УДК 579.23

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА В ОТНОШЕНИИ *Escherichia coli*

С.Н. Куликов, Д.Р. Оберемок, Е.А. Безродных,
В.Е. Тихонов, В.П. Варламов

Аннотация

Исследована антибактериальная активность образцов хитозана, различающихся по молекулярной массе в отношении *Escherichia coli*, при разных значениях pH. Показано, что в кислой среде более сильным ингибирующим действием обладают образцы с большей молекулярной массой, а в слабощелочной среде более активны олигомерные формы хитозана. Предполагается, что антибактериальная активность хитозана определяется степенью протонирования его аминогрупп, которая является переменной величиной и зависит как от степени полимеризации вещества, так и от значения pH среды. Показано, что антибактериальное действие хитозана сопровождается повреждениями клеточной стенки бактерий, в результате чего нарушается проницаемость мембранных структур.

Ключевые слова: хитозан, молекулярная масса, антибактериальная активность, *Escherichia coli*, β-галактозидаза.

Введение

В последние два десятилетия значительно возрос интерес к биоцидным свойствам хитозана, которые, наряду с нетоксичностью, биосовместимостью, гипоаллергенностью и биодеградируемостью, позволяют использовать его в биомедицинских целях в качестве альтернативы и/или вспомогательного вещества в антимикробной терапии, особенно по отношению к ряду бактериальных штаммов, резистентных к классическим антибиотикам.

Однако, несмотря на большое количество экспериментальных работ, посвящённых антимикробной, а также противогрибной активности хитозана, остаётся до конца невыясненной взаимосвязь между химической структурой хитозана как полимера и его биологическим эффектом на клетки микроорганизмов. Установление подобной взаимосвязи осложняется тем, что хитозан, состоящий в качестве субъединиц из глюкозамина и ацетилглюкозамина, представляет собой гетерогенную группу веществ, различающихся по молекулярной массе (вязкости), степени деацетилирования, расположению остаточных ацетилированных звеньев вдоль полимерной цепи, значению средней величины pK_a [1].

В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение антибактериальной активности ряда образцов хитозана с разной молекулярной массой при различных значениях кислотности среды в отношении *Escherichia coli*.

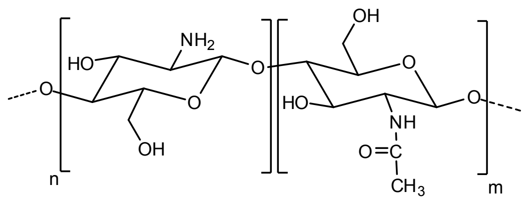

Рис. 1. Структурная формула хитозана

1. Материалы и методы

В работе использовали крабовый высокомолекулярный хитозан (Heppe, Германия) со средневязкостной молекулярной массой (M_v) 600 кДа и степенью дезацетилирования 85% (табл. 1). Средневязкостную молекулярную массу и степень дезацетилирования определяли по методу [2].

Низкомолекулярные и олигомерные формы хитозана получали из образца с молекулярной массой 70 кДа и степенью дезацетилирования 80% (Aldrich, США) с помощью деполимеризации в присутствии соляной кислоты по методу [3]. Степень дезацетилирования низкомолекулярных и олигомерных форм хитозана определяли с использованием ^{1}H ЯМР-спектроскопии по методу [4].

Хроматографический анализ хитозанов. Средневесовую молекулярную массу (M_w) и индекс полидисперсности образцов (ИП) низкомолекулярных хитозанов определяли с использованием высокоэффективной гельпроникающей хроматографии (ВЭГПХ) согласно методу [5] на хроматографе S 2100 (Sykam, Германия) на колонке Ultahydrogel-250 (7.8 × 300 мм) (Waters, США) в системе 0.05 М уксусная кислота – 0.15 М ацетат аммония, pH 5.1, скорости элюирования 0.5 мл/мин при температуре 30 °C с использованием предколонки GFC-4000 (4 мм × 3 мм) (Phenomenex, США). Контроль процесса анализа осуществляли с помощью рефрактометрического детектора К-2301 (Knauer, Германия). Расчет значений молекулярно массового распределения образцов хитозана осуществляли с помощью программы «Мультихром», версия 1.6 (ЗАО «Амперсенд», г. Москва). Для калибровки колонки использовали декстраны различной молекулярной массы для ВЭГПХ (Sigma, США).

Приготовление рабочих растворов низкомолекулярных хитозанов. Низкомолекулярные хитозаны в виде гидрохлоридов растворяли в дистиллированной воде до концентрации 8 мг/мл (массу хитозана рассчитывали без противоиона) и стерилизовали полученные растворы посредством фильтрации через мембраны с диаметром пор 0.22 мкм с последующим прогреванием на водяной бане в течение 5 мин. Растворы хранили перед использованием при 4 °C.

Определение значений pK_a образцов хитозана. Значение константы диссоциации сопряженной кислоты pK_a определяли методом титрования: в 50 мл дистиллированной воды растворяли 50 мг исследуемого образца гидрохлорида хитозана. После полного растворения вещества к раствору добавляли соляную кислоту до pH 3.00. После этого при постоянном перемешивании раствор титровали, добавляя аликвоты раствора 0.5 М NaOH. Значение pH раствора контролировали с помощью pH-метра (Hanna, Португалия). Расчёт значения pK_a

проводили по значению pH, при котором находилась середина плато на кривой титрования, как описано в работе [6].

Растворимость хитозанов оценивали с использованием TES-MES-ACES-Na-буфера с различным значением pH – от 6.5 до 8.0, как описано в работе [7].

Бактериальные штаммы и условия их культивирования. В работе использовали штамм *E. coli* ATCC 25922, который хранили в полужидком МПА при –20 °С. Рабочие культуры бактерий хранили на МПА при 4 °С. Для приготовления 18-часовой культуры бактерий в колбу объёмом 100 мл с МПБ добавляли суспензию в количестве 5% (об/об) из бактериальной культуры и смесь инкубировали при 37 °С на качалке при 150 об/мин.

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Для определения антибактериальной активности хитозанов использовали модифицированный метод, описанный в работе [8]. В стерильных 96-луночных круглодонных планшетах готовили двойные разведения вещества в МПБ, содержащем 0.15 М TES-ACES-MES-Na-буфер (0.05 М TES, 0.05 М ACES, 0.05 М MES) с заданным значением pH от 5.50 до 8.00 с шагом, равным 0.25. Затем в лунки планшета вносили суспензию бактерий в той же среде до конечного концентрации $2.5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. После 24 ч инкубации при 37 °С на качалке (220 об/мин) определяли МИК хитозанов по отсутствию роста культуры в лунках с минимальной концентрацией вещества. В качестве контроля служили лунки, содержащие питательную среду с буферным раствором соответствующего уровня pH без добавления хитозана, куда вносили инокулят, аналогичный опыту.

Оценку влияния хитозана на проницаемость цитоплазматической мембраны проводили, определяя уровень β-галактозидазной активности в культуральной среде по модифицированному методу, как описано в работе [9]. В качестве субстрата использовали О-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (ONPG). Для этого *E. coli* выращивали на МПБ с 2%-ной лактозой до логарифмической стадии роста. Отмывали клетки бактерий от питательной среды в физиологическом растворе с использованием центрифугирования. Ресуспендировали клетки в 0.1 М MES-Na буфере с pH 6.5 до оптической плотности 0.2 при 600 нм. К полученной суспензии добавляли раствор хитозана в том же буфере до конечной концентрации от 25 до 400 мкг/мл. Инкубировали клетки бактерий в присутствии хитозана в течение 2 ч, отбирая через каждые 20 мин аликвоты смеси. Из отобранных аликвот центрифугированием осаждали клетки. В надосадочной жидкости определяли β-галактозидазную активность, добавляя к ней 0.1 М натрий-фосфатный буфер с pH 7.4 и содержащий 30 мМ ONPG в соотношении 1 : 2. Инкубацию вели при +37 °С. Выход цитоплазматической галактозидазы оценивали по образованию О-нитрофенола, измеряя светопоглощение при 450 нм.

Трансмиссионную электронную микроскопию проводили, как описано в работе [8], в лаборатории микроскопии Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (г. Казань). Для этого аликвоты суспензий клеток микроорганизмов из контрольных вариантов и из вариантов с добавлением хитозанов подвергали центрифугированию при 1000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Собранные центрифугированием клетки однократно отмывали в 0.05 М фосфатном буфере с pH 7.2. Затем клетки ресуспендировали в том же буфере, содержащем 3%-ный глутаровый альдегид. Затем образцы помещали в 1%-ный раствор четырехокиси осмия и проводили дофиксацию в течение суток с последующим обезвоживанием. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Jeol-100 при 80 кВ.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003. Для описания признаков использовали построение 95%-ных доверительных интервалов для средних.

2. Результаты и их обсуждение

Для оценки антибактериальных свойств хитозана в работе были использованы олигомерные и низкомолекулярные образцы полимера. Хроматографический анализ позволил определить некоторые их молекулярно-массовые характеристики. Так, M_w образцов составляла от 0.7 до 15 кДа, что соответствовало степени полимеризации от 4 до 87 (табл. 1). С целью минимизации эффекта влияния ацетилированных остатков на биологическую активность в опыт были взяты высокодезацетилированные образцы, свойства которых зависят от их молекулярных масс. Наряду с высокой степенью дезацетилирования образцы обладали также низкой степенью полидисперсности, что позволяет более чётко выявить взаимосвязь физико-химических и биологических свойств полимера с его молекулярной массой.

Табл. 1

Характеристика образцов хитозана

№ образца	M_w, кДа	ИП	СП*	СД**, моль. %	pK_a
1	0.7	1.41	4	95	7.1 ± 0.05
2	1.5	1.39	8	93	6.7 ± 0.05
3	2.0	1.40	12	97	6.6 ± 0.05
5	3.5	1.71	20	95	6.5 ± 0.05
6	4.2	1.38	24	97	6.5 ± 0.05
7	5.5	2.28	32	78	6.5 ± 0.05
9	9.6	1.44	56	97	6.4 ± 0.05
10	12.7	1.39	74	95	6.4 ± 0.05
11	15.0	1.61	87	94	6.4 ± 0.05
13	600000***	–	3400	85	6.4 ± 0.05

* Средняя степень полимеризации (рассчитана из значения M_w).
** Степень дезацетилирования.
*** Средневязкостная молекулярная масса (M_v).

Титрование растворов образцов показало, что у хитозан с разной молекулярной массой значения константы диссоциации сопряженной кислоты pK_a различаются (табл. 1). У образцов с молекулярной массой более 5.5 кДа, в том числе у исходного высокомолекулярного, значение pK_a составляло 6.4, тогда как у олигомерных форм хитозана наблюдалось увеличение этого значения с уменьшением их молекулярной массы. И если у олигохитозана с M_w 5.5 кДа значение составляло 6.5, то у олигомеров менее 1 кДа это значение достигало 7.1. Последнее значение было и самым близким к pK_a мономера хитозана – глюкозамина, которое равнялось 7.9. Эти данные позволяют заключить, что в пределах молекулярных масс до ~ 10 кДа, уменьшение степени полимеризации

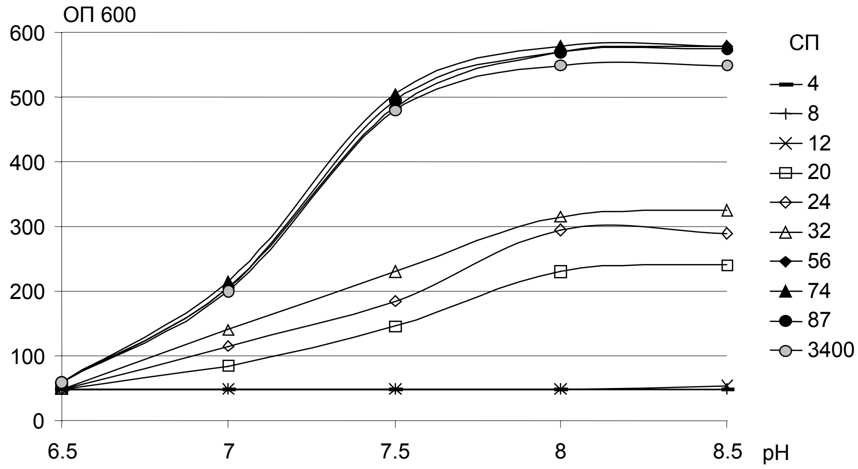

Рис. 2. Изменение оптической плотности хитозанов с различной степенью полимеризации в зависимости рН среды после 1 ч инкубации

молекул хитозана ведёт к увеличению степени протонирования их свободных аминогрупп. Известно, что антибактериальная активность хитозанового полимера связана с величиной положительного заряда его молекул, следовательно, данное явление необходимо учитывать при проведении экспериментов по установлению зависимости биологических свойств хитозана от его молекулярной массы.

Из приведённых выше данных следует, что при одном уровне кислотности среды олигохитозаны разной молекулярной массы могут иметь различную долю протонированных аминогрупп, что позволяет сделать вывод о различии в растворимости образцов. О растворимости образцов при различных рН судили по повышению мутности их растворов при повышении рН. На рис. 2 продемонстрирована зависимость оптической плотности растворов образцов хитозана с различной молекулярной массой через 1 ч инкубации. Из этих данных следует, что все хитозаны хорошо растворимы при значениях кислотности среды менее 6.5. При увеличении рН образцы демонстрировали различную растворимость. Высокомолекулярный хитозан (600 кДа), как и хитозаны с молекулярной массой 5.5 кДа (СП более 32), практически полностью выпадали в осадок при рН 7.5 и выше. Тогда как олигохитозаны с молекулярной массой от 3.5 до 5.5 кДа (СП от 20 до 32) показали существенно более высокую растворимость: оптическая плотность их растворов увеличивалась значительно меньше, чем у более высокомолекулярных образцов, достигая максимума при превышении уровня рН 8.0. Это говорит о том, что часть молекул олигохитозанов с этой молекулярной массой, вероятно, имеет достаточно высокую степень протонирования аминогрупп и присутствует в неагрегированном виде в системе с рН до 8.0. Растворы образцов с молекулярной массой 0.7 и 1.5 кДа, представляющие собой олигомеры хитозана со степенью полимеризации 4 и 8 соответственно, изменяли свою оптическую плотность во всём диапазоне кислотности растворов, использованных в экспериментах. Известно, что олигомеры с такой степенью полимеризации в осадок не выпадают и в сильно щелочных условиях.

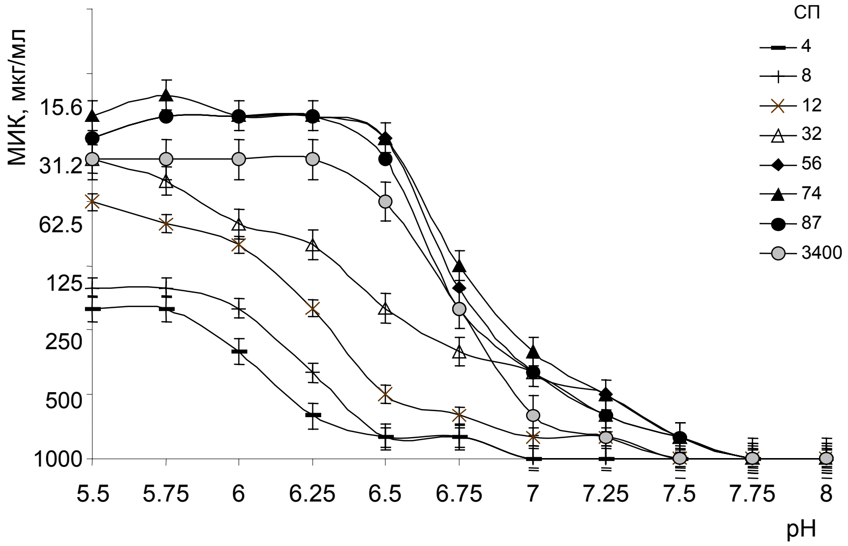

Рис. 3. Влияние pH и степени полимеризации на МИК хитозана в отношении *E. coli*

В ходе определения антибактериальной активности хитозана в отношении *E. coli* установлено, что ингибирующее действие полимера на рост бактерии зависит как от его молекулярной массы, так и от кислотности среды (рис. 3).

У всех исследуемых образцов ингибирующая активность увеличивалась при понижении pH среды, что выражалось в уменьшении минимальной концентрации вещества, необходимой для подавления роста микроорганизма. Значительные отличия в проявлении антибактериальных свойств характерны для олигомерных и самых низкомолекулярных форм хитозана, тогда как антибактериальная активность образцов со степенью полимеризации, близкой к 50 (около 10 кДа) и выше, практически одинакова. Зависимость антибактериального действия хитозана от молекулярной массы разделена на две области значений pH: кислую (pH до 7.00) и щелочную (pH более 7.00). В кислых средах при увеличении молекулярной массы хитозана его антибактериальная активность также усиливается. При этом для образцов с высокой степенью полимеризации для подавления роста бактерий требуется более чем на порядок меньшая концентрация вещества по сравнению с олигомерными образцами. В области щелочных значений pH антибактериальная активность хитозанов в целом ниже, чем в кислых средах, однако олигохитозаны с молекулярной массой от 3.5 до 5.5 кДа в таких условиях проявляют антибактериальные свойства, сопоставимые со свойствами более высокомолекулярных образцов, и превосходят исходный хитозан. Аналогичные данные были нами ранее получены в отношении грамположительного стафилококка [3], где в области нейтральных и слабощелочных значений pH олигохитозаны с молекулярной массой менее 8 кДа обладали более высокой антибактериальной активностью, чем образцы с молекулярной массой более 10 кДа. Кроме того, исходный образец хитозана со средневязкостной молекулярной массой 600 кДа хотя и был по антибактериальному действию близок к низкомолекулярным образцам с молекулярной массой в области 10–20 кДа, тем не менее обладал меньшей активностью в слабокислых средах в отношении

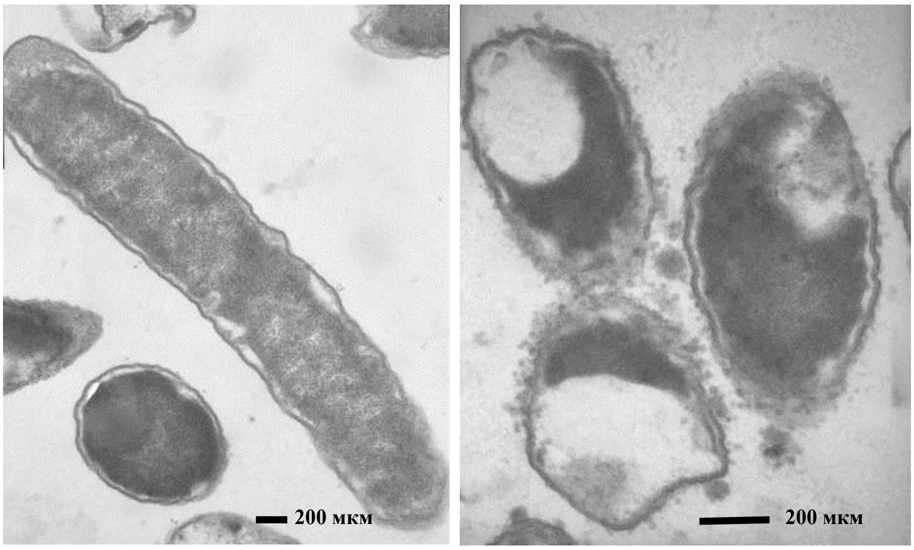

Рис. 4. Электронные микрофотографии *E. coli*: *а* – контроль, *б* – в присутствии хитозана (2.2 кДа) после 30 мин инкубации

E. coli (рис. 3). Возможно, это связано с худшей растворимостью данного образца, обладающего значительно более высокой степенью полимеризации по сравнению с низкомолекулярными хитозанами, которая может быть обусловлена меньшей агрегационной устойчивостью его растворов даже в кислых средах.

До настоящего времени нет единого мнения о механизме антибактериального действия хитозана, что связано с его множественным неспецифическим действием. Для грамположительных бактерий таковым может являться взаимодействие хитозана с отрицательно заряженными компонентами муреина – тейхоевыми и тейхуроновыми кислотами, что, в свою очередь, может индуцировать гиперактивацию автолитических ферментов, которые в норме депонированы на этих полианионах, и вызывать в дальнейшем неконтролируемую деградацию гликопротеина клеточной стенки. У грамотрицательных бактерий одним из основных мишеней действия хитозанового полимера является внешняя мембрана, поскольку поликатионная природа хитозана позволяет ему легко связываться с отрицательно заряженной поверхностью бактериальных клеток. Так, было показано, что хитозан вызывает такие изменения во внешней мембране грамотрицательных бактерий [10], которые ведут к гибели клеток [11]. Электронные микрофотографии клеток *E. coli* при действии на них олигохитозана (рис. 4) подтверждают литературные данные.

На рис. 4 видно, что внешняя мембрана клеток утолщается, местами она имеет сильно размытый вид, около таких участков можно наблюдать скопления агглютинированных веществ, вероятно, представляющих собой компоненты внешней мембраны или выходящего наружу периплазматического или цитоплазматического содержимого. Вероятность выхода цитоплазматического содержимого подтверждается тем, что протопласты клеток в присутствии хитозана сильно уменьшены в размерах, а агглютинированные компоненты на поверхности клеток сконцентрированы в области, где остатки цитоплазматического содержимого примыкают изнутри к внешней мембране.

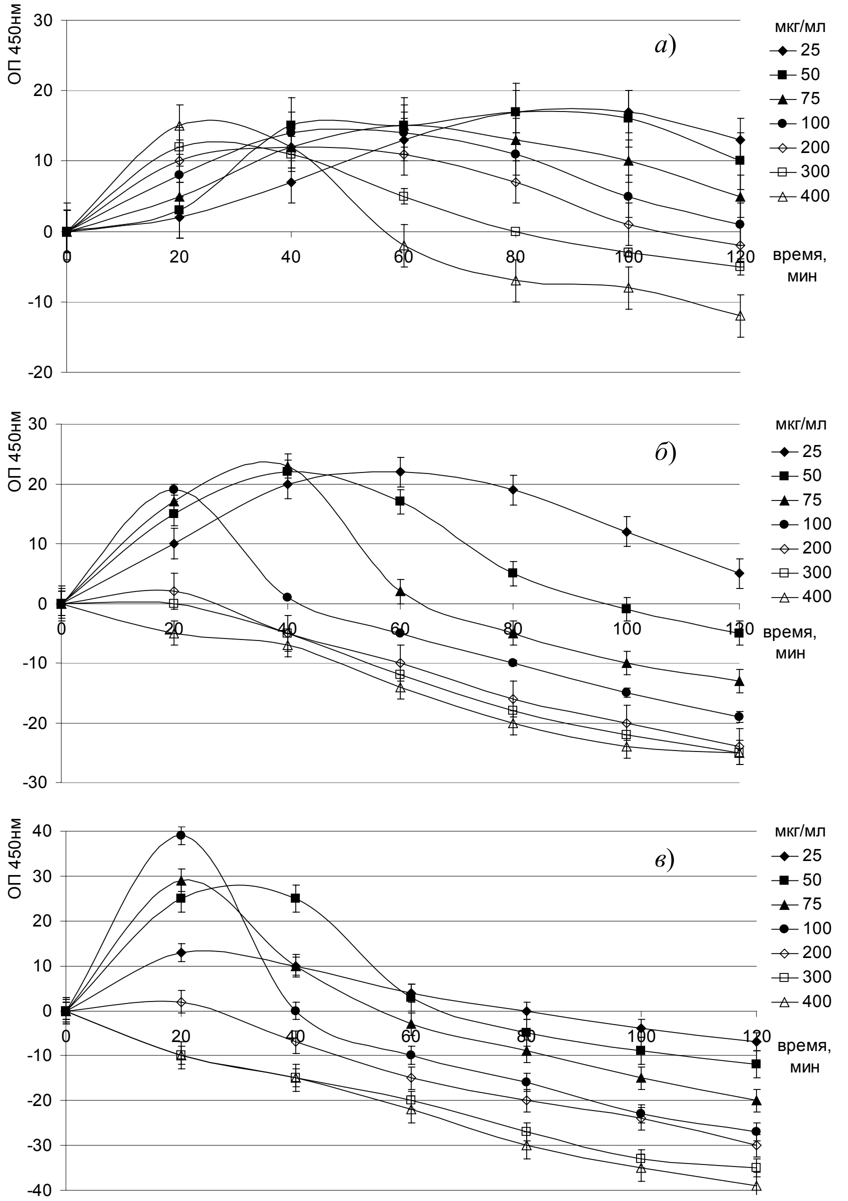

Рис. 5. Галактозидазная активность (по отношению к контролю) во внешней среде при действии на *E. coli* хитозана: *а*) 0.7 кДа, *б*) 5.5 кДа, *в*)15 кДа

Выход цитоплазматического содержимого может происходить при условии, что под действием хитозана также происходит нарушение проницаемости и внутренней (цитоплазматической) мембраны. В литературе описано выделение в среду цитоплазматической галактозидазы при воздействии на кишечную палочку хитозанового полимера [9, 12].

Для подтверждения того, что олигохитозаны проникают через клеточную стенку *E. coli*, взаимодействуют с ЦПМ и нарушают её проницаемость, нами было проведено исследование выхода галактозидазы во внешнюю среду. Как видно из рис. 5, уже через несколько минут после контакта клеток с хитозаном во внешней среде фиксировалась β-галактозидазная активность. Ферментативная активность регистрировалась при использовании всех образцов хитозана, однако её величина сильно зависела от молекулярной массы полимера. Так, максимальный выход фермента из клеток достигался при использовании образцов с более высокой молекулярной массой (рис. 5, *в*), что, вероятно, связано с более сильным нарушением целостности и проницаемости ЦПМ. Указанный эффект наблюдался через 20 мин после добавления хитозана к клеткам. При дальнейшей инкубации (60 мин и более) ферментативная активность во внешней среде переставала регистрироваться (рис. 5, *в*), что может быть связано с формированием на поверхности клеток непроницаемой для крупных молекул оболочки, сформированной хитозаном и агглютинированными им компонентами клеточной стенки (рис. 4). В некоторых исследованиях показано, что при действии хитозана выход белков и нуклеиновых кислот не наблюдается [13, 14], и такой эффект также связывают с образованием хитозаном непроницаемой оболочки на поверхности клеток микроорганизмов. Данное предположение подтверждается тем, что олигохитозаны с меньшей молекулярной массой из-за их меньшей степени полимеризации, и следовательно, обладающие более слабой способностью образовывать стабильные комплексы с веществами, не сильно влияют на уменьшение β-галактозидазной активности в течение гораздо более длительного времени (рис. 5, *а* и *б*). Кроме этого, высокая концентрация олигохитозана (рис. 5, *а*) приводит к тому, что картина изменения ферментативной активности в течение времени становится похожей на таковую, как в случае использования более высокомолекулярного образца, но с меньшей концентрацией (рис. 5, *В*). Таким образом, низкую степень полимеризации можно компенсировать более высокой концентрацией для достижения схожего эффекта в случае использования образцов с различной молекулярной массой. Похожая зависимость выхода цитоплазматических веществ от времени и концентрации хитозана описана в работе [15], где непроницаемая плёнка, постепенно формируясь, уменьшает количество выходящих веществ из клетки.

Заключение

Таким образом, проведенная оценка антибактериальной активности ряда образцов хитозана против грамотрицательной бактерии *E. coli* в зависимости от pH среды показало, что в характере изменения антибактериальных свойств хитозанового полимера важную роль играет его молекулярная масса, связанная с показателем pK_a. Обнаружено, что в нейтральных и слабощелочных условиях олигохитозаны с молекулярной массой от 3.5 до 5.5 кДа обладают такой же антибактериальной эффективностью, как и низкомолекулярные образцы (10 кДа и более), и превосходят по этому показателю исходный высокомолекулярный хитозан. Показано, что антибактериальное действие хитозана сопровождается повреждением клеточных стенок бактерий, нарушением проницаемости их мембранных структур. Увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны под действием хитозана сопровождается выделением во внешнюю среду цитоплазматических веществ, одним из которых является галактозидаза. Низкомолекулярный хитозан, а также олигохитозаны в высокой концентрации образуют плёнку на поверхности клеток бактерий, препятствующую выходу цитоплазматических компонентов наружу, а также, возможно, и поступлению питательных веществ внутрь клеток, что может являться одним из факторов антимикробного действия хитозанового полимера.

Авторы работы выражают благодарность В.В. Сальникову (КазНЦ РАН, г. Казань) и Р.З. Хайруллину (КНИИЭМ Роспотребнадзора, г. Казань) за помощь в проведении электронной микроскопии, а также С.А. Лопатину (Центр «Биоинженерия» РАН, г. Москва) за проведение хроматографического анализа образцов хитозана.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-04-97039 р_поволжье_а).

Литература

1. *Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С., Варламов В.П.* Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизмы действия и роль структуры // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2009. – № 5. – С. 91–97.
2. *Ильина А.В., Варламов В.П.* Влияние степени ацетилирования на ферментативный гидролиз хитозана препаратом Целловиридин Г20х // Прикл. биохимия и микробиол. – 2003. – Т. 39, № 3. – С. 273–277.
3. *Kulikov S., Tikhonov V., Blagodatskikh I., Bezrodnykh E., Lopatin S., Khairullin R., Philippova Y., Abramchuk S.* Molecular weight and pH aspects of the efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // Carbohyd. Polym. – 2012. – V. 87, No 1. – P. 545–550.
4. *Hirai A., Odani H., Nakajima A.* Determination of degree of deacetylation of chitosan by ^{1}H NMR spectroscopy // Polym. Bull. – 1991. – V. 26, No 1. – P. 87–94.
1. *Лопатин С.А., Дербенева М.С., Куликов С.Н., Варламов В.П., Шпигун О.А.* Фракционирование хитозана методом ультрафильтрации // Журн. анал. химии. – 2009. – Т. 64, № 6. – С. 666–670.
6. *Rawlinson L.A., Ryan S.M., Mantovani G., Syrett J.A., Haddleton D.M., Brayden D.J.* Antibacterial effects of poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against selected gram-positive and gram-negative bacteria // Biomacromol. – 2010. – V. 11, No 2. – P. 443–453. – doi: 10.1021/bm901166y.
7. *Хайруллин Р.З., Куликов С.Н., Тихонов В.Е., Степанов Е.А., Лопатин С.А., Варламов В.П.* Зависимость растворимости хитозана от молекулярной массы и значения pH среды // Вестн. Казан. технол. ун-та. – 2010. – № 7. – С. 148–152.
8. *Raafat D., von Bargen K., Haas A., Sahl H.-G.* Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74, No 12. – P. 3764–3773. – doi: 10.1128/aem.00453-08.
9. *Liu H., Du Y., Wang X., Sun L.* Chitosan kills bacteria through cell membrane damage // Int. J. Food Microbiol. – 2004. – V. 95, No 2 – P. 147–155.
10. *Helander I.M., Nurmiaho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S.* Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria // Int. J. Food Microbiol. – 2001. – V. 71, No 2–3. – P. 235–244.
11. *Chen W., Jin T.Z., Gurtler J.B., Geveke D.J., Fan X.* Inactivation of *Salmonella* on whole cantaloupe by application of an antimicrobial coating containing chitosan and allyl isothiocyanate // Int. J. Food Microbiol. – 2012. – V. 155, No 3. – P. 165–170. – doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.001.

12. *Tao Y., Qian L.-H., Xie J.* Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphyloccocus aureus* // Carbohyd. Polym. – 2011. – V. 86, No 2. – P. 969–974.
13. *Choi B.-K., Kim K.-Y., Yoo Y.-J., Oh S.-J., Choi J.-H., Kim C.-Y.* In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans* // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2001. – V. 18, No 6. – P. 553–557.
14. *Vishu Kumar A.B., Varadaraj M.C., Gowda L.R., Tharanathan R.N.* Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* // Biochem. J. – 2005. – V. 391, Pt. 2. – P. 167–175.
15. *Lou M.-M., Zhu B., Muhammad I., Li B., Xie G.-L., Wang Y.-L., Li H.-Y., Sun G.-C.* Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis* // Carbohyd. Res. – 2011. – V. 346, No 11. – P. 1294–1301. – doi: 10.1016/j.carres.2011.04.042.

Поступила в редакцию
27.01.13

Куликов Сергей Николаевич – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань, Россия.

E-mail: *kuliks@yandex.ru*

Оберемок Диана Рустемовна – студент кафедры микробиологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: *diana.shakirowa@yandex.ru*

Безродных Евгения Александровна – кандидат химических наук, научный сотрудник, Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва, Россия.

E-mail: *stepnova113@mail.ru*

Тихонов Владимир Евгеньевич – кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник, Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва, Россия.

E-mail: *tikhon@ineos.ac.ru*

Варламов Валерий Петрович – доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией, Центр «Биоинженерия» РАН, г. Москва, Россия.

E-mail: *varlamov@biengi.ac.ru*

* * *

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LOW-MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN AGAINST *Escherichia coli*

S.N. Kulikov, D.R. Oberemok, E.A. Bezrodnyh, V.E. Tikhonov, V.P. Varlamov

Abstract

Antibacterial activity of chitosan with different molecular weight at different pH values against gram-negative *Escherichia coli* was studied. It was found that the dependence of inhibitory activity of chitosan on its molecular weight was inversed when the medium pH was increased above 7.0. In acidic media higher molecular weight chitosan had the higher antibacterial activity, while in weakly alkaline media oligomeric forms of chitosan displayed the inhibition effect only. Our results showed that the antibacterial activity of chitosan against *Escherichia coli* was closely connected with its polycationic nature and was dependent on the degree of protonation of chitosan amino groups, which at the same time depended on the degree of polymerization and the solution pH values. It is shown that the antibacterial effect of chitosan is accompanied by damage in the bacterial cell wall, resulting in the disturbed permeability of the membrane structures.

Keywords: chitosan, molecular weight, antibacterial activity, *Escherichia coli*, β-galactosidase.

References

1. Kulikov S.N., Tyurin Yu.A., Fassakhov R.S., Varlamov V.P. Antimicrobial and antifungal activity of chitosan: the mechanisms of action and the role of structure. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol*., 2009, no. 5, pp. 91–97. (In Russian)
2. Ilina A.V., Varlamov V.P. Effect of the degree of acetylation of chitosan on its enzymatic hydrolysis with the preparation Celloviridin G20kh. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 2003, vol. 39, no. 3, pp. 273–277. (In Russian)
3. Kulikov S., Tikhonov V., Blagodatskikh I., Bezrodnykh E., Lopatin S., Khairullin R., Philippova Y., Abramchuk S. Molecular weight and pH aspects of efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Carbohyd. Polym*., 2012, vol. 87, no. 1, pp. 545–550.
4. Hirai A., Odani H., Nakajima A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by 1H NMR spectroscopy. *Polym. Bull*., 1991, vol. 26, no. 1, pp. 87–94.
5. Lopatin S.A., Derbeneva M.S., Kulikov S.N., Varlamov V.P., Shpigun O.A. Fractionation of chitosan by ultrafiltration. *Zh. Anal. Khim*., 2009, vol. 64, no. 6, pp. 666–670. (In Russian)
6. Rawlinson L.A., Ryan S.M.., Mantovani G., Syrett J.A.., Haddleton D.M., Brayden D.J. Antibacterial effects of poly(2-(dimethylamino ethyl)methacrylate) against selected gram-positive and gram-negative bacteria. *Biomacromol*., 2010, vol. 11, no. 2, pp. 443–453. doi: 10.1021/bm901166y.
7. Khairullin R.Z., Kulikov S.N., Tikhonov V.E., Stepanov E.A., Lopatin S.A., Varlamov V.P. Dependence of chitosan solubility on molecular weight and pH. *Vestn. Kazan. Technol. Univ*., 2010, no. 7, pp. 148–152. (In Russian)
8. Raafat D., Bargen K., Haas A., Sahl H.-G. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl. Environ. Microbiol*., 2008, vol. 74, no. 12, pp. 3764–3773. doi: 10.1128/aem.00453-08.
9. Liu H., Du Y., Wang X., Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int. J. Food Microbiol*., 2004, vol. 95, no. 2, pp. 147–155.
10. Helander I.M., Nurmiaho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol*., 2001, vol. 71, no. 2–3, pp. 235–244.
11. Chen W., Jin T.Z., Gurtler J.B., Geveke D.J., Fan X. Inactivation of *Salmonella* on whole cantaloupe by application of an antimicrobial coating containing chitosan and allyl isothiocyanate. *Int. J. Food Microbiol*., 2012, vol. 155, no. 3, pp. 165–170. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.001.
12. TaoY., Qian L.-H., Xie J. Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of Pseudomonas aeruginosa and Staphyloccocus *aureus*. *Carbohyd. Polym*., 2011, vol. 86, no. 2, pp. 969–974.
13. Choi B.-K., Kim K.-Y., Yoo Y.-J., Oh S.-J., Choi J.-H., Kim C.-Y. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2001, vol. 18, no. 6, pp. 553–557.
14. Vishu Kumar A.B., Varadaraj M.C., Gowda L.R., Tharanathan R.N. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochem. J*., 2005, vol. 391, Pt. 2, pp. 167–175.
15. Lou M.-M., Zhu B., Muhammad I., Li B., Xie G.-L., Wang Y.-L., Li H.-Y., Sun G.-C. Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis*. *Carbohyd. Res*., 2011, vol. 346, no. 11, pp. 1294–1301. doi: 10.1016/j.carres.2011.04.042.

Received
January 27, 2013

Kulikov Sergei Nikolaevich – PhD in Biology, Leading Research Fellow, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russia.
E-mail: *kuliks@yandex.ru*

Oberemok Diana Rustemovna – Student, Department of Microbiology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.
E-mail: *diana.shakirowa@yandex.ru*

Bezrodnykh Evgeniya Aleksandrovna – PhD in Chemistry, Research Fellow, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.
E-mail: *stepnova113@mail.ru*

Tikhonov Vladimir Evgenievich – PhD in Chemistry, Associate Professor, Senior Research Fellow, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.
E-mail: *tikhon@ineos.ac.ru*

Varlamov Valerii Petrovich – Doctor of Chemistry, Professor, Laboratory Chief, Centre “Bioengineering”, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.
E-mail: *varlamov@biengi.ac.ru*