуцированных клетках SW1353. На основании данных этих исследований можно сделать вывод, что олигохитозан с галловой кислотой можно использовать в качестве ингибитора свободных радикалов, препятствующего повреждению клеточных систем, а также рассматривать его в качестве перспективного активного вещества при профилактике и лечении остеоартрита [182].

По сообщению Eom et al. [183] осуществлен синтез конъюгатов хитоолигосахаридов с  $M_w$  3–5 кДа с различными полифенольными кислотами: гидроксibenзойной, кумаровой, протокатехиновой, кофейной, ванильной, феруловой, сиреневой и синапиновой, а также исследована антиоксидантная активность в тестах с ДФПГ,  $OH\cdot$ ,  $NO\cdot$ .

Наибольшую активность проявляли конъюгаты с кофейной и протокатехиновой кислотами; содержание полифенола составляло 81 и 89 мг/г полимера соответственно.

Синтезированные конъюгаты хитозана с кофейной кислотой были исследованы на предмет антиоксидантной активности и восстановительной способности в отношении модельных радикалов [184]. Исследовали линейку хитозанов с  $M_w$  47, 198 и 544 кДа. Было показано, что проявляемая активность связанной с хитозаном и свободной кофейной кислоты на ДФПГ была одинакова. Следовательно, ингибирующая активность конъюгатов хитозана в большей степени зависит только от фенольных гидроксильных групп в структуре производного. Восстановительную активность изучали по реакции  $Fe^{3+}$ /феррицианид с антиоксидантом. В данных исследованиях хитозан с  $M_w$  47 кДа показал более высокую восстановительную способность в отношении модельных радикалов, а хитозан с  $M_w$  544 кДа в отношении ионов железа, по всей видимости, за счет дополнительного хелатирования восстанавливаемых ионов металла [184].

В работе Woganuch et al. [185] исследователями был получен конъюгат хитозана ( $M_w$  200 кДа) с феруловой кислотой и показано улучшение растворимости и антиоксидантной активности производного биополимера. Ингибирующую активность изучали на примере реакции восстановления ДФПГ. Конъюгат хитозана характеризовался повышенной, в сравнении с хитозаном, ингибирующей активностью в отношении модельных радикалов (92.5–96.6%). В тесте на восстановительную активность  $Fe^{3+}$ – $Fe^{2+}$  модифицированный хитозан также показал более высокие результаты [185].

По сообщению Ngo et al. [186] на основе хитоолигосахарида с  $M_w$  3–5 кДа синтезирован конъюгат с галловой кислотой и изучена его антиоксидантная активность на макрофагах RAW264. Для выбора диапазона концентраций действующего вещества авторы сначала определяли цитотоксичность производных олигосахаридов. В диапазоне концентраций от 10 до 100 мкг/мл цитотоксический эффект не проявлялся. Окисление мембранных липидов изучали методом реактивных соединений тиобарбитуровой кислоты (РСТК). В концентрации 100 мкг/мл проявлялся наибольший антиоксидантный эффект: снижение концентрации РСТК до 80%, уровня перекисного окисления липидов до 62%, уровня окисления мембранных белков до 83%. Также был изучен процесс повреждения ДНК в ходе окислительного стресса. В течение 10 мин почти вся ДНК в контрольной группе, получавшей только  $H_2O_2$ – $Fe(II)$ , разлагалась. Конъюгат хитозана показал дозозависимый ингибирующий эффект на радикальное окислительное повреждение ДНК. При 100 мкг/мл

производного, повреждение ДНК ингибировалось более чем на 90%, в то время как хитоолигосахарид ингибировал повреждение ДНК только на 20% [186].

Исследования антиоксидантных свойств наночастиц хитозана с галловой кислотой и октилгаллатом проведены на модели *Clarias gariepinus* (африканский клариевый сом) [187]. Конъюгаты с полифенолами синтезированы в результате ферментативной реакции с тирозиназой на основе хитозана  $M_w$  110–120 кДа, СД 89%. Рыбы в различных группах были обработаны в течение 3-х недель следующим образом: группа 1 – необработанный контроль; группа 2 перорально получала охратоксин А (ОТА; 1 мг/кг массы тела); группы 3, 4, 5, перорально получали наночастицы хитозана (CSNP), наночастицы хитозана с галловой кислотой (GA-CSNP) или наночастицы хитозана с октилгаллатом (OG-CSNP; 280 мг/кг массы тела) соответственно; группы 6, 7, 8 получали перорально ОТА плюс CSNP, GA-CSNP или OG-CSNP соответственно. ОТА индуцировал окислительный стресс в печени и почках, о чем свидетельствовали нарушения биохимических параметров и гистологические изменения. CSNP или их ферментативно модифицированным производным OG-CSNP и GA-CSNP удалось противодействовать проявляемым ОТА токсическим эффектам [187].

Исследователями Liu et al. [188] был получен карбоксиметил хитозан с ковалентно связанным антиоксидантом (галловая, кофейная, феруловая кислоты), и антиоксидантная активность изучена в отношении ДФПГ, OH· радикалов и  $H_2O_2$ . Кроме того, было изучено ингибирование перекисного окисления липидов новыми соединениями. Показано, что антиоксидантная активность изменялась в ряду соединений следующим образом: карбоксиметил хитозан с полифенольной кислотой > карбоксиметил хитозан > хитозан [188].

Обобщающие данные по методам получения производных хитозана и модельным объектам исследования их антиокислительных свойств представлены в табл. 3.

На основании представленных исследований можно сделать вывод о наличии широкого спектра антиоксидантной активности хитозана. Снижение молекулярной массы хитозана является главным фактором, влияющим на увеличение активности полисахарида. Химическая модификация биополимера с введением новых функциональных групп и заместителей позволяет получать производные с повышенной растворимостью и антиоксидантной активностью. Одним из будущих направлений исследований полифенольных конъюгатов и различных производных хитозана является оценка *in vivo* потенциала антиоксидантной активности новых соединений.

Таблица 3. Антиоксидантные свойства хитозана и его производных

Объект исследования	Методы и модели исследования антиоксидантных свойств	Ссылка
Хитозан, $M_w = 2.2\text{--}300$ кДа	ДФПГ	[171]
Хитозан, $M_w = 2.8\text{--}931$ кДа	ДФПГ, АБТС, плазма крови + АБАП	[172]
Хитозан, $M_w = 20$ кДа, СД = 95%	ДФПГ, АБТС, показатели крови человека ОААП, содержание окисленного альбумина, плазма крови + АБАП	[170]
Хитоолигосахариды, СД > 95%	ECV304 + окислительный стресс $H_2O_2$	[174]
Хитоолигосахариды (тример, пентамер, гексамер)	$OH^\cdot$ , $O_2^\cdot$	[175]
$\beta$ -Хитозан из гладиуса кальмара	Крысы + окислительный стресс $CCl_4$	[177]
Сукцинированные хитоолигосахариды, $M_w = 6\text{--}7$ кДа, СД = 73%	Макрофаги RAW264.7; миелоидные клетки человека HL60	[178]
Конъюгат с галловой кислотой (СЗ = 15%), $M_w = 950$ кДа, СД = 95%	ДФПГ, $OH^\cdot$ и $R^\cdot$	[181]
Конъюгат хитозана с галловой кислотой, $M_w = 3\text{--}5$ кДа	ДФПГ, $OH^\cdot$ , $O_2^\cdot$ , $R^\cdot$ SW1353 + окислительный стресс $H_2O_2$	[182]
Конъюгаты хитоолигосахаридов с полифенольными кислотами, $M_w = 3\text{--}5$ кДа	ДФПГ, $OH^\cdot$ , $NO^\cdot$	[183]
Конъюгаты хитозана с кофейной кислотой, $M_w = 47, 198, 544$ кДа	ДФПГ, восстановление комплекса $Fe^{3+}$ /феррицианид	[184]
Конъюгат хитозана с феруловой кислотой, $M_w = 200$ кДа	ДФПГ, восстановление $Fe^{3+}$ – $Fe^{2+}$	[185]
Конъюгат хитозана с галловой кислотой, $M_w = 3\text{--}5$ кДа	Макрофаги RAW264 + окислительный стресс $H_2O_2$	[186]
Наночастицы на основе конъюгата хитозана с галловой кислотой, октилгаллатом, $M_w = 110\text{--}120$ кДа, СД = 89%	<i>Clarias gariepinus</i> (сом) + окислительный стресс (охратоксин А), анализ фрагментации ДНК	[187]
Карбоксиметил хитозан с полифенольными кислотами	ДФПГ, $OH^\cdot$ , $H_2O_2$ , перекисное окисление липидов	[188]

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный в настоящем обзоре анализ публикаций подтверждает важность как продолжения фундаментальных исследований, направленных на расширение представлений о распространении хитина и хитозана в природе, их участии и роли в глобальных биосферных циклах, так и перспективность расширения прикладных исследований, нацеленных на использование хитина, хитозана и их производных в различных сферах человеческой деятельности. Основное внимание в обзоре уделено фунгицидной, бактерицидной и антиоксидантной активностям различных производных хитозана. Наличие в молекуле полимера первичной аминогруппы позволяет осуществлять широкий спектр химических модификаций, изменяющих его свойства в различных направлениях с изменением растворимости, заряда, гидрофобности, хелатных, радиопротекторных и других свойств. Крайне важным моментом в расширении использования хитозана и его производных является дальнейшее развитие аналитической базы, создание валидированных методик определения основных физико-химических характеристик и получение разрешительной документации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Muzzarelli, R.A.A. (1987) *Chitin*, Oxford Pergamon Press, 309 p.
2. Ravi Kumar, M.N.V. (2000) A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*, **46**, 1–27.
3. Rinaudo, M. (2006) Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in Polymer Science*, **31**, 603–632.
4. Kumar, M.R., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiva, H., Domb, A.J. (2004) Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chemical Reviews*, **104**, 6017–6084.
5. *Хитозан* (2013) / Под ред. Скрябина К.Г., Михайлова С.Н., Варламова В.П. М.: Изд. Центр «Биоинженерия РАН», 593 с.
6. Wasko, A., Bulak, P., Polak-Berecka, M., Nowak, K., Polakowski, C., Bieganski, A. (2016) The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens*, *International Journal of Biological Macromolecules*, **92**, 316–320.
7. Khayrova, A., Lopatin, S., Varlamov, V. (2019) Black Soldier Fly *Hermetia illucens* as a novel source of chitin and chitosan, *International Journal of Science*, **8**, 81–86.
8. Ehrlich, H., Ilan, M., Maldonado, M., Muricy, G., Bavestrello, G., Kljajic, Z., Carballo, J.L., Shiaparelli, S., Ereskovsky, A., Schupp, P., Born, R., Worch, H., Bazhenov, V.V., Kurek, D., Varlamov, V., Vyalikh, D., Kummer, K., Sivkov, V.V., Molodtsov, S.L., Meissner, H., Richter, G., Steck, E., Richter, W., Hunoldt, S., Kammer, M., Paasch, S., Krasokhin, V., Patzke, G., Brunner, E. (2010) Three dimensional chitin-based scaffolds from *Verongida* sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin, *International Journal of Biological Macromolecules*, **47**, 132–140.

9. Dornish, M., Kaplan, D.S., Arepalli, S.R. (2012) Regulatory status of chitosan and derivatives, *Chitosan-based biopharmaceutical delivery, targeting and polymer therapeutics* / Eds. Sarmiento B., das Neves J., John Wiley & Sons, 463–481.
10. Курек Д. (2013) Современное состояние физико-химических методов определения основных характеристик хитозана и его производных, *Хитозан* / Под ред. Скрыбина К.Г., Михайлова С.Н., Варламова В.П., М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 61–70.
11. Richter, T., Gulich, M., Richter, K. (2012) Quality control and Good Manufacturing Practice (GMP) for chitosan-based biopharmaceutical products, *Chitosan-based biopharmaceutical delivery, targeting and polymer therapeutics* / Eds. Sarmiento B., das Neves J., John Wiley & Sons, 503–542.
12. Chen, R.N., Chen, W.Y., Wang, S.T., Hsu, C.H., Tsai, M.L. (2009) Changes in the Mark-Houwink hydrodynamic volume of chitosan molecules in solutions of different organic acids, at different temperatures and ionic strengths, *Carbohydrate Polymers*, **78**, 902–907.
13. Лопатин С.А. (2010) Проблемы определения молекулярно-массовых характеристик хитозана, *Рыбпром*, **2**, 82–85.
14. Chen, M., Zhu, X., Li, Z., Guo, X., Ling, P. (2010) Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in preparation of chitosan oligosaccharides (COS) with degree of polymerization (DP) 5-12 containing well-distributed acetyl groups, *International Journal of Mass Spectrometry*, **290**, 94–99.
15. dos Santos, Z.M., Caroni, A.L.P.F., Pereira, M.R., da Silva, D.R., Fonseca, J.L.C. (2009) Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis, *Carbohydrate Research*, **344**, 2591–2595.
16. Balázs, N., Sipos, P. (2011) Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, *Carbohydrate Research*, **342**, 124–130.
17. Shigemasa, Y., Matsuura, H., Sashiwa, H., Saimoto, H. (1996) Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin, *International Journal of Biological Macromolecules*, **18**, 237–242.
18. Kasaai, M.R. (2010) Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review, *Carbohydrate Polymers*, **79**, 801–810.
19. Vårum, K.W., Ottøy, M.H., Smidsrød, O. (2001) Acid hydrolysis of chitosan, *Carbohydrate Polymers*, **46**, 89–98.
20. Einbu, A., Grasdalen, H., Vårum, K.W. (2007) Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid, *Carbohydrate Research*, **342**, 1055–1062.
21. Lin, S.-B., Lin, Y.-C., Chen, H.-H. (2009) Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: characterization and antibacterial activity, *Food Chemistry*, **116**, 47–53.
22. Ильина А.В., Загорская Д.С., Левов А.Н., Албулов А.И., Ковачева Н.П., Варламов В.П. (2009) Получение низкомолекулярного хитозана и его производных с использованием ферментного препарата из гепатопанкреаса камчатского краба, *Прикладная биохимия и микробиология*, **45**, 415–421.
23. Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Гильванова Е.А., Кузьмина Л.Ю., Бойко Т.Ф., Сафина В.Р., Мелентьев А.И. (2018) Характеристика хити-

- назы алкалофильного штамма *Bacillus mannanolyticus* IB-OR17 B1, *Прикладная биохимия и микробиология*, **54**, 506–512.
24. Tian, F., Liu, Y., Hu, K., Zhao, B. (2004) Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide, *Carbohydrate Polymers*, **57**, 31–37.
25. Qin, C.Q., Du, Y.M., Xiao, L. (2002) Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan, *Polymer Degradation and Stability*, **76**, 211–218.
26. Vasilieva, T., Lopatin, S., Varlamov, V., Miasnikov, V., Aung Myat Hein, Vasiliev, M. (2016) Hydrolysis of chitin and chitosan in low temperature electron-beam plasma, *Pure and Applied Chemistry*, **88**, 873–879.
27. Рахметова А.А., Богословская О.А., Ольховская И.П., Жигач А.Н., Ильина А.В., Варламов В.П., Глушченко Н.Н. (2016) Ранозаживляющие свойства мягких лекарственных форм с наночастицами меди и низкомолекулярными производными хитозана, *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, **19** (7), 12–18.
28. Ильина А.В., Зубарева А.А., Курек Д.В., Левов А.Н., Варламов В.П. (2012) Наночастицы на основе сукцинилхитозана с доксирубицином: формирование и свойства, *Российские нанотехнологии*, **7** (1–2), 84–80.
29. Rane, K.D., Hoover, D.G. (1993) An evaluation of alkali and acid treatment for chitosan extraction from fungi, *Process Biochemistry*, **28**, 115–118.
30. Shinya, S., Fukamizo, T. (2017) Interaction between chitosan and its related enzymes: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, **104**, 1422–1435.
31. Horst, M.N., Walker, A.N., Klar, E. (1993) The pathway of crustacean chitin synthesis, *The Crustacean Integument: Morphology and Biochemistry* / Eds. Horst M.N., Freeman J.A. CRC: Boca Raton, USA, 113–149.
32. Немцев С.В. (2006) *Комплексная технология хитина и хитозана из панциря ракообразных*, М.: Изд-во ВНИРО, 134 с.
33. Немцев С.В., Зуева О.Ю., Хисматуллин М.Р., Албулов А.И., Варламов В.П. (2004) Получение хитина и хитозана из медоносных пчёл, *Прикладная биохимия и микробиология*, **40**, 46–50.
34. Tereshina, V.M., Memorskaya, A.S., Feofilova, E.P., Nemtsev, D.V., Kozlov, V.M. (1997) Isolation of polysaccharide complexes from mycelial fungi and determination of their deacetylation degree, *Microbiology (Moscow)*, **66**, 84–89.
35. Ruiz-Herrera, J., Gonzalez-Prieto, J.M., Ruiz-Medrano, R. (2002) Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi, *FEMS Yeast Research*, **1**, 247–256.
36. Tsigos, I., Nathalie, Z., Aggeliki, M., Alain, D., Bouriotis, V. (1999) Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides, *European Journal of Biochemistry*, **261**, 1–9.
37. Фефилова Е.П. (2002) Ключевая роль хитина в образовании клеточной стенки грибов, *Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение* / Под ред. Скрябина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П., М.: Наука, 79–99.
38. Фефилова Е.П. (2002) Хитин грибов: распространение, биосинтез, физико-химические свойства и перспектива использования, *Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение* / Под ред. Скрябина К.Г., Вихоревой Г.А., Варламова В.П., М.: Наука, 100–111.

39. Mysyakina, I.S., Bokareva, D.A., Usov, A.I., Feofilova, E.P. (2012) Differences in the carbohydrate composition between the yeastlike and mycelial cells of *Mucor hiemalis*, *Microbiology (Moscow)*, **81**, 405–408.
40. Karimi, K., Zamani, A. (2013) *Mucor indicus*: biology and industrial application perspectives: a review, *Biotechnology Advances*, **31**, 466–481.
41. Gaill, F., Persson, J., Sugiyama, P., Vuong, R., Chanzy, H. (1992) The chitin system in the tubes of deep sea hydrothermal vent worms, *Journal of Structural Biology*, **109**, 116–128.
42. Безродных Е.А., Тихонов В.Е., Lopez-Llorca L.V. (2010) Выделение хитина из отходов морепродуктов и получение из него хитозана, *Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов*, **2**, 9–12.
43. Morozov, A.A., Likhoshway, Ye.V. (2016) Evolutionary history of the chitin synthases of eukaryotes, *Glycobiology*, **26**, 635–639.
44. Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N. (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 11086–11091.
45. Knogge, W., Scheel, D. (2006) LysM receptors recognize friend and foe, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 10829–10830.
46. Lenardon, M.D., Munro, C.A., Gow, N.A. (2010) Chitin synthesis and fungal pathogenesis, *Current Opinion in Microbiology*, **13**, 416–423.
47. Sánchez-Vallet, A., Mesters, J.R., Thomma, B.P.H.J. (2014) The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions, *FEMS Microbiology Reviews*, **39**, 171–183.
48. Latgé, J.P. (2010) Tasting the fungal cell wall, *Cellular Microbiology*, **12**, 863–872.
49. Levin, D.E. (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway, *Genetics*, **189**, 1145–1175.
50. Teparić, R., Mrša, V. (2013) Proteins involved in building, maintaining and remodeling of yeast cell walls, *Current Genetics*, **59**, 171–185.
51. Langner, T., Göhre, V. (2016) Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions, *Current Genetics*, **62**, 243–254.
52. Bowman, S.M., Free, S.J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall, *BioEssays*, **28**, 799–808.
53. Roncero, C. (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi, *Current Genetics*, **41**, 367–378.
54. Ichinomiya, M., Yamada, E., Yamashita, S., Ohta, A., Horiuchi, H. (2005) Class I and class II chitin synthases are involved in septum formation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, *Eukaryotic Cell*, **4**, 1125–1136.
55. Silverman, S.J., Sburlati, A., Slater, M.L., Cabib, E. (1988) Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 4735–4739.
56. Kim, J.E., Lee, H.J., Lee, J., Kim, K.W., Yun, S.H., Shim, W.B., Lee, Y.W. (2009) *Gibberella zeae* chitin synthase genes, GzCHS5 and GzCHS7, are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenicity, *Current Genetics*, **55**, 449–459.
57. Weber, I., Assmann, D., Thines, E., Steinberg, G. (2006) Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection

- in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*, *Plant Cell*, **8**, 225–242.
58. Treitschke, S., Doehleemann, G., Schuster, M., Steinberg, G. (2010) The myosin motor domain of fungal chitin synthase V is dispensable for vesicle motility but required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*, *Plant Cell*, **22**, 2476–2494.
59. Cui, Z., Wang, Y., Lei, N., Wang, K., Zhu, T. (2013) *Botrytis cinerea* chitin synthase BcChsVI is required for normal growth and pathogenicity, *Current Genetics*, **59**, 119–128.
60. Durán, A., Bowers, B., Cabib, E. (1975) Chitin synthetase zymogen is attached to the yeast plasma membrane, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**, 3952–3955.
61. Bowen, A.R., Chen-Wu, J.L., Momany, M., Young, R., Szanislo, P.J., Robbins, P.W. (1992) Classification of fungal chitin synthases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 519–523.
62. Valdivia, R.H., Schekman, R. (2003) The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 10287–10292.
63. Starr, T.L., Pagant, S., Wang, C.W., Schekman, R. (2012) Sorting signals that mediate traffic of chitin synthase III between the TGN/endosomes and to the plasma membrane in yeast, *PLoS One*, **7**, e46386.
64. Cabib, E., Blanco, N., Grau, C., Rodriguez-Pena, J.M., Arroyo, J. (2007) Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to  $\beta(1-6)$ glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, *Molecular Microbiology*, **63**, 921–935.
65. Cabib, E., Arroyo, J. (2013) How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall, *Nature Reviews Microbiology*, **11**, 648–655.
66. Zakariassen, H., Hansen, M.C., Joranli, M., Eijsink, V.G., Sorlie, M. (2011) Mutational effects on transglycosylating activity of family 18 chitinases and construction of a hypertransglycosylating mutant, *Biochemistry*, **50**, 5693–5703.
67. Hartl, L., Zach, S., Seidl-Seiboth, V. (2012) Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **93**, 533–543.
68. Chitnis, M.V., Munro, C.A., Brown, A.J., Gooday, G.W., Gow, N.A., Deshpande, M.V. (2002) The zygomycetous fungus, *Benjaminiella poitrassii* contains a large family of differentially regulated chitin synthase genes, *Fungal Genetics and Biology*, **36**, 215–223.
69. López-Matas, M.A., Eslava, A.P., Díaz-Minguez, J.M. (2000) *Mechs1*, a member of a chitin synthase gene family in *Mucor circinelloides*, is differentially expressed during dimorphism, *Current Microbiology*, **40**, 169–175.
70. Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. (2013) Ферменты деградации хитина и хитозана, *Хитозан* / Под ред. К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова, М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 71–114.
71. Kielak, A.M., Cretoiu, M.S., Semenov, A.V., Sørensen, S.J., van Elsas, J.D. (2013) Bacterial chitinolytic communities respond to chitin and pH alteration in soil, *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 263–272.
72. Bai, Y., Eijsink, V.G., Kielak, A.M., van Veen, J.A., de Boer, W. (2016) Genomic comparison of chitinolytic enzyme systems from terrestrial and

- aquatic bacteria, *Environmental Microbiology*, **18**, 38–49.
73. Sanfilippo, C., Malaguarnera, L., Di Rosa, M. (2016) Chitinase expression in Alzheimer's disease and non-demented brains regions, *Journal of the Neurological Sciences*, **369**, 242–249.
  74. Nguyen, S.T.C., Freund, H.L., Kasanjian, J., Berlemont, R. (2018) Function, distribution, and annotation of characterized cellulases, xylanases, and chitinases from CAZy, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 1629–1637.
  75. Oyeleye, A., Normi, Y.M. (2018) Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications, *Bioscience Reports*, **38**, Article BSR2018032300.
  76. Tamadoni Jahromi, S., Barzkar, N. (2018) Marine bacterial chitinase as sources of energy, eco-friendly agent, and industrial biocatalyst, *International Journal of Biological Macromolecules*, **120**, Pt. B, 2147–2154.
  77. Lacombe-Harvey, M.-E., Brzezinski, R., Beaulieu, C. (2018) Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 7219–7230.
  78. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013, *Nucleic Acids Research*, **42** (Database issue), D490–D495.
  79. Howard, M., Ekborg, N.A., Weiner, R.M., Hutcheson, S.W. (2003) Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes: a review, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**, 627–635.
  80. Manucharova, N.A., Trosheva, E.V., Kol'tsova, E.M., Demkina, E.V., El'-Registan, G.I., Karaevskaya, E.V., Rivkina, E.M., Mardanov, A.V. (2016) Characterization of the structure of the prokaryotic complex of antarctic permafrost by molecular genetic techniques, *Microbiology (Moscow)*, **85**, 102–108.
  81. Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Sukhacheva, M.V., Mardanov, A.V., Ravin, N.V. (2012) Bacterial chitin utilization at extremely haloalkaline conditions, *Extremophiles*, **16**, 883–894.
  82. Sorokin, D.Y., Gumerov, V.M., Rakitin, A.L., Beletsky, A.V., Damsté, J.S.S., Muyzer, G., Mardanov, A.V., Ravin, N.V. (2014) Genome analysis of *Chitinivibrio alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., a novel extremely haloalkaliphilic anaerobic chitinolytic bacterium from the candidate phylum Termite Group 3, *Environmental Microbiology*, **16**, 1549–1565.
  83. Sorokin, D.Y., Rakitin, A.L., Gumerov, V.M., Beletsky, A.V., Sinninghe Damsté, J.S., Mardanov, A.V., Ravin, N.V. (2016) Phenotypic and genomic properties of *Chitinispirillum alkaliphilum* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic anaerobic chitinolytic bacterium representing a novel class in the phylum *Fibrobacteres*, *Frontiers in Microbiology*, **7**, 407. doi: 10.3389/fmicb.2016.00407
  84. Sorokin, D.Y., Elcheninov, A.G., Toshchakov, S.V., Bale, N.J., Sinninghe Damsté, J.S., Khijniak, T.V., Kublanov, I.V. (2019) *Natrarchaeobius chitinivorans* gen. nov., sp. nov., and *Natrarchaeobius halalkaliphilus* sp. nov., alkaliphilic, chitin-utilizing haloarchaea from hypersaline alkaline lakes, *Systematic and Applied Microbiology*, pii: S0723-2020(18)30438-7. doi: 10.1016/j.syapm.2019.01.001. [Epub ahead of print].
  85. Tran, D.M., Sugimoto, H., Nguyen, D.A., Watanabe, T., Suzuki, K. (2018) Identification and characterization of chitinolytic bacteria isolated from a freshwater lake, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **82**, 343–355.

86. Staley, J.T., Fuerst, J.A., Giovannoni, S., Schlesner, H. (1992) The Order *Planctomycetales* and the Genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata*, and *Isosphaera*, *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* / Eds. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. New York, NY: Springer, 3710–3731.
87. Ravin, N.V., Rakitin, A.L., Ivanova, A.A., Beletsky, A.V., Kulichevskaya, I.S., Mardanov, A.V., Dedysh, S.N. (2018) Genome analysis of *Fimbrigiobus ruber* SP5<sup>T</sup>, a planctomycete with confirmed chitinolytic capability, *Applied and Environmental Microbiology*, **84**, Article e02645-17.
88. Куличевская И.С., Наумов Д.Г., Иванова А.А., Ракитин А.Л., Дедыш С.Н. (2019) Выявление хитинолитического потенциала у пресноводного планктомицета *Planctomicrobium piriforme*, *Микробиология*, **88**, 426–437.
89. Belova, S.E., Ravin, N.V., Pankratov, T.A., Rakitin, A.L., Ivanova, A.A., Beletsky, A.V., Mardanov, A.V., Sinnighe Damsté, J.S., Dedysh, S.N. (2018) Hydrolytic capabilities as a key to environmental success: chitinolytic and cellulolytic *Acidobacteria* from acidic Sub-arctic soils and boreal peatlands, *Frontiers in Microbiology*, **9**, 2775.
90. Reintjes, G., Arnosti, C., Fuchs, B.M., Amann, R. (2017) An alternative polysaccharide uptake mechanism of marine bacteria, *The ISME Journal*, **11**, 1640–1650.
91. Boedeker, C., Schüler, M., Reintjes, G., Jeske, O., van Teeseling, M.C.F., Jogler, M., Rast, P., Borchert, D., Devos, D.P., Kucklick, M., Schaffer, M., Kolter, R., van Niftrik, L., Engelman, S., Amann, R., Rohde, M., Engelhardt, H., Jogler, C. (2017) Determining the bacterial cell biology of *Planctomycetes*, *Nature Communications*, **8**, Article 14853.
92. Kumar, M.R., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A.J. (2004) Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chemical Reviews*, **104**, 6017–6084.
93. Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, J. (2009) Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, *Food Chemistry*, **114**, 1173–1182.
94. Goy, R.C., de Britto, D., Assis, O.B.G. (2009) A review of the antimicrobial activity of chitosan, *Polimeros*, **19**, 241–247.
95. Kuprina, E., Kirillov, A.I., Ishevski, A.L., Murashev, S.V. (2015) Food supplement based on chitin with enhanced lipid-lowering and sorption properties, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, **XX**, 156–161.
96. Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М., Борисова Е.А., Колесников Л.Е., Тютерев С.Л. (2017) Биологическая активность хитозана с разной молекулярной массой, *Вестник защиты растений*, **3 (93)**, 28–33.
97. Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Лопатин С.А., Карташов М.И., Арсланова Л.Р., Джавахия В.Г., Варламов В.П. (2018) Изучение защитного действия гидролизата хитозана против септориоза пшеницы и альтернариоза табака, *Прикладная биохимия и микробиология*, **54**, 68–73.
98. Варламов В.П., Мысякина И.С. (2018) Хитозан в биологии, микробиологии, медицине и сельском хозяйстве, *Микробиология*, **87**, 595–598.
99. Roberts, G.A. (2008) Thirty years of progress in chitin and chitosan, *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, **XIII**, 7–15.

100. Tan, W., Li, Q., Dong, F., Wei, L., Guo, Z. (2016) Synthesis, characterization, and antifungal property of chitosan ammonium salts with halogens, *International Journal of Biological Macromolecules*, **92**, 293–298.
101. Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology, *Molecular Plant Pathology*, **13**, 414–430.
102. Badawy, M.E.I., Rabea, E.I., Ismail, R.I.A. (2015) Antimicrobial activity of different molecular weight chitosans produced from shrimp shells against different plant pathogens, *Current Bioactive Compounds*, **11**, 264–273.
103. Gooday, G.W. (1990) The ecology of chitin degradation, *Advances in Microbial Ecology*, **11**, 387–419.
104. Sathiyabama, M., Parthasarathy, R. (2016) Biological preparation of chitosan nanoparticles and its *in vitro* antifungal efficacy against some phytopathogenic fungi, *Carbohydrate Polymers*, **151**, 321–325.
105. Malerba, M., Cerana, R. (2018) Recent advances of chitosan applications in plants, *Polymers*, **10**, 118. doi: 10.3390/polym10020118
106. Sun, C., Fu, D., Jin, L., Chen, M., Zheng, X., Yu, T. (2018) Chitin isolated from yeast cell wall induces the resistance of tomato fruit to *Botrytis cinerea*, *Carbohydrate Polymers*, **199**, 341–352.
107. Xing, K., Xing, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Shen, X., Li, X., Miao, X., Feng, Z., Peng, X., Qin, S. (2018) Fungicidal effect of chitosan via inducing membrane disturbance against *Ceratocystis fimbriata*, *Carbohydrate Polymers*, **192**, 95–103.
108. Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., Li, P. (2007) Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan, *Carbohydrate Research*, **342**, 1329–1332.
109. Badawy M.E.I., Rabea E.I. (2009) Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit, *Postharvest Biology and Technology*, **51**, 110–117.
110. Silva, Júnior S., Stamford, N.P., Lima, M.A.B., Arnaud, T.M.S., Pintado, M.M., Sarmiento, B.F. (2014) Characterization and inhibitory activity of chitosan on hyphae growth and morphology of *Botrytis cinerea* plant pathogen, *International Journal of Applied Research in Natural Products*, **7**, 31–38.
111. Yoonkyung, P., Kim, M.-H., Park, S.-C., Cheong, H., Jang, M.-K., Nah, J.-W., Hahm, K.-S. (2008) Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, 1729–1734.
112. Xu, J., Zhao, X., Han, X., Du, Y. (2007) Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **87**, 220–228.
113. Rahman, M.H., Hjeljord, L.G., Aam, B.B., Sorlie, M., Tronsmo, A. (2015) Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization, *European Journal of Plant Pathology*, **141**, 147–158.
114. Heggset, E.B., Dybvik, A.I., Hoell, I.A., Norberg, A.L., Sørli, M., Eijsink, V.G.H., Vårum, K.M. (2010) Degradation of chitosans with a family 46 chitosanase from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Bio-macromolecules*, **11**, 2487–2497.

115. Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. (2009) Functional characterization of chitin and chitosan, *Current Chemical Biology*, **3**, 203–230.
116. Badawy, M.E.I. (2010) Structure and antimicrobial activity relationship of quaternary N-alkyl chitosan derivatives against some plant pathogens, *Journal of Applied Polymer Science*, **117**, 960–969.
117. Falcón, A.B., Cabrera, J.C., Costales, D., Ramírez, M.A., Cabrera, G., Toledo, V., Martínez-Téllez, M.A. (2008) The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**, 103–112.
118. Allan, C.R., Hadwiger, L.A. (1979) The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition, *Experimental Mycology*, **3**, 285–287.
119. Choi, B.-K., Kim, K.-Y., Yoo, Y.-J., Oh, S.-J., Choi, J.-H., Kim, C.-Y., (2001) *In vitro* antimicrobial activity of a chitoooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **18**, 553–557.
120. Verlee, A., Mincke, S., Stevens, C.V. (2017) Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives, *Carbohydrate Polymers*, **164**, 268–283.
121. Peng, Y., Han, B., Liu, W., Xu, X. (2005) Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan, *Carbohydrate Research*, **340**, 1846–1851.
122. Карпова Н.В., Шагдарова Б.Ц., Ляпина Т.С., Ильина А.В., Терешина В.М., Варламов В.П. (2019) Влияние основных характеристик низкомолекулярного хитозана на рост фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea*, *Прикладная биохимия и микробиология*, **55**, 386–395.
123. Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П. (2006) Влияние молекулярной массы хитозана на его противовирусную активность в растениях, *Прикладная биохимия и микробиология*, **42**, 224–228.
124. Park, Y., Kim, M.-H., Park, S.-C., Cheong, H., Jang, M.-K., Nah, J.-W., Hahm, K.-S. (2008) Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, 1729–1734.
125. Shagdarova, B., Lunkov, A., Il'ina, A., Varlamov, V. (2019) Investigation of the properties of N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chloride chitosan derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules*, **124**, 994–1001.
126. Луньков А.П., Ильина А.В., Варламов В.П. (2018) Антиоксидантные, антибактериальные и фунгицидные свойства пленок на основе хитозана (обзор), *Прикладная биохимия и микробиология*, **54**, 444–454.
127. Guo, Z.Y., Chen, R., Xing, R.E., Liu, S., Yu, H.H., Wang, P.B., Li, C.P. (2006) Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*, *Carbohydrate Research*, **341**, 351–354.
128. Guo, Z., Ren, J., Dong, F., Wang, G., Li, P. (2012) Comparative study of the influence of active groups of chitosan derivatives on antifungal activity, *Journal of Applied Polymer Science*, **127**, 2553–2556.
129. Jasso de Rodriguez, D., Hernandez-Castillo, D., Rodriguez-Garcia, R., Angulo-Sanchez, J. L. (2005) Antifungal activity *in vitro* of

- Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi, *Industrial Crops and Products*, **21**, 81–87.
130. Badawy, M.E.I., Rabea, E.I., Taktak, N.E.M. (2014) Antimicrobial and inhibitory enzyme activity of N-(benzyl) and quaternary N-(benzyl) chitosan derivatives on plant pathogens, *Carbohydrate Polymers*, **111**, 670–682.
  131. Ghaouth, El., Arul, A., Grenier, J., Asselin, A. (1992). Antifungal activity of chitosan on two post-harvest pathogens of strawberry fruits, *Phytopathology*, **82**, 398–402.
  132. Wei, L., Mi, Y., Zhang, J., Li, Q., Dong, F., Guo, Z. (2019) Evaluation of quaternary ammonium chitosan derivatives differing in the length of alkyl side-chain: Synthesis and antifungal activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, **129**, 1127–1132.
  133. Zhang, J., Tan, W., Zhang, Z., Song, Y., Li, Q., Dong, F., Guo, Z. (2018) Synthesis, characterization, and the antifungal activity of chitosan derivatives containing urea groups, *International Journal of Biological Macromolecules*, **109**, 1061–1067.
  134. Gunasekaran, N., Vadivel, V., Halcovitch, N. R., Tiekink, E.R.T. (2017) Preparation, characterization and *in vitro* antioxidant and cytotoxicity studies of some 2,4-dichloro-N-[di(alkyl/aryl)carbamothioyl] benzamide derivatives, *Chemical Data Collections*, **9–10**, 263–276.
  135. Zheng, Q.-Z., Cheng, X.-M. Zhang, K.X.-M., Liu, K., Jiao, Q.-C., Zhu, H.-L. (2010) Synthesis of some N-alkyl substituted urea derivatives as antibacterial and antifungal agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 3207–3212.
  136. Li, Q., Ren, J., Dong, F., Feng, Y., Gu, G., Guo, Z. (2013) Synthesis and antifungal activity of thiadiazole-functionalized chitosan derivatives, *Carbohydrate Research*, **373**, 103–107.
  137. Qin, Y., Liu, S., Xing, R., Yu, H., Li, K., Meng, X., Li, R., Li, P. (2012) Synthesis and characterization of dithiocarbamate chitosan derivatives with enhanced antifungal activity, *Carbohydrate Polymers*, **89**, 388–393.
  138. Li, R.C., Guo, Z.Y., Jiang, P.A. (2010) Synthesis, characterization, and antifungal activity of novel quaternary chitosan derivatives, *Carbohydrate Research*, **345**, 1896–1900.
  139. Yang, G., Jin, Q., Xu, C., Fan, S., Wang, C., Xie, P. (2018) Synthesis, characterization and antifungal activity of coumarin-functionalized chitosan derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules*, **106**, 179–184.
  140. Hernandez-Lauzardo, A.N., Bautista-Banos, S., Velazquez-del Valle, M.G., Mendez-Montealvo, M.G., Sanchez-Rivera, M.M., Bello-Perez, L.A. (2008) Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill, *Carbohydrate Polymers*, **73**, 541–547.
  141. Jia, R., Duan, Y., Fang, Q., Wang, X., Huang, J. (2016) Pyridine-grafted chitosan derivative as an antifungal agent, *Food Chemistry*, **196**, 381–387.
  142. Qiu, M., Wu, C., Ren, G., Liang, X., Wang, X., Huang, J. (2014) Effect of chitosan and its derivatives as antifungal and preservative agents on postharvest green asparagus, *Food Chemistry*, **155**, 105–111.
  143. Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., Li, P. (2007) The influence of the cationic of quaternized chitosan on antifungal

- activity, *International Journal of Food Microbiology*, **118**, 214–217.
144. Mellegård, H., Strand, S.P., Christensen, B.E., Granum, P.E., Hardy, S.P. (2011) Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism, *International Journal of Food Microbiology*, **148**, 48–54.
145. Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., Nasri, M. (2014) Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities, *International Journal of Food Microbiology*, **185**, 57–63.
146. Chang, S.-H., Lin, H.-T.V., Wu, G.-J., Tsai, G.J. (2015) pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan, *Carbohydrate Polymers*, **134**, 74–81.
147. Хасанова Л.М., Ильина А.В., Варламов В.П., Сеницына О.А., Сеницын А.П. (2014) Деполимеризация хитозана с использованием ферментного комплекса, продуцируемого *Myceliophthora* sp., *Прикладная биохимия и микробиология*, **50**, 422–428.
148. Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Варламов В.П. (2016) Антибактериальная активность алкилированных и ацилированных производных низкомолекулярного хитозана, *Прикладная биохимия и микробиология*, **52**, 237–241.
149. Vasil'eva, T.M., Lopatin, S.A., Varlamov, V.P. (2016) Production of the low molecular-weight chitin and chitosan forms in electron-beam plasma, *High Energy Chemistry*, **50**, 150–154.
150. Mourya, V.K., Inamdar, N.N., Tiwari, A. (2010) Carboxymethyl chitosan and its applications, *Advanced Materials Letters*, **1**, 11–33.
151. Bashir, S. Teo, Y.Y., Ramesh, S., Ramesh, K., Khan, A.A. (2015) N-Succinyl chitosan preparation, characterization, properties and biomedical applications: a state of the art review, *Reviews in Chemical Engineering*, **31**, 563–597.
152. Zhang, K., Weltrowski, A., Peschel, D., Fischer, S., Groth, T. (2012) Synthesis and characterization of biologically active chitosan sulfates, *ACS Symposium Series*, **1107**, 297–314.
153. Ильина А.В., Куликов С.Н., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Варламов В.П. (2008), Получение и исследование моносахаридных производных низкомолекулярного хитозана, *Прикладная биохимия и микробиология*, **44**, 606–614.
154. Han, B., Wei, Y., Jia, X., Xu, J., Li, G. (2012) Correlation of the structure, properties, and antimicrobial activity of a soluble thiolated chitosan derivative, *Journal of Applied Polymer Science*, **125** (S2), E143–E148.
155. Domard, A., Rinaudo, M., Terrassin, C. (1986) New method for the quaternization of chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, **8**, 105–107.
156. Lim, S., Hudson, S. (2004) Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group, *Carbohydrate Research*, **339**, 313–319.
157. Wu, M., Long, Z., Xiao, H., Dong, C. (2016) Recent research progress on preparation and application of N,N,N-trimethyl chitosan, *Carbohydrate Research*, **434**, 27–32.
158. Rúnarsson, Ö.V., Holappa, J., Nevalainen, T., Hjalmsdóttir, M., Järvinen, T., Loftsson, T., Einarsson, J.M., Jónsdóttir, S., Valdimarsdóttir, M., Mátsson, M. (2007) Antibacterial activity of methylated chitosan and chitoooligomer deri-

- vatives: Synthesis and structure activity relationships, *European Polymer Journal*, **43**, 2660–2671.
159. Gruškiene, R., Deveikyte, R., Makuška, R. (2013) Quaternization of chitosan and partial destruction of the quaternized derivatives making them suitable for electrospinning, *Chemija*, **24**, 325–334.
  160. Sajomsang, W., Gonil, P., Saesoo, S. (2009) Synthesis and antibacterial activity of methylated N-(4-N,N-dimethylaminocinnamyl) chitosan chloride, *European Polymer Journal*, **45**, 2319–2328.
  161. Sajomsang, W., Tantayanon, S., Tangpasuthadol, V., Daly, W.H. (2009) Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: synthesis, characterization, and antibacterial activity, *Carbohydrate Research*, **344**, 2502–2511.
  162. Xu, T., Xin, M., Li, M., Huang, H., Zhou, S., Liu, J. (2011) Synthesis, characterization, and antibacterial activity of N,O-quaternary ammonium chitosan, *Carbohydrate Research*, **346**, 2445–2450.
  163. Xie, Y., Liu, X., Chen, Q. (2007) Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity, *Carbohydrate Polymers*, **69**, 142–147.
  164. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. (2010) Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review, *International Journal of Food Microbiology*, **144**, 51–63.
  165. Eaton, P., Fernandes, J.C., Pereira, E., Pintado, M.E., Xavier Malcata, F. (2008) Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Ultramicroscopy*, **108**, 1128–1134.
  166. Jarmila, V., Vavříková, E. (2011) Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities – a review, *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 3596–3607.
  167. Jiang, Q. (2014) Natural forms of vitamin E: Metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy, *Free Radical Biology and Medicine*, **72**, 76–90.
  168. Murphy, M.P., Holmgren, A., Larsson, N.G., Halliwell, B., Chang, C.J., Kalyanaraman, B., Rhee, S.G., Thornalley, P.J., Partridge, L., Gems, D., Nyström, T., Belousov, V., Schumacker, P.T., Winterbourn, C.C. (2011) Unraveling the biological roles of reactive oxygen species, *Cell Metabolism*, **13**, 361–366.
  169. Anraku, M., Gebicki, J.M., Iohara, D., Tomida, H., Uekama, K., Maruyama, T., Hirayama, F., Otagiri, M. (2018) Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in *in vitro* and *in vivo* studies, *Carbohydrate Polymers*, **199**, 141–149.
  170. Anraku, M., Fujii, T., Furutani, N., Kadowaki, D., Maruyama, T., Otagiri, M., Gebicki, J.M., Tomida, H. (2009) Antioxidant effects of a dietary supplement: Reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan, *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 104–109.
  171. Chang, S.H., Wu, C.H., Tsai, G.J. (2018) Effects of chitosan molecular weight on its antioxidant and antimutagenic properties, *Carbohydrate Polymers*, **181**, 1026–1032.
  172. Tomida, H., Fujii, T., Furutani, N., Michihara, A., Yasufuku, T., Akasaki, K., Maruyama, T., Otagiri, M., Gebicki, J.M., Anraku, M. (2009) Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans, *Carbohydrate Research*, **344**, 1690–1696.
  173. Zou, P., Yang, X., Wang, J., Li, Y., Yu, H., Zhang, Y., Liu, G. (2016)

- Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides, *Food Chemistry*, **190**, 1174–1181.
174. Xia, W., Liu, P., Zhang, J., Chen, J. (2011) Biological activities of chitosan and chito-oligosaccharides, *Food Hydrocolloids*, **25**, 170–179.
175. Liu, H.T., Li, W.M., Xu, G., Li, X.Y., Bai, X.F., Wei, P., Yu, C., Du, Y.G. (2009) Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells, *Pharmacological Research*, **59**, 167–175.
176. Li, K., Xing, R., Liu, S., Li, R., Qin, Y., Meng, X., Li, P. (2012) Separation of chito-oligomers with several degrees of polymerization and study of their antioxidant activity, *Carbohydrate Polymers*, **88**, 896–903.
177. Subhapradha, N., Saravanan, R., Ramasamy, P., Srinivasan, A., Shanmugam, V., Shanmugam, A. (2014) Hepatoprotective effect of  $\beta$ -chitosan from gladius of *Sepioteuthis lessoniana* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in wistar rats, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **172**, 9–20.
178. Rajapakse, N., Kim, M.M., Mendis, E., Kim, S.K. (2007) Inhibition of free radical-mediated oxidation of cellular biomolecules by carboxylated chito-oligosaccharides, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 997–1003.
179. Zhang, X., Geng, X., Jiang, H., Li, J., Huang, J. (2012) Synthesis and characteristics of chitin and chitosan with the (2-hydroxy-3-trimethylammonium)propyl functionality, and evaluation of their antioxidant activity *in vitro*, *Carbohydrate Polymers*, **89**, 486–491.
180. Hu, Q., Luo, Y. (2016) Polyphenol-chitosan conjugates: Synthesis, characterization, and applications, *Carbohydrate Polymers*, **151**, 624–639.
181. Pasanphan, W., Chirachanchai, S. (2008) Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant, *Carbohydrate Polymers*, **72**, 169–177.
182. Ngo, D.N.H., Qian, Z.J., Ngo, D.N.H., Vo, T.S., Wijesekara, I., Kim, S.K. (2011) Gallyl chito-oligosaccharides inhibit intracellular free radical-mediated oxidation, *Food Chemistry*, **128**, 974–981.
183. Eom, T.K., Senevirathne, M., Kim, S.K. (2012) Synthesis of phenolic acid conjugated chito-oligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **34**, 519–527.
184. Aytakin, A.O., Morimura, S., Kida, K. (2011) Synthesis of chitosan-caffeic acid derivatives and evaluation of their antioxidant activities, *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 212–216.
185. Woranuch, S., Yoksan, R. (2013) Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan, *Carbohydrate Polymers*, **96**, 495–502.
186. Ngo, D.H., Qian, Z.J., Vo, T.S., Ryu, B., Ngo, D.N., Kim, S.K. (2011) Antioxidant activity of gallate-chito-oligosaccharides in mouse macrophage RAW264.7 cells, *Carbohydrate Polymers*, **84**, 1282–1288.
187. Abdel-Wahhab, M.A., Aljawish, A., Kenawy, A.M., El-Nekeety, A.A., Hamed, H.S., Abdel-Aziem, S.H. (2016) Grafting of gallic acid onto chitosan nano particles enhances antioxidant activities *in vitro* and

- 
- protects against ochratoxin A toxicity in catfish (*Clarias gariepinus*), *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **41**, 279–288.
188. Liu, J., Lu, J.-F., Kan, J., Tang, Y.-Q., Jin C.-H. (2013) Preparation, characterization and antioxidant activity of phenolic acids grafted carboxymethyl chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, **62**, 85–93.