

УДК 547.995.12 + 632.952 + 582.28

ЗАВИСИМОСТЬ ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ХИТОЗАНА ОТ ЕГО МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА

Е.А. Степнова¹, В.Е. Тихонов¹, С.А. Лопатин², В.П. Варламов², И.А. Ямсков¹¹Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН;²Центр «Биоинженерии» РАН; e-mail: stepnova113@mail.ru)

В работе описан метод получения серии низкомолекулярных хитозанов и результаты их биологического тестирования на некоторых фитопатогенных грибах.

Наиболее распространенным среди природных полисахаридов является аминополисахарид хитин, придающий опору экзоскелету ракообразных и насекомых, клеточной стенке грибов и других организмов [1]. Частично или полностью дезацетилированный хитин (поли- β -(1 \rightarrow 4)-2-амино-2-дезоксид- D -глюкан) носит название хитозан (рис. 1).

Хитозаны низкого молекулярного веса (НМХ) с высокой растворимостью и низкой вязкостью водных растворов при физиологическом рН обладают биологической активностью, которая зависит от степени ацетилирования хитозана, распределения глюкозаминных фрагментов по цепи молекулы хитозана и др. Условия получения НМХ также влияют на результаты его активности, поскольку метод получения НМХ (ферментативным или химическим гидролизом) определяет химическую структуру восстанавливающего конца полисахаридной цепи хитозана.

В настоящем исследовании серия низкомолекулярных хитозанов была получена из ряда хитиносодержащих биоисточников: креветок (*Pandalus borealis*), кальмара (*Loligo vulgaris*), каракатицы (*Sepia officinalis*), съедобных моллюсков (*Cerastoderma edule*) и речного рака (*Actacus leptodactylus*) методом контролируемого кислотного гидролиза высокомолекулярного хитозана.

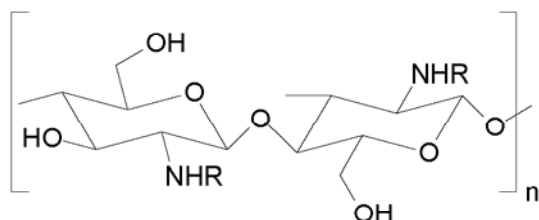


Рис. 1. Строение хитина (R=Ac) и хитозана (R=H)

На первом этапе из указанных выше природных источников был получен хитин. Способ получения хитина включает химические реакции, проходящие гетерогенно между твердой и жидкой фазами. При этом критическим моментом является размер частиц [2]. В данной работе используемые биоотходы были предварительно измельчены до размера частиц от 1 до 3 мм, а затем подвергнуты щелочному депротенированию 0,5 М раствором гидроксида натрия при 80°C в течение 2 ч. По окончании процесса щелочного депротенирования отделяли супернатант и полностью промывали частицы депротенированного хитина так, чтобы значение рН промывных вод стало равным 7,0.

Для деминерализации хитина мы использовали 0,5 М соляную кислоту, которую вводили порциями в перемешиваемую водно-хитиновую смесь до полного прекращения выделения углекислого газа, а затем оставляли на 1–2 ч. Для снижения пенообразования добавляли незначительные количества бутилового спирта.

Дезацетилирование хитина проводили 50%NaOH при 90°C в течение 3 ч. Полученный хитозан промывали водой и высушивали на воздухе. Результаты наших экспериментов (таблица) показали, что для получения хитозана в промышленных масштабах нецелесообразно использовать моллюски, так как выход хитозана при использовании этого источника невелик из-за высокого содержания в нем карбоната кальция.

Высокомолекулярный хитозан (ВМХ), выделенный из различных источников, был использован далее для получения низкомолекулярного хитозана (НМХ). Гидролиз ВМХ и его производных осуществляли соляной кислотой различной концентрации*. Полученные нами

* Отходы соляной кислоты в этой операции могут быть использованы для деминерализации хитиносодержащих отходов и нейтрализации щелочи, используемой для дезацетилирования хитина, что позволяет снизить загрязнение стоков кислотными и щелочными отходами.

Расход сырья, требуемый для получения 1 кг хитозана

Номер образца	Сырьевой источник	Требуемое количество сырья, (кг) для получения 1 кг хитозана
1	креветки: цельные	90–110
2	креветки: отходы	50–70
3	кальмар: гладиус	4–5
4	сепион каракатицы	80–85
6	моллюск	1600
7	речной рак	80–100

образцы НМХ анализировали методом ГПХ для определения их молекулярной массы (M_w) и индекса полидисперсности. Индекс полидисперсности полученных образцов находился в пределах 1,4–2,2.

Далее нами было проведено исследование ингибирующей активности полученных хитозанов на рост грибов *Penicillium vermaesseni*. При сравнении активности 0,1% растворов ряда низкомолекулярных хитозанов при значениях M_w от 4,1 до 90 кДа по отношению к *Penicillium vermaesseni* было продемонстрировано, что наибольшей активностью обладают хитозаны с молекулярной массой от 4 до 10 кДа (рис. 2).

Эффект ингибирования роста при применении 0,1% раствора хитозана с молекулярной массой 7,57 кДа наблюдали также по отношению к таким низшим грибам-патогенам растений, как *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium daliae*, *Pythium ultimum* (рис. 3).

Таким образом, нами получена серия низкомолекулярных хитозанов, для некоторых из них была проде-

монстрирована весьма высокая ингибирующая активность на рост некоторых грибов, в том числе и фитопатогенных.

Экспериментальная часть

Молекулярную массу хитозана определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Средневесовую молекулярную массу (M_w), среднечисловую молекулярную массу (M_n) и значения полидисперсности (M_w/M_n) полученных низкомолекулярных хитозанов определяли при температуре 30°C с использованием колонки “*Ultra-hydrogel 500*” (“*Waters*”, США) в системе 0,05 М уксусная кислота–0,15 М ацетат аммония при значении pH 5,2 и скорости элюции 0,5 мл/мин. Контроль и анализ хроматограмм осуществляли с помощью программы “*Мультихром*” в. 1.6 (“*Амперсент*”, Москва). Для калибровки колонки использовали декстрановые стандарты молекулярных масс (1080, 4440, 9890, 43500, 66700, 123600 и 196300 кДа) (“*Sigma*”, США).

Фунгицидную активность определяли измерением радиального роста колонии гриба. Испытываемые образцы хитозана растворяли в 0,25 М соляной кислоте, затем pH раствора доводили 1 М NaOH до 5,0–5,5. *Antifungal Assay Agar* (“*Sigma*”) – 7,5% агаровая среда, содержащая 1 мг/мл хитозана, была стерилизована при 110°C в течение 20 мин и затем разлита в стерильные чашки Петри (9 см в диаметре). Чашки были инокулированы колонией гриба диаметром 6 мм. Для каждого образца была проведена серия из трех экспериментов. В качестве контроля была использована та же агаровая среда, не содержащая хитозана. Все чашки были инкубированы в темноте при 20°C. Радиальный рост колоний измеряли ежедневно в течение 15 дней.

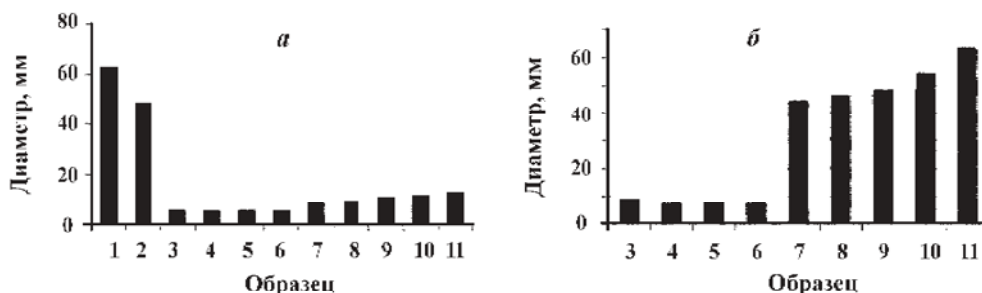


Рис. 2. Активность 0,1% растворов ряда низкомолекулярных хитозанов по отношению к *Penicillium vermaesseni*: 1 – контроль; 2 – $GlcNH_2$; хитозан с M_w (кДа): 3 – 4,10; 4 – 5,15; 5 – 7,57; 6 – 9,92; 7 – 15,03; 8 – 24,23; 9 – 29,19; 10 – 40,45; 11 – 90,00. Измерения проводили в течение: а – 5 дней, б – 15 дней

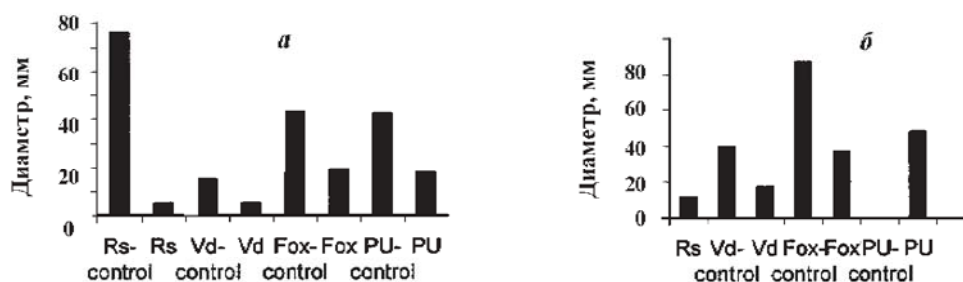


Рис. 3. Активность 0,1% раствора низкомолекулярного хитозана (7,57 кДа) по отношению к *Rhizoctonia solani* (Rs), *Verticillium dalei* (Vd), *Fusarium oxysporum* (Fox), *Pythium ultimum* (Pu). Измерения проводили в течение: *a* – 5 дней, *б* – 15 дней

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pastor de Abram A.* Qitina y Quitosano: abtenciyn, carecterizaciyn y aplicaciynes, Pontifica Universidad Catolica del Peru, Lima-Peru. 2004. P. 105.
2. *Heyn A.* // Proc. Acad. Sci. Amsterdam. 1936. **39**. P. 132.

Поступила в редакцию 09.04.07

MOLECULAR WEIGHT DEPENDANT BACTERICIDAL ACTIVITY OF CHITOSAN

Ye.A. Stepnova, V.Ye. Tikhonov, S.A. Lopatin, V.P. Varlamov, Ya.A. Yamskov

(A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian Academy of Science, Moscow; Center of Bioengineering Russian Academy of Science, Moscow)

Synthesis of the series of low molecular weight chitosans and the results of their biological testing against several plant pathogenic fungi is presented in the paper.