استخراج کیتوزان گاما از دیواره سلولی قارچ *Aspergillu sniger* (PTCC 5223) و ارزیابی خواص ضد میکروبی آن

محمدصادق خاکشور و جمیله پازوکی*

تهران ، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۵

چکیده

قارچ *Aspergillus niger* با توجه به امکان تولید بایومس بالا و مقادیر قابل‌توجه کیتوزان در دیواره‌ی سلولی جهت تولید کیتوزان انتخاب و کشت گردید. قارچ کشت‌شده روی محیط پوتیتو دکستروز آگار، در محیط کشت پوتیتو دکستروز براث تلقیح و در دمای محیط و دور شیکر ۱۸۰ rpm گرمخانه گذاری شد. تغییرات بایومس، میزان کیتوزان و دیگر پارامترهای رشد در طی یک بازه‌ی زمانی ۲۱ روزه اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده نشان داد که حداکثر بایومس قارچی (۲۲/۵ g/L)، کیتوزان(۷/۳۷٪) و دیگر پارامترهای رشد در اواخر مرحلهٔ رشد لگاریتمی قارچ بدست آمد. در این مرحلهٔ رشد، pH محیط نیز در کمترین مقدار خود (۲/۵) قرار گرفت. پس از ورود محیط کشت به مرحلهٔ سکون فاکتورهای مذکور بطور محسوسی کاهش یافتند. کیتوزان بدست آمده روی ۹ میکروارگانیسم بیماری‌زا مورد مطالعه قرار گرفت. خواص ضدمیکروبی کیتوزان استخراج‌شده روی باکتری-های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود (۰,۵p≤). اما بیشترین بازدارندگی کیتوزان روی قارچ *Candida albicans* بود. درعین‌حال تفاوت معنی‌داری بین خاصیت ضدقارچی و ضد باکتری کیتوزان مشاهده نشد (۰,۵ ≤p). با توجه به در دسترس بودن، کشت و نگهداری آسان این سویه ی قارچی و تولید مقدار قابل قبولی کیتوزان، می‌توان از آن به‌عنوان یک‌سویه‌ی مناسب برای تولید کیتوزان و جایگزین منابع قدیمی (سخت‌پوستان) یادکرد. خواص ضدمیکروبی مشاهده شده نیز بیانگر اثر قابل‌قبول کیتوزان روی برخی از سویه‌ها میکروبی می‌باشد که نیازمند مطالعات بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: میکروارگانیسم، کیتوزان، جداسازی، خواص زیستی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۹۹۰۲۷۲۰ ، پست الکترونیکی: pazooki2001@yahoo.com

مقدمه

کیتین یک پلیمرساخته شده از واحدهای N-acetyl-D-glucosamine است که پس از سلولز فراوانترین پلیمر طبیعی تجدید پذیر می‌باشد (۴). کیتوزان نیز یک پلیمر دربردارنده‌ی دو زیر واحد D-glucosamine و N-acetyl-D-glucosamine می‌باشد که با داستیله شدن کیتین تحت شرایط قلیایی شدید بدست می‌آید (۱۱، ۲۲، ۳۶). ویژگی‌های منحصر بفرد کیتوزان باعث کاربردهای بسیار زیاد این پلیمر در صنایع مختلف ازجمله صنایع آرایشی، افزودنی‌های غذایی، غذاهای دریایی، تصفیه‌ی آب، کشاورزی، پزشکی و بیوتکنولوژی شده است (۱۸، ۲۰، ۴۴). کیتوزان بصورت تجاری از دورریزهای حاصل از سخت‌پوستان بدست می‌آید. اما مواد اولیه بدست آمده از این صنعت برای تولید کیتوزان فصلی و محدود به مکان‌های خاص می‌باشد. روش کار نیز علاوه بر پیچیدگی و هزینه‌ی بالا دارای تأثیرات منفی زیست‌محیطی بسیاری است. همچنین به‌واسطه استفاده از شرایط شدید اسیدی-بازی در فرایند استخراج، کیتوزان بدست آمده دارای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی یکدست نمی‌باشد (۲۵، ۳۲،

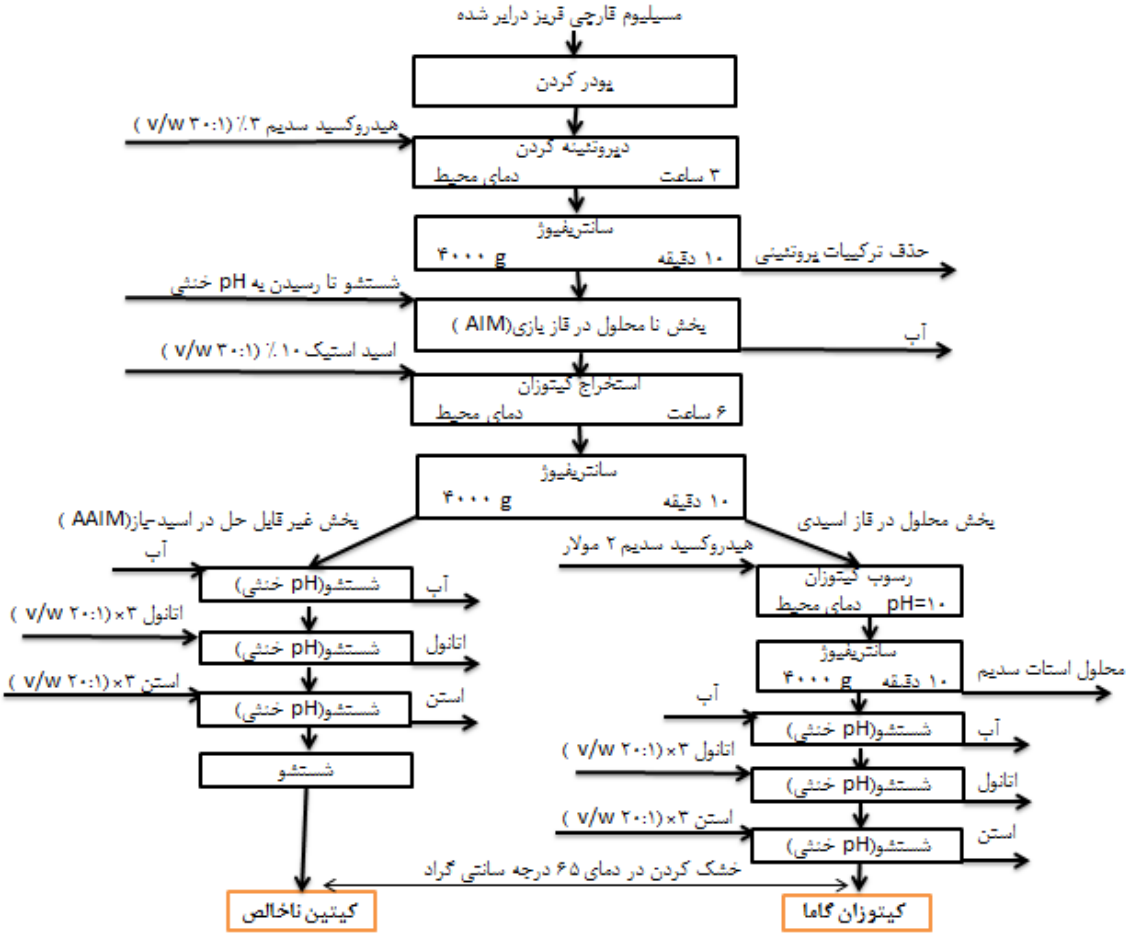
۳۶، ۴۷، ۴۹). به همین خاطر قارچ‌ها به دلیل داشتن کیتوزانی با خصوصیات کمی و کیفی یکدست‌تر به‌عنوان یک منبع پیشنهادی دیگر مطرح و مورد بررسی قرارمی‌گیرند (۴۱). اخیراً استفاده از قارچ‌ها در این زمینه بیشتر مورد توجه بوده و مطالعات متعددی در زمینه شناسایی سویه‌های قارچی با مقادیر قابل‌توجه کیتوزان در دیواره‌ی سلولی آنها صورت گرفته است (۴۹). بااین‌وجود کیتوزان حاصل از میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با کیتوزان حاصل از منابع قدیمی ناچیز می‌باشد (۴۶). از مزایای بالقوه‌ی استفاده از منابع قارچی می‌توان به کشت، رشد، برداشت و جابجایی سریع در محیط‌های کشت ساده، کنترل آسان کیفیت محصول و سهولت در استخراج کیتوزان از سلول‌های قارچی اشاره کرد (۳۲،۲۱). مسیلیوم-های قارچی را می‌توان در هر فصل و منطقه‌ی جغرافیایی به‌راحتی روی محیط‌های کشت ساده کشت داد (۲۹). بعلاوه مسلیوم‌های قارچی نسبت به پوسته‌ی سخت‌پوستان دارای ترکیبات همسان‌تر و مواد معدنی کمتری می‌باشد (۴۴، ۴۷). همچنین با دستکاری در پارامترهای مؤثر در کشت می‌توان ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میزان کیتوزان را کنترل کرد (۳۶). بنابراین با توجه به مزایای ذکرشده برای کیتوزان قارچی، در این مطالعه قارچ *A.niger* جهت بررسی میزان تولید کیتوزان مورد بررسی قرار می‌گیرد. همچنین اثر زمان روی بازده کیتوزان و دیگر فاکتورهای رشد بررسی و درنهایت خواص ضد میکروبی کیتوزان قارچی استخراج‌شده بررسی می‌گردد.

مواد و روشها

شرایط کشت و تلقیح میکروارگانیسم: قارچ *A.niger* از سازمان پژوهش‌های علمی- صنعتی، کلکسیون باکتری و قارچ‌های زنده، (IROST) تهیه گردید. کشت اولیه‌ی این ارگانیسم در اسلنت‌های محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (Potato Dextros Agar, PDA, Merk Company) تهیه و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۷ روز در گرمخانه نگهداری شد. پس از اتمام دوره‌ی رشد (۷ روز) یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچی تهیه‌شده (10^7 اسپور در میلی‌لیتر) به ۹۹ میلی‌لیتر محیط کشت پوتیتو دکستروز براث (Potato Dextros Broth, PDB, Merk Company) در یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه گردید (۴). به‌منظور بررسی روند تغییرات بایومس قارچی، کیتوزان و دیگر فاکتورهای رشد، ۸ محیط کشت تهیه شد. هر ۳ روز یکی از محیط‌های کشت با استفاده از کاغذ صافی (Whatman No, 1) صاف‌شده و پس از شستشو با آب مقطر و خشک‌کردن بایومس در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی گراد از لحاظ فاکتورهای فوق‌الذکر مورد بررسی قرارگرفت. پس از بررسی آخرین محیط کشت (۲۱ روز) پروفایل تغییرات این فاکتورها تهیه گردید (۲۲).

استخراج کیتوزان قارچی: مسیلیوم قارچی بدست آمده با استفاده از NAOH 3% (w/v) (۳۰ میلی‌لیتر NAOH به ازای هر گرم وزن خشک قارچی) در دمای محیط و به مدت ۳ ساعت دپروتئینه گردید. ترکیبات غیرقابل‌حل در مرحلهٔ بازی (AIM, Alkaline Insoluble Materials) بوسیله‌ی سانتریفیوژ (g ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) جداشده و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر برای استفاده در مرحلهٔ بعد در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. برای استخراج کیتوزان، اسید استیک ۱۰٪ به بخش AIM (۱۰۰ میلی‌لیتر به ازای هر گرم وزن خشک AIM) در دمای محیط و به مدت ۶ ساعت اضافه گردید. پس از ۶ ساعت بخش غیرقابل‌حل در باز و اسید (AAIM, Alkaline-Acid Insoluble Materials) با استفاده از سانتریفیوژ (g۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شد. سپس کیتوزان محلول در فاز اسیدی (AcSM, Acid acetic Soluble Materials) با رساندن pH آن به حدود ۱۰ با استفاده از NAOH ۲ مولار رسوب داده شد. بخش رسوب داده‌شده را با استفاده از سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جدا و تا رسیدن به pH خنثی چندین بار با آب مقطر، اتانول و استن شستشو داده شد. کیتوزان

بدست آمده پس از خشک شدن در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد جهت انجام مطالعه ضد میکروبی در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (۱). همچنین بخش نامحلول در اسید و باز (AAIM) که درواقع کیتین ناخالص می‌باشد (کیتین+گلوکان) پس از چندین بار شستشو با آب مقطر، اتانول و استن جداسازی و وزن خشک آن اندازه‌گیری گردید (۱۶) (شکل ۱). تمامی آزمایشات با ۳ تکرار انجام شد و نتایج بصورت میانگین به همراه انحراف معیار گزارش گردید.



شکل ۱- روش استخراج ترکیبات کیتین و کیتوزان از دیواره‌ی سلولی قارچ *Aspergillus niger*

سویه‌های میکروبی استفاده شده: خواص ضد میکروبی کیتوزان گاما استخراج‌شده از قارچ *A. niger* روی ۵ باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1310)، *Escherichia coli* (PTCC 1763)، *Proteus mirabilis* (PTCC 1076)، *Salmonella typhi* (PTCC 1609)، *Serratia marcescens* (PTCC 1621)، ۲ باکتری گرم مثبت *Bacillus subtilis* (PTCC 1156)، *Staphylococcus aureus* (PTCC 1189) و ۲ سویه قارچی *Candida albicans* (PTCC 5027)، *Aspergillus niger* (PTCC 5223) مورد مطالعه قرارگرفت. میکروارگانیسم‌های فوق‌الذکر از سازمان پژوهش‌های علمی- صنعتی، کلکسیون باکتری و قارچ‌های زنده، (IROST) تهیه گردیدند.

بررسی خواص ضد میکروبی: مطالعه حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به کیتوزان قارچی به روش

دیسک‌گذاری و با دستورالعمل National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) انجام شد (۴۵، ۴۷). برای شروع باید کلنی‌های تازه و جوانی از باکتری و قارچ‌ها تهیه شود. بدین منظور باکتری و قارچ‌های موردنظر به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت قبل از انجام آزمایش روی محیط کشت‌های مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar, MHA, Merk Company) و در پوتیتو دکستروز براث (Potato Dextrose Broth, PDB, Merk Company) کشت داده شدند. باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و قارچ‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه نگهداری شدند. از کلنی‌های تازه باکتریایی برای تهیه‌ی سوسپانسیون در محیط کشت مولر هینتون براث (Muller Hinton Broth, MHB, Merk Company) استفاده شد. غلظت سوسپانسیون باکتریایی روی ۵/. مک فارلند (حدود $۱۰^{۸}\times$ ۱/۲ باکتری در میلی‌لیتر) تنظیم و روی محیط کشت تازه‌ی مولر هینتون آگار تلقیح داده شد. ۱/. میلی‌لیتر از سویه‌های قارچی نیز که به مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت پوتیتو دکستروز براث (Potato Dextrose Broth, PDB, Merk Company) کشت داده شده بود روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar, PDA, Merk Company) تلقیح گردید. با استفاده از استیک اسید ۱٪ سوسپانسیون کیتوزانی تهیه و به هر دیسک بلانک استریل ۶ میلی‌متری ۱۰۰ میکرولیتر (۵۰۰ میکروگرم) از سوسپانسیون را تزریق و در دمای محیط خشک گردیدند. از دیسک‌های آغشته به اسیداستیک ۱٪ به‌عنوان شاهد منفی، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی Amoxicillin (۲۵ میکروگرم بر دیسک) بعنوان شاهد مثبت برای باکتری‌ها و آنتی‌بیوتیک Nystatin (۳۰ میکروگرم بر دیسک) برای قارچ‌ها مورداستفاده قرارگرفتند. سپس دیسک‌های حاوی کیتوزان به همراه دیسک‌های شاهد منفی و مثبت و دیسک بلانک با فواصل مشخص بر روی محیط قرار داده و باکتری‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و قارچ‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه نگهداری شدند. قطر هاله‌های عدم رشد برای باکتری‌ها پس از ۲۴ ساعت و قارچ‌ها پس از ۴۸ ساعت در مقیاس میلی‌متر اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفت. تمامی آزمایشات با ۳ تکرار انجام شد و نتایج بصورت میانگین به همراه انحراف معیار گزارش گردید.

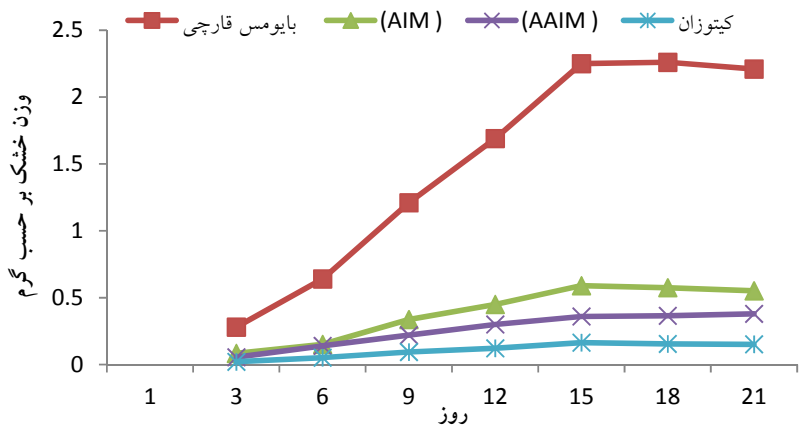
آزمون‌های آماری: از برنامه SPSS نسخه‌ی ۱۹ برای آنالیز داده‌ها و برنامه Excel ۲۰۰۷ برای رسم نمودارها استفاده شد. نتایج تست اسمیرنو-کلوموگروف نشان داد که داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار نیستند، به همین خاطر از لگاریتم داده‌ها برای کارهای آماری استفاده شد.

نتایج

قارچ *A. niger* به‌منظور استخراج ترکیبات کیتوزانی در محیط کشت پوتیتو دکستروز براث، در دمای محیط، دور شیکر ۱۸۰ rpm (دور بر دقیقه) و به مدت ۲۱ روز کشت گردید. میزان بایومس قارچی، کیتوزان، AIM و AAIM در طی این مدت و به فاصله هر ۳ روز اندازه‌گیری شد. روند تغییرات فاکتورهای مذکور در جدول و نمودار ۱ آمده است. حداکثر وزن خشک مسیلیوم قارچی (۲,۲۵ گرم) پس از ۱۵ روز بدست آمد و پس‌ازآن بطور محسوس کاهش یافت (نمودار ۱). کیتوزان قابل‌استخراج نیز با افزایش تا روز پانزدهم کشت (۰,۱۶۴ گرم)، پس‌ازآن تقریباً در یک سطح باقی ماند. بخش‌های AIM و AAIM به‌عنوان پارامترهایی از رشد قارچی روند افزایش و کاهشی مشابه با کیتوزان داشتند (جدول و نمودار ۱). همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده‌شده است تا روز پانزدهم کشت، قارچ رشد لگاریتمی داشته و بیشترین مقدار کیتوزان قابل‌استخراج در اواخر دوره‌ی رشد لگاریتمی (روز ۱۵) بدست آمده است (۷,۲۸٪ وزن خشک) و پس‌ازآن محیط کشت وارد مرحلهٔ سکون می‌شود و در پارامترهای رشد قارچی کاهش تدریجی مشاهده می‌شود.

جدول ۱- میزان بایومس قارچی، ترکیبات کیتوزانی و دیگر پارامترهای رشد قارچ *A. niger*(برحسب گرم)

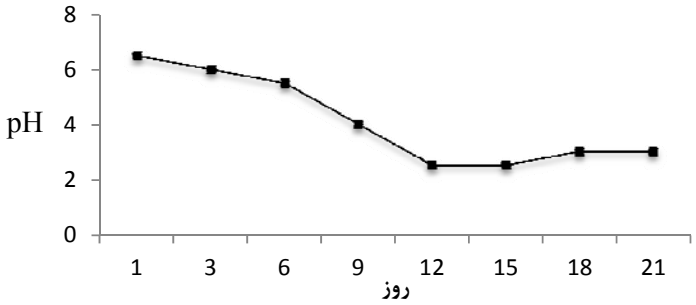
روز	۳	۶	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱
وزن خیس قارچ	۲/۳۵±. /۱۱	۴/۵±. /۲۱	۷/۷۲±. /۱۵	۹/۴۵±. /۱۷	۱۲/۳۶±. /۳۵	۱۲/۵۶±. /۲۹	**۱۲/۵±. /۲۳**
وزن خشک قارچ	. /۲۸±. /۰۶	. /۶۴±. /۰۸	۱/۲۱±. /۱	۱/۶۹±. /۱۳	۲/۲۵±. /۱۵	۲/۲۲±. /۱۲	**۲/۲۱±. /۱۵**
AIM	. /۰۸۴±. /۰۰۸	. /۱۵۱±. /۰۰۹	. /۳۳۷±. /۰۱	. /۴۵±. /۰۱	. /۵۹±. /۰۲	. /۵۷۵±. /۰۱	**. /۵۵۲±. /۰۱**
AAIM(کیتین ناخالص)	. /۰۵۵±. /۰۴	. /۱۱±. /۰۳۱	. /۲۲±. /۰۱۱	. /۳±. /۰۰۹	. /۳۶±. /۰۲۶	./۰۳۶۵±. /۰۵۱	**. /۳۸۰±۰,۰۴۴**
کیتوزان	۰,۰۲۱±۰,۰۰۴	. /۰۵۲±. /۰۰۶	. /۰۹۴±. /۰۱	. /۱۲۲±. /۰۱	. /۰۱۶۴±. /۰۲	. /۰۱۵۵±. /۰۲	**. /۱۵۲±. /۰۲**
کیتوزان/بایومس خشک قارچی	٪۷/۵	٪۸/۱۲	٪۷/۷۶	٪۷/۲۱	٪۷/۲۸	٪۶/۸۵	**٪۶/۸۷**
AIM /بایومس خشک قارچی	٪۳۰	٪۲۳/۵۹	٪۲۷/۸۵	٪۲۶/۶۲	٪۲۶/۲۲	٪۲۵/۴۴	**٪۲۴/۹۷**
AAIM / بایومس خشک قارچی	٪۱۹/۶۴	٪۱۷/۱۸	٪۱۸/۱۸	٪۱۷/۷۵	٪۱۶	٪۱۶/۶۵	**٪۱۷/۱۹**



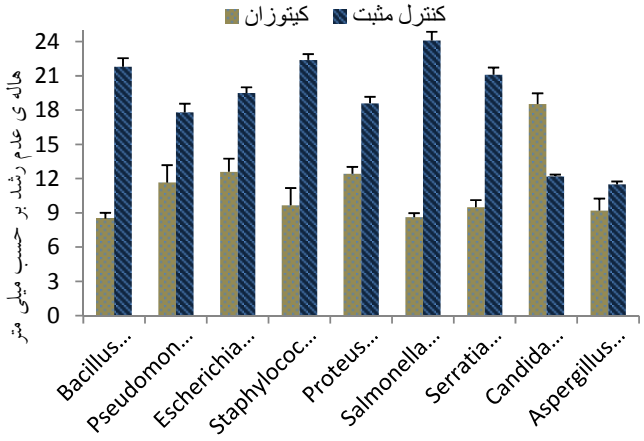
نمودار ۱- وزن خشک قارچی، بخش نامحلول در فاز بازی(AIM)، بخش نامحلول در فاز بازی و اسیدی(AAIM) و کیتوزان قابل‌استخراج از قارچ *A. niger* در طی دوره‌ی ۲۱ روزه (برحسب گرم)

با توجه به رشد قارچ در طی زمان، pH محیط کشت نیز کاهش‌یافته بطوریکه با توجه به نمودار ۲ تغییرات pH نشان‌دهنده‌ی این است که بیشترین میزان کیتوزان قابل‌استخراج در روز پانزدهم کشت با کمترین pH محیطی مطابقت دارد. فعالیت ضد میکروبی کیتوزان استخراج‌شده از قارچ *A. niger* روی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در نمودار ۳ نشان داده‌شده است.

نتایج بدست آمده نشان داد که کیتوزان قارچی اثر بازدارندگی بیشتری روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی داشت ($p \leq ۰,۵$). از بین باکتری‌های مورد مطالعه *E. coli* (۱۲,۶۰ میلی‌متر)، *P. mirabilis* (۱۲,۴۳ میلی‌متر) و *P. aeroginosa* (۱۱/۶۶ میلی‌متر) بیشترین حساسیت را نسبت به کیتوزان از خود نشان دادند. بیشترین فعالیت بازدارندگی رشد کیتوزان روی *C. albicans* (۱۸,۴۳ میلی‌متر) مشاهده شد که به مقدار قابل‌توجهی حتی از شاهد مثبت (۱۲,۲۰ میلی‌متر) نیز بیشتر بود. بااین‌وجود تفاوت معنی‌داری بین خاصیت ضد قارچی و ضد باکتری کیتوزان مشاهده نشد.



نمودار۲- روند تغییرات pH محیط کشت قارچ *A.niger* در طی بازه‌ی زمانی ۲۱ روزه



نمودار ۳- فعالیت ضد میکروبی کیتوزان قارچی روی برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

بحث

مطالعات روی منابع قدیمی کیتوزان ازجمله سخت‌پوستان و نرم‌تنان بطور گسترده تاکنون انجام‌شده است (۲، ۲۳، ۵۲). گزارشات در مورد تولید قارچی کیتوزان در صنایع محدود بوده است. به‌منظور حفظ تنوع زیستی اکوسیستم‌های دریایی بهتر است تا از میکروارگانیسم‌ها جهت تولید کیتوزان در صنعت استفاده شود. با پیشرفت‌های اخیر در روش های کشت، نشان داده شده است که کشت میکروارگانیسم‌های حاوی کیتین و کیتوزان در مقیاس بزرگ می‌تواند یک روش مناسب برای تولید این پلیمر باشد (۲۶). دیواره‌ی سلولی قارچ‌های خانواده Ascomycetes، Zygomycetes، Basidiomycetes و Deuteromycetes حاوی مقادیر قابل‌توجهی ترکیبات کیتینی هستند که برای حفظ شکل و استحکام ساختار سلولی ضروری می‌باشد (۳۲). از بین سویه‌های قارچی، استخراج کیتوزان بیشتر از گونه‌های *Aspergillus* spp. ، *Rhizopus* spp. ، *Mucor* spp. و *Absidia* spp. گزارش شده است (۱۴، ۲۷، ۳۲).

در مطالعه حاضر ترکیبات کیتوزانی از مسیلیوم قارچ *A. niger* در طی یک دوره‌ی ۲۱ روزه و به فاصله‌ی هر ۳ روز اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار کیتوزان و AIM بدست آمده به ترتیب ۷/۳۷٪ و ۲۶/۸۷٪ وزن خشک مسیلیوم قارچی محاسبه گردیدند. در مطالعات گذشته مقادیر مختلفی از کیتوزان و AIM و دیگر پارامترهای رشد از سویه‌های مختلف قارچی گزارش‌شده است. مقدار کیتوزان بدست آمده از *A. niger* در این مطالعه کمتر از مقدار بدست آمده توسط ناتارجان و همکاران(۲۰۱۱) (۱۰٪)، پوچاناوانیچ و سانتورسوک (۲۰۰۲)(۱۱٪)، تائو و

همکاران (۲۰۰۵) (۱۱٪)، نادارجاح و همکاران (۲۰۰۱) (۱۱/۲٪)، مقصودی و همکاران(۲۰۰۸) (۰٫۸۴ g/L) و لوگش و همکاران(۲۰۱۲) (۱/۳ g/L) می باشد. در بسیاری از مطالعات گذشته اشاره شده است که سوبه های قارچی دارای یک رشد لگاریتمی بوده و بیشترین میزان کیتوزان قابل استخراج در اواخر مرحله ی رشد لگاریتمی بدست می آید که با نتایج این مطالعه نیز مطابقت دارد(۴۴). در مطالعه صورت گرفته توسط تائو و همکاران در یک دوره ی ۲۱ روزه کشت قارچ *A. niger* بیشترین مقدار بایومس (۶/۵ g/L) ، کیتوزان(۱۱٪) وAIM(۳۶/۳۵٪)، در آخرین مرحله رشد لگاریتمی بدست آمد. در برخی مطالعات سویه های مختلف قارچی برای رسیدن به بهترین گزینه جهت استخراج کیتوزان مورد مقایسه قرار گرفته اند. در مطالعه دیگری قارچ های *A. niger* ، *Penicillium citrinum*، *Rhizopus oryzae* و *Fusarium oxysporum* از لحاظ تولید کیتوزان مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند و بیشترین میزان کیتوزان استخراج شده از *A. niger* ۱/۳ گرم در روز ۱۲ کشت (اواخر مرحله ی رشد لگاریتمی) محاسبه گردید که نسبت به دیگر سویه ها کمتر بود(۲۰). پوچاناوانیچ و سانتورسوک (۲۰۰۲) نیز در بین ۴ سویه قارچی مورد مطالعه کمترین مقدار کیتوزان (۳/۶٪) را از *A. niger* بدست آوردند. اگرچه ممکن است مقدار کیتوزان موجود در دیواره سلولی قارچ *A. niger* نسبت به برخی از قارچ ها کمترباشد، اما به دلیل تولید بایومس بیشتر کاربرد بیشتری در زمینه ی استخراج کیتوزان نسبت به دیگر قارچ ها دارد(۳۵و۴۴). در مطالعه ی مشابه دیگری پس از ۱۲ روز کشت *A. niger* بیشترین مقدار کیتوزان بدست آمد(۱۱ g/kg وزن خشک محیط) و پس ازآن کاهش یافت(۲۱).

کاهش مقدار کیتوزان قابل استخراج پس از پایان مرحله رشد لگاریتمی می‌تواند به دلیل مصرف پلیمرهای زیستی کیتین و کیتوزان به‌عنوان مواد غذایی توسط میکروارگانیسم و درنتیجه افزایش در بایومس باشد که شامل انتشار آنزیم‌ها، هیدرولیز پلیمرها بوسیله آنزیم‌های هیدرولیتیک و انتشار محصولات حاصل از این هیدرولیز می‌باشد (۱۱، ۲۱). نادارجاح و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی ۱۵ سویه قارچی ازجمله *A.niger*، مشاهده کردند که بایومس در طی ۸۴ ساعت اولیه‌ی کشت افزایش یافت و پس‌ازاین زمان سویه‌ها وارد مرحلهٔ سکون شدند. نتایج نشان می‌دهد که بیشترین مقدار کیتوزان قابل استخراج در آخرین مرحلهٔ رشد لگاریتمی بدست می‌آید. بنابراین در این مطالعه و دیگر مطالعات صورت گرفته می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که آخرین مرحله از رشد لگاریتمی بهترین زمان برای استخراج کیتوزان می‌باشد. اعتقاد بر این است که کاهش مشاهده شده در کیتوزان قابل استخراج می‌تواند به دلیل تغییرات فیزیولوژیک در دیواره‌ی سلول قارچی باشد. کیتوزان در دیواره‌ی سلولی قارچ با عملکرد آنزیم کیتین داستیلاز روی کیتین بدست می‌آید. در اواخر مرحلهٔ رشد لگاریتمی به دلیل فعالیت بالای این آنزیم و کریستاله بودن بیشتر کیتین در این مرحله و حساسیت بیشتر آن نسبت به این آنزیم، در این مرحله مولکول‌های کیتوزان آزاد نسبتاً بالاست (۹، ۳۶). پس از ورود به مرحلهٔ سکون وقتی قارچ‌ها وارد یک مرحلهٔ رشد غیرفعال (مرحلهٔ سکون) می‌شوند، کیتین (پیش‌ساز کیتوزان) بیشتر به لیپیدها، پروتئین‌ها و دیگر کربوهیدرات‌های دیواره‌ی قارچی متصل شده و استخراج آن مشکل‌تر است (۸، ۲۵). بنابراین اگرچه که بایومس قارچی در طی مرحلهٔ سکون در بالاترین سطح خود می‌باشد ولی کیتوزان قابل استخراج کاهش می‌یابد (۳۹).

برعکس بسیاری از گزارشات در مطالعه رزاو همکاران (۲۰۰۱) روی ۲ قارچ *Mucor racemosus* و *Cunninghamella elegans* بیشترین بایومس قارچی در اوایل مرحلهٔ رشد لگاریتمی بدست آمد (۳۶). این امر پیشنهادکننده‌ی این است که پروفایل رشد ایزوله‌های قارچی نیاز است که قبل از تعیین میزان و زمان برداشت مورد بررسی قرارگیرد. ازآنجایی‌که سویه‌های مختلف

قارچی سرعت رشد و رسیدن به اواخر مرحلهٔ رشد لگاریتمی متفاوتی دارند، تعیین یک‌زمان برداشت یکسان برای تمامی ایزوله‌های قارچی درست نیست زیرا که ممکن است حداکثر میزان قابل برداشت بدست نیاید (۲۵، ۳۹). البته باید به این نکته نیز توجه کرد که میزان کیتوزان موجود در قارچ و دیگر پارامترهای رشد با توجه به نوع سویه، سن مسلیوم، محیط کشت و انواع مکمل‌ها و روش استخراج متفاوت می‌باشد (۱۲، ۲۱). درصد کیتوزان و دیگر پارامترهای رشد در بسیاری از دیگر سویه‌های قارچی نیز مورد مطالعه قرارگرفته است. وایت و همکاران (۱۹۷۹) مقدار کیتوزان بدست آمده از *M. rouxii* را ۹-۶٪ از وزن خشک بایومس و پس از ۱۲ روز گزارش کردند (۴۸). سو و همکاران (۱۹۹۶)(۳۹) سویه‌های مختلف Zygomycetes را مطالعه و مشاهده کردند که *C. echinulata* بیشترین میزان کیتوزان (۷٪) را دارا می‌باشد. همچنین در دیگر مطالعات سویه‌های *Rizopus oryzae* (کیتوزان ۱۴٪) (۳۲)، *Zygosaccharomyces rouxii* (کیتوزان ۳/۶٪)(۳۲)، *Candida albicans* (کیتوزان ۴/۴٪)(۳۲)، *Absidia coerulea* (کیتوزان ۶/۲٪ و AIM ۳۹٪)(۳)، *Absidia coerulea* (کیتوزان ۲۷٪)(۲۵)، *Mucor* sp. (کیتوزان ۲۵٪)(۲۵)، *Rhizopus* sp. KNO1 (کیتوزان ۲۱/۳۱٪)، *Rhizopus* sp. KNO2 (کیتوزان ۱۹/۰۳٪)، *Gongronella butleri* (کیتوزان ۹/۳-۸/۲٪) و *Mucor rouxii* (AIM ۳۹٪)(۶) مورد بررسی قرارگرفتند.

همانطور که اشاره شد کمیت و کیفیت کیتوزان قارچی به فاکتورهای مختلفی ازجمله pH بستگی دارد (۳۱). نمودار ۲ نیز بیان‌کننده‌ی این مطلب است که pH ابتدایی محیط کشت (۶/۵) پس از ۱۵-۱۲ روز که بیشترین مقدار بایومس و کیتوزان بدست آمده است به کمترین مقدار خود (۲/۵) رسیده است. در مطالعه‌ای مشابه، pH محیط کشت از ۵ در روز اول به کمتر از ۳/۵ در روز سوم که بیشترین میزان کیتوزان بدست آمد، رسید (۸). در مطالعه رزا و همکاران (۲۰۰۱) در طی رشد ۲ سویه‌ی قارچی *M.recemosus* و *C. elegans* ، pH محیط کشت در ۲۴ ساعت اول کاهش یافت که به دلیل افزایش تدریجی برهمکنش‌های متابولیکی بین قارچ و محیط کشت و جذب و آزادسازی یون‌ها از سلول قارچی می‌باشد. بیشترین میزان کیتوزان در ۲۴ ساعت اولیه‌ی کشت هر دو قارچ بدست آمد که pH به ۳/۵ رسیده بود که این کاهش pH به نظر یک عامل جهت تحریک برای تولید این پلیمر می‌باشد (۳۶). علاوه بر این ران و هوور (۱۹۹۳) نیز گزارش کردند که pH محیط کشت روی میزان و درصد داستیله شدن کیتوزان قارچ *Absidia coerulea* تأثیر دارد و این امر به این دلیل است که این شرایط جهت فعالیت آنزیم کیتین داستیلاز و تبدیل کیتین به کیتوزان مناسب می‌باشد (۳۳). براساس مطالعه کافزوپولوس و همکاران (۱۹۹۳) نیزpH اپتیمم برای استخراج کیتوزان از *Mucor rouxii* ۴/۵ می‌باشد (۱۷). نتایج بدست آمده در این مطالعه با تحقیق میوشی و همکاران (۱۹۹۲)(۲۴) و نیوو همکاران (۲۸) مطابقت دارد که تولید کیتوزان بوسیله میکروارگانیسم‌ها شدیداً به شرایط کشت ازجمله زمان و pH بستگی دارد.

در میان انواع کاربردهای بالقوه‌ی کیتین و کیتوزان در صنایع مختلف، استفاده از این پلیمر زیستی به‌عنوان عوامل ضد میکروب و ضد آفت بطور ویژه‌ای موردتوجه بوده است. کیتوزان قارچی فعالیت ضد میکروبی قابل قبولی روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت ازجمله *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Salmonella typhimurium*، *Listeria monocytogenes* و سویه‌های قارچی مانند *Fusarium* sp. ، *A. niger* و Alternaria از خود نشان داده است (۷، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۵۱). اما باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر کیتوزان حساس‌تر هستند (۱۵، ۳۰، ۴۲، ۴۵، ۵۰). به دلیل برهمکنش بین بارهای مثبت سطح کیتوزان و بارهای منفی سطح باکتری، دیواره‌ی سلولی باکتری ازهم‌گسیخته و با تراوش اجزای درون‌سلولی به بیرون

درنهایت باعث مرگ سلول باکتری می‌شود (۴۰). براساس فرضیه‌ای دیگر الیگومرهای کیتوزان بانفوذ به سلول‌های پروکاریوتی باعث تداخل در امر رونویسی از RNA و سنتز پروتئین می‌شوند (۵). بررسی خواص ضدمیکروبی کیتوزان گاما از سویه‌های مختلف قارچی بوسیله دیگر گروه‌ها نیز صورت گرفته است (۱۹، ۲۰، ۲۶، ۳۴، ۴۲، ۴۴، ۴۸). در مطالعه نادارجاح و همکاران (۲۰۰۱) کیتوزان قارچی استخراج‌شده روی باکتری‌های گرم مثبت اثر بهتری داشت. همچنین در این مطالعه *B. cereus* و *S. aureus* و *E. coli* حساسیت بیشتری نسبت به دیگر باکتری‌های مورد استفاده از خود نشان دادند که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. در مطالعه مشابه تجدینی و همکاران (۲۰۱۰) نیز رشد تمامی سویه‌های *C. albicans* بطور کامل توسط محلول کیتوزان ۵٪ جلوگیری شد که این نتایج مشابه مطالعه سیفارس و همکاران (۲۰۰۸) می‌باشد (۳۷). در این مطالعه حساسیت *C. albicans* بیشتر از دیگر سویه‌های قارچی می‌باشد که با نتایج گزارش‌شده توسط شعبان و همکاران (۲۰۱۳)(۳۸) مطابقت دارد. همچنین در این مطالعه به‌مانند مطالعه حاضر بیشترین فعالیت روی *C. albicans* مشاهده شد. البته در برخی مطالعات تفاوتی معنی‌داری بین حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و منفی نسبت به کیتوزان قارچی گزارش نشده است (۵، ۴۳).

کیتوزان با توجه به ماکرومولکول بودن، قادر به عبور از غشاء خارجی برخی باکتری‌های گرم منفی نیست، زیرا این غشاء به‌عنوان یک مانع نفوذناپذیر نسبت به ماکرومولکول-ها می‌باشد. به همین خاطر کیتوزان هیچ اثر بازدارندگی روی *Salmonella typhi* نداشته است (۱۳). در این مطالعه به‌مانند مطالعه کریمی و همکاران اثر بازدارندگی کیتوزان قارچی روی *E. coli* نسبت *S. aureus* بیشتر بود (۱۹).

رشد سویه‌های مختلف قارچی و طی کردن مراحل مختلف رشد با یکدیگر متفاوت می‌باشد. بنابراین قبل از انتخاب یک‌سویه جهت استخراج کیتوزان باید پروفایل رشد آن را تهیه و بهترین زمان برای بدست آوردن بیشترین مقدار کیتوزان مشخص شود. همچنین رشد سویه‌های قارچی مختلف به مقادیر متفاوتی تحت تأثیر فاکتورهایی ازجمله نوع محیط کشت، دما، زمان، دور شیکر و... می‌باشد. از نتایج بدست آمده در این مطالعه می‌توان اینگونه برداشت کرد که سویه مورد مطالعه با توجه به حجم بایومس قابل‌توجه تولیدی بدون استفاده از هیچ مکمل رشد، به‌عنوان یک منبع امیدوارکننده برای استحصال کیتوزان می‌باشد. حتی با پیشرفت‌های اخیر در علم بیوتکنولوژی دارویی، می‌توان در جهت بدست آوردن کیتوزانی با کمیت و کیفیت اقتصادی و مطابق با صنایع مختلف سویه‌های موردنظر را مورد دستکاری ژنتیکی قرارداد.

منابع

1. Akram, Z., Lars, E., Bjorn, S., and Mohammad, J.T., 2007. Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of Zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. Biomacromolecules, 8(12), PP: 3786-3790.
2. Al Sagheer, F.A., Al Sughayer, M.A., Muslim, S., and Elsabee, M.Z., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, Carbohydr Polym. 77 (2), PP: 410-419.
3. Andreas, N., and Bernd, W.M., 2004. A method for direct preparation of chitosan with low molecular weight from fungi. 57 (1), PP: 101-105.
4. Antonio, M., Susan, E., Sonia, P., and Maria, L.N., 2008. In vitro antimicrobial activity of garlic, oregano and chitosan against *Salmonella enterica*, World J Microbiol Biotechnol. 24 (10), PP: 2357-2360.
5. Badavy, M.E.I., and Rabea, E.I., 2011. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection, Int J Carbohydr Chem. PP: 1-29.
6. Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K., and Chatterjee, B.P., 2005. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physiochemical characterization. 40 (1), PP: 395-400.

7. Chung, Y.C., Su, Y.A., Chen, C.C., Jia, G., Wang, H.L., Wu, J.C.G., and Lin, J.G., 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall, Acta Pharmacol Sin. 25, PP: 932-936.

8. Da Silva Amorim, R.V., Rodrigo, P.P., Fukushima, K., Martinez, R.C., and Ledingham, W.M., 2006. Alternative carbone sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan, Food Technol Biotechnol. 44 (4), PP: 519-523.

9. Davis, L.L., and Bartinicki Garcia, S., 1984. Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *M. rouxii*, Biochem. 23 (6), PP: 1073- 1984.

10. Devlieghere, F., and Debevere, A.V., 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interaction with food components and applicability as a coating on fruits and vegetables, Food Microbial. 21 (6), PP: 703-714.

11. Fernanda, S., Fernanda, K., Mauro, C.M.L., and Jorge, L.N., 2009. Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate.Braz J Microbiol. 40 (1), PP: 20-25.

12. Harish, P.K.V., and Tharanathan, R.N., 2006. Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential an overview. Trend Food Sci Technol. 18 (3), PP:1-15.

13. Helander, I.M., Nurmiaho-Lassila, E.I., Ahvenainen, R., Rhoades, J., and Roller, S., 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria, Int J Food Microbial. 71 (2), PP: 235-244.

14. Jaworska, M.M., and Konieczna, E., 2001.The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*, Appl Microbial Biotechnol. 56 (1), PP: 220-224.

15. Joen, Y.J., Park, P.J., and Kim, S.K., 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharide produced by bioreactor, Carbohydr Polym. 44 (1), PP: 71-76.

16. Jozef, S., and Ali, A.Q.K., 1997. Mycelia of Mucor rouxii as a source of chitin and chitosan.Food Chem. 60 (4), PP: 605-610.

17. Kafetzopoulos, D., Martinou, A., and Bouriotis, V., 1993. Bioconversion of chitin to chitosan. purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. Proc Natl Acad Sci. 90 (7), PP: 2564-2568.

18. Kannan, M., Nesakumari, M., Rajarathinam, K., and Singh, A.J.A.R., 2010. Production and characterization of mushroom chitosan under solid-state fermentation conditions.Adv Biol Res. 4 (1), PP: 10-13.

19. Karimi, K., Jeihanpour, A., and Taherzadeh, M.J., 2007. Antimicrobial properties of fungal chitosan.Res J Bio Sci. 2 (3), PP: 239-243.

20. Logesh, A.R., Thillaimaharani, K.A., Sharmila, K., Kalaiselvam, M., and Raffi, S.M., 2012. Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity, Asian Pac J Trop Biomed. 2 (2), PP: 140-143.

21. Maghsoodi, V., Yaghmaei, S., Beigi, S.M., 2008. Influence of different nitrogen sources on amount of chitosan production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, Iran J Chem Chem Eng. 27 (1), PP: 47-52.

22. Maghsoodi, V., Razavi, J., and Yaghmaei, S., 2009. Production of chitosan by submerged fermentation from *Aspergillus niger*, Chem Chem Eng. 16 (2), PP: 145-148.

23. Ming, T.Y., Joan, H.Y., and Jeng, L.M., 2009. Physiochemical characterization of Chitin and Chitosan from crab shells, Carbohydr Polym. 75 (1), PP: 15-21.

24. Miyoshi, H., Shimura, K., Watanabe, K., and Onodera, K., 1992. Characterization of some fungal chitosans, Biosci Biotechnol Biochem. 56 (12), PP: 1901-1905.

25. Nadarajah, K., Kader, J., Mazmira, M., and Paul, D.C., 2001. Production of chitosan by fungi.Pak J Biol Sci. Vol. 4, No. 3, PP: 263-265.

26. Natarajan, K., Riyaz, A.B., and Rengarajan, S., 2011. Production and evaluation of chitosan from *Aspergillus niger* MTCC strains. Iran J Pharm Res. 10 (3), PP: 553-558.

27. New, N., and Stevens, W.F., 2002. Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction, Biotechnol Lett. 24 (2), PP: 131-134.

28. New, N., Furuika, T., and Tamura, H., 2011. Production, properties and applications of fungal cell wall polysaccharides: chitosan and glucan. Adv Polym Sci. 244, PP: 187-208.

29. Nitar, N., Suwalee, C., Willem, F.S., Theingi, M., Teck, K.T., Eugene, K., and Sek, M.W., 2001. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation, Carbohydr polym. 49 (2), PP: 235-237.

30. No, K.H., Park, Y.N., Lee, H.S., and Meyers, P.S., 2002. Antimicrobial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights.Int J Food Microbiol. 74 (1), PP: 65-72.

31. Paul, D.C., Nadarajah, K., and Kader, J., 2005. The yield and quality of chitosan from fungi grown on different growth media.Asian I Microbial Biotechnol Environ Sci. 7 (3), PP: 1-4.

32. Pochanavanich, P., and Suntornsuk, W., 2002. Fungal chitosan production and its characterization, Lett Appl Microbiol. 35 (1), PP: 17-21.

33. Rane, K.D., Hoover, D.G., 1993. Production of chitosan by fungi.Food Biotechnol. 7 (1), PP: 11-33.

34. Roberta, A.B., Tania, L.M.S., Galba, M.C.T., Thayza, C.M.S., and Evandro, L.S., 2009. Potential of chitosan from Mucor rouxii UCP064 as alternative natural compound to inhibit Listeria monocytogenes, Braz J Microbiol. 40 (3), PP: 583-589.

35. Romanazzi, C., Cabler. F.M., Margosan, D., Mackey, B.E., and Smilanick, J.L., 2009. Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape, Phytopathology. 99 (9), PP: 1028-1038.

36. Rosa, V.S.A., Wanderley, S., Kazutaka, F., and G, M.C.T., 2001. Faster chitosan production by mocoralean strains in submerged culture, Braz J Microbiol. 32 (1), PP: 20-23.

37. Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P., and Hipler, U.C., 2008. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against Candida albicans, Candida krusei and Candida glabrata.Inte J Pharm. 353 (1), PP: 139-148.

38. Shaaban, H.M., Ahmed, A.T., Ahmed, A.H., and Farouk, A., 2013. Tetrazolium/Formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity, J Mycol. PP: 1-7.

39. Su, C.T., Teck, K.T., Sek, M.W., and Eugene, K., 1996. The chitosan yield of Zygomycetes at their optimum harvesting time.Carbohydr Polym. 30 (4), PP: 239-242.

40. Sudharshan, N.R., Hoover, D.G., and Knorr, D., 1992. Antibacterial action of chitosan, Food Biotechnol. 6 (3), PP: 257-272.

41. Suntornsuk, W., Pochanavanich, P., and Suntornsuk, L., 2002. Fungal chitosan production on food processing by-products, Process Biochem. 37 (7), PP: 727-729.

42. Tajdini, F., Amini, M. A., Nafissi-Varcheh, N., and Faramarzi, M.A., 2010. Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from Rhizomucor miehei and Mucor racemosus, Int J Biol Macromol. 47 (2), PP: 180-183.

43. Tajik, H., Moradi, M., Rohani, S.M.P., Erfani, A.M., and Jalali, F.S.S., 2008. Preparation of chitosan from brine shrimp (Artemia urmiana) cyst shells and effects of different chemical processing sequences on the physiochemical and functional properties of the product study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, Molecules. 13 (6), PP: 1263-1274.

44. Tao, W., Svetlana, Z., Draughon, F.A., William, S.C., and Carl, E.S., 2005. physiochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. J Agric F Chem. 53 (10), PP: 3888-3894.

45. Tayefeh Hendi, E., Sefidkon, F., Yousefi, M., and Teimouri, M., 2012. Essential oil composition and antimicrobial activities of oil, alcoholic extract of Artemisia sieberi from Firoozkooh. Region, Iran J Bio. 25 (3), PP: 445-455.

46. Vania, S.A., Benicio, B.N., Kazutaka, F., and Galba, M.C.T., 2003. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) – A factorial study, Rev Iberoam Micol. 20 (4), PP: 149-153.

47. Wee, L.T., Eugene, K., Teck, K.T., Lee, Y.L., and Su, C. T., 2001. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi.Carbohydr Res. 332 (3), PP: 305-316.

48. White, S.A., Farina, P.R., and Fulton, I., 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*, Appl Environ Micribiol. 38 (2), PP: 323-328.

49. Woo, J.K., Woo, G.L., Kalaimahan, T., and Ho, N.C., 2001. Optimization of culture conditions and continuous production of chitosan by the fungi, *Absidia coerulea*.Biotechnol, Bioprocess Eng. 6 (1), PP: 6-10.

50. Yaghoubi, H., Naderi-Manesh, H, Omidi, Y., and Asoodeh, A., 2012. Solid phase chemical synthesis and structure- activity study of brevinin-2R and analogues as antimicrobial peptides, Iran J Bio. 25 (3), PP: 366-376.

51. Zheng, L.Y., and Zhu, J.F., 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weight, Carbohydr Polym. 54 (4), PP: 527-530.

52. Zouhour, L., Salah, S., Saloua, S., and Amor, E.A., 2011. Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: biological and physicochemical properties. Afr J Biotechnol. 10 (4), PP: 640-647.

Extraction and evaluation of antimicrobial activity of γ- chitosan from cell wall of *Aspergillus Niger* (PTCC 5223)

Khakshoor M.S. and Pazooki J.

Marine Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Due to high biomass and substantial amount of chitosan in the cell wall, cultivation and production of chitosan from *Aspergillus Niger* was studied. The fungus grown on Potato Dextrose Agar (PDA) slants were inoculated in Potato Dextrose Broth (PDB) and incubated (25°C, 180 rpm). To evaluate changes in biomass, chitosan and other growth parameters over a period of 21 days and the interval of 3 days these factors were measured. The results showed that maximum of fungal biomass (22.5 g/L), chitosan (7.37%) and other growth parameters in the late exponential growth phase found. The pH of the medium in this stage was the lowest (2.5). After entering the medium to stationary phase, these factors were significantly reduced.Gram positive bacteria were more sensitive to chitosan compared to gram negative bacteria ($P \leq 0.5$).But *Candida albicans* showed the highest sensitivity to chitosan. The antibacterial properties of chitosan were more than their antifungal properties. Due to availability, ease of cultivation and maintenance this strain and acceptable level of chitosan, can be used as an alternative for transitional source (shellfish). Based on the present finding, it could be inferred that the *A. niger* can be considered as an source of chitosan which have inhibitory activity against some microorganisms that require further study.

Key words: Microorganisms, chitosan, isolation, biological properties