

УДК 577.152.321:577.114.4

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ ХИТОЗАНА МИКРОБНЫМИ ХИТИНАЗАМИ И ХИТОЗАНАЗАМИ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ОБРАЗУЕМЫХ ХИТООЛИГОМЕРОВ

© 2021 г. В. Р. Сафина¹, А. И. Мелентьев¹, Н. Ф. Галимзянова¹, Е. А. Гильванова¹, Л. Ю. Кузьмина¹, С. А. Лопатин², В. П. Варламов², Андр. Х. Баймиев³, Г. Э. Актуганов¹, *

¹Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

²Институт биоинженерии ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 117312 Россия

³Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: gleakt@anrb.ru

Поступила в редакцию 17.03.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

Изучены особенности ферментативной деструкции хитозана со степенью деацетилирования (СД) 85 и 50% препаратами микробных хитиназ и хитозаназ по показателям глубины гидролиза, молекулярно-массового распределения (ММР) и антимикробной активности образуемых продуктов реакции. Ферментный комплекс штамма *Bacillus thuringiensis* В-387, характеризующегося высоким уровнем продукции хитозаназ (>4.5 ед/мл), осуществлял деструкцию полимера до низкомолекулярных хитоолигосахаридов ($M_w \leq 2$ кДа) при низком выходе (~5%) олигохитозанов (M_w 2–16 кДа). Препараты штаммов *Bacillus atrophaeus* IB-33-1 и *Cohnella* sp. IB-P192, характеризующиеся активностью преимущественно хитиназы (0.3–0.5 ед./мл), показали наиболее низкие скорость и глубину гидролиза хитозана с СД 85%. Подбор соотношения фермент : субстрат в интервале 2–5 ед./г (по хитозану) позволил снизить глубину гидролиза исходного полимера и повысить выход олигохитозанов с $M_w \sim 15$ –17 кДа до 30% при деполимеризации хитозана (СД 85%) ферментным комплексом *B. thuringiensis* В-387. При гидролизе хитозана различной степени деацетилирования (СД 85% и 50%) ферментными комплексами с высокой активностью хитозаназы бактерицидный и фунгицидный эффект образуемых олигомеров снижался, как правило, более заметно, чем при использовании хитиназы. Однако в некоторых случаях имело место как неспецифическое, так и специфическое усиление антимикробного действия продуктов ферментации по сравнению с исходным полимером, что определялось индивидуальной чувствительностью штаммов бактерий и микромицетов.

Ключевые слова: ферментативная деполимеризация хитозана, биоактивные хитоолигосахариды, хитинолитические ферменты, хитозаназы, антимикробная активность

DOI: 10.31857/S0555109921050135

Хитозан – уникальный по физико-химическим свойствам и разнообразию биологической активности аминополисахарид, получаемый щелочным деацетилированием хитина из панциря морских ракообразных [1]. Объемы промышленно производимого хитозана существенно превышают известные в настоящее время потенциально значимые естественные источники этого биополимера, относящиеся в основном к грибам класса *Zygomycetes*, например, *Absidia caerulea* [2, 3]. Неотъемлемыми биологическими свойствами хитозана являются антибактериальная и фунгицидная активности, обусловленные, в известной степени, его поликатионной природой [1, 4, 5]. Вне зависимости от источника хитозана, его антимикробная активность в значительной мере определяется такими характеристиками как мо-

лекулярная масса (M_w) и степень деацетилирования (СД) [4, 6, 7]. Олигомеры хитозана, включая хитоолигосахариды (ХОС) со степенью полимеризации $n = 4$ –10 и низкомолекулярный хитозан с $M_w \sim 4$ –20 кДа, представляют собой более функциональные соединения по сравнению с исходным полимером в силу их растворимости в воде при нейтральных значениях pH и низкой вязкости [8–10]. По различным данным, наиболее высокой бактерицидной и фунгицидной активностью обладают хитоолигомеры с $M_w \sim 5$ –10 кДа, тогда как другие виды биологической/физиологической активности значительно варьируют по своему уровню среди олигомеров с $M_w \sim 1.5$ –20 кДа и более [6, 9, 11–13]. Особенности структуры исходного полимера и способ его деструкции могут

оказывать существенное влияние на спектр образующихся олигомеров и их биологическую активность [14]. Преимущества ферментативной деструкции хитозана заключаются в безопасности этого процесса для окружающей среды (по сравнению с химическими методами) и отсутствии побочных продуктов, а также возможности контроля протекающей реакции и глубины гидролиза субстрата [10, 15, 16]. Хитозан может быть гидролизован различными гидролазами, в том числе некоторыми целлюлазами, протеазами, пектиназами и др. [15]. Однако, в отличие от неспецифических ферментов, ограниченная деструкция полимера хитозаназами (КФ 3.2.1.132) может протекать при существенно меньшем соотношении фермент-субстрат и требует меньшего времени инкубации. Сравнительная оценка потенциала микробных хитозаназ и хитиназ представляет значительный интерес с точки зрения образования и выхода водорастворимых хитоолигомеров.

Цель настоящей работы – сравнительное изучение эффективности ферментативного гидролиза хитозана до олигомеров, обладающих антимикробной активностью, под действием хитиназы и хитозаназ бактериального и грибного происхождения, различающихся по специфичности и каталитическим свойствам.

МЕТОДИКА

Основными объектами исследования являлись штаммы хитинолитических бактерий и микромицетов из коллекции Уфимского института биологии (УИБ УФИЦ РАН) и Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ), в том числе, *Bacillus atrophaeus* IB-33-1, *B. licheniformis* IB-A41.4.2, *B. licheniformis* IB-P141 B21-1, *B. mannanilyticus* IB-OR17 B1 (штамм депонирован в ВКМ под номером В-2715D), *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* ВКМ В-387, *Cohnella* sp. IB-P192, *Paenibacillus ehimensis* IB-739 (депонирован в ВКМ под номером В-2680D), *P. illinoisensis* IB-1087, а также хитозанолитический штамм *Penicillium* sp. IB-37-2A (депонирован в ВКМ под номером F-4780). Культуры поддерживали на агаризованных средах, описанных в работе [17], а также на агаризованной среде LB и картофельно-глюкозном агаре (КГА). В качестве тест-объектов для оценки антибактериальной и фунгицидной активности хитозана и его олигомеров использовали коллекционные и собственные (коллекции УИБ и ИБГ УФИЦ РАН) штаммы условно патогенных бактерий *Bacillus cereus* ВКМ В-688, *Enterobacter cloacae* IB-34 4 CPA, *Escherichia coli* IBG-9 и *Pseudomonas aeruginosa* IB-39D, а также фитопатогенных микромицетов *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker ИБ Г-12, *Fusarium culmorum* (Wm.G.Sm.) Sacc. ВКМ F-844, *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyd. et Hans. ВКМ F-137 и *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn ВКМ F-895.

В работе использовали хитозан с СД ~ 85% (ЗАО “Биопрогресс”, Россия), а также частично N-ацетилованный хитозан (СД ~ 50%), любезно предоставленный лабораторией инженерии биополимеров (Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН).

Хитозан (СД 85%) растворяли в 100 мл 0.2 М уксусной кислоты (х. ч.) при 40°C и постоянном перемешивании. Полученный раствор затем титровали 0.2 М NaOH до pH 6.0, после чего доводили до объема 200 мл деионизированной водой и хранили при 5°C. В дальнейшей работе приготовленный раствор хитозана разбавляли деионизированной водой до необходимых концентраций. Аналогичным способом готовили раствор хитозана (СД 50%).

Активность хитозаназы и хитиназы препаратов, а также содержание в них белка определяли, как описано ранее в работе [18].

Деполимеризацию хитозана СД 85 и 50% ферментными препаратами оценивали по снижению кинематической вязкости его растворов, которую измеряли с помощью капиллярного стеклянного вискозиметра ВПЖ-4 (“Экохим”, Россия) с диаметром капилляра 0.82 мм. Концентрацию субстрата подбирали в интервале 1–1.35% в соответствии с рекомендациями по рабочему диапазону времени истечения. В расходный резервуар вискозиметра вносили около 6 мл раствора хитозана, к которому добавляли от 0.01 до 0.1 мл раствора ферментного препарата. Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали при 50°C в течение 60 мин. Вязкость раствора субстрата измеряли через 2, 5, 10, 20, 40 и 60 мин от начала реакции. Кинематическую вязкость реакционной смеси рассчитывали по формуле:

$$V = g/9.807TK,$$

где g – ускорение свободного падения в месте измерения, T – время истечения, K – постоянная вискозиметра, равная 0.03 мм²/с² для вискозиметра ВПЖ-4.

Степень гидролиза хитозана с СД 85% оценивали после 1 ч обработки при 50°C ферментными препаратами штаммов *B. atrophaeus* IB-33-1, *B. thuringiensis* В-387, *Cohnella* sp. IB-P192, *P. ehimensis* IB-739 и *Penicillium* sp. IB-37-2A. Остаточное содержание хитозана определяли следующим образом. Частично гидролизованный полисахарид осаждали добавлением в реакционную смесь 0.5 М NaOH в соотношении 1 : 3 (об./об.), центрифугировали, промывали деионизированной водой и высушивали при 45°C до постоянного веса и взвешивали на аналитических весах Leki B2104 (Финляндия) с погрешностью ±0.1 мг. Глубину гидролиза субстрата определяли по формуле $[(C_0 - C_1)/C_1] \times 100$ (%), где C_0 – начальная, а C_1 – остаточная концентрация хитозана (мг/мл) в ре-

акционной смеси после инкубации в присутствии ферментных препаратов.

Средневесовую (M_w), среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также индекс полидисперсности (M_w/M_n) образцов низкомолекулярного хитозана определяли с помощью высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии (HP-SEC) на жидкостном хроматографе S-2100 ("Sykam", Германия). Ферментные препараты добавляли к 2%-ному раствору хитозана (СД 85%) в 50 мМ Na-ацетатном буфере (рН 6.0) в различных объемных соотношениях и инкубировали в течение 60 мин при 50°C. Образовавшиеся олигохитозаны осаждали добавлением 2.0 М раствора NaOH (1 : 1, об./об.), центрифугировали, промывали деионизированной водой до нейтральной реакции и перерастворяли в 50 мМ Na-ацетатном буфере (рН 6.0). Полученные растворы лиофильно высушивали на установке Иней 6 (ИБП РАН, Пушкино, Россия) и после повторного растворения в деионизированной воде фракционировали на колонке PolySep-GFC-P 4000 ("Phenomenex", США) 7.8 × 300 мм с предколонкой 5.0 × 2 мм. В качестве элюента использовали 50 мМ уксусную кислоту – 150 мМ ацетат натрия, рН 5.0, при скорости потока 0.5 мл/мин, температуре 30°C и давлении 2 МПа. Колонку калибровали декстрановыми стандартами с молекулярной массой 1.08, 4.44, 9.89, 43.5, 66.7, 123.6 и 196.3 кДа ("Sigma", США). Анализ хроматограмм проводили с помощью программы Chrom&Spec v. 1.6 ("Ampersand", Россия).

Анализ антибактериальной и фунгицидной активности ферментативных гидролизатов образцов хитозана со СД 85 и 50% проводили в стандартных 96-луночных полистирольных культуральных планшетах ("Corning", США). Образцы хитозана после ферментализации подвергали термообработке в водной бане (10 мин при 100°C) для инактивации ферментов и затем стерилизовали пропусканием через бактериальные шприцевые фильтры с размером пор 0.20 мкм ("GVS", США) или 0.45 мкм ("Sartorius", Германия). Тест-штаммы бактерий предварительно выращивали в течение ночи в бульоне LB при 220 об./мин и 36.5°C для бацилл и 30°C – для других бактерий.

Инокуляты готовили разведением свежей культуры бактерий в стерильной среде LB до значений оптической плотности 0.05–0.10 ед. и вносили в лунки в объеме 0.1 мл. К инокулятам добавляли стерильные растворы ферментативных гидролизатов хитозана в различном соотношении и доводили общий объем среды до 0.2 мл. Смеси инкубировали от 24 до 48 ч при 30°C, после чего измеряли их оптическую плотность при 600 нм на планшетном спектрофотометре EnSpier ("Perkin-Elmer", США). В качестве контроля использовали образцы питательной среды, не содержащей

олигомеров хитозана, а также среду с хитозаном без ферментативной обработки. Степень ингибирования (СИ, %) тест-штаммов бактерий рассчитывали с помощью стандартной формулы $СИ = ((ОП_k - ОП_3) / ОП_k) \times 100$, где $ОП_k$ и $ОП_3$ – оптическая плотность среды в контрольных и экспериментальных вариантах соответственно. Минимальную ингибирующую концентрацию (мкг/мл) рассчитывали по количеству хитозана и хитоолигосахаридов, вызывающее снижение оптической плотности тест-культур не менее, чем на 50%. Значения представляли как средние трех независимых экспериментов.

Фунгицидную активность хитоолигосахаридов оценивали аналогичным способом, используя в качестве питательной среды картофельно-глюкозный бульон. Инокуляты готовили на основе свежей (5–6 сут) культуры микромицетов; в качестве посевного материала использовали суспензию спор концентрацией около 10^5 спор/мл питательной среды. Среднее количество грибных спор/конидий в инокуляте рассчитывали с помощью камеры Горяева. После засева планшеты инкубировали при 28°C в течение 3–4 сут.

Фунгицидную активность некоторых гидролизатов хитозана количественно определяли также по подавлению радиального роста колоний фитопатогенного гриба *B. sorokiniana* IB Г-12 при культивировании на КГА. Предварительный гидролиз 1%-ных растворов хитозана (СД 85% и СД 50%, рН 6.0) проводили в течение 1 ч при 50°C концентрированными ферментными препаратами штаммов *B. atrophaeus* IB-33-1 (ХОС 1), *B. thuringiensis* B-387 (ХОС 2) и *Penicillium* sp. IB-37-2A (ХОС 3) в соотношении от 1 : 60 до 1 : 120 (о/о). Затем реакцию смесь инкубировали 10 мин при 100°C, остужали, центрифугировали и пропускали через бактериальные фильтры с размером пор 0.20 мкм ("GVS", США). Полученные растворы вносили в расплавленный и охлажденный перед застыванием КГА в соотношениях 1 : 15 и 1 : 30 (об./об.), после чего агар разливали по 15 мл в чашки Петри. В застывшем КГА вырезали лунки диаметром 9 мм, в которые вставляли агаровые блоки того же диаметра стерильно вырезанные из свежей (5–7 сут) культуры тест-гриба. Чашки инкубировали в течение 7 сут при 28°C, после чего измеряли диаметр выросших колоний гриба. Размер колоний, выросших на КГА в отсутствие гидролизатов хитозана, принимали в качестве негативного контроля. В качестве положительного контроля принимали размеры колоний, выросших в присутствии исходных растворов 1%-ного (в/о) хитозана (СД 85% и СД 50%), внесенных в среду в том же объемном отношении (1 : 30), что и полученные из них гидролизаты. Степень подавления роста гриба рассчитывали в % по стандартной формуле (см. выше), используя в качестве пе-

ременных значения площади (мм^2) колоний гриба в контрольном и опытном вариантах. Значения представляли как средние арифметические данных трех независимых экспериментов, со стандартным отклонением в качестве доверительного интервала.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы OriginPro 2018 (версия b9.5.0.193), “OriginLab Corp.”). Коэффициенты корреляции по Пирсону и линейную регрессию оценивали, используя пакет анализа MS Office Excel 2007 (12.0.6611.1000).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Понятие “эффективности” гидролиза хитозана ферментными препаратами может интерпретироваться по-разному в зависимости от целей, однако ключевым критерием при этом является соблюдение баланса между достигаемым повышением растворимости продуктов частичной деструкции полимера в водных растворах и их биологической, в данном контексте, антимикробной активностью. Важным фактором, оказывающим влияние на эффективность процесса деполимеризации, является степень деацетилирования исходного полимера. Как известно, некоторые бактериальные экзохитиназы семейства GH18, в отличие от эндохитиназ GH19, эффективно расщепляют хитозан со степенью деацетилирования (СД) 35–50% [16, 19]. По мере увеличения СД до 68–87% размер молекул олигомерных продуктов ферментализации возрастает, при этом хитиназы, такие как ChiB, сохраняют эффективность в отношении хитозана [16]. Поскольку последовательности, кодирующие консервативные участки каталитических доменов хитиназ ChiA и ChiB, широко распространены среди почвенных бактерий, на предварительном этапе работы нами была оценена активность гидролиза хитозана (в отношении хитозана со СД 85%) комплексом ферментов бактерий порядка *Bacillales* – продуцентов внеклеточных хитиназ. Тестировали девять коллекционных штаммов различной таксономической принадлежности. Для сравнения в работе использовали также штамм микромицета *Penicillium* sp. IB-37-2A [20]. Сравнительный групповой анализ показал отсутствие прямой корреляции ($R_{x,y} = -0.39$) и плохую взаимосвязь ($r^2 < 0.5$) между значениями хитиназной и хитозаназной активности у исследуемых штаммов (табл. 1). Данный факт свидетельствует о том, что при групповой характеристике бактерий уровень их хитинолитической активности не может адекватно характеризовать их способность к гидролизу хитозана. Основную роль в гидролизе высокодеацетилированного хитозана могут играть хитозаназы (КФ 3.2.1.132), распространенные у бацилл и актинобактерий [21], однако на уровне отдельных штаммов хитозанолитическая актив-

ность может складываться из эффекта разных групп ферментов, в том числе, неспецифических. Объективным показателем способности хитинолитических штаммов к продукции хитозаназ, по-видимому, может служить значение индекса (I_{ChOA}) соотношения хитозаназной и хитиназной активности у изучаемой культуры (табл. 1). Так, при $I_{\text{ChOA}} \geq 1$ можно говорить о хорошей способности бактериальных штаммов к продукции хитозаназ, тогда как значения $I_{\text{ChOA}} \sim 1.1–1.9$ могут косвенно свидетельствовать о синтезе неспецифических гидролаз, участвующих в деградации хитозана.

Для сравнительной оценки деполимеризации хитозана под действием различных ферментных систем, нами были отобраны штаммы, способные к одновременной продукции хитиназ и хитозаназ, с высоким и умеренным индексом хитозаназной активности – *B. thuringiensis* B-387, *Penicillium* sp. IB-37-2A и *P. ehimensis* IB-739, а также культуры, синтезирующие преимущественно хитиназы – *B. atrophaeus* IB-33-1, *Cohnella* sp. IB-P192. Из перечисленных культур штамм *P. ehimensis* IB-739 рассматривался ранее как потенциальный продуцент ферментного комплекса для получения низкомолекулярного хитозана [22]. Другими исследователями показана возможность применения хитозаназы штамма *P. ehimensis* B-23118 для деструкции хитозана до функциональных хитоолигосахаридов со степенью полимеризации от 2 до 6 [23]. Количественный анализ удельной ферментативной активности отобранных штаммов на основе оценки скорости накопления восстанавливаемых сахаров, образуемых при гидролизе коллоидного хитина и растворимого хитозана со СД 85%, показал довольно сходный интервал значений продукции хитиназ, при наличии резко выделяющейся хитозаназной активности у штаммов *B. thuringiensis* B-387 и *Penicillium* sp. IB-37-2 (рис. 1). Уровень деструкции хитозана СД 85% ферментными комплексами исследуемых штаммов по данным вискозиметрического анализа в целом коррелировал с показателями динамики освобождения продуктов гидролиза, за исключением штамма *Penicillium* sp. IB-37-2A, который при более высокой “сахаробразующей” активности, чем у ферментного комплекса *P. ehimensis* IB-739, характеризовался сравнительно медленной динамикой снижения вязкости субстрата (рис. 2а). Проявление такой диспропорции типично для действия ферментов экзо-типа, которым является хитозаназ *Penicillium* sp. IB-37-2A [20]. Следует отметить сходный характер воздействия на хитозан с СД $\sim 50\%$, все ферментные препараты быстрее снижали вязкость его раствора по сравнению с хитозаном СД 85% (рис. 2б), что может быть связано с повышением активности хитиназ в отношении N-ацетилированных остатков.

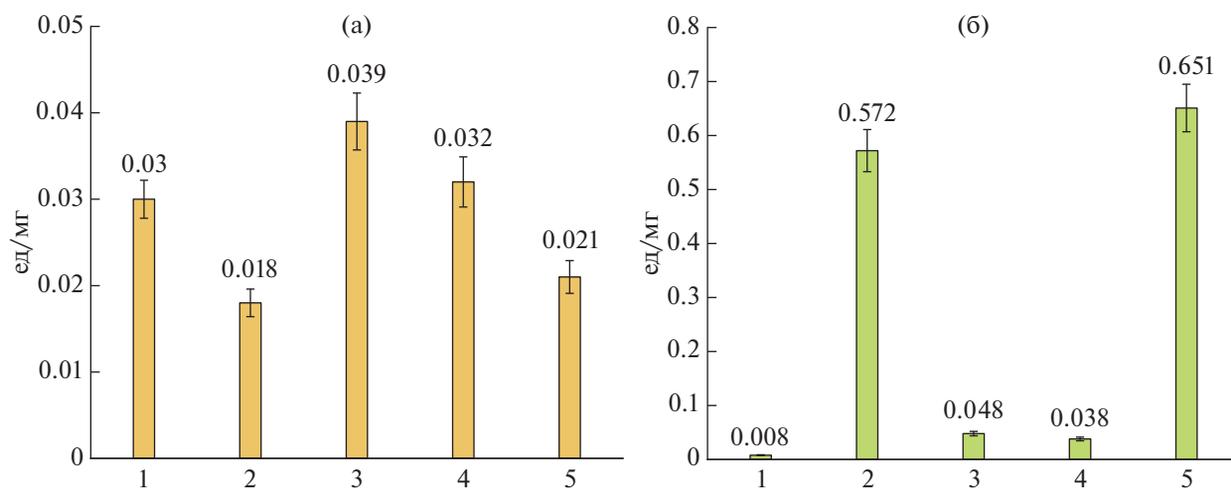


Рис. 1. Удельная хитиназная (а) и хитозаназная (б) активности (ед./мг белка) штаммов хитинолитических бактерий (1–4) и *Penicillium* sp. IB-37-2A (5) при глубинном культивировании в среде с 0.5% коллоидного хитина (штаммы 1, 3–5) и среде LB (штамм 2). 1 – *B. atrophaeus* IB-33-1; 2 – *B. thuringiensis* B-387; 3 – *Cohnella* sp. IB-P192; 4 – *P. ehimensis* IB-739.

Таблица 1. Средняя продуктивность и индекс хитозаназной активности штаммов бактерий и микромицетов, способных к гидролизу хитина и хитозана

№	Штамм	Средняя продуктивность штамма (ферментативная активность в СН КЖ), ед./мл		I_{ChoA}^1
		хитиназа	хитозаназа ²	
1	<i>Bacillus atrophaeus</i> IB-33-1	0.407 ± 0.027	0.107 ± 0.014	0.26
2	<i>B. licheniformis</i> IB-A41.4.2	0.220 ± 0.024	0.281 ± 0.024	1.28
3	<i>B. licheniformis</i> IB-P141 B21-1	0.265 ± 0.027	0.285 ± 0.027	1.08
4	<i>B. mannanilyticus</i> IB-OR17 B1	0.318 ± 0.047	0.038 ± 0.005	0.12
5	<i>B. thuringiensis</i> ВКМ В-387	0.457 ± 0.038 ³	4.609 ± 0.125 ⁴	10.09 (32) ⁵
6	<i>Cohnella</i> sp. IB-P192	0.240 ± 0.017	0.303 ± 0.010	1.26
7	<i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739	0.217 ± 0.016	0.328 ± 0.020	1.51
8	<i>P. illinoisensis</i> IB-1087	0.366 ± 0.024	0.528 ± 0.032	1.44
9	<i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A	0.095 ± 0.007	2.486 ± 0.644	26.17
Коэффициент корреляции по Пирсону между показателями активности		0.32332		–
Коэффициент корреляции обеих активностей по Пирсону (с показателем I_{ChiA})		–0.38531	0.6558	
Коэффициент детерминации r^2 Y-пересечение		0.148467 10.046	0.430109 0.8960	

¹ I_{ChoA} – относительный индекс хитозанолитической активности;

² оценка по скорости гидролиза растворимого/коллоидного хитозана с СД 85%;

³ индукция 0.25–1.0%-ным коллоидным хитином;

⁴ базовый уровень конститутивного синтеза в среде LB;

⁵ значение в скобках указано для соотношения уровня хитозаназной активности, индуцируемой в тех же условиях, что и аналогичная хитиназная активность.

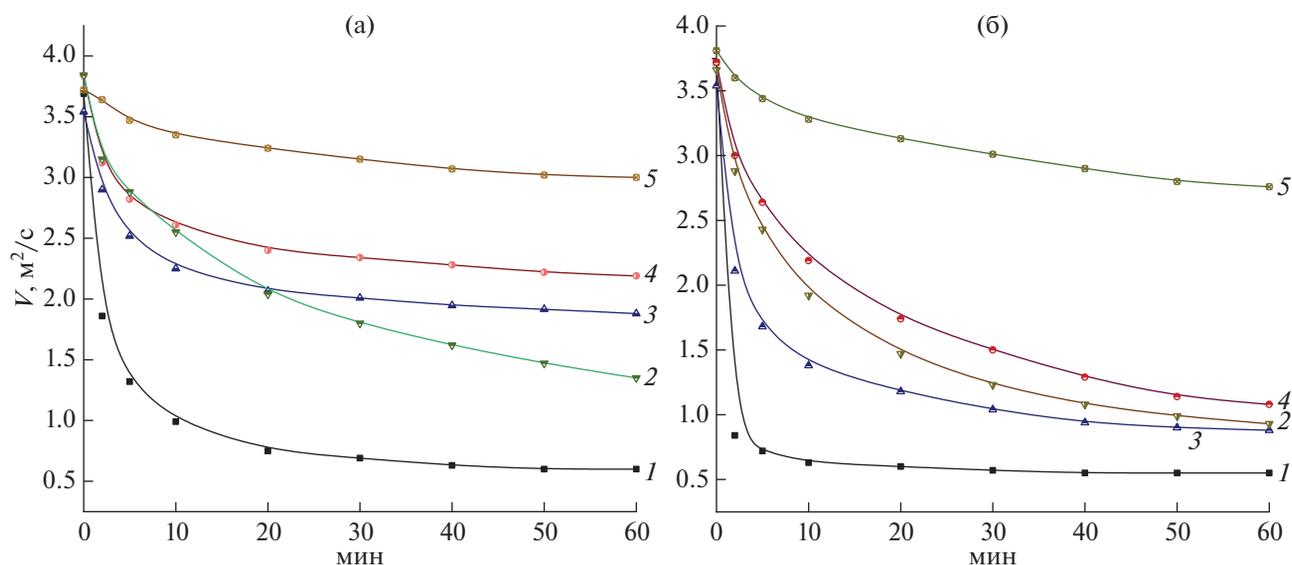


Рис. 2. Динамика снижения кинематической вязкости (V) 1.3%-ных растворов хитозана с СД 85% (а) и 50% (б) под действием препаратов КЖ штаммов: 1 – *B. thuringiensis* B-387 (ед./мг); 2 – *P. ehimensis* IB-739 (ед./мг); 3 – *Cohnella* sp. IB-P192 (ед./мг); 4 – *Penicillium* sp. IB-37-2A (ед./мг); 5 – *B. atropheaus* IB-33-1 (ед./мг). Объемное соотношение (об./об.) растворов фермента и субстрата – 1 : 60, 50°C, 50 мМ Na-ацетатный буфер, pH 6.0.

Глубина конверсии хитозана СД 85% до низкомолекулярных водорастворимых хитоолигосахаридов напрямую определялась уровнем хитозаназной активности ферментных препаратов ($R_{X,Y} = 0.83$; $r^2 \sim 0.68$), тогда как значения их хитиназной активности не оказывали существенного влия-

ния на степень гидролиза данного полисахарида ($R_{X,Y} = -0.04$; $r^2 \sim 0.001$) (табл. 2). Из табл. 3 видно, что при одинаковых объемных соотношениях (1 : 60) ферментных препаратов и раствора субстрата, показатели их индивидуального фермент-субстратного соотношения по хитозаназе могли

Таблица 2. Степень деструкции высокомолекулярного хитозана (СД 85%) и выход частично гидролизованного олигохитозанов при действии концентрированных ферментных препаратов различных штаммов (50°C, pH 5.5)

Фермент-субстратное соотношение, ед./г хитозана			Концентрация микробного белка в реакционной смеси, мг/мл	Степень конверсии хитозана за 1 ч, %*	Средний выход олигомерных продуктов, %**
об./об.	хитиназа	хитозаназ			
Штамм <i>B. atropheaus</i> IB-33-1					
1 : 120	3.2	0.5	0.44 ± 0.05	9.1 ± 1.1	91
1 : 60	6.4	1.1	0.89 ± 0.10	16.3 ± 1.5	84
Штамм <i>B. thuringiensis</i> B-387					
1 : 240	0.3	10.2	0.06 ± 0.005	95.3 ± 3.2	5
1 : 120	0.6	20.3	0.12 ± 0.010	97.3 ± 2.8	3
1 : 60	1.2	40.5	0.25 ± 0.018	97.6 ± 1.7	2
Штамм <i>Cohnella</i> sp. IB-P192					
1 : 60	1.6	0.2	0.28 ± 0.025	22 ± 2.1	78
Штамм <i>P. ehimensis</i> IB-739					
1 : 60	2.5	3	0.34 ± 0.027	31.2 ± 2.8	68
Штамм <i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A					
1 : 120	1.7	19	0.11 ± 0.014	37.2 ± 2.9	63
1 : 60	3.5	38	0.21 ± 0.016	51.2 ± 4.4	49

* Содержание продуктов глубокого гидролиза, не осаждаемых 0.5 М NaOH (низкомолекулярные хитоолигосахариды);
 ** Доля (по сухому веществу) частично гидролизованного олигомерного хитозана, осаждаемого 0.5 М NaOH.

Таблица 3. Молекулярно-массовые характеристики и относительный выход олигохитозанов, образуемых под действием ферментных комплексов исследуемых штаммов после 1 ч гидролиза хитозана (20 мг/мл, СД ~ 85%) при различной температуре и соотношении фермент : субстрат

Фермент-субстратное соотношение, ед./г хитозана			M _n ¹ , кДа	M _w ² , кДа	M _w /M _n ³	Выход, %
об./об.	хитиназа	хитозаназа				
Штамм <i>B. thuringiensis</i> В-387						
1 : 600 ⁴	0.02	0.5	22.7	46.2	2.03	44.2
1 : 120 ⁶	0.1	2.3	9.2	14.8	1.62	29.2
1 : 60 ⁴	0.2	4.6	10.7	16.7	1.55	30.0
Штамм <i>Cohnella</i> sp. IB-P192						
1 : 60 ⁴	1.3	0.2	30.5	70.6	2.32	58.3
Штамм <i>P. ehimensis</i> IB-739						
1 : 600 ⁴	0.2	0.2	35.9	90.1	2.51	70
1 : 120 ⁴	1	1.2	25.8	67.8	2.63	45.8
1 : 60 ⁴	1.9	2.3	15.2	27.1	1.79	55.0
Штамм <i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A						
1 : 240 ⁴	0.03	0.8	57.8	127.9	2.21	50.0
1 : 60 ⁵	0.1	3.1	41.2	97.1	2.36	61.7

¹ Среднечисловая молекулярная масса; ² средневесовая молекулярная масса; ³ индекс полидисперсности; ⁴⁻⁶ температура инкубации 50, 60 и 70°C соответственно.

различаться в 40 и более раз. Ферментный препарат *B. thuringiensis* В-387 осуществлял наиболее глубокий гидролиз хитозана СД 85% (95–97%) в течение 1 ч инкубации (50°C) при минимальной степени загрязнения реакционной смеси микробным белком (табл. 2). Высокую степень конверсии полимера (80–85%) показывал также ферментный комплекс *Penicillium* sp. IB-37-2A после 4-часовой обработки (данные не показаны). Как известно, продукты глубокого гидролиза хитозана, включая мономер и димер, не проявляют антибактериальной активности, а хитоолигосахариды со степенью полимеризации $n = 3-6$ показывают существенно меньший антимикробный эффект по сравнению с низкомолекулярным хитозаном [24]. С точки зрения выхода низкомолекулярного хитозана, эффективность конверсии исходного полисахарида показывала обратную зависимость от уровня хитиназной активности проверенных ферментных препаратов). Так, олигохитозан, осаждаемый 0.5 М раствором NaOH, практически отсутствовал при гидролизе хитозана (СД 85%) высокоактивным ферментным комплексом *B. thuringiensis* В-387 (табл. 2) в течение 1 ч (табл. 2).

Молекулярная масса (M_w) олигомерного хитозана является важным показателем эффективности ограниченного ферментативного гидролиза, определяющего ключевые функциональные характеристики продуктов реакции, такие как растворимость и антибактериальная и фунгицидная активность. Следует отметить, что по этому кри-

терию, комплексы гидролаз большинства исследуемых штаммов, при низком соотношении фермент : субстрат, показывали относительно слабую степень конверсии исходного полимера, образуя продукты в интервале молекулярных масс 67–128 кДа и индексов полидисперсности 2.2–2.6 (по данным ВЭЖХ, табл. 3). Олигомерные продукты гидролиза хитозана (СД 85%) ферментным комплексом штамма *B. atrophaeus* IB-33-1 не были нами исследованы в силу того, что он показывал наименьшую хитозан-деградирующую активность среди всех исследуемых культур. Высокоактивный комплекс *B. thuringiensis* В-387 при использовании более низких рабочих концентраций хитозаназы (2–5 ед./г субстрата) демонстрировал максимальную эффективность среди всех штаммов по показателям средневесовой молекулярной массы образуемых олигомеров (M_w ~ 15–17 кДа) при сравнительно невысоком выходе ~ 30% (табл. 3). Олигохитозаны с M_w 5–15 кДа являются наиболее функциональными водорастворимыми олигомерами хитозана в аспекте проявления антимикробной активности [1, 6, 12]. Всесторонний анализ влияния ключевых параметров ферментативной реакции (фермент-субстратное соотношение, температура, время, рН, ионная сила и т.д.) на показатели молекулярно-массового распределения продуктов гидролиза хитозана позволит в дальнейшем более детально оценить потенциал ферментных препаратов исследуемых штаммов при получении функцио-

Таблица 4. Минимальная ингибирующая концентрация хитозана (СД 85%) и олигомерных продуктов его гидролиза ферментными комплексами исследуемых штаммов (1 ч, 50°C)

Штамм-продуцент (соотношение фермент : субстрат)	МИК, мкг/мл			
	<i>Bacillus cereus</i> В-688	<i>Escherichia coli</i> IBG-9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IB-39D	<i>Enterobacter cloacae</i> IB-34 4CPA
Хитозан СД 85%	225 ± 35	45 ± 7	1250 ± 71	40 ± 7
Ферментативные гидролизаты 1%-ного хитозана (СД 85%)				
<i>B. atrophaeus</i> IB-33-1 (1 : 60)	425 ± 35	28 ± 4	900 ± 141	НД*
<i>B. thuringiensis</i> В-387 (1 : 240)	475 ± 35	28 ± 4	1250 ± 71	НД*
<i>Cohnella</i> sp. IB-P192 (1 : 60)	550 ± 71	НД ¹	900 ± 141	НД*
<i>P. ehimensis</i> IB-739 (1 : 60)	900 ± 141	23 ± 4	425 ± 35	28 ± 4
<i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A (1 : 120)	325 ± 35	28 ± 4	1000 ± 71	НД*
Коэффициент корреляции между значениями МИК и глубиной гидролиза хитозана, $r_{x,y}$	0.34	0.27	0.61	—

*Нет достоверных данных.

нальных хитоолигомеров с M_w 5–15 кДа. Предварительные данные показывают, что увеличение температуры инкубации с 50 до 70°C обеспечивало сходную эффективность конверсии хитозана (по показателям выхода и молекулярно-массового распределения) ферментным комплексом *B. thuringiensis* В-387 в условиях 2-кратного снижения его концентрации (табл. 3).

Проведена сравнительная оценка бактерицидной и фунгицидной активности суммарных гидролизатов 1%-ного хитозана, полученных при действии концентрированных ферментных комплексов (см. табл. 2). Активность олигомерных продуктов гидролиза в отношении штамма *B. cereus* В-688 заметно снижалась по сравнению с исходным полимером (табл. 4), при этом показатели минимальной ингибирующей концентрации суммарных гидролизатов коррелировали с глубиной гидролиза хитозана в незначительной степени ($r_{x,y} \sim 0.34$). Рост остальных штаммов бактерий, напротив, в целом более сильно подавлялся олигомерами, чем хитозаном (табл. 4). Если в отношении *E. coli* гидролизаты, полученные с помощью ферментных препаратов большинства тестируемых штаммов (*B. atrophaeus* IB-33-1, *B. thuringiensis* В-387, *P. ehimensis* IB-739 и *Penicillium* sp. IB-37-2A) показывали примерно одинаковую активность, то против *B. cereus* и *P. aeruginosa* наиболее эффективны были продукты ферментных комплексов *Penicillium* sp. IB-37-2A и *P. ehimensis* IB-739 соответственно (табл. 4). Фунгицидная активность ферментативных гидролизатов хитозана в значительной степени зависела от видовой принадлежности тестируемых штаммов

микромикетов, степени деацетилирования исходного полисахарида и метода оценки. При проведении эксперимента в планшетах, в интервале концентраций 25–150 мкг/мл, олигомерные продукты всех ферментных препаратов демонстрировали примерно одинаковую активность против фитопатогенных грибов *F. culmorum* и *R. solani*, тогда как подавление роста *F. oxysporum* заметно снижалось (на 30–40%) только у гидролизата *B. thuringiensis* В-387, что обусловлено, по видимому, более глубокой деструкцией хитозана (СД 85%) ферментным комплексом этого штамма (табл. 5). При деполимеризации хитозана (СД 50%) фунгицидная активность уменьшалась у гидролизатов *P. ehimensis* IB-739, *B. thuringiensis* В-387 и *Cohnella* sp. IB-P192, что также может быть связано с более глубоким гидролизом ими N-ацетилованного хитозана за счет совместного действия хитиназ и хитозаназ (табл. 5).

При оценке фунгицидной активности хитозана (СД 85%) и ХОС в агаризованной среде в отношении фитопатогена *B. sorokiniana* резкое снижение степени подавления роста гриба отмечалось у 1-часовых гидролизатов, полученных при действии препаратов с высокой активностью хитозаназ (штаммы *B. thuringiensis* В-387 и *Penicillium* sp. IB-37-2A) (рис. 3). В то же время, деструкция (1 ч) хитозана (СД 50%) комплексом *B. thuringiensis* В-387 с преимущественно эндо-хитозаназной активностью, в отличие от ферментных препаратов *B. atrophaeus* IB-33-1 и *Penicillium* sp. IB-37-2A, приводила к возрастанию фунгицидной активности олигомерных продуктов примерно на 30% по сравнению с исходным полисахаридом (рис. 3).

Таблица 5. Сравнительная степень подавления роста (72 ч, 28°C) штаммов фитопатогенных микромицетов одинаковыми концентрациями (150 мкг/мл) хитозанов со СД 85 и 50% и продуктов их ферментативного гидролиза (1 ч, 50°C) различными препаратами хитиназ/хитозаназ

Хитозаны и олигомерные продукты их гидролиза ферментными комплексами	Степень ингибирования роста тест-грибов, %		
	<i>Fusarium culmorum</i> F-844	<i>Fusarium oxysporum</i> F-137	<i>Rhizoctonia solani</i> F-895
Хитозан СД 85%	77 ± 6	79 ± 4	90 ± 5
Ферментативные гидролизаты 1%-ного хитозана (СД 85%)			
<i>B. atrophaeus</i> IB-33-1 (1 : 60)*	85 ± 4	80 ± 10	89 ± 4
<i>B. thuringiensis</i> B-387 (1 : 240)*	81 ± 6	56 ± 8	87 ± 7
<i>Cohnella</i> sp. IB-P192 (1 : 60)*	84 ± 6	70 ± 6	93 ± 2
<i>P. ehimensis</i> IB-739 (1 : 60)*	82 ± 6	76 ± 8	73 ± 7
<i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A (1 : 120)*	87 ± 4	77 ± 4	91 ± 5
Хитозан СД 50%	61 ± 6	71 ± 6	82 ± 4
Ферментативные гидролизаты 1%-ного хитозана (СД 50%)			
<i>B. atrophaeus</i> IB-33-1 (1 : 60)*	81 ± 7	78 ± 8	90 ± 9
<i>B. thuringiensis</i> B-387 (1 : 240)*	80 ± 5	54 ± 7	90 ± 10
<i>Cohnella</i> sp. IB-P192 (1 : 60)*	88 ± 4	60 ± 4	93 ± 2
<i>P. ehimensis</i> IB-739 (1 : 60)*	76 ± 5	52 ± 7	91 ± 9
<i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A (1 : 120)*	80 ± 5	71 ± 6	92 ± 9

* В скобках дано объемное соотношение растворов ферментного комплекса и субстрата (1% хитозан) в реакционной смеси, при котором был получен каждый гидролизат.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ферментные комплексы высокоактивных культур (*B. thuringiensis* B-387 и *Penicillium* sp. IB-37-2A), продуцирующих хитозаназы, более эффективно гидролизуют хитозан с СД 85 и 50%, по времени и глубине гидролиза, а также высокой растворимости олигомерных продуктов и меньшей степени загрязнения реакционной смеси микробными белками и метаболитами (табл. 2). Вместе с тем, ферментные препараты штаммов, синтезирующих преимущественно хитиназу (*B. atrophaeus* IB-33-1, *Cohnella* sp. IB-P192), либо незначительное количество эндохитозаназ (*P. ehimensis* IB-739), при сходных условиях реакции характеризуются более высокими показателями выхода и значений M_w олигомерных продуктов. В целом, суммарные смеси хитоолигосахаридов, полученные с помощью последних, демонстрируют более стабильную антибактериальную и фунгицидную активность по сравнению с олигомерами, образующимися под действием высокоактивных деградирующих хитозан комплексов. Глубокий ферментативный гидролиз хитозанов приводит, как правило, к заметному снижению их антимикробной активности. Однако, в отношении некоторых штаммов грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*) ферментативные гидролизаты хитозана показывают более высокую антибактериальную активность по сравнению с исходным хитозаном (СД 85%), что может быть связано с их специ-

ческой восприимчивостью к смесям хитоолигомеров. Отмечено заметное повышение фунгистатической активности по сравнению с исходным хитозаном (СД 50%) смеси его олигомеров, полу-

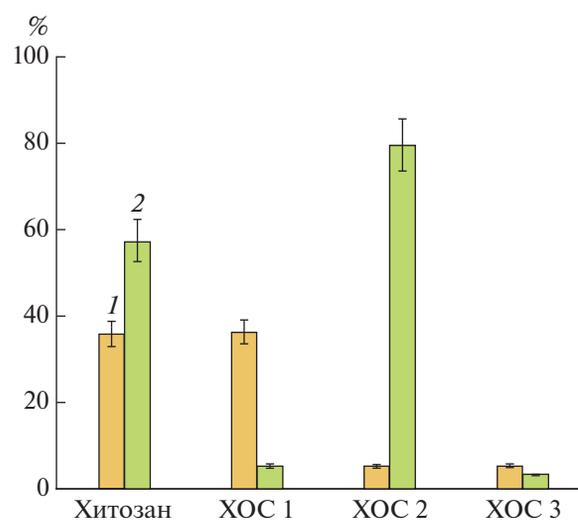


Рис. 3. Степень подавления радиального роста (%) микромицета *Bipolaris sorokiniana* в агаре (КГА, 28°C, 7 сут) в присутствии одинаковых концентраций (275 ± 35 мкг/мл) хитозанов с СД 85% (1) и СД 50% (2) и их гидролизатов, полученных при действии ферментных комплексов *B. atrophaeus* IB-33-1 (ХОС 1), *B. thuringiensis* B-387 (ХОС 2) и *Penicillium* sp. IB-37-2A (ХОС 3).

ченных под действием пяти ферментных препаратов (табл. 5) против некоторых штаммов микромицетов (*Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*). В то же время, в отношении гриба *Bipolaris sorokiniana* данный эффект отмечался только у продуктов гидролиза хитозана (СД 50%) ферментным комплексом *B. thuringiensis* В-387, что также может быть обусловлено специфической чувствительностью этого гриба к низкомолекулярным хитоолигосахаридам со значительным содержанием ацетилированных остатков. Оптимизация процесса ферментативной деструкции хитозана по ключевым параметрам (соотношение фермент:субстрат, время, температура и т.п.) позволит более эффективно регулировать получение целевых продуктов, в том числе, повысить выход олигомеров, демонстрирующих оптимальное соотношение таких характеристик, как растворимость и биологическая активность. С практической точки зрения наиболее перспективно применение высокоактивных комплексов хитозанолитических ферментов (например, *B. thuringiensis* В-387), поскольку эффективность гидролиза хитозана должна оцениваться на основе интегрального показателя, включающего не только выход целевых олигомеров и уровень их биологической активности, но и скорость реакции (длительность процесса), расход ферментного препарата, растворимость олигомеров, а также степень загрязнения продуктов микробным белком. С другой стороны, принимая во внимание постоянное расширение сведений о биологической активности хитоолигомеров, можно предположить, что в ближайшем будущем возникнет необходимость комбинированного применения ферментов, различающихся по специфичности и удельной активности, для направленного получения конкретного олигомера (или смеси олигомеров), обладающего определенными функциональными характеристиками.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90119, а также в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП “Агидель” УФИЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
2. Hamed I., Özogul F., Regenstein J.M. // Trends Food Sci. Technol. 2016. V. 48. P. 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>
3. Ghormade M., Pathan E.K., Deshpande M.V. // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 104(B). P. 1415–1421. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112>
4. Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С., Варламов В.П. // ЖМЭИ. 2009. № 5. С. 91–97.
5. Yilmaz Atay H.Y. Functional Chitosan. / Ed. S. Jana, J. Subrata. Syngapore: Springer Nature, 2019. P. 457–489. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7_15
6. Герасименко Д.В., Авдиенко И.Д., Банникова Г.Е., Зуева О.Ю., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 3. С. 301–306.
7. Hosseinejad M., Jafari S.M. // Int. J. Biol. Macromol. 2016. V. 85. P. 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>
8. Plyina A.V., Tikhonov V.E., Albulov A.I., Varlamov V.P. // Process Biochem. 2000. V. 35. № 6. P. 563–568. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00104-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00104-1)
9. Liaqat F., Eltem R. // Carbohydr. Polym. 2018. V. 184. № 15. P. 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.067>
10. Liang S., Sun Y., Dai X. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 8. P. 2197. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19082197>
11. Tokura S., Ueno K., Miyazaki S., Nishi N. // Macromol. Symp. 1997. V. 120. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1002/masy.19971200103>
12. Park Y., Kim M.H., Park S.C., Cheong H., Jang M.K., Nah J.W., Hahn K.S. // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 18. № 10. P. 1729–1734.
13. Lin S.-B., Lin Y.-C., Chen H.-H. // Food Chem. 2009. V. 116. № 1. P. 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.002>
14. Sánchez Á., Mengíbar M., Rivera-Rodríguez G., Moerschbacher B., Acosta N., Heras A. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 157. P. 251–257.
15. Jung W.-J., Park R.-D. // Mar. Drugs. 2014. V. 12. № 11. P. 5328–5356. <https://doi.org/10.3390/md12115328>
16. Aam B., Heggset E., Norberg A., Sørli M., Vårum K., Eijsink V. // Mar. Drugs. 2010. V. 8. № 5. P. 1482–1517. <https://doi.org/10.3390/md8051482>
17. Актуганов Г.Э., Сафина В.Р., Галимзянова Н.Ф., Кузьмина Л.Ю., Гильванова Е.А., Бойко Т.Ф., Мелентьев А.И. // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. С. 599–609. <https://doi.org/10.1134/S0026365618050026>
18. Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Терегулова Г.А., Мелентьев А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 5. С. 520–526. <https://doi.org/10.7868/S0555109916050020>
19. Sørli M., Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Eijsink V.G.H. // React. Funct. Polym. 2020. V. 148. P. 104488. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104488>
20. Aktuganov G.E., Galimzianova N.F., Gilvanova E.A., Pudova E.A., Kuzmina L.Yu., Melentiev A.I., Safina V.R. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 35. № 2. P. 1–13. <https://doi.org/10.007/s11274-019-2590-4>

21. Viens P., Lacombe-Harvey M.-E., Brzezinski R. // *Mar. Drugs*. 2015. V. 13. № 11. P. 6566–6587. <https://doi.org/10.3390/md13116566>
22. Ильина А.В., Варламов В.П., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2001. Т. 37. № 2. С. 160–163. <https://doi.org/10.1023/A:1002867412442>
23. Pagnocelli M.G.B., De Araujo N.K., Da Silva N.M.P., De Assis C.F., Rodrigues S., De Macedo G.R. // *Bras. Arch. Biol. Technol.* 2010. V. 53. № 6. P. 1461–1468. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000600023>
24. Hadwiger L.A., Ogawa T., Kuyama H. // *MPMI*. 1994. V. 7. № 4. P. 531–533. <https://doi.org/10.1094/mpmi-7-0531>

Chitosan Depolymerization Efficiency by Microbial Chitinases and Chitosanases in Viewpoint of Antimicrobial Effect Displayed by Generated Chitoooligomers

V. R. Safina^a, A. I. Melentiev^a, N. F. Galimzianova^a, E. A. Gilvanova^a, L. Yu. Kuzmina^a, S. A. Lopatin^b, V. P. Varlamov^b, Andr. H. Baymiev^c, and G. E. Aktuganov^{a,*}

^aUfa Institute of Biology of Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, 450054 Russia

^bThe Institute of Bioengineering of Federal Research Centre “Fundamentals principles of Biotechnology” of the RAS, Moscow, 117312 Russia

^cInstitute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: glaekt@anrb.ru

The specific features of chitosan (DD 85%) enzymatic degradation by the microbial chitinases and chitosanases were studied in terms of the conversion degree, molecular weight distribution (MWD) and antimicrobial activity of generated reaction products. The enzyme complex produced by the *B. thuringiensis*, strain B-387, indicating highest chitosanase production ($>4.5 \text{ U mL}^{-1}$), highly extensively degrades the polymer to soluble low-molecular weight chitoooligosaccharides (CHOs, $M_w \leq 2 \text{ kDa}$) along with minor yield (~5%) of alkali-precipitated oligochitosans ($M_w 2\text{--}16 \text{ kDa}$). Hydrolytic complexes produced by the *B. atrophaeus*, strain IB-33-1, and *Cohnella* sp., strain IB-P192, comprising mainly chitinases ($0.3\text{--}0.5 \text{ U mL}^{-1}$), demonstrate the lowest rate and degree of chitosan (DD 85%) hydrolysis. The selection of enzyme : substrate ratio within range of $2\text{--}5 \text{ U g}^{-1}$ (based on chitosanase activity) under $50\text{--}70^\circ\text{C}$ indicates optimal values of the reaction rate and MWD of resulting oligomers ($M_w \sim 15\text{--}17 \text{ kDa}$, yield 30%) for chitosan (DD 85%) depolymerization by the enzyme complex from *B. thuringiensis* B-387. The selection of the enzyme: substrate ratio in the range of $2\text{--}5 \text{ units/g}$ (based on chitosanase) made it possible to reduce the hydrolysis depth of the initial polymer and to increase yield of oligochitosans with $M_w \sim 15\text{--}17 \text{ kDa}$ to 30% for chitosan (DD 85%) depolymerization by the enzyme complex from *B. thuringiensis* B-387. Bactericidal and fungicidal effect of oligomers formed during the destruction of chitosan of varying deacetylation degree (DD 85 and 50%) by the enzyme complexes displaying high chitosanase activity, as a rule, drops more distinctly than when using the chitinases. However, in some cases, there is both nonspecific and specific enhancement of antimicrobial action of hydrolytic products in comparison with the initial polymer, which is determined by individual sensitivity of bacterial and micromycetes strains.

Keywords: enzymatic depolymerization of chitosan, bioactive chitoooligosaccharides, chitinolytic enzymes, chitosanase, antimicrobial activity