ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>

СИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ХИТОЗАНАЗЫ ЭНТОМОПАТОГЕННЫМ ШТАММОМ *BACILLUS THURINGIENSIS* B-387 И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БИОАКТИВНЫХ ХИТООЛИГОСАХАРИДОВ

Сафина В.Р.¹, Актуганов Г.Э.¹, Баймиев Ан.Х.²,
Галимзянова Н.Ф.¹, Мелентьев А.И.¹

¹ Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа

² Институт биохимии и генетики Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа

E-mail: vitaqwer@mail.ru

Исследованы особенности синтеза внеклеточной хитозаназы штаммом *B. thuringiensis* B-387 при культивировании в присутствии различных источников углерода, азота и минеральных солей. Установлена способность *B. thuringiensis* B-387 к конститутивной продукции хитозаназы на уровне 3-12,5 ед/мл. Синтез фермента возрастал в 2-4 раза при добавлении в среду коллоидного крабового хитина или растворимого хитозана в концентрациях до 1-2%. Среди источников азота наибольшей продуктивности штамма способствовали триптон и гидролизат лактальбумина, среди солей – сернокислый магний. Показано, что ферментный комплекс *B. thuringiensis* B-387 с высокой скоростью гидролизует хитозан со степенью деацетилирования 85 и 50%, образуя фракции водорастворимых олигомеров ($M_w \sim 14-15$ кДа), проявляющих повышенную рост-ингибирующую активность против фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* и ряда условно патогенных штаммов бактерий.

Ключевые слова: хитозан, хитозаназа, хитоолигосахариды, *Bacillus thuringiensis*, антибактериальная активность, биофунгициды

SYNTHESIS OF EXTRACELLULAR CHITOSANASE BY ENTOMOPATHOGENIC STRAIN OF *BACILLUS THURINGIENSIS* B-387 AND ITS APPLICATION FOR PREPARATION OF WATER-SOLUBLE BIOACTIVE CHITOOLIGOSACCHARIDES

Safina V.R.¹, Aktuganov G.E.¹, Baymiev An.K.²,
Galimzianova N.F.¹, Melentiev A.I.¹

¹ Ufa Institute of Biology of Ufa Federal Research Center of
Russian Academy of Sciences, Ufa

² The Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal
Research Center of Russian Academy of Sciences, Ufa

E-mail: vitaqwer@mail.ru

Specific properties of extracellular chitosanase synthesis by *B. thuringiensis*, strain B-387, in presence of various carbon and nitrogen sources as well as mineral salts, were studied. The strain *B. thuringiensis* B-387 demonstrated constitutive high production of chitosanase at the level 3-12.5 U·ml⁻¹. The supplement of colloidal chitin or soluble chitosan into nutritional medium under 1-2% (w/v) resulted to 2-4-fold increase of the enzyme synthesis. Amongst the tested nitrogen sources tryptone and lactalbumine hydrolysate promoted to highest productivity of the strain, and amongst the mineral salts magnesium sulfate demonstrated the same effect. It was demonstrated that the enzyme complex from culture supernatant of *B. thuringiensis* B-387 rapidly hydrolyzed chitosan varying in deacetylation degree (85 and 50%) to form the mixture of water-soluble oligomers ($M_w \sim 14-15$ kDa) displaying increased growth-inhibiting activity against plant pathogenic micromycete *Botrytis cinerea* and number of opportunistic pathogenic bacteria strains.

Keywords: chitosan, chitosanase, chitoooligosaccharides, *Bacillus thuringiensis*, antibacterial activity, biofungicides

Поступила в редакцию: 6.08.2019

DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-3-293-301](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-293-301)

ВВЕДЕНИЕ

Хитозан – линейный полисахарид, получаемый в промышленных и лабораторных условиях щелочным деацетилированием хитина и состоящий преимущественно из остатков D-глюкозамина, соединенных 1,4-β-гликозидными связями. Как правило, коммерческий хитозан содержит в среднем 10-20% остатков N-ацетил-D-глюкозамина, однако условно к хитозанам причисляют производные хитина со степенью ацетилирования до 60% [Aam et al., 2010]. В естественных условиях хитозан обнаруживается как самостоятельный полимер в

основном только в клеточных стенках мукоровых грибов (подотдел *Mucoromycotina*). У представителей высших отделов грибов (*Saccharomyces*, *Aspergillus* и др.), насекомых и зеленых водорослей (*Chlorella*) хитозан может встречаться в виде деацетилованных фрагментов в составе фибрилл хитина [Zhao et al., 2010]. Являясь биосовместимым полимером, хитозан характеризуется уникальным разнообразием биологической активности и физико-химических свойств, что обуславливает его значительный биотехнологический потенциал [Cheung et al., 2015]. Вместе с тем, хитозан способен растворяться только в разбавленных растворах минеральных и органических кислот, образуя при этом высоковязкие растворы [Вихорева, Тюкова, 2013; Pillai et al., 2009]. Эта особенность ограничивает эффективное применение хитозана в ряде областей медицины, сельского хозяйства и др. Решение настоящей проблемы основано, как правило, на ограниченной деструкции хитозана с помощью физических, химических, ферментативных или комбинированных методов [Aam et al., 2010; Mao et al., 2004; Titov et al., 2016]. Водорастворимые олигомеры хитозана в некоторых случаях проявляют более высокую биологическую активность и характеризуются низкой вязкостью, а хитоолигосахариды со степенью полимеризации 4-7 (и ниже) представляют перспективный материал для дальнейших модификаций с помощью химического и ферментативного синтеза [Jung, Park, 2014]. Ферментативный гидролиз хитозана имеет ряд преимуществ перед физико-химическими способами его деструкции, позволяя осуществлять управляемый процесс деполимеризации в мягких условиях температуры, pH и ионной силы реакционной смеси при отсутствии случайных модификаций функциональных групп и образования побочных продуктов. Среди микробных гидролаз эндо- (КФ 3.2.1.132) и экзохитозаназы (КФ 3.2.1.165) могут рассматриваться как наиболее высокоспецифичные и перспективные ферменты для контролируемой деполимеризации хитозана, из них наиболее изучены хитозаназы семейства 46 гликозил-гидролаз [Viens et al., 2015]. Тем не менее, широкое биотехнологическое применение хитозаназ ограничивается их значительной стоимостью, что оставляет актуальным поиск новых эффективных микробных продуцентов этих ферментов и изучение способов снижения стоимости их культивирования.

Целью настоящей работы являлось изучение особенностей синтеза хитозаназы *Bacillus thuringiensis* В-387 и оценка эффективности ее применения для ограниченной деструкции хитозана и получения биоактивных хитоолигомеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследований использовали штамм *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* В-387 из коллекции ВКМ, составляющий основу инсектицидного препарата «Дендробациллин», использовавшегося для борьбы с личинками сибирского шелкопряда [Талалаев и др., 1971]. Штамм поддерживали на агаризованной среде LB, либо на среде следующего состава (г/л): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1; KH_2PO_4 , 0,5; $(NH_4)_2HPO_4$, 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,4; $CaCl_2$, 0,2; пептон, 3; дрожжевой экстракт, 3; кукурузный экстракт, 0,5; коллоидный хитин, 5; агар, 16. Глубинное культивирование бактерий осуществляли в течение 3-4 сут в бульоне LB, либо в модифицированной среде упомянутого выше состава, на шейкере-инкубаторе Innova 40R при 220 об/мин и 36°C. Влияние источников углерода и азота оценивали, заменяя коллоидный хитин другими субстратами в концентрации 5 г/л, а органические источники азота – одним источником азота в концентрации 1 г/л. В работе использовали хитозан со степенью деацетилирования 85% («Биопрогресс», Россия) и 50% (Институт биоинженерии

РАН) Хитозаназную активность измеряли по скорости накопления продуктов 1-ч гидролиза 0,5%-ного раствора хитозана (0,1 М уксусная кислота + NaOH, pH 6). Реакцию проводили при 50°C, концентрацию восстанавливающих сахаров определяли феррицианидным методом [Синицын и др., 1993]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ-экв D-глюкозамина (GlcN) в 1 мл реакционной смеси за 1 мин при описанных условиях. Кинематическую вязкость растворов хитозана измеряли с помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-4 с диаметром капилляра 0,82 мм, значения вязкости измеряли по формуле: $V = g/9,807 \cdot T \cdot K$, где g – ускорение свободного падения в месте измерения, T – время истечения, K – постоянная вискозиметра, равная 0,03 мм²/с². Антибактериальную и фунгицидную активность водорастворимых олигомеров хитозана оценивали по подавлению развития (%) тест-штаммов бактерий и фитопатогенных грибов в бульоне LB и картофельно-глюкозной среде, соответственно. Эксперимент проводили в 96-лучночных полистироловых культуральных планшетах (“Corning”) с объемом среды в лунках по 0,2 мл. Оптическую плотность тест-культур микроорганизмов оценивали на планшетном спектрофотометре EnSpier (“Perkin-Elmer”) при 600 нм после 24-ч и 72-ч культивирования (28°C) для бактерий и микромицетов, соответственно. Развитие и морфологию клеток *B. thuringiensis* B-387, а также влияние хитоолигосахаридов на тест-культуры бактерий изучали с помощью светооптической микроскопии на микроскопе Leica DM1000 (“Leica Microsystems”) при увеличении $\times 1000$. Бактериальные клетки предварительно окрашивали по Граму. Эксперименты проводили в трехкратной повторности, статистическую обработку осуществляли с помощью программы ORIGIN SRO 7.0 (версия 7.0220 (B220), «OriginLab Corp.»). Достоверными считали различия между сравниваемыми выборками при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые была установлена способность штамма *B. thuringiensis* B-387 к конститутивному синтезу внеклеточной хитозаназы в отсутствие субстрата-индуктора. Ранее такая активность была продемонстрирована только у отдельных штаммов *Bacillus* spp. [Choi et al., 2004; Kim et al., 2004], тогда как у представителей вида *B. thuringiensis*, входящего

Рис. 1. Динамика роста и синтеза хитозаназы штаммом *B. thuringiensis* B-387 и изменение pH культуральной среды при периодическом культивировании в бульоне LB.

в группу *B. cereus*, об этой способности не сообщалось. Lee с соавт. (2007), характеризуя экспрессию хитозаназ семейства GH8 гликозил-гидролаз у группы штаммов *B. thuringiensis*, на стадии скрининга выявили активность у 12 из 29 сероваров этого вида на среде LB, проявляющуюся, однако, только при добавлении в среду растворимого хитозана [Lee et al., 2007]. Хитозаназная активность *B. thuringiensis* B-387 в бульоне LB достигала максимума к 2-м суткам

культивирования (>3 ед/мл), в дальнейшем незначительно увеличиваясь (рис. 1). Плотность роста и титр культуры показывали максимальные значения ($6,6 \times 10^8$ КОЕ/мл) на первые сутки, резко снижаясь к 4-м суткам ферментации. По всей видимости, это могло быть обусловлено частичной гибелью бактериальных клеток вследствие защелачивания pH среды от 6,5 до 9 в конце культивирования (рис. 1). Для представителей *B. thuringiensis* характерен также автолиз клеток на стадии споруляции [Chen et al., 2018]. В 3-сут. культуре *B. thuringiensis* В-387 наряду с вегетативными клетками отмечалось значительное количество свободных эндоспор, в клетках – параспоральных включений. Наряду с продукцией хитозаназы, штамм показывал на среде LB невысокую хитиназную активность (0,1 ед/мл), которая могла быть обусловлена гидролитическим действием некоторых хитозаназ в отношении смешанных связей типа GlcNAc-GlcN или GlcN-GlcNAc, в незначительном количестве присутствующих в хитине. Хитиназная активность *B. thuringiensis* В-387 существенно возрастала (до 0,25-0,30 ед/мл и выше) при добавлении в среду коллоидного крабового хитина, а также растворимого хитозана (данные не показаны). Это указывает на индуцибельный синтез хитиназ у *B. thuringiensis* В-387, в отличие от хитозаназ. Хитин в различных формах и большинство других источников углерода (глюкоза, целлюлоза, инулин, лактоза и др.), за исключением хитозана, существенно снижали продукцию хитозаназы исследуемым штаммом (данные не представлены). Однако, в питательной среде, сбалансированной по источникам органического азота, добавление коллоидного хитина способствовало возрастанию синтеза хитозаназы в 1,8-4,6 раз, в зависимости от концентрации данного субстрата (рис. 2А). Использование в качестве основного источника растворимого хитозана приводило к увеличению продукции хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 примерно в 2,3 раза уже при концентрации 0,25%, однако дальнейшее повышение его содержания в среде сопровождалось не столь существенным ростом секреции фермента (рис. 2Б). При 2% хитозана в среде наблюдалось 3-кратное снижение активности фермента, что может быть связано с пороговым проявлением рост-ингибирующих свойств полимера в отношении штамма-продуцента.

Рис. 2. Влияние концентрации коллоидного крабового хитина (А) и растворимого хитозана СД 85% (Б) на продукцию хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 (72 ч) в среде с различным содержанием источников азота: А – по 1% триптона и гидролизата лактальбумина, Б – 1% триптона.

Особенностью *B. thuringiensis* В-387 являлся высокий уровень синтеза хитозаназы в присутствии гидролизатов казеина (триптон) и лактальбумина – молочных белков (рис. 3) и относительно низкая его продуктивность при использовании пептона, мясного, дрожжевого и кукурузного экстрактов (данные не представлены). Вероятно, это может быть обусловлено большим содержанием в этих компонентах аминокислот-предшественников, необходимых для синтеза хитозаназы. Комбинированное использование нескольких источников азота, за исключением пептона, мясного и кукурузного экстрактов, приводило к повышению продукции хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 до значений, близких к максимальным.

Рис. 3. Влияние концентрации триптона и гидролизата лактальбумина при их использовании в качестве единственного источника азота на продукцию хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 (72 ч) по сравнению с контрольной средой LB.

В качестве альтернативных источников углерода для синтеза хитозаназы *B. thuringiensis* В-387, могут довольно эффективно использоваться лактоза и молочная сыворотка. Использование обезжиренного молока в составе питательной среды в умеренных концентрациях (до 2,5% об.) приводило более чем к 2-кратному возрастанию синтеза фермента (табл. 1). Лактоза в концентрациях 0,25-2% также способствовала повышению хитозаназной активности штамма, хотя при этом в среде увеличивалось остаточное содержание восстанавливающих сахаров. В то же время, продуктивность *B. thuringiensis* В-387 снижалась

практически на порядок в присутствии пчелиного подмора (табл. 1). Данный факт может объясняться изменением метаболизма штамма, либо частичным ингибированием его роста соединениями, присутствующими в этом субстрате, содержащим помимо хитина разнообразные белки, пигменты группы меланина, жиры и т.п. Тем не менее, увеличение содержания подмора в питательной среде сопровождалось повышением секреции хитозаназы штаммом (табл. 1).

Таблица 1. Влияние некоторых источников углерода на синтез внеклеточной хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 (72 ч, 36°C)

Концентрация, % мас./об.*	Синтез хитозаназы в присутствии различных источников углерода, ед/мл		
	Молоко обезжиренное	Лактоза	Пчелиный подмор
0,25	-	3,366±0,179	-
0,5	-	4,777±0,269	0,269±0,023
1	-	4,819±0,178	0,290±0,027
1,25*	6,536±0,299	-	-
2	-	5,741±0,238	0,365±0,030
2,5*	6,034±0,234	-	-
4	-	-	0,419±0,036

*Объемная концентрация представлена для молока.

Из минеральных компонентов наиболее благоприятный эффект на синтез хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 оказывал сернокислый магний. С увеличением концентрации этой соли от 0,05 до 0,5% продукция хитозаназы возрастала в 2,2, 2,6 и 4,3 раза (рис. 4). Хлорид кальция 2-кратно активировал секрецию фермента только при 0,1% масс., не оказывая существенного влияния при более его высоких концентрациях, тогда как хлорид марганца, напротив, приводил к снижению синтеза хитозаназы уже при 0,05% (рис. 4).

Рис. 4. Влияние некоторых минеральных солей на биосинтез хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 (72 ч).

Эмпирический подбор состава питательной среды демонстрировал высокий потенциал в увеличении продукции внеклеточной хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 (от 3 до 20 ед/мл). Оценка влияния таких параметров глубинного культивирования, как температура и степень аэрации (перемешивания) выявила максимальные показатели продуктивности штамма при 32 °С и 250 об/мин, соответственно (рис. 5А, Б).

Рис. 5. Влияние температуры культивирования (А) и степени аэрации культуры (Б) солей на продукцию внеклеточной хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 (72 ч).

Ферментный комплекс *B. thuringiensis* В-387 на 50-80% снижал вязкость растворов хитозана с различной степенью деацетилирования в первые минуты реакции, что характерно для ферментов с эндо-механизмом действия (рис. 6).

Рис. 6. Снижение кинематической вязкости 1,3%-ных растворов хитозана со СД 85% (А) и СД 50% (Б) в натрий-ацетатном буфере (рН 6) при 50°С ферментным комплексом *B. thuringiensis* ВКМ В-387 при различных фермент-субстратных соотношениях.

В отличие от ферментного комплекса, очищенная хитозаназа значительно быстрее гидролизовала хитозан с более высоким содержанием ацетилированных остатков (рис. 7).

Рис. 7. Снижение кинематической вязкости хитозана со СД 85% и 50% в натрий-ацетатном буфере (рН 6) очищенной хитозаназой *B. thuringiensis* В-387

Это факт свидетельствует о том, что фермент *B. thuringiensis* В-387 по всей видимости относится к высокоспецифичным хитозаназам семейства GH46 [Viens et al., 2015]. Предварительный ВЭЖХ-анализ продуктов ограниченного гидролиза хитозана со СД 85% показал преобладание хитоолигомеров со средневесовой молекулярной массой 14-15 кДа (данные не представлены). Как известно, олигомеры хитозана, имеющие массу от 5 до 15 кДа, обладают более высокой антимикробной активностью, чем хитоолигосахариды с массой 1-4 кДа [Park et al., 2008]. Водорастворимые фракции олигомеров, образующихся при гидролизе хитозанов со СД 85 и 50% хитозаназой *B. thuringiensis* В-387, в некоторых случаях

показывали более высокую фунгицидную и бактерицидную активность по сравнению с исходными образцами высокомолекулярного хитозана (рис. 8, 9).

Рис. 8. Концентрационные кривые ингибирования фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* F-894 хитозанами СД 85% (1А) и СД 50% (1Б) и их олигомерами (2А и 2Б, соответственно), получаемыми под действием хитозаназы *B. thuringiensis* В-387. Оценка на третьи сутки культивирования (28°C).

Так, ингибирование возбудителя серой гнили плодовых культур *Botrytis cinerea* отмечалось при более низких концентрациях хитоолигомеров, чем исходного хитозана, как со СД 85%, так и 50% (рис. 8, А, Б). Ферментативные гидролизаты обоих хитозанов показывали также большую степень подавления штаммов тест-бактерий *Bacillus cereus* и *Pseudomonas aeruginosa* при концентрации 1 мг/мл по сравнению с исходными образцами полимера (рис. 9).

Рис. 9. Влияние хитозанов СД 85% и 50% и их гидролизатов (1 мг/мл), полученных при действии хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 на интенсивность роста штаммов условно патогенных бактерий. Оценка после 24 ч культивирования (30°C).

Представленные результаты свидетельствуют о высокой эффективности применения хитозаназы *B. thuringiensis* В-387 для ограниченной деструкции высокомолекулярного хитозана различной степени деацетилирования с целью получения водорастворимых олигомеров, подавляющих развитие фитопатогенных микромицетов и условно патогенных бактерий. Быстрая деструкция хитозана в отдельных аспектах может негативно сказываться

на биологической активности получаемых олигомеров, однако, возможность контроля этого процесса по параметрам фермент-субстратного соотношения, температуры, pH и ионной силы реакционной смеси должна стать одним из решений этой проблемы. Наряду с получением олигомеров Mw 14-15 кДа, хитозаназный комплекс исследуемого штамма показывал также высокую степень конверсии хитозана в хитоолигосахариды со степенью полимеризации 2-5 (данные не представлены), которые являются целевым продуктом различных областей биотехнологии и биомедицины. Высокий уровень синтеза хитозаназы *B. thuringiensis* B-387, не требующий добавления специфического субстрата в питательную среду, а также значительный потенциал в увеличении продуктивности данного штамма, позволяют рассматривать его в качестве перспективного объекта для биотехнологического получения микробной хитозаназы и биоактивных хитоолигосахаридов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вихорева Г.А., Тюкова И.С. Растворимость и свойства растворов хитозана // В. кн.: Хитозан. Ред. Скрыбин К.Г., Михайлов С.Н., Варламов В.П. М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. С. 162-184.
2. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Сер. Биотехнология; Т. 25.- М., 1993. 152 с.
3. Талалаев Е.В., Федосова З.П., Федоров Н.К. Отечественный препарат дендробациллин: Обзор / М.: Глав. упр. микробиол. пром-сти при Совете Министров СССР, 1971. 52 с.
4. Aam B, Heggset E, Norberg A, Sørli M, Vårum K, Ejsink V. Production of chitoooligosaccharides and their potential application in medicine. Review // Mar. Drugs. 2010. V. 8. P. 1482-1517.
5. Chen X., Gao T., Peng Q., Zhang J., Chai Y., Song F. Novel cell wall hydrolase CwlC from *Bacillus thuringiensis* is essential for mother cell lysis // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. No. 7. DOI: 10.1128/AEM.02640-17
6. Cheung R.C.F., Ng T.B., Wong J.H., Chan W.Y. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications // Mar. Drugs. 2015. V. 13. No. 7. P. 5156-5186.
7. Choi Y.J., Kim E.J., Piao Z., Yun Y.C., Shin Y.C. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. No. 8. P. 4522-4531.
8. Kim P., Kang T.H., Chung K.J., Kim I.S., Chung K.C. Purification of a constitutive chitosanase produced by *Bacillus* sp. MET 1299 with cloning and expression of the gene // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 240. No. 1. P. 31-39.
9. Lee H.-S., Jung J.S., Choi S.-K., Lee D.-W., Kim E.-J., Jung H.-C., Pan J.-G. Identification and expression of GH-8 family chitosanases from several *Bacillus thuringiensis* subspecies // FEMS Microbiol. Lett. 2007. V. 277. No. 2. P. 133-141.
10. Jung W.-J., Park R.-D. Bioproduction of chitoooligosaccharides: present and perspectives // Mar. Drugs. 2014. V. 12. No. 7. P. 5328-5356.
11. Mao S., Shuai X., Unger F., Simon M., Bi D., Kissel T. Depolymerization of chitosan: effects of physicochemical and biological properties // Int. J. Pharm. 2004. V. 281. No. 1-2. P. 45-54.
12. Park Y., Kim M.H., Park S.C., Cheong H., Jang M.K., Nah J.W., Hahm K.S. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 18. No. 10. P. 1729-1734.
13. Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation // Progr. Polym. Sci. 2009. V. 34. P. 641-678.
14. Titov V.A., Lipatova I.M., Mezina E.A., Kuz'micheva L.A. Plasma-chemical destruction and modification of chitosan in solution // High Energ. Chem. 2016. V. 50. No. 5. P. 411-415.
15. Viens P., Lacombe-Harvey M.-E., Brzezinski R. Chitosanases from family 46 of glycoside hydrolases: from proteins to phenotypes // Mar. Drugs. 2015. V. 13. No. 11. P. 6566-6587.
16. Zhao Y., Park R.-D., Muzzarelli R.A.A. Chitin-deacetylases: properties and application // Mar. Drugs. 2010. V. 8. No. 1. P. 24-46.