

УДК 635.8:582.28: 547.995.12

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ВЫДЕЛЕНИЮ И МОДИФИКАЦИИ МАКРОМОЛЕКУЛ ХИТИНА И ХИТОЗАНА ВЫСШИХ ГРИБОВ ДЛЯ ИХ ПРИКЛАДНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

© Д.В. Минаков^{1*}, Е.Ю. Егорова², В.И. Маркин¹, Н.Г. Базарнова¹

¹ Алтайский государственный университет, пр. Ленина, 61, Барнаул,
656049 (Россия), e-mail: MinakovD-1990@yandex.ru

² Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова, пр. Ленина, 46, Барнаул, 656038 (Россия)

Обзор посвящен обобщению научных данных в области химической структуры и свойств хитина и хитозана, полученных из биомассы грибов, и анализу направлений их модификации для использования в медицине и пищевой промышленности в качестве веществ с антибактериальной, противовирусной, ранозаживляющей и антикоагулянтной активностью. Освещены особенности биосинтеза хитина грибами отделов *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Deuteromycota* и биосинтеза хитозана грибами отдела *Zygomycota*. Показано, что высшие грибы содержат хитин в своих клеточных стенках в виде хитин-глюканового комплекса, низшие (зигомицеты) – в форме хитозан-глюкана. Определены эффективные компоненты субстратов, влияющие на продуцирование полисахаридов грибами – углеводы в виде глюкозы, сахарозы и мальтозы, органические формы азота в виде дрожжевого экстракта и кукурузной муки, минеральные компоненты в виде дигидрофосфата и моногидрофосфата дикалия. Особое внимание уделено аспектам выделения хитина, его направленной химической модификации до хитозана, карбоксиметил- и сульфопроизводных хитиновых полимеров. Описаны биологические свойства и применение основных производных. Показано, что свойства и область применения карбоксиметилпроизводных хитина и хитозана в значительной степени зависят от их структуры, степени замещения и расположения гидроксильных и аминогрупп. Основными реагентами при получении карбоксиметилпроизводных являются монохлоратетат натрия, монохлоруксунная и глиоксалеваая кислоты, выбор соответствующих условий реакции и реагентов позволяет получить карбоксиметилхитин, N-, O-, N,O-карбоксиметилхитозаны или N,N-дикарбоксиметилхитозан. Карбоксиметильные производные хитина и хитозана находят применение в составе систем доставки лекарств, противомикробных средств, в тканевой инженерии, в качестве компонентов некоторых косметических средств и продуктов питания. Основными сульфорирующими агентами являются олеум, пиридин и хлорсульфоновая кислота, такая модификация позволяет получать 2-N-, 6-O-, 2-N-6-O- и 3-O-сульфаты хитозана. Сульфопроизводные хитина и хитозана могут быть использованы в качестве основы для получения гемосовместимых материалов (с антитромботической и антибактериальной активностями).

Ключевые слова: высшие грибы, биополимеры, полисахариды, хитин, хитозан, глюкозамины, модификация, биологическая активность.

Введение

За два последних десятилетия мировое производство съедобных грибов демонстрирует четкую положительную динамику с увеличением тоннажа в несколько раз [1]. Основной прирост отмечается по широко культивируемому в странах Европы шампиньону двуспоровому (*Agaricus bisporus*, около 32% мирового про-

Минаков Денис Викторович – кандидат биологических наук, доцент кафедры органической химии,
e-mail: MinakovD-1990@yandex.ru

Егорова Елена Юрьевна – заведующая кафедрой технологии хранения и переработки зерна, доктор технических наук, доцент, e-mail: egorovaeyu@mail.ru

Маркин Вадим Иванович – кандидат химических наук, доцент кафедры органической химии,
e-mail: markin@chemwood.asu.ru

Базарнова Наталья Григорьевна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой органической химии, e-mail: bazarnova@chem.asu.ru

изводства грибов), шиитаке (*Lentinus edodes* (Berk.) Pegler) и мейтаке (*Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) Gray) – видам, традиционно выращиваемым в Китае и ряде других восточных стран, и вешенке обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*), выращиваемой в промышленных масштабах в нескольких странах мира [2]. Основной причиной такой динамики называется рост информированности потребителей о роли компонентов грибов в структуре рациона и так называемом «здоровом питании» [3].

* Автор, с которым следует вести переписку.

Одним из наиболее ценных компонентов химического состава грибов, обладающих выраженными биологическими эффектами, считается хитин-глюкановый комплекс (ХГК или СГС) – комплекс специфичных производных глюканов, ковалентно связанных с хитином и составляющих основу клеточных стенок высших базидиальных грибов [4–6]. В структуре клеточной стенки хитин относится к числу основных компонентов [7]. Кроме плодовых тел и мицелия, хитин содержится в спорах и клеточных стенках гифов, в составе микрофибрилл, обеспечивающих специфичную морфологию и жесткость клеточной стенки. Целым рядом исследований было показано, что полисахариды высших грибов, в том числе из *A. bisporus*, эффективно выполняют функции пребиотиков [8–13]. Кроме того, хитин и его деацетилированное производное хитозан считаются наиболее хорошо изученными и наиболее активными веществами грибного происхождения, обладающими противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами [14–16].

Важно отметить, что наращивание объемов производства культивируемых грибов сопровождается и ростом побочных продуктов и отходов, суммарная доля которых составляет от 5 до 20% объема производства самих грибов [17]. Так, только производство шампиньонов (*A. bisporus*) ежегодно приводит к образованию около 50 тыс. тонн отходов [18]. Эти отходы являются быстро портящимися объектами с высокой активностью собственных ферментов (в частности тирозиназы), представляя одну из экологических проблем для перерабатывающих предприятий [4], но при этом – и бесплатный естественный источник биологически активных полисахаридов. Таким образом, ежегодный прирост объемов грибных отходов свидетельствует о необходимости поиска эффективных технологий выделения и очистки хитина и хитозана и их рационального использования.

Хитин и хитозан являются природными биополимерами, получаемыми не только из грибной биомассы, но преимущественно из панцирей ракообразных, экзоскелетов насекомых и моллюсков [19, 20]. Однако известные обзоры, посвященные особенностям строения, структуры и свойств хитина и хитозана, обобщают информацию преимущественно о соединениях, выделенных из насекомых, гидробионтов и низших грибов.

Все вышесказанное послужило основанием для обобщения ранее опубликованных научных данных о методах выделения и доказанных свойствах хитина и хитозана. Целью представленной работы стала систематизация научных данных в области получения хитина и хитозана из биомассы грибов, модификации их структуры и обусловленных ею биологических свойств, а также выявление механизмов возможной взаимосвязи химической и ферментативной модификации азотсодержащих полисахаридов с проявляемой ими биологической активностью.

Основная часть

Хитин – линейная макромолекула, состоящая преимущественно из N-ацетилглюкозаминовых мономеров (рис. 1). Хитин грибов, как и хитин ракообразных, имеет подобную целлюлозе молекулярную структуру, основное отличие состоит в замещении гидроксильной группы С2 целлюлозы на ацетамидную группу.

Хитин считается вторым по распространенности на земле биополимером (после целлюлозы), с ежегодным биосинтезом в объеме более 100 млрд т [21]. В процессе роста насекомых, ракообразных и грибов хитин ферментативно синтезируется из гликогена (рис. 2). Первым этапом является катализ гликогена фосфорилазой, после чего гликоген превращается в глюкозо-1-фосфат. В присутствии фосфомутазы образуется глюкоза-6-фосфат, преобразующийся гексокиназой во фруктозу-6-фосфат. На следующем этапе фруктоза-6-фосфат через последовательное аминирование и ацетилирование преобразуется в N-ацетилглюкозамин. Стадия изомеризации заключается в катализируемом фосфо-N-ацетилглюкозаминмутазой переносе фосфата с углерода С6 на С1. Далее из уридинтрифосфата (UTP) образуется N-ацетилглюкозамин уридиндифосфата (UDP). И, наконец, из UDP N-ацетилглюкозамина трансмембранными хитинсинтазами катализируется образование хитина [20, 22], который впоследствии в клетках членистоногих образует ассоциаты с белками, а в клетках грибов – с другими углеводами [23]. В клетках низших грибов образующиеся хитиновые цепи сразу частично деацетируются хитиндеацетилазами, действующими одновременно с хитинсинтазами [24].

Хитозан представляет собой линейный биополимер из β -(1-4)-D-глюкозаминовых звеньев (GlcN), его получение из хитина в клеточной стенке низших грибов катализируется хитиндеацетилазой [25]. В отличие от целлюлозы, содержание азота в хитине и хитозане составляет 5–8%, что обеспечивает им особые биологические функции и реакционную способность [18]. Однако наличие аминных и гидроксильных групп на каждом деацетилированном звене делает хитозан химически и биологически более активным, чем хитин. Различные физико-химические модификации этих реакционноспособных групп позволяют дополнительно изменять физико-механические и биологические свойства хитозана [26].

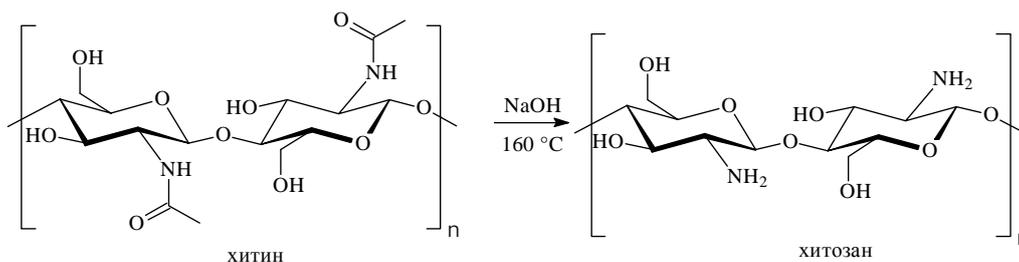


Рис. 1. Схема получения хитозана

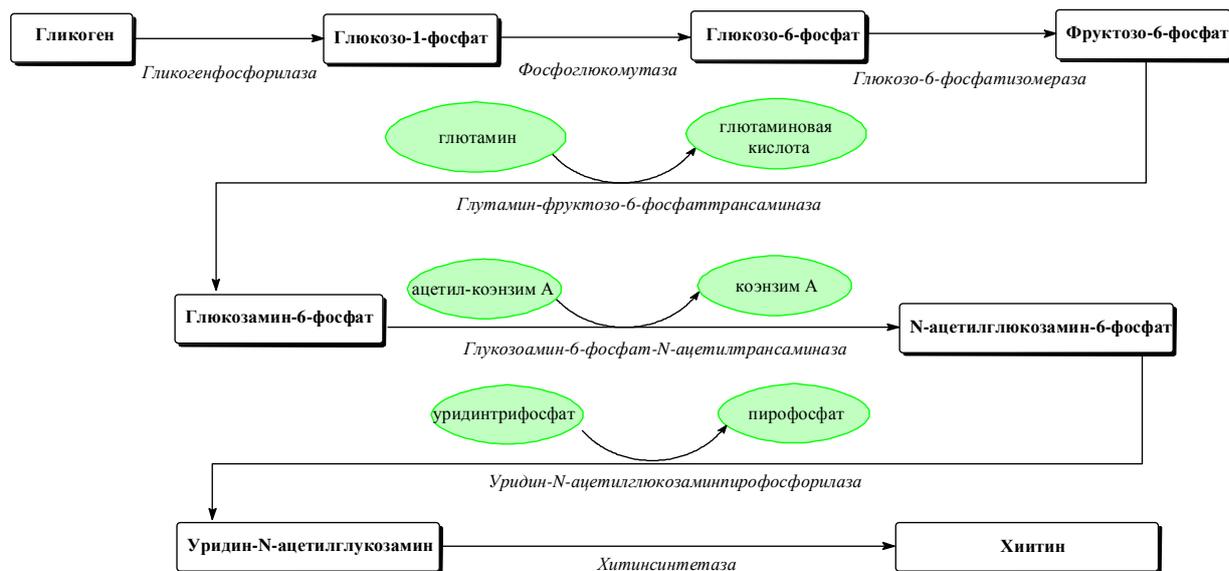


Рис. 2. Этапы биосинтеза хитина, цитируется по [25]

Как в ракообразных, так и в грибах хитин находится в полиморфной форме. Ключевое отличие хитина грибов от хитина насекомых и гидробионтов заключается в том, что ковалентная связь хитина с глюканами, имеющими (1→3) гликозидные связи и боковые ответвления в положении (1>6) и отщепляемыми при кислотной обработке, в грибах – более прочная [27, 28]. В панцирях ракообразных и чешуе насекомых хитин находится в форме минерально-белковых комплексов, начинающих гидролизываться уже в процессе экстракции хитина, но разрушаемых полностью только после щелочного гидролиза и последующей кислотной деминерализации, применяемой с целью удаления минеральных составляющих – преимущественно карбонатов и фосфатов кальция [18, 23, 29]. Тем не менее по окончании всех обработок структура хитина грибов становится подобной структуре хитина ракообразных [30].

Считается, что наличие хитина повышает целостность и прочность клеточной стенки ткани высших и низших грибов и обеспечивает ее механическую защиту от разрушения и резких перепадов температур [31–33]. Несмотря на то, что пределы варьирования хитиновой составляющей в грибах составляют от 8 до 43%, а в мицелии – от 5 до 35% [30], хитин и хитозан являются компонентами клеточной стенки не всех грибов. Высшие грибы содержат хитин в своих клеточных стенках в виде хитин-глюканового комплекса, низшие (например, зигомицеты) – в форме хитозан-глюкана [34, 35]. Биосинтез хитозана грибами является результатом работы двух ферментов – хитинсинтазы и хитиндеацетилазы. Первый отвечает за биосинтез хитина, второй катализирует реакцию деацетилирования. Уридин-дифосфо-N-ацетилглюкозамин (UDP-GlcNAc) является доминирующим донором глюкозила для образования хитина. Считается, что эта реакция в клетках грибов происходит вблизи плазматической мембраны, где хитинсинтазы высвобождают UDP-GlcNAc из цитоплазмы и присоединяют его к хитиновой цепи, которая одновременно направляется к клеточной стенке [24, 25]. В клетках грибов хитинсинтаза хранится в субклеточных органеллах, называемых хитосомами. До 2/3 хитосом состоят из белка (хитинсинтазы), а оставшаяся часть – из липидов. В хитосомах хитинсинтаза находится в зимогенной форме, и для ее активации необходим частичный протеолиз. Синтез

хитина в клетках задерживается из-за этой зимогенности до тех пор, пока хитосомы не достигнут определенного места на поверхности клетки, где будет формироваться клеточная стенка [31]. Как только хитосомы достигают плазматической мембраны, хитинсинтаза активируется, и каждая субъединица хитосомы начинает синтезировать новую хитиновую цепь. Хитосомальные хитинсинтазы (субъединицы), достигающие поверхности клетки, могут либо оставаться прочно связанными в комплексе, либо диспергироваться. Когда хитинсинтазы остаются связанными, растущие цепи хитина располагаются близко друг к другу и поэтому могут непосредственно кристаллизоваться в длинные микрофибриллы. Однако когда хитинсинтазы переходят в дисперсную форму на поверхности клетки, хитиновым цепям требуется больше времени для кристаллизации и, следовательно, стадия их зарождения продлевается. После синтеза хитина хитиндеацетилаза, расположенная в клеточной стенке, атакует вновь сформированный хитин с образованием хитозана. Однако этот фермент неэффективен в отношении кристаллического хитина, и, следовательно, только цепи хитина, образующиеся из диспергированной хитинсинтазы, подвержены деацетилированию в хитозан. Поскольку хитозана в клеточной стенке грибов-зигомизетов больше, чем хитина, по-видимому, основная часть хитинсинтазы действует в диссоциированной форме на плазматической мембране этих грибов [34, 35].

Количество хитина в клеточной стенке грибов зависит от вида, условий окружающей среды и возраста. Так, например, по результатам исследований разными авторами разных проб шампиньона (*A. bisporus*), плодовые тела этого гриба могут содержать хитина от 13.3 до 17.3%, 35%, от 20 до 38%, 43% [7]. Такое разнообразие значений по содержанию хитина можно объяснить тем фактом, что его количество значительно меняется в течение жизненного цикла гриба, а также за время хранения после сбора. Отмечается также, что для достижения максимального выхода хитина и хитозана грибы следует собирать на поздней фазе экспоненциального роста [36].

Содержание хитина в грибной массе может варьировать и в зависимости от метода и условий культивирования грибов [37]. В условиях искусственного культивирования основные различия в метаболической активности, а следовательно, и в продуктивности синтеза хитина грибом возникают в основном вследствие изменений субстрата и условий окружающей среды. При глубинном выращивании упрощается процедура наращивания грибной биомассы и получения из нее хитина и хитозана [22, 38].

Как содержание, так и характеристики полисахаридов во многом зависят от вида и штамма грибов и условий ферментации (температуры, освещенности, аэрации, состава и pH субстрата). Показано, что некоторые штаммы шиитаке (*Lentinus edodes*), трутовика лакированного (*Ganodem lucidum*) и кринипеллиса шероховатого (*Crinipellis chevchenkovi*) в условиях погруженной культуры способны синтезировать до 8.0 г/л экзополисахаридов и 8–10 г эндополисахаридов на каждые 100 г биомассы [39]. Как правило, биосинтез полисахаридов достигает своего оптимального уровня в условиях хорошего кислородного снабжения. Однако существует определенный предел, после которого биосинтез полисахаридов снижается. Для большинства видов грибов в качестве интервала температур, оптимального для интенсивного синтеза полисахаридов, указывается 22...30 °С. pH субстрата является еще одним фактором, влияющим на выработку полисахаридов грибами: изменение pH среды индуцирует производство полимеров с различной молекулярной массой. При этом в отличие от «быстрого» синтеза полисахаридов бактериями грибам требуется более длительное время инкубации [40]. Так, в условиях погруженной культуры антродии камфорной (*Antrodia cinnamomea*) установлено, что с увеличением продолжительности ферментации молекулярная масса синтезируемых полисахаридов может снижаться.

Еще одним критическим фактором, определяющим продуцирование полисахаридов, является вид и концентрация входящих в субстрат углеводов, используемых грибами в качестве основного источника углерода. Хотя в большинстве случаев характеристики синтезируемых грибами полисахаридов не связаны с видом вводимых в состав субстрата углеводов, интенсивность их выработки мицелием существенно зависит от используемого источника углерода и его дозировки в субстрате.

Для интенсификации роста мицелия и выработки полисахаридов многие исследователи добавляли к традиционному субстрату дополнительные источники углеводного и азотного питания. Целым рядом работ показано, что оптимальным является введение в питательную среду от 30 до 60 г/дм³ углеводов. В качестве рекомендуемых углеводных добавок чаще всего указываются глюкоза, сахароза и мальтоза, но для некоторых видов грибов выявлены однозначные предпочтения в отношении углеводов. Так, для большинства видов высших грибов синтез полисахаридов на субстрате с мальтозой – выше, по сравнению с использованием сахарозы, а для шиитаке и вешенки характерна максимальная интенсивность синтеза полисахаридов при

внесении в культуральные среды в качестве источника углерода глюконата натрия. Наличие подобной зависимости поясняется тем, что разные виды и штаммы грибов по-разному метаболизируют углеводы, то есть с вероятностью катаболической репрессии различных сахаров при синтезе грибами специфичных по структуре и молекулярной массе полисахаридов [40].

Выработку грибами полисахаридов стимулирует и усиление азотного питания. При наличии неорганических источников азота грибы производят меньше полисахаридов по сравнению с использованием органических форм азота. Наиболее универсальными азотными добавками, способствующими усилению биосинтеза полисахаридов разными видами высших грибов, показали себя дрожжевой экстракт и кукурузная мука, относительно эффективным является использование аммонийных солей и мочевины [40, 41]. Вне зависимости от вида источника азотного питания, достаточной признана концентрация азота в культуральной среде в пределах 1–10 г/дм³ [40]. Следствием усиления азотного питания является не только усиление синтеза хитина, но и расширение диапазона молекулярных масс этого полимера [42].

Важным дополнением к питанию, необходимым грибам для синтеза полисахаридов, считается наличие в субстрате источника фосфора, что объясняется участием фосфора в синтезе соединений – предшественников глюкозаминов (рис. 2). Как наиболее эффективные фосфатные добавки отмечены дигидрофосфат и моногидрофосфат дикалия [40]. В ряде случаев дополнительные положительные эффекты наблюдались при введении в питательную среду других минеральных солей и органических добавок – таких как витамины, аминокислоты, определенные жирные кислоты или жирное масло и др. Можно предположить, что некоторые из отмеченных эффектов могут быть связаны с синтезом полисахаридов грибами не напрямую, а опосредованно, посредством участия этих веществ в синтезе необходимых для выработки хитина ферментов.

Физико-химические свойства и, соответственно, биологическая активность хитина и хитозана определяются природой хитинсодержащего сырья, но в значительной мере также связаны со способом их выделения из природных источников и последующей очистки, что сопровождается получением продукта с разной конформацией и степенью деацетилирования.

Отдельные неразветвленные цепи макромолекулы хитина имеют линейную, спиралеподобную структуру, каждый из витков которой имеет диаметр 10.0–10.49 Å вдоль условной «оси» цепи. В нативном состоянии этого полимера отдельные звенья 2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозы, соединенные между собой 1,4-β-гликозидной связью, развернуты в структуре молекулы хитина друг относительно друга на 180° [(GlcNAc)₂] [43]. Такая спиралеподобная структура микрофибрилл хитина обеспечивает им высокую прочность и эластичность.

В зависимости от ориентации боковых ответвлений различают три природных разновидности хитина, различающиеся по расположению и полярности соседних цепей: α-, β- и γ-формы [44, 45]. Наиболее кристаллической, нерастворимой, химически стабильной и распространенной в природе формой считается α-хитин [46–48], мономер которого имеет орторомбическую форму и состоит из двух N,N'-диацетилхитобиозных звеньев, образующих две антипараллельные цепи [49]. Это определяет способность α-хитина образовывать дополнительные внутримолекулярные водородные связи и относительную плотность образующейся структуры.

В составе β-хитина элементарным звеном является N,N'-диацетилхитобиоза, формирующая полимер в виде жесткой и негибкой ленты из параллельных цепей за счет более слабых межмолекулярных связей O3→O5 N-связей [50], вследствие чего β-хитин, как правило, более реакционноспособен [51]. И, наконец, γ-хитин является алломорфом, в котором сочетаются две параллельные и одна антипараллельная цепи [52].

В животном и грибном сырье хитин естественным образом связан с другими полимерами, такими как белки или глюканы, на долю которых часто приходится более половины массы хитинсодержащей ткани [53], эта связь может быть как ковалентной, так и ассоциативной [49]. Наличие разных форм хитина в одном организме связывается со спецификой физиологических функций, выполняемых этими формами хитина.

Хитин выделяют, как правило, щелочным гидролизом, после промывки и гомогенизации сырья. Повышение концентрации растворов щелочи обеспечивает прямое деацетилирование хитина [54]. При этом для выделения хитина из ракообразных требуется от 17 до 72 ч, включая 1–24 ч деминерализующей обработки соляной кислотой и 16–48 ч щелочного гидролиза-депротеинирования; деацетилирование в 40% растворе гидроксида натрия при 120 °С в течение 1–3 ч дает 70% деацетилированного хитозана [23].

По сравнению с ракообразными грибы содержат меньше хитина (в среднем, до 26% от общей биомассы грибов, в виде хитин-глюканового комплекса), однако выделение хитина и хитозана из грибной биомассы представляет безусловный научный и коммерческий интерес [55, 56], что объясняется отсутствием сезонности

и региональной изменчивости (при условии промышленного культивирования) и более простой технологией извлечения. В частности, отсутствием необходимости агрессивной кислотной обработки, необходимой для очистки и деминерализации хитина ракообразных [47, 57], поскольку твердое роговое вещество ракообразных только в поверхностном слое представляет собой хитин-карбонат кальция, а внутренние его структуры содержат также белок, который невозможно полностью удалить без кислотной деминерализации [58].

Основная биологическая активность полисахаридов высших грибов, представляющих собой линейные или разветвленные β -D-глюканы либо их комплексы с белками, заключается в активации макрофагов, являющихся первым звеном в каскаде иммунных реакций и отвечающих за продуцирование цитокинов – естественных регуляторов иммунной системы [39]. Молекулярная масса, степень ацетилирования и распределение заряженных групп в хитине и хитозане грибоного происхождения потенциально отличаются от таковых в ракообразных, что обуславливает широту функциональных свойств и более высокую биологическую активность полисахаридов [7]. В грибах жесткая структура хитина дополнена более «гибким» и разветвленным глюканом, обеспечивающим естественную прочность и жесткость волокон хитина в грибной биомассе [59]. Хитину грибов в большей степени присущ β -полиморфизм (а соответственно, и более высокая реакционная способность, по сравнению с α -хитином), зависящий от условий выделения и степени полимеризации [23, 30]. В свою очередь, грибной хитозан рассматривается как полимер с колоссальным биологическим потенциалом из-за его свободных аминогрупп, обеспечивающих поликатионную, хелатообразующую активность и диспергирующие свойства наряду с хорошей растворимостью в разбавленных кислотах, например, в уксусной кислоте [36].

Для выделения хитина из грибов используют мицелиальную биомассу и плодовые тела. Получение хитина и хитозана из биомассы грибов имеет большое преимущество в получении продуктов со стабильным составом и свойствами, при относительной простоте технологии выделения [5]. На этапе щелочного гидролиза-деацетилирования обеспечивают условия, исключающие контакт реакционной смеси с кислородом воздуха, для чего реакционную смесь продувают азотом либо добавляют NaBH_4 , чтобы контролировать нежелательную деполимеризацию и производство реакционноспособных веществ [23].

Во многих работах показано, что антимикробная и фунгицидная активность хитина и хитозана, как и некоторые другие виды проявляемой ими биологической активности, взаимосвязана с молекулярной массой этих полисахаридов, а не только с наличием определенных функциональных групп. В исследованиях полисахаридов низших грибов установлено, что большую антимикробную активность проявляет хитозан с более низкой молекулярной массой [60–62]. Это объясняется тем, что меньшие по размеру молекулы легче проникают через клеточную мембрану бактерий, ингибируя транскрипцию РНК, чем вызывают подавление роста и гибель клеток [63, 64]. Другая теория объясняет антимикробное и антигрибковое действие хитозана его поликатионной природой, вызывающей изменение проницаемости клеток и провоцирующей тем самым утечку внутриклеточных компонентов из-за взаимодействия с компонентами клеточной мембраны или активными компонентами содержимого бактериальных клеток, что также приводит к их гибели [65, 66]. В частности, в грибковом патогене *Botrytis cinerea* хитозан обладает способностью подавлять активность полигалактуроназы, что вызывает цитологические повреждения гифов [18].

Молекулярная масса выделенных из природного сырья хитина и хитозана может варьировать от 50 до 2000 кДа [23, 67, 68], в качестве одной из основных причин такого разброса молекулярных масс указывается применение в процессе выделения этих полисахаридов агрессивных химических реагентов – щелочей и минеральных кислот, способных вызвать разрушение цепей хитина.

Наряду с взаимосвязью биологической активности с молекулярной массой хитина и хитозана многие биологические свойства полисахаридов связаны с зарядом аминогрупп, поэтому количество и распределение ацетильных групп в полимерной цепи также влияют на активность этих соединений. Считается, что именно наличие положительного заряда и связанной с этим способности к хелатообразованию обеспечивает хитозану широту ингибирующего действия в отношении вирусов, бактерий, дрожжей и плесеней [26, 69, 70]. Увеличение доли положительно заряженных катионных групп в полимерной цепи полисахарида обуславливает взаимодействие с отрицательно заряженной поверхностью бактерий, что ингибирует рост микроорганизмов [71–73]. Увеличение степени деацетилирования, отражающей долю свободных аминогрупп в молекуле хитина, сопровождается повышением вязкости, что усиливает проявление ингибирующей активности хитозана [23]. Как следствие, хитозан с почти предельно высокой степенью деацетилирования (97.5%) имеет более высокую плот-

ность положительного заряда по сравнению с повышенной степенью деацетилирования (83.7%), что сопровождается и проявлением более выраженных антимикробных свойств. Хелатирующей способностью объясняется и наличие у полисахаридов свойств антиоксидантов, обусловленных связыванием ионов металлов, способных катализировать окислительные процессы [74, 75].

Из разных источников в различных условиях выделены полисахариды с разной степенью деацетилирования, обусловленной разным соотношением хитина и его деацетилированной формы – хитозана [76]. Специфичное аксиально-экваториальное положение ацетамидной и гидроксильной групп (C2 и C3) обуславливает определенную устойчивость ацетамидных групп хитина к гидролитическому отщеплению, в том числе в условиях повышенных значений pH [46]. И хотя для деацетилирования хитина могут быть использованы как концентрированные растворы кислот, так и растворы щелочи, тот факт, что гликозидные связи более уязвимы к кислотам, способным повредить линейную цепь полимера, деацетилирование хитина растворами щелочи применяется значительно чаще [47, 77]. К другим агрессивным факторам, способным повредить полимерную цепь хитозана и повлиять на его активность, относят высокие температуры и давление [78].

N-ацетилирование, то есть соотношение 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкопиранозы к основным звеньям 2-амино-2-дезоксид-глюкопиранозы, определяет растворимость и структурные свойства хитиновых полимеров [79]. Соответственно, степень деацетилирования является одной из наиболее важных характеристик полисахаридов, влияющих на их растворимость и биологическую активность [33]. Относительно полное деацетилирование удается осуществить лишь в достаточно жестких условиях щелочного гидролиза – при обработке 40–49% растворами NaOH при температуре 110–140 °C в течение 4–6 ч. Однако и в этих условиях степень деацетилирования составляет не более 80–90% [46].

Хитин имеет подобную целлюлозе степень полимеризации и аморфно-кристаллическую структуру, вследствие чего отличается очень низкой растворимостью; при этом по механической прочности и химической стойкости хитин во многом превосходит целлюлозу [46]. Степень ацетилирования хитина составляет примерно 90%. Плохая растворимость хитина, нерастворимого в воде и большинстве органических растворителей, является основным ограничивающим фактором в его использовании.

Хитозаном считаются полимеры со степенью деацетилирования 50–98%. Хитозан нерастворим в большинстве органических растворителей и водных растворах с pH выше 6.5. Считается, что для обеспечения хорошей растворимости уровень деацетилирования полисахарида должен быть близок к 50%, а ацетильные группы должны быть равномерно распределены вдоль цепи полимера, что недостижимо в сильнощелочной среде из-за нарушения конфигурации [80]. С этим связано то, что именно хитозан находит более широкое применение – он более растворим в воде и растворим в водных растворах кислот, таких как уксусная, муравьиная и молочная (при pH < 6.0). Наиболее часто используемым раствором является 1%-ная уксусная кислота, дающая растворы с pH около 4.0 [81]. Значение pH влияет на ионное состояние и характеристики хитозана. При низких значениях pH происходит протонирование аминов, что делает полимер положительно заряженным и более растворимым. При pH более 6 амины хитозана депротонируются, происходит потеря заряда и образуется нерастворимый ионный электролит [23]. Именно поэтому образцы хитозана со степенью деацетилирования более 85% в водных растворах с pH ниже 6 образуют коллоидные растворы с сильным положительным зарядом [18].

При очевидных преимуществах в растворимости и проявляемой биологической активности хитозан не отличается высокой технологичностью (прежде всего в обеспечении необходимых адгезивных свойств и эластичности). Отсутствие ацетильных групп, обеспечивающих образование водородных связей в хитине и стабилизирующих его кристаллическую структуру, делает хитозан механически непригодным для получения тонких, но эластичных пленок и прочных композитов [82]. Напротив, хитин является прочным, с прочностью на разрыв нановолокон порядка 1.6–3.0 ГПа, что считается сопутствующим эффектом от наличия водородных связей между цепями макромолекул [83]. Как следствие, современные способы модификации хитина и хитозана направлены на повышение их функциональности и расширение возможностей применения [23, 74, 84, 85].

Большинство исследований сосредоточено на химической модификации либо включении хитина или хитозана в нанокompозиты с целью устранения физических, биомедицинских или механических недостатков нативных хитиновых полимеров. Часто такая модификация связана с улучшением растворимости хитина и хитозана [86] и основана на наличии у включаемых в структуру полимера заместителей дополнительной протонодонорной активности [74].

Одно из перспективных направлений модификации хитина и хитозана сопряжено с интересом к хи-тоолигосахаридам со степенью полимеризации $n \geq 5-6$, образующимся при разрушении хитина и хитозана в процессе их выделения из природных источников либо при целенаправленной химическом или фермента-тивным гидролизе [87, 88]. Такой интерес вызван множеством клинических примеров проявления олигоме-рами более высокой репаративной активности по сравнению с более высокомолекулярными хитиновыми полимерами [89, 90].

Химическая деполимеризация, последствия которой наблюдаются при щелочном гидролизе и кислот-ной деминерализации выделенного хитина, приводит к получению смеси различающихся по степени деаце-тирования олигомеров и мономеров, что связано с подверженностью гидролизу $\beta(1 \rightarrow 4)$ -гликозидных и ацетамидных связей глюкозаминов. Следствием кислотного гидролиза является появление случайно повто-ряющихся звеньев D-глюкозамина: при непродолжительной обработке 35% HCl при 80 °C получены олиго-меры хитозана, имеющие 1–15 и 20–40 мономеров, кратковременная обработка азотной кислотой или пере-кисью водорода позволяет получать стехиометрически более чистые олигомеры. Еще более однородный по составу олигомеров продукт обеспечивает медленный (до 4 недель при комнатной температуре) гидролиз хитинглюканового комплекса в 85% H_3PO_4 [55]. Физико-химические способы деполимеризации хитина и хитозана также достаточно эффективны и, как правило, основаны на комбинировании реагентных способов и различных видов волновых воздействий – микроволнового [91], ультразвукового или СВЧ [92].

Ферментативная деполимеризация основана на возможности гидролиза хитозана целым рядом фер-ментов – гемицеллюлазами, липазами, целлюлазами, лизоцимом, папаиназой, пектиназами и др. Скорость и глубина ферментативной деполимеризации регулируется изменением продолжительности обработки, pH, температуры [92]. Основной недостаток ферментативной деполимеризации заключается в том, что продукты гидролиза, как правило, контаминированы белками самого ферментного препарата и сопутствующими мик-робными метаболитами, что недопустимо в условиях применения в фармации и медицине и требует соот-ветствующих дополнительных методов очистки целевого продукта.

Химическая модификация хитозана осуществляется с целью добавления хитиновому полимеру раз-личных функциональных групп, включая первичный амин и первичные и вторичные ОН-группы. (рис. 3). В литературных источниках в основном приведены реакции химической модификации хитина и хитозана, по-лученных из ракообразных. В связи с тем, что хитин и хитозан, полученные из биомассы грибов, схожи по структуре и свойствам этих полимеров из ракообразных, их можно модифицировать по таким же схемам и механизмам. Поэтому далее в обзоре приведены реакции модификации полимеров, полученных в основном из ракообразных.

Наиболее частыми приемами химической модификации хитина и хитозана являются карбоксимети-лирование, при котором вводятся новые карбоксиметильные группы, и кватернирование, при котором тре-тичный амин переводится в четвертичное аммониевое соединение.

Карбоксиметилирование хитина и хитозана, заключающееся во введении в структуру мономера до-полнительной карбоксиметильной группы, считается одной из наиболее эффективных и многоплановых мо-дификаций. Прежде всего, такая модификация позволяет перевести полисахариды в более гидрофильную форму, чем обеспечивает повышение их растворимости в водной среде и некоторых органических раство-рителях [93], улучшение технологических свойств и биосовместимости получаемых на их основе гидрогелей [94], пленочных материалов и биоклеев [95], поскольку подобные материалы из немодифицированного хи-тозана слишком жесткие [23, 30, 96].

Специфика проявляемых биологических свойств карбоксиметилированного хитозана зависит от сте-пени карбоксиметилирования и положения заместителя карбоксиметильной группы [97]. К настоящему вре-мени отработано четыре основных схемы замещения хитозана, с получением О-карбоксиметилхитозана, N-карбоксиметилхитозана, N,O-карбоксиметилхитозана и N,N-дикарбоксиметилхитозана [94]. Все эти карбок-симетилированные производные растворимы в воде, но при этом проявляют разную по направленности и/или выраженности биологическую активность. Так, N,O-карбоксиметилхитозан обладает лучшими анти-бактериальными свойствами, чем О-карбоксиметилхитозан и немодифицированный хитозан [98], N-карбок-симетилхитозан эффективнее работает на репарацию мягких тканей, индуцируя выработку воспалительных цитокинов [97], а N,N-дикарбоксиметилхитозан – на регенерацию костной ткани, путем хелатирования ионов кальция и магния [99].

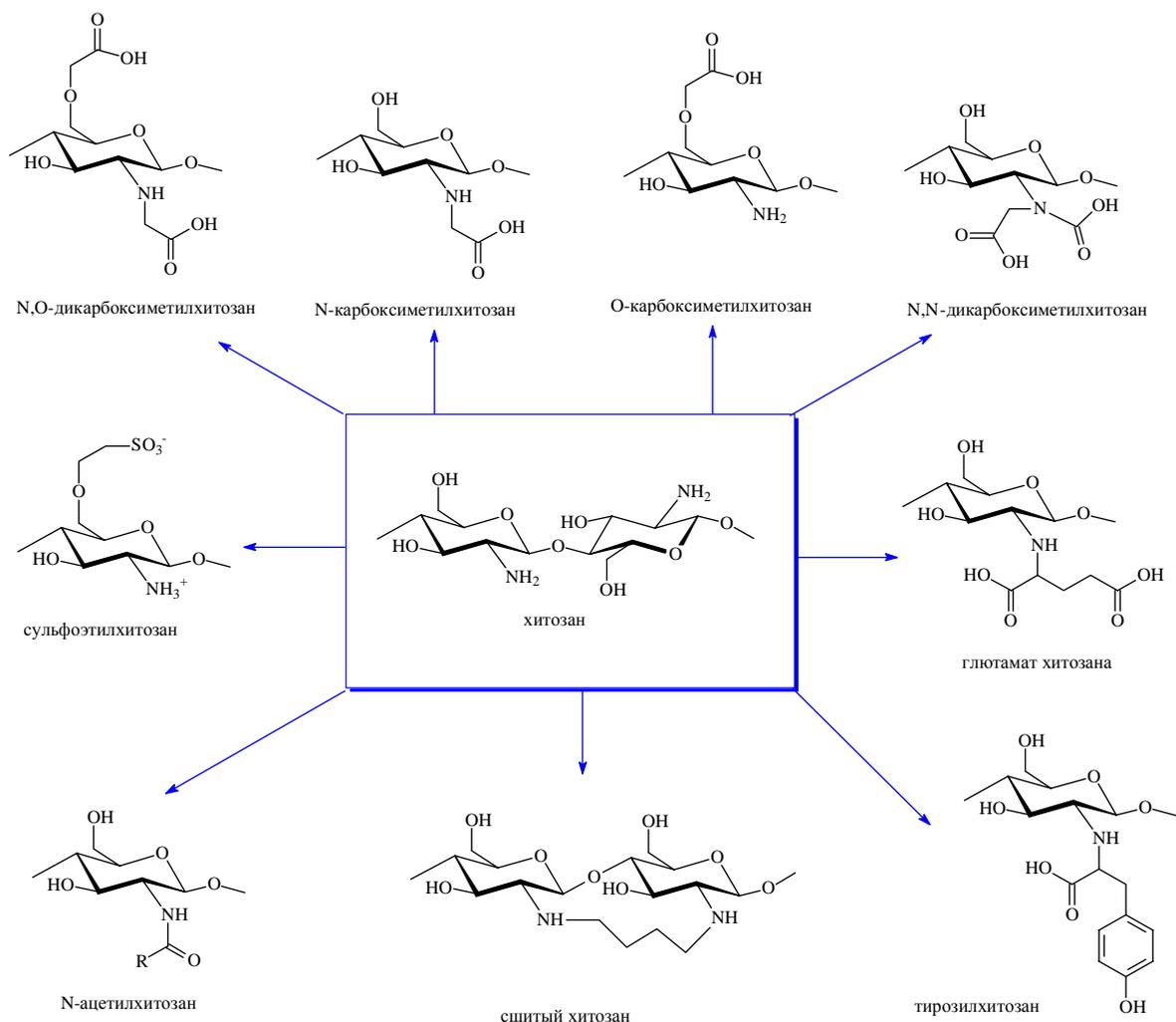


Рис. 3. Направления модификации хитозана (цитируется по [23, 30])

Методы получения карбоксиметилпроизводных хитина и хитозана

Карбоксиметилхитин (КМХ) является водорастворимым производным хитина и представляет собой полиэлектролит со свойствами, схожими с карбоксиметилцеллюлозой. КМХ можно получить реакцией взаимодействия порошкообразного хитина с монохлоруксусной кислотой в среде изопропилового спирта. Перед проведением реакции хитин предварительно обрабатывают 60% раствором гидроксида натрия при 20 °С в течение 12 ч [100]. Степень карбоксиметилирования хитина, влияющая на растворимость в воде, определяется концентрацией NaOH при обработке хитина на первой стадии. Общая схема реакции получения КМХ приведена на рисунке 4.

Один из запатентованных способов получения карбоксиметилхитина включает три основные стадии: (1) растворение хитина в смешанном растворе NaOH и $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$; (2) добавление в раствор хлорацетата натрия в соотношении 1 : (4–20) при перемешивании, температуре 0–20 °С в течение 72–120 ч с последующей нейтрализацией раствора до pH 7.0 разбавленной соляной кислотой; (3) диализ и сушка содержащего хитин раствора [101]. К преимуществам описанного способа следует отнести возможность проведения реакции карбоксиметилирования в мягких условиях, несущественное повреждение нативной структуры хитина и высокую степень замещения карбоксиметильными группами. Полученный продукт обладает высокой растворимостью в воде и может найти применение в пищевой, фармацевтической промышленности и медицине, при создании косметических средств, гемостатических, ранозаживляющих материалов, таблеток, пленок, мембран, микрокапсул и других лекарственных форм, а также в сельском хозяйстве для предпосевной обработки семян в качестве стимулятора роста растений.

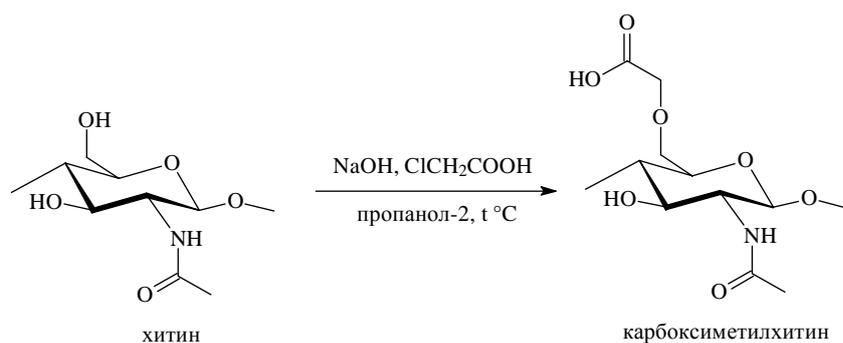


Рис. 4. Схема получения карбоксиметилхитина

Другой вариант получения карбоксиметилового эфира хитина предусматривает предварительную активацию хитина водным раствором гидроксида натрия в присутствии изопропанола при соотношении хитина, гидроксида натрия, изопропанола и воды по массе, соответственно, 1 : (1.04–1.1) : (9.4–10.6) : (1.1–1.3) при 23–30 °С в течение 2.5–3.0 ч, последующее алкилирование хитина монохлоруксусной кислотой в присутствии изопропанола при массовом соотношении хитина, монохлоруксусной кислоты и изопропилового спирта 1 : (1.12–1.20) : (0.81–2.40) соответственно 1.5–2.0 ч при 70–80 °С (табл. 1) [102]. Такая последовательность обработок хитина позволяет получать щелочерастворимые эфиры, содержащие, наряду с N-ацетильными, карбоксильные группы, что обеспечивает полученному веществу более высокую активность полиэлектrolита, чем существенно расширяет возможности его применения в медицине, пищевой и химической промышленности.

Определенные перспективы может получить и метод карбоксиметилирования хитин-глюканового комплекса грибов в среде изопропанола и атмосфере азота [103], апробированный на мицелиальной биомассе *Aspergillus niger* при гидромодуле 1 : 30. В качестве алкилирующего агента в данном случае используется монохлоруксусная кислота, а для связывания отщепляющегося хлора – гидроксид натрия. Рекомендованная последовательность операций заключается в следующем: в среде изопропанола суспендируют 47% раствор NaOH, загружают навеску ХГК и перемешивают в течение 15 мин, затем через 30 мин добавляют порциями монохлоруксусную кислоту. Термостатирование реакционной смеси при 80 °С с непрерывным перемешиванием до окончания реакции заканчивают частичной нейтрализацией щелочности реакционной смеси 10% уксусной кислотой (до pH 8.0), после чего продукт карбоксиметилирования охлаждают и отфильтровывают, промывают от остатков щелочи и солей 80% метанолом, обезвоживают ацетоном и сушат под вакуумом при 60 °С.

В перечне синтезированных водорастворимых производных хитозана O-карбоксиметилхитозан (О-КМХт) – производное амфипротного эфира, содержащее группы –COOH и –NH₂, – биоразлагаемый, биосовместимый и нетоксичный полимер, обладающий выраженной антибактериальной и противогрибковой активностью, благодаря чему находит применение в биомедицине: при разработке скаффолдов, ранозаживляющих повязок и гемостатических губок [104, 105]. Так же, как и КМХ, О-КМХт можно получить обработкой хитина монохлоруксусной кислотой в изопропиловом спирте (рис. 5), обязательным условием является предварительная обработка 50%-ным раствором едкого натра при 18 °С в течение 12 ч; полученный продукт растворим в воде [100].

Таблица 1. Условия карбоксиметилирования хитина и его свойства

Т, °С	Условия активации		Условия карбоксиметилирования			СЗ	Растворимость Na-КМХт в воде	Выход г/г хитина
	Соотношение Хт : NaOH : ИПС : H ₂ O	Продолжительность, ч	Соотношение Хт : МХУК : ИПС	Продолжительность, ч	Т, °С			
23	1 : 1.04 : 9.4 : 1.1	2.5	1 : 1.12 : 0.81	1.5	70	0.90	100	1.39
28	1 : 1.08 : 10.0 : 1.2	2.8	1 : 1.16 : 1.60	1.7	75	0.96	100	1.41
30	1 : 1.10 : 10.5 : 1.3	3.0	1 : 1.20 : 2.40	2.0	80	1.00	100	1.43
10	1 : 0.99 : 9.2 : 1.0	2.2	1 : 1.10 : 0.73	1.3	65	0.79	60	0.83
35	1 : 1.20 : 10.8 : 1.5	3.2	1 : 1.23 : 2.5	2.3	80	1.00	100	1.43

Примечания: Хт – хитин, КМХт – карбоксиметилхитин, ИПС – изопропиловый спирт, МХУК – монохлоруксусная кислота, СЗ – степень замещения.

Введением карбоксиметильных групп в некоторые amino- и 6-гидроксильные участки глюкозаминных звеньев в структуре хитозана можно получить N,O-карбоксиметил-производное хитозана (N,O-КМХт). При хорошей растворимости в воде это вещество обладает влагоудерживающей, гелеобразующей способностью и биосовместимостью. Установлено, что N,O-КМХт является подходящим полимером для доставки и кишечной абсорбции анионных макромолекулярных терапевтических средств. В дополнение к антибактериальной активности N,O-КМХт способен стимулировать внеклеточную лизоцимную активность фибробластов [106], обеспечивая повышение пролиферации фибробластов кожи и проявляя противоопухолевое действие [107]. N,O-КМХт получают также взаимодействием хитозана с гидроксидом натрия и монохлоруксусной кислотой в среде изопропанола (рис. 5).

Для получения другого водорастворимого производного – N-карбоксиметилхитозана (N-КМХт) – используют монохлоруксусную и глиоксальевую кислоты [108]. Общепринятым способом синтеза N-КМХт является реакция взаимодействия хитозана с глиоксальной кислотой с последующим восстановлением тетрагидроборатом натрия [100]. Это производное содержит карбоксиметильные и свободные аминогруппы в пропорциях, легко регулируемых выбором исходного хитозана (по степени деацетилирования и молекулярной массе) и количеством используемой глиоксальной кислоты. Схема получения N-КМХт приведена на рисунке 6.

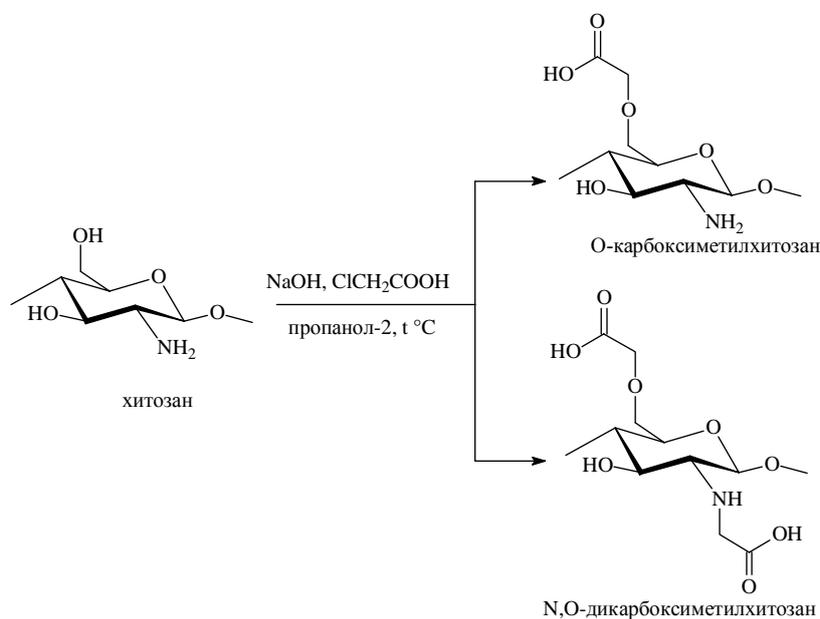


Рис. 5. Схема получения O-карбоксиметилхитозана и N,O-дикарбоксиметилхитозана, (цитируется по [100])

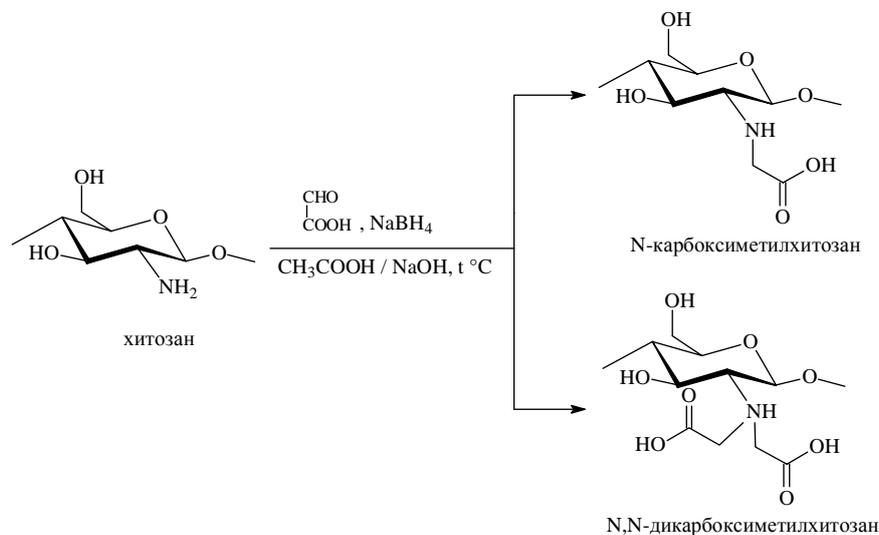


Рис. 6. Схема получения N-карбоксиметилхитозана и N,N-дикарбоксиметилхитозана

N,N-дикарбоксиметилхитозан (N,N-ДКМХт) – модификация хитозана, формирующая прозрачные и механически стойкие пленочные материалы с остеоиндуктивными свойствами [109]. Способ получения заключается во взаимодействии хитозана с глиоксалевой кислотой при мольном соотношении амина и глиоксалевой кислоты 1 : 9 с последующим восстановлением тетрагидроборатом натрия в присутствии воды. Основное отличие от схемы получения N-карбоксиметилхитозана заключается в соотношении реагентов [110]. Реакция получения N,N-ДКМХт показана на рисунке 6; вещество полностью растворимо в водном растворе при pH 4.5.

Таким образом, выбор соответствующих условий реакции и реагентов позволяет получить N-, O-, N,O- или N,N-дикарбоксиметилхитозаны. Свойства и область применения карбоксиметилпроизводных хитина и хитозана в значительной мере зависят от их структуры и других характеристик, в основном от степени замещения и расположения amino- или гидроксильных групп в результате реакции карбоксиметилирования. Основными реагентами при получении карбоксиметилпроизводных являются монохлоруксуная и глиоксалева кислоты, последняя селективно взаимодействует со свободной аминогруппой хитозана.

Методы получения сульфопроизводных хитина и хитозана

В медицине для лечения и профилактики тромбозов используется природный антикоагулянт крови – гепарин, по химическому строению являющийся смешанным полисахаридом (рис. 7). Сульфат хитозана, считающийся наиболее близким структурным аналогом гепарина – также обладает антикоагулянтной активностью, возрастающей при увеличении степени сульфатирования. Возможность реализации синергетического эффекта (усиления активности гепарина при введении добавок сульфата хитозана) делает это соединение перспективным для создания лекарственных препаратов антикоагуляционного и антисклеротического действия.

Стремление создать полный аналог природного антикоагулянта гепарина обусловило поиск эффективных путей синтеза направленно замещенных соединений, основанных на введении в определенные положения сульфо- и карбоксильных групп. Предложено несколько способов получения сульфопроизводных хитина и хитозана – аналогов гепарина, основанных на различных подходах к выбору сульфатирующих агентов и реакционных сред. Основная проблема сульфирования полисахаридов заключается в том, что вследствие плохой растворимости полисахаридов в воде и органических растворителях, реакцию необходимо проводить в гетерогенной среде.

Впервые сульфирование хитозана было осуществлено в 1956 г. смесью серного и сернистого ангидридов при температуре кипения смеси, процесс сопровождался образованием серосодержащего (14.4% серы) эфира. Полученные производные проявляли антикоагуляционную активность *in vitro* и *in vivo*. Более поздние методики предлагали для сульфирования хитозана олеум, концентрированную серную кислоту, триоксид серы, триоксид серы/триметиламин, хлорсульфоновую кислоту/серную кислоту, триоксид серы/пиридин, триоксид серы/диоксид серы, тетрагидрофуран и муравьиную кислоту с нагревом в широком диапазоне температур либо в условиях микроволнового излучения [111–113].

Схемы получения сульфопроизводных хитозана, обладающих антикоагулянтной активностью, представлены на рисунке 8. Такие типы сульфопроизводных хитозана обладают антикоагулянтной активностью и способностью контролировать агглютинацию железа из-за химического структурного сходства с гепарином. В дополнение к этому сульфопроизводные хитина и хитозана обладают антиоксидантной, антисклеротической, противовирусной, анти-ВИЧ и антибактериальной активностями. Сульфирование хитозана приводит к превращению некоторых групп $-NH_2$ в отрицательные ионные центры и образованию полимера с улучшенными мультиэлектrolитными характеристиками, который может быть использован для создания потенциальных переносчиков лекарств в форме микрокапсул или мицелл [114].

Влияние температуры и продолжительности реакции на процесс получения сульфопроизводных хорошо прослеживается на примере получения сульфатированных хитина и хитозана в условиях использования серной кислоты, тетрагидрофурана и пятиоксида фосфора [116]. Определение молекулярной массы и выхода сульфопроизводных показало значительное разрушение структуры хитина и хитозана концентрированной серной кислотой при повышении температуры и продолжительности обработки.

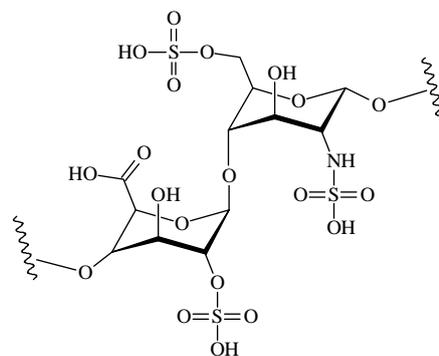


Рис. 7. Структурная формула гепарина

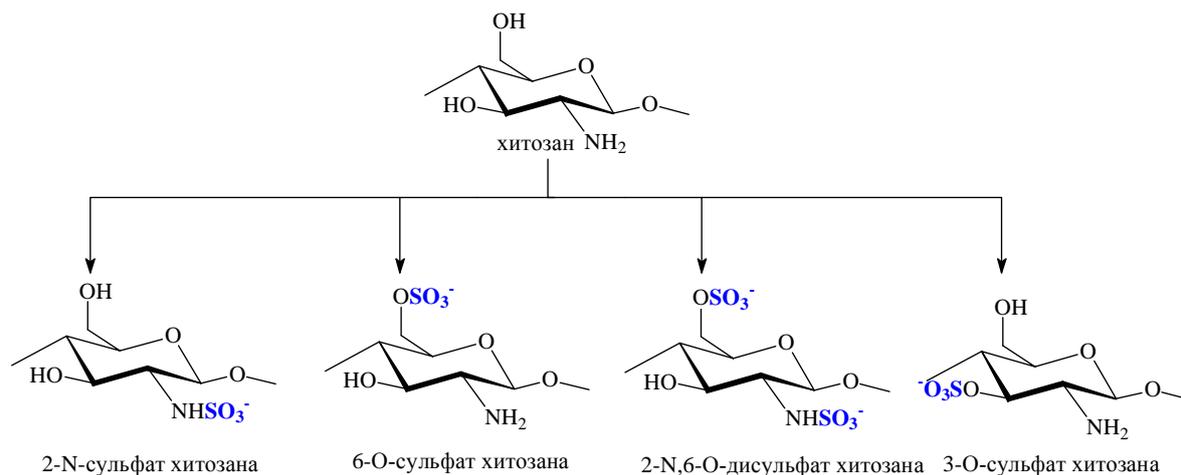


Рис. 8. Химическая структура хитозана, модифицированного сульфатными группами в различные положения [115]

Получение сульфозтилхитозана в щелочной среде с использованием натриевой соли 2-хлорэтансульфокислоты обеспечило степень замещения синтезированного производного на уровне 0.11–0.35 при содержании серы в пределах 1.39–5.32%. Анализ подтвердил, что в таких условиях замещению подвергаются как положение O-6, так и положение N-2. Пленки сульфозтилхитозана обладали выраженным антитромбогенным свойством [117].

Проведение сульфирования хитозана в более мягких условиях (реакция Шиффа) – натриевой солью 5-формил-2-фурансульфоновой кислоты позволяет избежать деградации полимера и эффективно провести O-замещение карбоксильных групп [118]. Методами инфракрасной спектроскопии, алкаиметрии и элементного анализа установлено, что степень замещения сульфопроизводного составила 0.26.

N,O-сульфатированные, O-сульфатированные и O-карбоксиметил-сульфатированные производные могут быть получены реакцией хитозана с N,N-диметилформамидом (ДМФА) и триоксидом серы, более высокий выход достигается при получении продукта в виде кислой натриевой соли. Аналогичным образом получают O-сульфатированный N-гексаноилхитозан [119].

Особое значение отводится коллоидному состоянию среды, в которой реализуется получение сульфопроизводных хитозана. Псевдогомогенный способ получения сульфатированного хитозана предусматривает взаимодействие 2% раствора хитозана с хлорсульфоновой кислотой в безводной смеси (ДМФА-дихлоруксусная кислота) в соотношении 60 : 1. Проведение реакции при комнатной температуре в течение 4 ч приводит к образованию геля. По окончании реакции гель разбавляют водой, нейтрализуют NaOH и осаждают сульфопроизводное хитозана метанолом. Гомогенный способ получения также основан на взаимодействии раствора хитозана (3%) с хлорсульфоновой кислотой в безводной смеси ДМФА-дихлоруксусная кислота, но в соотношении 40 : 1, продолжительность реакции при 50 °C составляет 1 ч. Полугетерогенный способ представляет собой взаимодействие порошкообразного хитозана с хлорсульфоновой кислотой в безводной смеси ДМФА-дихлоруксусная кислота (60 : 1) при комнатной температуре в течение 1 ч [120].

Получение сульфатированного хитозана в виде белого воздушного водорастворимого материала с выходом более 90% и степенью замещения 0.76 достигается взаимодействием хитозана с безводным карбонатом натрия и триоксидом триметиламина серы (Me₃N-SO₃) [116]. Еще один вариант сульфирования основан на взаимодействии низкомолекулярного хитозана с нитритом натрия в смеси пиридин-SO₃ [120]. В каждом случае вид и степень замещения подтверждены с помощью ИК-Фурье и ЯМР-спектроскопии. Установлено также, что сульфаты хитозана можно рассматривать как сополимеры, состоящие из случайно чередующихся моно-, ди- и тризамещенных звеньев хитозана.

Сопоставление параметров получения сульфопроизводных хитозана дано в таблице 2. Мольное соотношение сульфатирующего агента может составлять от 1.9 до 4.0 – для низкомолекулярного, и от 5.0 до 16.0 – для высокомолекулярного хитозана; наиболее часто используемым является соотношение от 4.0 до 9.0. Степень замещения хитозанов сульфогруппами при разных условиях проведения реакции варьирует от 8.0 до 16.4%. Температура реакции поддерживается на уровне от 50 до 85 °C, но при проведении реакции в растворе серной кислоты (от 1.0 до 26.0 ч) рекомендуется поддерживать температуру на уровне комнатной – во избежание деполимеризации получаемого сульфопроизводного.

Несмотря на относительно небольшую степень замещения (11.95–16.20%), сульфатированный хитозан обладает высокой растворимостью в воде и хорошей гелеобразующей способностью. N- и O-сульфатированные хитозаны проявляют антикоагулянтные свойства *in vitro*, сопоставимые с гепарином на 23 и 45% соответственно; повышение антикоагулянтной активности находится в прямой корреляции с содержанием серы в хитозане.

Использование в качестве сульфатирующего агента хлорсульфоновой кислоты позволяет проводить реакцию в одну стадию (рис. 9). В целом, все реакции сульфирования хитозана представляют собой механизм электрофильного замещения, при котором протон замещается группой $-SO_3H$.

Все четвертичные производные хитозана можно сульфатировать хлорсульфоновой кислотой по принципиально общей методике: хитозан диспергируют в диметилформамиде (ДМФА) с порционным введением в реакционную смесь сульфатирующего комплекса (хлорсульфоновая кислота в ДМФА, 1 : 6.7). Смесь вымешивают при комнатной температуре в течение 5 ч, после чего нейтрализуют 20% раствором NaOH, получая осадок сульфатированного хитозана. Осадок дважды перекристаллизовывают из метанола [126].

Сульфатированные хитозаны обладают антикоагулянтными свойствами, благодаря чему рассматриваются в качестве ценных материалов для медицины. Антикоагулянтные свойства сульфатированных производных связывают с непрямым ингибированием активности ферментов свертывающего каскада крови (тромбина, активированных факторов X и XI) посредством неспецифического (электростатического) или высокоспецифического взаимодействия с плазменными ингибиторами сериновых протеаз – серпинами [127].

Наличие функциональных групп, реакционноспособных amino- и гидроксильных групп в основной цепи хитина и хитозана делает их пригодными для химической модификации тремя основными подходами:

- введением боковых групп в цепь полимера в результате реакции замещения;
- удлинением цепи и/или увеличением молекулярной массы полимера;
- деполимеризацией.

Таблица 2. Сравнительная характеристика условий сульфатирования хитозана с разной степенью деацетилирования [115]

Хитозан		Растворитель ¹	Сульфатирующий агент	Мольное соотношение ²	T(°C)/t(ч) ³	СЗ, %	Источник
СД, %	M _v (г/моль)						
>90	6.5×10^4	H ₂ O, Na ₂ CO ₃	SO ₃ -пиридин	3	60/24	8.0	[111]
>96	–	ДМФА	SO ₃ -пиридин	6	70/26	16.4	[121]
–	2.2×10^4	ДМФА	Олеум, пиридин	3-4	60/1-3	15.9	[122]
–	$<1 \times 10^3$	ДМФА	HCISO ₃	1.9	60/4	11.0	[123]
>90	2.5×10^5	Формаид, H ₂ SO ₄	HCISO ₃	12.1	0-4/3	9.0	[111]
85	3.2×10^5	–	HCISO ₃ -ДМФА	16.0	85/4	10.9	[124]
>90	2.5×10^5	Формаид, CH ₂ O ₂	HCISO ₃ -ДМФА	7.7	50/2	14.9	[111]
82	4.6×10^5	ДМФА, CH ₂ O ₂	HCISO ₃ -ДМФА	4.8	25/3	9.0	[115]

Примечания: 1 – растворитель или реагент, используемый для активации хитозана; 2 – Моль сульфатирующего агента на моль звена глюкозамина; 3 – Температура реакции (°C) и продолжительность реакции, в ч.

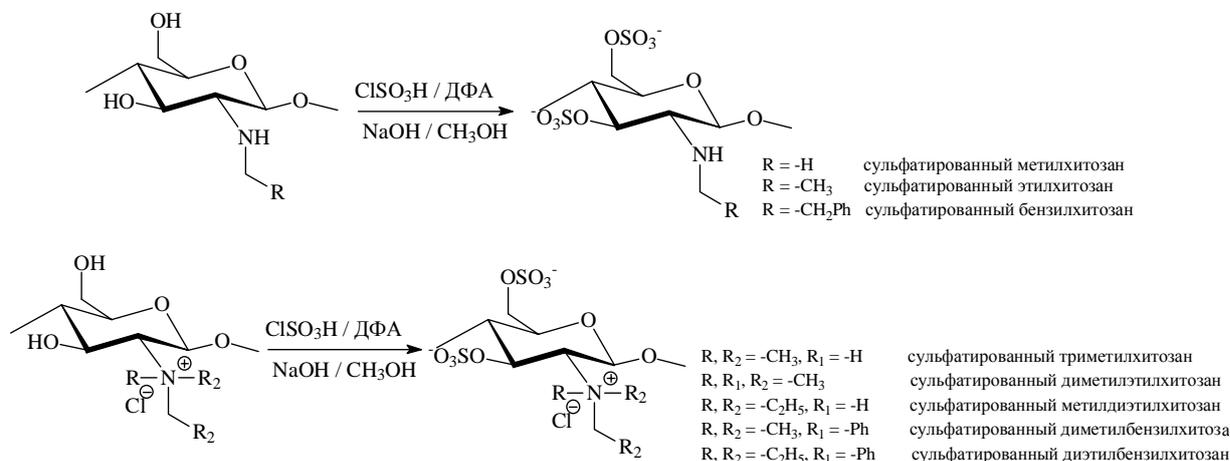


Рис. 9. Схемы синтеза сульфатированных производных хитозана [125]

Наиболее часто используемыми реакциями являются кватернизация, алкилирование, ацилирование, карбоксиалкилирование, фосфорилирование, сульфатирование, привитая сополимеризация, сшивание и деполимеризация. Модификация хитина и хитозана данными реакциями позволяет повысить биологическую активность, биосовместимость, механическую и химическую стойкость, изменить гидрофильность и растворимость получаемых производных и использовать их в различных отраслях промышленности – пищевой, фармацевтической, сельском хозяйстве и медицине.

Заключение

Хитин и хитозан являются природными биополимерами, которые нетоксичны, биоразлагаемы и биосовместимы. Несмотря на то, что в промышленности основным источником хитина и хитозана являются ракообразные, безусловный научный и коммерческий интерес представляют мицелий низших и плодовые тела высших грибов. Это объясняется отсутствием сезонности, региональной изменчивости при промышленном производстве грибов и более простой технологией извлечения. Благодаря низкому содержанию минеральных веществ в клеточной стенке грибов, в технологии производства хитина из сырья грибного происхождения используются слабые растворы щелочи и кислоты. Это – один из ключевых моментов отличия от технологии получения хитина и хитозана из ракообразных, содержащих значительное количество карбоната кальция и белка, которые невозможно полностью удалить в «мягких» условиях обработки. Помимо вышеизложенного, хитин и хитозан в биомассе грибов связан с β -глюканами, проявляющими дополнительную биологическую активность, в частности иммуномодулирующую, антибактериальную и противовирусную. Особый интерес представляют грибы-зигомецеты, клеточная стенка которых содержит хитозан, что позволяет избежать дорогостоящей стадии химического деацетилирования при его получении. С развитием технологии ферментации грибы-зигомецеты сегодня широко применяются для производства различных биотехнологических продуктов, поэтому хитозан, содержащийся в мицелии этих грибов, может производиться в больших масштабах как побочный продукт.

Производные хитина и хитозана из биомассы грибов вызвали значительный интерес в биомедицине, как природные вещества с антибактериальной, противовирусной, ранозаживляющей и антикоагулянтной активностью. Введение в структуру хитина или хитозана карбоксиметильных или сульфатных групп значительно повышает растворимость этих биополимеров при нейтральных и щелочных значениях pH. Карбоксиметильные производные хитина и хитозана находят применение в качестве систем доставки лекарств, противомикробных средств, в тканевой инженерии, в качестве компонентов косметических средств и продуктов питания. Сульфопроизводные хитина и хитозана из биомассы грибов могут быть использованы в качестве основы для получения гемосовместимых материалов (с антитромботической и антибактериальной активностями), необходимых, например, при замене кровеносных сосудов, востребованной медицинской практикой; а также в биомедицинских разработках защитных материалов для устройств и покрытий с антикоагулянтной активностью.

Список литературы

1. Chang S.T. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk). Sing. in China // Int. J. Med. Mushrooms. 1999. Vol. 1. Pp. 291–301. DOI: 10.1615/INTJMED-MUSHR.V1.I4.10.
2. Chakravarty B. Trends in mushroom cultivation and breeding // Aust. J. Agric. Eng. 2011. Vol. 2. Pp. 102–109.
3. Wani B.A., Bodha R.H., Wani A.H. Nutritional and medicinal importance of mushrooms // J. Med. Plants Res. 2010. Vol. 4. Pp. 2598–2604. DOI: 10.5897/JMPR09.565.
4. Fraga S.M., Nunes F.M. Agaricus bisporus By-Products as a Source of Chitin-Glucan Complex Enriched Dietary Fibre with Potential Bioactivity // Appl. Sci. 2020. Vol. 10. Article 2232. DOI: 10.3390/app10072232.
5. Bays H.E., Evans J.L., Maki K.C., Evans M., Maquet V., Cooper R., Anderson J.W. Chitin-glucan fiber effects on oxidized low-density lipoprotein: A randomized controlled trial // Eur. J. Clin. Nutr. 2013. Vol. 67. Pp. 2–7. DOI: 10.1038/ejcn.2012.121.
6. Cao Y., Zou S., Xu H., Li M., Tong Z., Xu M., Xu X. Hypoglycemic activity of the Baker's yeast β -glucan in obese/type 2 diabetic mice and the underlying mechanism // Mol. Nutr. Food Res. 2016. Vol. 60. Pp. 2678–2690. DOI: 10.1002/mnfr.201600032.
7. Wu T., Zivanovic S., Draughon F.A., Sams C.E. Chitin and chitosan – valueadded products from mushroom waste // J Agric Food Chem. 2004. Vol. 52. N26. Pp. 7905–7910. DOI: 10.1021/jf0492565.
8. Giannenas I., Tsalie E., Chronis E.F., Mavridis S., Tontis D., Kyriazakis I. Consumption of *Agaricus bisporus* mushroom affects the performance, intestinal microbiota composition and morphology and antioxidant status of turkey poulters // Anim. Feed Sci. Technol. 2011. Vol. 165. Pp. 218–229. DOI: 10.1016/j.anifeeds.2011.03.002.

9. Synytsya A., Mířková K., Synytsya A., Jablonský I., Speřvácěk J., Erban V., Kováříková E., Čopíková J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity // *Carbohydr. Polym.* 2009. Vol. 76. Pp. 548–556. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.11.021.
10. Xu X., Yang J., Ning Z., Zhang X. *Lentinula edodes*-derived polysaccharide rejuvenates mice in terms of immune responses and gut microbiota in mice // *Food Funct.* 2015. Vol. 6. Pp. 2653–2663. DOI: 10.1039/c5fo00689a.
11. Kalač P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms // *J. Sci. Food Agric.* 2013. Vol. 93. Pp. 209–218. DOI: 10.1002/jsfa.5960.
12. Rodrigues D., Walton G., Sousa S., Rocha-Santos T.A.P., Duarte A.C., Freitas A.C., Gomes A.M.P. *In vitro* fermentation and prebiotic potential of selected extracts from seaweeds and mushrooms // *LWT Food Sci. Technol.* 2016. Vol. 73. Pp. 131–139. DOI: 10.1016/J.LWT.2016.06.004.
13. Zhao J., Cheung P.C.K. Fermentation of β -Glucans derived from different sources by bifidobacteria: Evaluation of their bifidogenic effect // *J. Agric. Food Chem.* 2011. Vol. 59. Pp. 5986–5992. DOI: 10.1021/jf200621y.
14. Carbonero E.R., Gracher A.H.P., Komura D.L., Marcon R., Freitas C.S., Baggio C.H., Santos A.R.S., Torri G., Gorin P.A.J., Iacomini M. *Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects // *Food Chem.* 2008. Vol. 111. Pp. 531–537. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.04.015.
15. Komura D.L., Carbonero E.R., Gracher A.H.P., Baggio C.H., Freitas C.S., Marcon R. Structure of *Agaricus spp.* fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. *Bioresour Technol.* 2010. Vol. 101. Pp. 6192–6199. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.142.
16. Chang C.-W., Lur H.-S., Lu M.-K., Cheng J.-J. Sulfated polysaccharides of *Armillariella mellea* and their anti-inflammatory activities via NF- κ B suppression // *Food Res. Int.* 2013. Vol. 54. Pp. 239–245.
17. Zivanovic S. Identification of opportunities for production of ingredients based on further processed fresh mushrooms, off-grade mushrooms, bi-products, and waste material. Knoxville, TN: Mushroom Council, University of Tennessee, Department of Food Science and Technology, 2006. 33 p.
18. Abo Elsoud M.M., El Kady E.M. Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan // *Bulletin of the National Research Centre.* 2019. Vol. 43. Article 59. DOI: 10.1186/s42269-019-0105-y.
19. Arrouze F., Essahli M., Rhazi M., Desbrieres J., Tolaimate A. Chitin and chitosan: study of the possibilities of their production by valorization of the waste of crustaceans and cephalopods rejected in Essaouira // *J. Mat. Environ. Sci.* 2017. Vol. 8. N7. Pp. 2251–2258.
20. Abdelmalek B.E., Sila A., Haddar A., Bougatef A., Ayadi M.A. β -Chitin and chitosan from squid gladius: biological activities of chitosan and its application as clarifying agent for apple juice // *Int. J. Biol. Macromol.* 2017. Vol. 104. Pp. 953–962. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.107.
21. Tharanathan R.N., Kittur F.S. Chitin – the undisputed biomolecular of great potential // *Crit. Rev. Food Sci.* 2003. Vol. 43. Pp. 61–87. DOI: 10.1080/10408690390826455.
22. Sitanggang A.B., Sophia L., Wu H.S. MiniReview: aspects of glucosamine production using microorganisms // *Int. Food Res. J.* 2012. Vol. 19. N2. Pp. 393–404.
23. Sabir A., Altaf F., Shafiq M. Synthesis and Characterization and Application of Chitin and Chitosan-Based Eco-friendly Polymer Composites // *Sustainable Polymer Composites and Nanocomposites.* 2019. Pp. 1365–1405. DOI: 10.1007/978-3-030-05399-4_46.
24. Cord-Landwehr S., Moerschbacher B.M. Deciphering the ChitoCode: fungal chitins and chitosans as functional biopolymers // *Fungal Biology and Biotechnology.* 2021. Vol. 8. N19. Pp. 1–9. DOI: 10.1186/s40694-021-00127-2.
25. Batista A.C.L., Souza Neto F.E., Paiva W.S. Review of fungal chitosan: past, present and perspectives in Brazil // *Polymeros.* 2018. Vol. 28. N3. Pp. 275–283. DOI: 10.1590/0104-1428.08316.
26. Islam S., Bhuiyan M.A.R., Islam M.N. Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering // *J. Polym. Environ.* 2017. Vol. 25. Pp. 854–866. DOI: 10.1007/s10924-016-0865-5.
27. Heux L., Brugnerotto J., Desbrieres J., Versali M.-F., Rinaudo M. Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan // *Biomacromolecules.* 2000. Vol. 1. Pp. 746–751. DOI: 10.1021/bm000070y.
28. Latge J.P. The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell // *Mol. Microbiol.* 2007. Vol. 66. Pp. 279–290. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x.
29. Muzzarelli R.A. Chitin nanostructures in living organisms // *Chitin.* Springer, 2011. Pp. 1–34. DOI: 10.1007/978-90-481-9684-5_1.
30. Jones M., Kujundzic M., John S., Bismarck A. Crab vs. mushroom: A review of crustacean and fungal chitin in wound treatment // *Marine Drugs.* 2020. Vol. 18(1). N64. DOI: 10.3390/md18010064.
31. Adams D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases // *Microbiology.* 2004. Vol. 150(1). Pp. 2029–2035. DOI: 10.1099/mic.0.26980-0.
32. Banks I.R., Specht C.A., Donlin M.J., Gerik K.J., Levitz S.M., Lodge J.K. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* // *Eukaryot Cell.* 2005. Vol. 4(11). Pp. 1902–1912. DOI: 10.1128/EC.4.11.1902-1912.2005.
33. Baker L.G., Specht C.A., Donlin M.J., Lodge J.K. Chitosan, the Deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans* // *Eukaryot Cell.* 2007. Vol. 6(5). Pp. 855–867. DOI: 10.1128/EC.00399-06.
34. Ruiz-Herrera J. Fungal cell wall: estructure, synthesis, and assembly // *Current topics in medical mycology.* Springer, 1989. Vol. 3. Pp. 168–217.
35. Fernando L.D., Dickwella Widanage M.C., Penfield J., Lipton A.S., Washton N., Latgé J-P. Structural polymorphism of chitin and chitosan in fungal cell walls from solid-state NMR and principal component analysis // *Frontiers in Molecular Biosciences.* 2021. N8. DOI: 10.3389/fmolb.2021.72705-3.

36. Akila R.M. Fermentative production of fungal chitosan, a versatile biopolymer (perspectives and its applications) // Adv. Appl. Sci. Res. 2014. Vol. 5(4). Pp. 157–170.
37. Gabiatti C.J., Vendruscolo F., Piaia J.C.Z., Rodrigues R.C., Durrant L.R., Costa J.A.V. Radial growth rate as a tool for the selection of filamentous fungi for use in bioremediation // Braz. Arch. Biol. Technol. 2006. Vol. 49. Pp. 29–34.
38. Bhargav S., Panda B.P., Ali M., Javed S. Solid-state fermentation: an overview // Chem. Biochem. Eng. Q. 2008. Vol. 22. Pp. 49–70.
39. Щерба В.В., Бабицкая В.Г. Полисахариды ксилотрофных базидиомицетов // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. №1. С. 90–95.
40. Mahapatra S., Banerjee D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications // Microbiology Insights. 2013. Vol. 6. Pp. 1–16. DOI: 10.4137/MBLS10957.
41. Mishra A., Kumar S. Cyanobacterial biomass as N-supplement to agro-waste for hyper-production of laccase from *Pleurotus ostreatus* in solid-state fermentation // Process Biochem. 2007. Vol. 42. Pp. 681–685. DOI: 10.1016/j.procbio.2006.09.022.
42. Nwe N., Stevens W.F. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation // Process Biochem. 2004. Vol. 39. Pp. 1639–1642.
43. Kumirska J., Weinhold M.X., Thöming J., Stepnowski P. Biomedical activity of chitin/ chitosan based materials – influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation // Polymers. 2011. Vol. 3. N4. Pp. 1875–1901. DOI: 10.3390/polym3041875.
44. Sudha P.N., Saranya M., Gomathi T., Gokila S., Aisverya S., Venkatesan J., Anil S. Perspectives of chitin- and chitosan-based scaffolds dressing in regenerative medicine // Chitosan Deriv Comp Appl. 2017. Pp. 253–269. DOI: 10.1002/9781119364849.ch10.
45. Gbenebor O.P., Akpan E.I., Adeosun S.O. Thermal, structural and acetylation behavior of snail and periwinkle shells chitin // Prog. Biomat. 2017. Vol. 6. N3. Pp. 97–111. DOI: 10.1007/s40204-017-0070-1.
46. Гришин А.А., Зорина Н.В., Луцкий В.И. Хитин и хитозан: химия, биологическая активность, применение // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2014. №1(6). С. 29–34.
47. Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications // Mar Drugs. 2015. Vol. 13. N3. Pp. 1133–1174. DOI: 10.3390/md13031133.
48. Yu Z., Lau D. Flexibility of backbone fibrils in a-chitin crystals with different degree of acetylation // Carbohydr Polym. 2017. Vol. 174. Pp. 941–947. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.06.099.
49. Friedman A.J., Phan J., Schairer D.O., Champer J., Qin M., Pirouz A., Modlin R.L. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens // J. Invest. Dermatol. 2013. Vol. 133. N5. Pp. 1231–1239. DOI: 10.1038/jid.2012.399.
50. Badwan A.A., Rashid I., Al Omari M.M., Darras F.H. Chitin and chitosan as direct compression excipients in pharmaceutical applications // Mar Drugs. 2015. Vol. 13. N3. Pp. 1519–1547. DOI: 10.3390/md13031519.
51. Silva S.S., Mano J.F., Reis R.L. Ionic liquids in the processing and chemical modification of chitin and chitosan for biomedical applications // Green Chem. 2017. Vol. 19. N5. Pp. 1208–1220.
52. Akpan E., Gbenebor O., Adeosun S. Synthesis and characterisation of chitin from periwinkle (*Tympanotonus fusatus* (L.)) and snail (*Lissachatina fulica* (Bowdich)) shells // Int. J. Biol. Macromol. 2018. Vol. 106. Pp. 1080–1088. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.106.
53. Xu Q., Wang C.-H., Wayne P.D. Polymeric carriers for gene delivery: chitosan and poly (amidoamine) dendrimers // Curr Pharm Des. 2010. Vol. 16. N21. Pp. 2350–2368. DOI: 10.2174/138161210791920469.
54. Nawawi W., Jones M., Murphy R.J., Lee K.-Y., Kontturi E., Bismarck A. Nanomaterials derived from fungal sources – Is it the new hype? // Biomacromolecules. 2019. Vol. 21. Pp. 30–55. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b01141.
55. Karimi K., Zamani A. *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review // Biotechnol. Adv. 2013. Vol. 31. Pp. 466–481. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.009.
56. Jones M., Weiland K., Kujundzic M., Theiner J., Kahlig H., Kontturi E., John S., Bismarck A., Mautner A. Waste-Derived Low-Cost Mycelium Nanopapers with Tunable Mechanical and Surface Properties // Biomacromolecules. 2019. Vol. 20. Pp. 3513–3523. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00791.
57. Hassainia A., Satha H., Boufi S. Chitin from *Agaricus bisporus*: Extraction and characterization // Int. J. Biol. Macromol. 2018. Vol. 117. Pp. 1334–1342. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.172.
58. Гальбрайт Л.С. Хитин и хитозан: строение, свойства, применение // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т.7. №1. С. 51–56.
59. Nawawi W., Lee K.-Y., Kontturi E., Murphy R., Bismarck A. Chitin nanopaper from mushroom extract: Natural composite of nanofibres and glucan from a single bio-based source // ACS Sustain. Chem. Eng. 2019. Vol. 7. Pp. 6492–6496. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b00721.
60. Araújo D., Ferreira I.C., Torres C.A.V., Neves L., Freitas F. Chitinous polymers: extraction from fungal sources, characterization and processing towards value-added applications // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2020. Vol. 95. Pp. 1277–1289. DOI: 10.1002/jctb.6325.
61. Oliveira C.E.V., Magnani M., Sales C.V., Pontes A.L.S., Campos-Takaki G.M., Stamford T.C.M., Souza E.L. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.) // Int J Food Microbiol. 2014. Vol. 171. Pp. 54–61. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.006.
62. Moussa S.H., Tayel A.A., Al-Turki I.A. Evaluation of fungal chitosan as a biocontrol and antibacterial agent using fluorescence-labeling // Int J Biol Macromol. 2013. Vol. 54. Pp. 204–208. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.12.029.

63. Klaykrueyay B., Siralertmukul K., Srikulkit K. Chemical modification of chitosan with cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine and its antimicrobial activity on cotton fabric // *Carbohydr Polym.* 2010. Vol. 80. N1. Pp. 197–207. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.11.013.
64. Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Gemma G., Heras A. Functional characterization of chitin and chitosan // *Curr Chem Biol.* 2009. Vol. 3. N2. Pp. 203–230. DOI: 10.2174/187231309788166415.
65. Lim S.H., Hudson S.M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group // *Carbohydr Res.* 2004. Vol. 339. N2. Pp. 313–319. DOI: 10.1016/j.carres.2003.10.024.
66. Zheng L.Y., Zhu J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights // *Carbohydr Polym.* 2003. Vol. 54. Pp. 527–530. DOI: 10.1016/j.carbpol.2003.07.009.
67. Pillai C., Paul W., Sharma C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation // *Prog. Polym. Sci.* 2009. Vol. 34. Pp. 641–678. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001.
68. Alsarra I.A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds // *Int. J. Biol. Macromol.* 2009. Vol. 45. Pp. 16–21. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2009.03.010.
69. Hai T.A.P., Sugimoto R. Surface modification of chitin and chitosan with poly (3-hexylthiophene) via oxidative polymerization // *Appl Surf Sci.* 2018. Vol. 434. Pp. 188–197. DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.10.197.
70. Janesch J., Jones M., Bacher M., Konturi E., Bismarck A., Mautner A. Mushroom-derived chitosan-glucan nanopaper filters for the treatment of water // *React. Funct. Polym.* 2019. Vol. 146. Article 104428. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104428.
71. Xu T., Xin M., Li M., Huang H., Zhou S. Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives // *Carbohydr. Polym.* 2010. Vol. 81. Pp. 931–936. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.04.008.
72. Luan F., Wei L., Zhang J., Tan W., Chen Y., Wang P., Dong F., Li Q., Guo Z. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activity of N-Quaternized and N-Diquaternized Chitin Derivatives // *Starch Stärke.* 2018. Vol. 70. N11–12. Article 1800026. DOI: 10.1002/star.201800026.
73. Khattak S., Wahid F., Liu L.-P., Jia S.-R., Chu L.-Q., Xie Y.-Y., Li Z.-X., Zhong C. Applications of cellulose and chitin/chitosan derivatives and composites as antibacterial materials: Current state and perspectives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. Vol. 103. Pp. 1989–2006.
74. Луньков А.П., Ильина А.В., Варламов В.А. Антиоксидантные, антибактериальные и фунгицидные свойства пленок на основе хитозана (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2018. Т. 54. №5. С. 444–454. DOI: 10.1134/S0555109918050124.
75. Альмяшева Н.Р., Ярина М.С., Гольшкин А.В., Джавахян Б.Р., Краснополяская Л.М. Антиоксидантные свойства водорастворимых полисахаридов и этанольных экстрактов мицелия ксилотрофных базидиальных грибов // *Антибиотики и химиотерапия.* 2017. Т. 62. №7–8. С. 8–12.
76. Yang T.-L. Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. Vol. 12. N3. Pp. 1936–1963. DOI: 10.3390/ijms12031936.
77. Hajji S., Younes I., Ghorbel-Bellaaj O., Hajji R., Rinaudo M., Nasri M., Jellouli K. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources // *Int. J. Biol. Macromol.* 2014. Vol. 65. Pp. 298–306. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.045.
78. Aider M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review // *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie.* 2010. Vol. 43. N6. Pp. 837–842. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.01.021.
79. Kabalak M., Aracagök Y.D., Torun M. Extraction and Physicochemical Properties of Chitins from Four Different Insect Species // *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity.* Minsk, 2017. P. 297.
80. Jothimani B., Sureshkumar S., Venkatachalapathy B. Hydrophobic structural modification of chitosan and its impact on nanoparticle synthesis – a physicochemical study // *Carbohydr Polym.* 2017. Vol. 173. Pp. 714–720. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.06.041.
81. Zamani A., Jhehanipour A., Edebo L., Niklasson C., Taherzadeh M.J. Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell walls // *J. Agric. Food Chemistry.* 2008. Vol. 56. Pp. 8314–8318. DOI: 10.1021/jf801478j.
82. Cui J., Yu Z., Lau D. Effect of Acetyl Group on Mechanical Properties of Chitin/Chitosan Nanocrystal: A Molecular Dynamics Study // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17. N1. DOI: 10.3390/ijms17010061.
83. Bamba Y., Ogawa Y., Saito T., Berglund L.A., Isogai A. Estimating the Strength of Single Chitin Nanofibrils via Sonication-Induced Fragmentation // *Biomacromolecules.* 2017. Vol. 18. Pp. 4405–4410. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01467.
84. Варламов В.А., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты // *Успехи биологической химии.* 2020. Т. 60. С. 317–368.
85. Мависакалян В.М., Ерицян К.М., Ерицян М.Л. Модификация хитозана азотсодержащими функционально активными соединениями // *Проблемы современной науки и образования.* 2020. №8(153). С. 12–17.
86. Oh B.H.L., Bismarck A., Chan-Park M.B. High Internal Phase Emulsion Templating with Self-Emulsifying and Thermoresponsive Chitosan-graft-PNIPAM-graft-Oligoproline // *Biomacromolecules.* 2014. Vol. 15. Pp. 1777–1787. DOI: 10.1021/bm500172u.
87. Aktuganov G.E., Melentiev A.I. Specific features of chitosan depolymerization by chitinases, chitosanases, and non-specific enzymes in the production of bioactive chitooligosaccharides (Review) // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2017. Vol. 53. N6. Pp. 611–627. DOI: 10.1134/S0003683817060023.

88. Aktuganov G.E., Melentiev A.I., Varlamov V.P. Biotechnological Aspects of the Enzymatic Preparation of Bioactive Chitooligosaccharides (Review) // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2019. Vol. 55. N4. Pp. 323–343. DOI: 10.1134/S0003683819040021.
89. Minagawa T., Okamura Y., Shigemasa Y., Minami S., Okamoto Y. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing // *Carbohydr. Polym.* 2007. Vol. 67. Pp. 640–644. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.07.007.
90. Vasconcelos D.P., Costa M., Neves N., Teixeira J.H., Vasconcelos D.M., Santos S.G. The use of chitosan porous 3D scaffolds embedded with resolvins D1 to improve *in vivo* bone healing // *J Biomed Mat Res Part A*. 2018. DOI: 10.1002/jbma.a.36370.
91. Cheon J.Y., Lee H.M., Park W.H. Formation of silver nanoparticles using fluorescence properties of chitosan oligomers // *Mar Drugs*. 2018. Vol. 16. N1. DOI: 10.3390/md16010011.
92. Naqvi S., Moerschbacher B.M. The cell factory approach toward biotechnological production of high-value chitosan oligomers and their derivatives: an update // *Crit Rev Biotechnol*. 2017. Vol. 37. N1. Pp. 11–25. DOI: 10.3109/07388551.2015.1104289.
93. Upadhyaya L., Singh J., Agarwal V., Tewari R.P. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans // *Carbohydr. Polym.* 2013. Vol. 91. Pp. 452–466. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.07.076.
94. Liu H., Liu J., Qi C., Fang Y., Zhang L., Zhuo R., Jiang X. Thermosensitive injectable in-situ forming carboxymethyl chitin hydrogel for three-dimensional cell culture // *Acta Biomater.* 2016. Vol. 35. Pp. 228–237. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.02.028.
95. Azuma K., Nishihara M., Shimizu H., Itoh Y., Takashima O., Osaki T., Itoh N., Imagawa T., Murahata Y., Tsuka T. Biological adhesive based on carboxymethyl chitin derivatives and chitin nanofibers // *Biomaterials*. 2015. Vol. 42. Pp. 20–29. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.11.043.
96. Kim K.M., Son J.H., Kim S.K., Weller C.L., Hanna M.A. Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type // *J. Food Sci.* 2006. Vol. 71. N3. Pp. 119–124. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb15624.x.
97. Chang J., Liu W., Han B., Peng S., He B., Gu Z. Investigation of the skin repair and healing mechanism of N-carboxymethyl chitosan in second-degree burn wounds // *Wound Repair Regen.* 2013. Vol. 21. Pp. 113–121. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00859.x.
98. Anitha A., Rani V.D., Krishna R., Sreeja V., Selvamurugan N., Nair S., Tamura H., Jayakumar R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles // *Carbohydr. Polym.* 2009. Vol. 78. Pp. 672–677. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.05.028.
99. Mattioli-Belmonte M., Nicoli-Aldini N., De Benedittis A., Sgarbi G., Amati S., Fini M., Biagini G., Muzzarelli R. Morphological study of bone regeneration in the presence of 6-oxychitin // *Carbohydr. Polym.* 1999. Vol. 40. Pp. 23–27.
100. Jayakumar R., Prabakaran M., Nair S.V., Tokura S., Tamura H., Selvamurugan N. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications // *Progress in Materials Science*. 2010. Vol. 55. N7. Pp. 675–709. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2010.03.001.
101. Patent 103288980A (CN). Preparation method of carboxymethyl chitin / S. Xiaowen, D. Fuyuan, D. Hongbing, Y. Hua, D. Yumin. – 11.09.2013.
102. Патент №2100373C1 (РФ). Способ получения карбоксилсодержащих производных хитозана / С.З. Роговина, Г.А. Вихорева, И.Н. Горбачева, С.Н. Зеленецкий, Т.А. Аكوпова. – 1996.
103. Нудьга Л.А. Структурно-химическая модификация хитина, хитозана и хитин-глюкановых комплексов : дисс. ... докт. хим. наук. СПб., 2006. 360 с.
104. Chen X.-G., Park H.-J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions // *Carbohydrate Polymers*. 2003. Vol. 53. N4. Pp. 355–359. DOI: 10.1016/s0144-8617(03)00051-1.
105. Fei Liu X., Lin Guan Y., Zhi Yang D., Li Z., De Yao K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan // *Journal of Applied Polymer Science*. 2000. Vol. 79. N7. Pp. 1324–1335. DOI: 10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L.
106. Narayanan D., Jayakumar R., Chennazhi K.P. Versatile carboxymethyl chitin and chitosan nanomaterials: a review // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2014. Vol. 6. N6. Pp. 574–598. DOI: 10.1002/wnan.1301.
107. Jones M., Kujundzic M., John S., Bismarck A. Crab vs. Mushroom: A Review of Crustacean and Fungal Chitin in Wound Treatment // *Marine Drugs*. 2020. Vol. 18. N1. Article 64. DOI: 10.3390/md18010064.
108. Fonseca-Santos B., Chorilli M. An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems // *Materials Science and Engineering*. 2017. Vol. 77. Pp. 1349–1362. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.198.
109. Fan C., Li Z., Ji Q., Sun H., Liang Y., Yang P. Carboxymethyl chitin or chitosan for osteoinduction effect on the human periodontal ligament stem cells // *Dent Mater J*. 2022. Vol. 41(3). Pp. 392–401. DOI: 10.4012/dmj.2021-250.
110. Dung P., Milas M., Rinaudo M., Desbrières J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan // *Carbohydrate Polymers*. 1994. Vol. 24. N3. Pp. 209–214. DOI: 10.1016/0144-8617(94)90132-5.
111. Zhou H., Qian J., Wang J., Yao W., Liu C., Chen J., Cao X. Enhanced bioactivity of bone morphogenetic protein-2 with low dose of 2-N, 6-O-sulfated chitosan *in vitro* and *in vivo* // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30. N9. Pp. 1715–1724. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.1.
112. Bolshakov I.N., Gornostaev L.M., Fominykh O.I., Svetlakov A.V. Synthesis, Chemical and Biomedical Aspects of the Use of Sulfated Chitosan // *Polymers*. 2022. Vol. 14. N16. Article 3431. DOI: 10.3390/polym14163431.

113. Petrova V.A., Chernyakov D.D., Moskalenko Y.E., Gasilova E.R., Strelina I.A., Okatova O.V., Baklagina Y.G., Vlasova E.N., Skorik Y.A. O,N-(2-sulfoethyl)chitosan: Synthesis and properties of solutions and films // *Carbohydr Polym.* 2017. Vol. 101. N57. Pp. 866–874. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.058.
114. Zhang C., Ping Q., Zhang H., Shen J. Preparation of N-alkyl-O-sulfate chitosan derivatives and micellar solubilization of taxol // *Carbohydr Polym.* 2003. Vol. 54. N2. Pp. 137–141. DOI: 10.1016/S0144-8617(03)00090-0.
115. Pires N.R., Cunha P.L.R., Maciel J.S., Angelim A.L., Melo V.M.M., de Paula R.C.M., Feitosa J.P.A. Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity // *Carbohydrate Polymers.* 2013. Vol. 91. N1. Pp. 92–99. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.08.011.
116. Jayakumar R., Nwe N., Tokura S., Tamura H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials // *International Journal of Biological Macromolecules.* 2007. Vol. 40. N3. Pp. 175–181. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.06.02.
117. Nudga L.A., Plisko E.A., Danilov S.N. Synthesis and properties of sulfoethylchitosan // *Журнал прикладной химии.* 1974. №47. С. 872–875.
118. Muzzarelli R.A.A. Modified chitosans carrying sulfonic acid groups // *Carbohydrate Polymers.* 1992. Vol. 19. N4. Pp. 231–236. DOI: 10.1016/0144-8617(92)90074-z.
119. Nud'ga L.A., Petrova V.A., Ben'kovich A.D., Petropavlovskii G.A. Comparative study of reactivity of cellulose, chitosan, and chitin-glucan complex in sulfoethylation // *Russ. J. Appl. Chem.* 2001. N74. Pp. 145–148. DOI: 10.1023/A:1012776807384.
120. Gamzazade A., Sklyar A., Nasibov S., Sushkov I., Shashkov A., Knirel Y. Structural features of sulfated chitosans // *Carbohydrate Polymers.* 1997. Vol. 34. N1–2. Pp. 113–116. DOI: 10.1016/s0144-8617(97)00067-2.
121. Zhang K. et al. FT Raman investigation of novel chitosan sulfates exhibiting osteogenic capacity // *Carbohydr. Polym.* 2011. Vol. 83. N1. Pp. 60–65.
122. Vikhoreva G. et al. Preparation and anticoagulant activity of a lowmolecular-weight sulfated chitosan // *Carbohydr. Polym.* 2005. Vol. 62. N4. Pp. 327–332. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.05.022.
123. Karadeniz F. et al. Sulfation of chitosan oligomers enhances their antiadipogenic effect in 3T3-L1 adipocytes // *Carbohydr. Polym. Elsevier Ltd.* 2011. Vol. 86. N2. Pp. 666–671. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.05.005.
124. Huang R. et al. A new approach to chemically modified chitosan sulfates and study of their influences on the inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth // *React. Funct. Polym.* 2004. Vol. 59. N1. Pp. 41–51. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2003.11.014.
125. Imran M., Sajwan M., Alsuwayt B., Asif M. Synthesis, characterization and anticoagulant activity of chitosan derivatives // *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2019. Vol. 28. Pp. 28–32. DOI: 10.1016/j.jsps.2019.11.003.
126. Cristiane R.M., Giacommo R., Marco A.D.P. Synthesis in pilot plant scale and physical properties of sulfonate polystyrene // *J. Braz. Chem. Soc.* 2003. Vol. 14. Pp. 797–802. DOI: 10.1590/S0103-50532003000500015.
127. Heise K., Hobisch M., Sacarescu L., Maver U., Hobisch J., Reichelt T., Sega M., Fischer S., Spirk S. Low-molecular-weight sulfonated chitosan as template for anticoagulant nanoparticles // *Int. J. Nanomedicine.* 2018. Vol. 13. Pp. 4881–4894. DOI: 10.2147/IJN.S172230.

Поступила в редакцию 21 июля 2023 г.

После переработки 24 сентября 2023 г.

Принята к публикации 2 октября 2023 г.

Для цитирования: Минаков Д.В., Егорова Е.Ю., Маркин В.И., Базарнова Н.Г. Современные подходы к выделению и модификации макромолекул хитина и хитозана высших грибов для их прикладного использования // *Химия растительного сырья.* 2023. №4. С. 29–52. DOI: 10.14258/jcprm.20230413381.

Minakov D.V.^{1*}, Egorova E.Yu.², Markin V.I.¹, Bazarnova N.G.¹ PROSPECTS FOR MODIFYING THE STRUCTURE OF CHITIN AND CHITOSAN OF HIGHER FUNGI TO EXPAND THE POTENTIAL OF THEIR APPLIED USE

¹ Altai State University, pr. Lenina, 61, Barnaul, 656049 (Russia), e-mail: MinakovD-1990@yandex.ru

² Altai State Technical University named after I.I. Polzunov, pr. Lenina, 46, Barnaul, 656038 (Russia)

The review is devoted to summarizing scientific data in the field of the chemical structure and properties of chitin and chitosan obtained from fungal biomass, and to analyzing directions for their modification for use in medicine and the food industry as substances with antibacterial, antiviral, wound-healing and anticoagulant activity. The features of chitin biosynthesis by fungi of the *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Deuteromycota* departments and chitosan biosynthesis by fungi of the *Zygomycota* department are covered. It has been shown that higher fungi contain chitin in their cell walls in the form of a chitin-glucan complex, while lower fungi (zygomycetes) contain chitin in the form of chitosan-glucan. Effective components of substrates that influence the production of polysaccharides by fungi have been identified - carbohydrates in the form of glucose, sucrose and maltose, organic forms of nitrogen in the form of yeast extract and corn flour, mineral components in the form of dihydrogen phosphate and dipotassium monohydrogen phosphate. Particular attention is paid to methods for isolating chitin and modifying it to chitosan with a detailed description of the physicochemical and biological properties of polymers. The review also presents the main reactions and methods for obtaining carboxymethyl and sulfo derivatives of chitin and chitosan. The biological properties and application of these groups of substances are described. In the carboxymethylation of chitin and chitosan, the choice of appropriate reaction conditions and reagents makes it possible to obtain carboxymethyl chitin, N-, O-, N,O-carboxymethylchitosan, or N,N-dicarboxymethylchitosan. The properties and applications of carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan strongly depend on their structure, degree of substitution, and arrangement of amino or hydroxyl groups. The main reagents in the preparation of carboxymethyl derivatives are sodium monochloroacetate, monochloroacetic and glyoxalic acids. Carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan are used as drug delivery systems, antimicrobial agents, in tissue engineering, as components of cosmetics and food products. Modification of chitosan with sulfate groups makes it possible to obtain chitosan 2-N-, 6-O-, 2-N-6-O- and 3-O-sulphates. The main sulfonating agents are oleum, pyridine and chlorosulfonic acid. Sulfonic derivatives of chitin and chitosan can be used as a basis for obtaining hemocompatible materials (with antithrombotic and antibacterial activities).

Keywords: higher fungi, biopolymers, fungal polysaccharides, chitin, chitosan, glucosamines, modification, biological activity.

References

1. Chang S.T. *Int. J. Med. Mushrooms*, 1999, vol. 1, pp. 291–301. DOI: 10.1615/INTJMEDMUSHR.V1.I4.10.
2. Chakravarty B. *Aust. J. Agric. Eng.*, 2011, vol. 2, pp. 102–109.
3. Wani B.A., Bodha R.H., Wani A.H. *J. Med. Plants Res.*, 2010, vol. 4, pp. 2598–2604. DOI: 10.5897/JMPR09.565.
4. Fraga S.M., Nunes F.M. *Appl. Sci.*, 2020, vol. 10, article 2232. DOI: 10.3390/app10072232.
5. Bays H.E., Evans J.L., Maki K.C., Evans M., Maquet V., Cooper R., Anderson J.W. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2013, vol. 67, pp. 2–7. DOI: 10.1038/ejcn.2012.121.
6. Cao Y., Zou S., Xu H., Li M., Tong Z., Xu M., Xu X. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2016, vol. 60, pp. 2678–2690. DOI: 10.1002/mnfr.201600032.
7. Wu T., Zivanovic S., Draughon F.A., Sams C.E. *J Agric Food Chem.*, 2004, vol. 52, no. 26, pp. 7905–7910. DOI: 10.1021/jf0492565.
8. Giannenas I., Tsalie E., Chronis E.F., Mavridis S., Tontis D., Kyriazakis I. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2011, vol. 165, pp. 218–229. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2011.03.002.
9. Synytsya A., Mířková K., Synytsya A., Jablonský I., Speřvácěk J., Erban V., Kovářříková E., Čopříková J. *Carbohydr. Polym.*, 2009, vol. 76, pp. 548–556. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.11.021.
10. Xu X., Yang J., Ning Z., Zhang X. *Food Funct.*, 2015, vol. 6, pp. 2653–2663. DOI: 10.1039/c5fo00689a.
11. Kalař P. *J. Sci. Food Agric.*, 2013, vol. 93, pp. 209–218. DOI: 10.1002/jsfa.5960.
12. Rodrigues D., Walton G., Sousa S., Rocha-Santos T.A.P., Duarte A.C., Freitas A.C., Gomes A.M.P. *LWT Food Sci. Technol.*, 2016, vol. 73, pp. 131–139. DOI: 10.1016/J.LWT.2016.06.004.
13. Zhao J., Cheung P.C.K. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, vol. 59, pp. 5986–5992. DOI: 10.1021/jf200621y.
14. Carbonero E.R., Gracher A.H.P., Komura D.L., Marcon R., Freitas C.S., Baggio C.H., Santos A.R.S., Torri G., Gorin P.A.J., Iacomini M. *Food Chem.*, 2008, vol. 111, pp. 531–537. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.04.015.
15. Komura D.L., Carbonero E.R., Gracher A.H.P., Baggio C.H., Freitas C.S., Marcon R. *Technol.*, 2010, vol. 101, pp. 6192–6199. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.142.
16. Chang C.-W., Lur H.-S., Lu M.-K., Cheng J.-J. *Food Res. Int.*, 2013, vol. 54, pp. 239–245.
17. Zivanovic S. *Identification of opportunities for production of ingredients based on further processed fresh mushrooms, off-grade mushrooms, bi-products, and waste material*. Knoxville, TN: Mushroom Council, University of Tennessee, Department of Food Science and Technology, 2006, 33 p.
18. Abo Elsouid M.M., El Kady E.M. *Bulletin of the National Research Centre*, 2019, vol. 43, article 59. DOI: 10.1186/s42269-019-0105-y.
19. Arrouze F., Essahli M., Rhazi M., Desbrieres J., Toláimate A. *J. Mat. Environ. Sci.*, 2017, vol. 8, no. 7, pp. 2251–2258.
20. Abdelmalek B.E., Sila A., Haddar A., Bougatef A., Ayadi M.A. *Int J Biol Macromol.*, 2017, vol. 104, pp. 953–962. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.107.
21. Tharanathan R.N., Kittur F.S. *Crit Rev Food Sci.*, 2003, vol. 43, pp. 61–87. DOI: 10.1080/10408690390826455.

* Corresponding author.

22. Sitanggang A.B., Sophia L., Wu H.S. *Int Food Res J.*, 2012, vol. 19, no. 2, pp. 393–404.
23. Sabir A., Altaf F., Shafiq M. *Sustainable Polymer Composites and Nanocomposites.*, 2019, pp. 1365–1405. DOI: 10.1007/978-3-030-05399-4_46.
24. Cord-Landwehr S., Moerschbacher B.M. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2021, vol. 8, no. 19, pp. 1–9. DOI: 10.1186/s40694-021-00127-2.
25. Batista A.C.L., Souza Neto F.E., Paiva W.S. *Polymeros*, 2018, vol. 28, no. 3, pp. 275–283. DOI: 10.1590/0104-1428.08316.
26. Islam S., Bhuiyan M.A.R., Islam M.N. *J Polym Environ.*, 2017, vol. 25, pp. 854–866. DOI: 10.1007/s10924-016-0865-5.
27. Heux L., Brugnerotto J., Desbrieres J., Versali M.-F., Rinaudo M. *Biomacromolecules*, 2000, vol. 1, pp. 746–751. DOI: 10.1021/bm000070y.
28. Latge J.P. *Mol. Microbiol.*, 2007, vol. 66, pp. 279–290. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x.
29. Muzzarelli R.A. *Chitin*. Springer, 2011, pp. 1–34. DOI: 10.1007/978-90-481-9684-5_1.
30. Jones M., Kujundzic M., John S., Bismarck A. *Marine Drugs*, 2020, vol. 18(1), no. 64. DOI: 10.3390/md18010064.
31. Adams D.J. *Microbiology*, 2004, vol. 150(1), pp. 2029–2035. DOI: 10.1099/mic.0.26980-0.
32. Banks I.R., Specht C.A., Donlin M.J., Gerik K.J., Levitz S.M., Lodge J.K. *Eukaryot Cell*, 2005, vol. 4(11), pp. 1902–1912. DOI: 10.1128/EC.4.11.1902-1912.2005.
33. Baker L.G., Specht C.A., Donlin M.J., Lodge J.K. *Eukaryot Cell*, 2007, vol. 6(5), pp. 855–867. DOI: 10.1128/EC.00399-06.
34. Ruiz-Herrera J. *Current topics in medical mycology*. Springer, 1989, vol. 3, pp. 168–217.
35. Fernando L.D., Dickwella Widanage M.C., Penfield J., Lipton A.S., Washton N., Latgé J-P. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021, no. 8. DOI: 10.3389/fmolb.2021.72705-3.
36. Akila R.M. *Adv Appl Sci Res.*, 2014, vol. 5(4), pp. 157–170.
37. Gabiatti C.J., Vendruscolo F., Piaia J.C.Z., Rodrigues R.C., Durrant L.R., Costa J.A.V. *Braz Arch Biol Technol.*, 2006, vol. 49, pp. 29–34.
38. Bhargav S., Panda B.P., Ali M., Javed S. *Chem Biochem Eng Q*, 2008, vol. 22, pp. 49–70.
39. Shcherba V.V., Babitskaya V.G. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2008, vol. 44, no. 1, pp. 90–95. (in Russ.).
40. Mahapatra S., Banerjee D. *Microbiology Insights*, 2013, vol. 6, pp. 1–16. DOI: 10.4137/MBLS10957.
41. Mishra A., Kumar S. *Process Biochem.*, 2007, vol. 42, pp. 681–685. DOI: 10.1016/j.procbio.2006.09.022.
42. Nwe N., Stevens W.F. *Process Biochem.*, 2004, vol. 39, pp. 1639–1642.
43. Kumirska J., Weinhold M.X., Thöming J., Stepnowski P. *Polymers*, 2011, vol. 3, no. 4, pp. 1875–1901. DOI: 10.3390/polym3041875.
44. Sudha P.N., Saranya M., Gomathi T., Gokila S., Aisverya S., Venkatesan J., Anil S. *Chitosan Deriv Comp Appl.*, 2017, pp. 253–269. DOI: 10.1002/9781119364849.ch10.
45. Gbenebor O.P., Akpan E.I., Adeosun S.O. *Prog Biomat.*, 2017, vol. 6, no. 3, pp. 97–111. DOI: 10.1007/s40204-017-0070-1.
46. Grishin A.A., Zorina N.V., Lutskiy V.I. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya*, 2014, no. 1(6), pp. 29–34. (in Russ.).
47. Younes I., Rinaudo M. *Mar Drugs*, 2015, vol. 13, no. 3, pp. 1133–1174. DOI: 10.3390/md13031133.
48. Yu Z., Lau D. *Carbohydr Polym.*, 2017, vol. 174, pp. 941–947. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.06.099.
49. Friedman A.J., Phan J., Schairer D.O., Champer J., Qin M., Pirouz A., Modlin R.L. *J Invest Dermatol.*, 2013, vol. 133, no. 5, pp. 1231–1239. DOI: 10.1038/jid.2012.399.
50. Badwan A.A., Rashid I., Al Omari M.M., Darras F.H. *Mar Drugs*, 2015, vol. 13, no. 3, pp. 1519–1547. DOI: 10.3390/md13031519.
51. Silva S.S., Mano J.F., Reis R.L. *Green Chem.*, 2017, vol. 19, no. 5, pp. 1208–1220.
52. Akpan E., Gbenebor O., Adeosun S. *Int J Biol Macromol.*, 2018, vol. 106, pp. 1080–1088. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.106.
53. Xu Q., Wang C.-H., Wayne P.D. *Curr Pharm Des.*, 2010, vol. 16, no. 21, pp. 2350–2368. DOI: 10.2174/138161210791920469.
54. Nawawi W., Jones M., Murphy R.J., Lee K.-Y., Kontturi E., Bismarck A. *Biomacromolecules*, 2019, vol. 21, pp. 30–55. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b01141.
55. Karimi K., Zamani A. *Biotechnol. Adv.*, 2013, vol. 31, pp. 466–481. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.009.
56. Jones M., Weiland K., Kujundzic M., Theiner J., Kahlig H., Kontturi E., John S., Bismarck A., Mautner A. *Biomacromolecules*, 2019, vol. 20, pp. 3513–3523. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00791.
57. Hassainia A., Satha H., Boufi S. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, vol. 117, pp. 1334–1342. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.172.
58. Galbreikh L.S. *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal*, 2001, vol. 7, no. 1, pp. 51–56. (in Russ.).
59. Nawawi W., Lee K.-Y., Kontturi E., Murphy R., Bismarck A. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2019, vol. 7, pp. 6492–6496. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b00721.
60. Araújo D., Ferreira I.C., Torres C.A.V., Neves L., Freitas F. *J Chem Technol Biotechnol.*, 2020, vol. 95, pp. 1277–1289. DOI: 10.1002/jctb.6325.
61. Oliveira C.E.V., Magnani M., Sales C.V., Pontes A.L.S., Campos-Takaki G.M., Stamford T.C.M., Souza E.L. *Int J Food Microbiol.*, 2014, vol. 171, pp. 54–61. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.006.
62. Moussa S.H., Tayel A.A., Al-Turki I.A. *Int J Biol Macromol.*, 2013, vol. 54, pp. 204–208. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.12.029.

63. Klaykrueyay B., Siralertmukul K., Srikulkit K. *Carbohydr Polym.*, 2010, vol. 80, no. 1, pp. 197–207. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.11.013.
64. Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Gemma G., Heras A. *Curr Chem Biol.*, 2009, vol. 3, no. 2, pp. 203–230. DOI: 10.2174/187231309788166415.
65. Lim S.H., Hudson S.M. *Carbohydr Res.*, 2004, vol. 339, no. 2, pp. 313–319. DOI: 10.1016/j.carres.2003.10.024.
66. Zheng L.Y., Zhu J.F. *Carbohydr Polym.*, 2003, vol. 54, pp. 527–530. DOI: 10.1016/j.carbpol.2003.07.009.
67. Pillai C., Paul W., Sharma C.P. *Prog. Polym. Sci.*, 2009, vol. 34, pp. 641–678. DOI: 10.1016/j.progpolymer.2009.04.001.
68. Alsarra I.A. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2009, vol. 45, pp. 16–21. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2009.03.010.
69. Hai T.A.P., Sugimoto R. *Appl Surf Sci.*, 2018, vol. 434, pp. 188–197. DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.10.197.
70. Janesch J., Jones M., Bacher M., Kontturi E., Bismarck A., Mautner A. *React. Funct. Polym.*, 2019, vol. 146, article 104428. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104428.
71. Xu T., Xin M., Li M., Huang H., Zhou S. *Carbohydr. Polym.*, 2010, vol. 81, pp. 931–936. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.04.008.
72. Luan F., Wei L., Zhang J., Tan W., Chen Y., Wang P., Dong F., Li Q., Guo Z. *Starch Stärke*, 2018, vol. 70, no. 11–12, article 1800026. DOI: 10.1002/star.201800026.
73. Khattak S., Wahid F., Liu L.-P., Jia S.-R., Chu L.-Q., Xie Y.-Y., Li Z.-X., Zhong C. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, vol. 103, pp. 1989–2006.
74. Lun'kov A.P., Il'ina A.V., Varlamov V.A. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2018, vol. 54, no. 5, pp. 444–454. DOI: 10.1134/S0555109918050124. (in Russ.).
75. Al'myashева N.R., Yarina M.S., Golyshkin A.V., Dzhavakhyan B.R., Krasnopol'skaya L.M. *Antibiotiki i khimioterapiya*, 2017, vol. 62, no. 7–8, pp. 8–12. (in Russ.).
76. Yang T.-L. *Int J Mol Sci.*, 2011, vol. 12, no. 3, pp. 1936–1963. DOI: 10.3390/ijms12031936.
77. Hajji S., Younes I., Ghorbel-Bellaaj O., Hajji R., Rinaudo M., Nasri M., Jellouli K. *Int J Biol Macromol.*, 2014, vol. 65, pp. 298–306. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.045.
78. Aider M. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2010, vol. 43, no. 6, pp. 837–842. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.01.021.
79. Kabalak M., Aracagök Y.D., Torun M. *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity*. Minsk, 2017, p. 297.
80. Jothimani B., Sureshkumar S., Venkatachalapathy B. *Carbohydr Polym.*, 2017, vol. 173, pp. 714–720. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.06.041.
81. Zamani A., Jehanipour A., Edebo L., Niklasson C., Taherzadeh M.J. *J Agric Food Chemistry*, 2008, vol. 56, pp. 8314–8318. DOI: 10.1021/jf801478j.
82. Cui J., Yu Z., Lau D. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, vol. 17, no. 1. DOI: 10.3390/ijms17010061.
83. Bamba Y., Ogawa Y., Saito T., Berglund L.A., Isogai A. *Biomacromolecules*, 2017, vol. 18, pp. 4405–4410. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b01467.
84. Varlamov V.A., Il'ina A.V., Shagdarova B.Ts., Lun'kov A.P., Mysyakina I.S. *Uspekhi biologicheskoy khimii*, 2020, vol. 60, pp. 317–368. (in Russ.).
85. Mavisakalyan V.M., Yeritsyan K.M., Yeritsyan M.L. *Problemy sovremennoy nauki i obrazovaniya*, 2020, no. 8(153), pp. 12–17. (in Russ.).
86. Oh B.H.L., Bismarck A., Chan-Park M.B. *Biomacromolecules*, 2014, vol. 15, pp. 1777–1787. DOI: 10.1021/bm500172u.
87. Aktuganov G.E., Melentiev A.I. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, vol. 53, no. 6, pp. 611–627. DOI: 10.1134/S0003683817060023.
88. Aktuganov G.E., Melentiev A.I., Varlamov V.P. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2019, vol. 55, no. 4, pp. 323–343. DOI: 10.1134/S0003683819040021.
89. Minagawa T., Okamura Y., Shigemasa Y., Minami S., Okamoto Y. *Carbohydr. Polym.*, 2007, vol. 67, pp. 640–644. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.07.007.
90. Vasconcelos D.P., Costa M., Neves N., Teixeira J.H., Vasconcelos D.M., Santos S.G. *J Biomed Mat Res Part A*, 2018, DOI: 10.1002/jbm.a.36370.
91. Cheon J.Y., Lee H.M., Park W.H. *Mar Drugs*, 2018, vol. 16, no. 1. DOI: 10.3390/md16010011.
92. Naqvi S., Moerschbacher B.M. *Crit Rev Biotechnol.*, 2017, vol. 37, no. 1, pp. 11–25. DOI: 10.3109/07388551.2015.1104289.
93. Upadhyaya L., Singh J., Agarwal V., Tewari R.P. *Carbohydr. Polym.*, 2013, vol. 91, pp. 452–466. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.07.076.
94. Liu H., Liu J., Qi C., Fang Y., Zhang L., Zhuo R., Jiang X. *Acta Biomater.*, 2016, vol. 35, pp. 228–237. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.02.028.
95. Azuma K., Nishihara M., Shimizu H., Itoh Y., Takashima O., Osaki T., Itoh N., Imagawa T., Murahata Y., Tsuka T. *Biomaterials*, 2015, vol. 42, pp. 20–29. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.11.043.
96. Kim K.M., Son J.H., Kim S.K., Weller C.L., Hanna M.A. *J Food Sci.*, 2006, vol. 71, no. 3, pp. 119–124. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb15624.x.
97. Chang J., Liu W., Han B., Peng S., He B., Gu Z. *Wound Repair Regen.*, 2013, vol. 21, pp. 113–121. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00859.x.

98. Anitha A., Rani V.D., Krishna R., Sreeja V., Selvamurugan N., Nair S., Tamura H., Jayakumar R. *Carbohydr. Polym.*, 2009, vol. 78, pp. 672–677. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.05.028.
99. Mattioli-Belmonte M., Nicoli-Aldini N., De Benedittis A., Sgarbi G., Amati S., Fini M., Biagini G., Muzzarelli R. *Carbohydr. Polym.*, 1999, vol. 40, pp. 23–27.
100. Jayakumar R., Prabakaran M., Nair S.V., Tokura S., Tamura H., Selvamurugan N. *Progress in Materials Science*, 2010, vol. 55, no. 7, pp. 675–709. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2010.03.001.
101. Patent 103288980A (CN). 11.09.2013.
102. Patent 2100373C1 (RU). 1996. (in Russ.).
103. Nudga L.A. *Strukturno-khimicheskaya modifikatsiya khitina, khitozana i khitin-glyukanovykh kompleksov : dissertatsiya doktora khimicheskikh nauk*. [Structural-chemical modification of chitin, chitosan and chitin-glucan complexes: dissertation of Doctor of Chemical Sciences]. Saint Petersburg, 2006, 360 p. (in Russ.).
104. Chen X.-G., Park H.-J. *Carbohydrate Polymers*, 2003, vol. 53, no. 4, pp. 355–359. DOI: 10.1016/S0144-8617(03)00051-1.
105. Fei Liu X., Lin Guan Y., Zhi Yang D., Li Z., De Yao K. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000, vol. 79, no. 7, pp. 1324–1335. DOI: 10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L.
106. Narayanan D., Jayakumar R., Chennazhi K.P. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2014, vol. 6, no. 6, pp. 574–598. DOI: 10.1002/wnan.1301.
107. Jones M., Kujundzic M., John S., Bismarck A. *Marine Drugs*, 2020, vol. 18, no. 1, article 64. DOI: 10.3390/md18010064.
108. Fonseca-Santos B., Chorilli M. *Materials Science and Engineering*, 2017, vol. 77, pp. 1349–1362. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.198.
109. Fan C., Li Z., Ji Q., Sun H., Liang Y., Yang P. *Dent Mater J.*, 2022, vol. 41(3), pp. 392–401. DOI: 10.4012/dmj.2021-250.
110. Dung P., Milas M., Rinaudo M., Desbrières J. *Carbohydrate Polymers*, 1994, vol. 24, no. 3, pp. 209–214. DOI: 10.1016/0144-8617(94)90132-5.
111. Zhou H., Qian J., Wang J., Yao W., Liu C., Chen J., Cao X. *Biomaterials*, 2009, vol. 30, no. 9, pp. 1715–1724. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.1.
112. Bolshakov I.N., Gornostaev L.M., Fominykh O.I., Svetlakov A.V. *Polymers (Basel)*, 2022, vol. 14, no. 16, article 3431. DOI: 10.3390/polym14163431.
113. Petrova V.A., Chernyakov D.D., Moskalenko Y.E., Gasilova E.R., Strelina I.A., Okatova O.V., Baklagina Y.G., Vlasova E.N., Skorik Y.A. *Carbohydr Polym.*, 2017, vol. 101, no. 57, pp. 866–874. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.058.
114. Zhang C., Ping Q., Zhang H., Shen J. *Carbohydr Polym.*, 2003, vol. 54, no. 2, pp. 137–141. DOI: 10.1016/S0144-8617(03)00090-0.
115. Pires N.R., Cunha P.L.R., Maciel J.S., Angelim A.L., Melo V.M.M., de Paula R.C.M., Feitosa J.P.A. *Carbohydrate Polymers*, 2013, vol. 91, no. 1, pp. 92–99. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.08.011.
116. Jayakumar R., Nwe N., Tokura S., Tamura H. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, vol. 40, no. 3, pp. 175–181. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.06.02.
117. Nudga L.A., Plisko E.A., Danilov S.N. *Zhurnal Prikl. Khimii*, 1974, no. 47, pp. 872–875.
118. Muzzarelli R.A.A. *Carbohydrate Polymers*, 1992, vol. 19, no. 4, pp. 231–236. DOI: 10.1016/0144-8617(92)90074-z.
119. Nud'ga L.A., Petrova V.A., Ben'kovich A.D., Petropavlovskii G.A. *Russ. J. Appl. Chem.*, 2001, no. 74, pp. 145–148. DOI: 10.1023/A:1012776807384.
120. Gamzazade A., Sklyar A., Nasibov S., Sushkov I., Shashkov A., Knirel Y. *Carbohydrate Polymers*, 1997, vol. 34, no. 1–2, pp. 113–116. DOI: 10.1016/S0144-8617(97)00067-2.
121. Zhang K. et al. *Carbohydr. Polym.*, 2011, vol. 83, no. 1, pp. 60–65.
122. Vikhoreva G. et al. *Carbohydr. Polym.*, 2005, vol. 62, no. 4, pp. 327–332. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.05.022.
123. Karadeniz F. et al. *Carbohydr. Polym. Elsevier Ltd*, 2011, vol. 86, no. 2, pp. 666–671. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.05.005.
124. Huang R. et al. *React. Funct. Polym.*, 2004, vol. 59, no. 1, pp. 41–51. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2003.11.014.
125. Imran M., Sajwan M., Alsuwat B., Asif M. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2019, vol. 28, pp. 28–32. DOI: 10.1016/j.jsps.2019.11.003.
126. Cristiane R.M., Giacommo R., Marco A.D.P. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003, vol. 14, pp. 797–802. DOI: 10.1590/S0103-50532003000500015.
127. Heise K., Hobisch M., Sacarescu L., Maver U., Hobisch J., Reichelt T., Sega M., Fischer S., Spirk S. *Int. J. Nanomedicine*, 2018, vol. 13, pp. 4881–4894. DOI: 10.2147/IJN.S172230.

Received July 21, 2023

Revised September 24, 2023

Accepted October 2, 2023

For citing: Minakov D.V., Egorova E.Yu., Markin V.I., Bazarnova N.G. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 4, pp. 29–52. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20230413381.