

Optimization of Chitosan Production from Iranian Medicinal Fungus *Trametes- Versicolor* by Taguchi Method and Evaluation of Antibacterial Properties

Negin Yasrebi¹, Ashrafal Sadat Hatamian Zarmi^{2*}, Mohaddeseh Larypoor³

1. Department of Biology, Faculty of Bio Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Life Sciences Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Bio Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

doi [10.30699/ijmm.14.3.1](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.3.1)



ABSTRACT

Background: Chitosan is a natural polymer with special properties that are prepared and purified in the industry of crustaceans. In this study, *Trametes versicolor* fungus, which was obtained from the forests of northern Iran, was used due to its medicinal properties, and the extracted chitosan of this fungus was optimized and its antimicrobial properties were investigated.

Materials & Methods: To increase chitosan, four influential NaOH parameters, time, temperature, and biomass to NaOH ratio were performed by the Taguchi method. Fourier Transformed Infrared Spectrometry (FTIR) was identified, and the antibacterial properties of the disc release method were investigated against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria and the bacterial non-growth halo by millimeters.

Results: The optimal conditions of the variables were: 5.94 Molar, 4 hours, and 40 minutes, 65.6 degrees Celsius, and 1:25 ratio, respectively. Under these conditions, the amount of chitosan produced was equal to 0.261 g/L and the degree of deacetylation 78% was obtained. The antibacterial properties against *E. coli* gram-negative bacteria and *S. aureus* gram-positive bacteria were found to be 12±1 and 18±2, respectively.

Conclusion: Evidence has shown that four parameters had a positive effect on more chitosan production and the *S. aureus* is more sensitive to the resulting chitosan.

Keywords: *Trametes versicolor*, Optimization, Chitosan, Taguchi, Disc diffusion

Received: 2020/01/19; Accepted: 2020/06/08; Published Online: 2020/06/18

Corresponding Information: Ashrafal Sadat Hatamian Zarmi, Assistant Professor, Department of Life Sciences Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: hatamian_a@ut.ac.ir



Copyright © 2020. This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Yasrebi N, Hatamian Zarmi A S, Larypoor M. Optimization of Chitosan Production from Iranian Medicinal Fungus *Trametes- Versicolor* by Taguchi Method and Evaluation of Antibacterial Properties. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (3) :

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

Introduction

Fungi are especially popular with researchers and the scientific community because of their unique properties. Species of wild mushrooms are also grown commercially in some communities. A distinctive feature of mushrooms is that they are an important source of biologically active compounds with medicinal value that have attracted the attention of many researchers around the world (1). These physiological medicinal properties include increased levels of immunity, regulation of heart rate, improving life-threatening diseases such as cancer, stroke and heart disease. They are also a valuable source of anti-inflammatory, antioxidant, anti-cancer, probiotic, antimicrobial and anti-diabetic compounds (2). *Trametes versicolor*, also known as *Coriolus versicolor* or *Polyporus versicolor* in East Asian countries, has been used in traditional medicine for medicinal purposes since ancient times and is currently used in modern medicine. The fungus is found all over the world, especially in the northern hemisphere. The fungus has various bioactive components, including polysaccharide peptide, krestin polysaccharide, which have been shown to have anti-tumor and anti-cancer properties. They also protect the animal liver from aflatoxins (3). Chitin is a polysaccharide derived from the fungus *Trametes versicolor*, which is considered as a commercial raw material for the production of chitosan and glucosamine. Chitosan becomes a flexible and soluble polymer through the deacetylation of chitin. Chitosan is a fiber-like and homopolymeric material, first introduced as a natural cationic flocculant for wastewater treatment in 1975 and it was used industrially (4). Chitosan is also found in some fungi and has gained much attention recently due to its special properties such as different chemical structure, non-toxicity, bio-compatibility with many organs and processing in various forms such as fibers, powders, membranes, gels, sponges and fiber (5,6). These unique properties has led to its high potential to produce applied materials (7). In 2018, Mokhtari *et al.* Extracted and optimized chitin and chitosan of the Iranian fungus *Ganoderma leucidum*, for biopolymer production (9). Currently commercial chitosan is produced from marine resources, including crustaceans, but due to problems such as environmental pollution during the process of detoxification and the high cost of extraction from these resources as well as the contamination of waters with heavy metals due to the entry of petroleum products. Damage to vessels containing petroleum and ultimately contamination of hard-skinned creatures that are the main source of chitosan production have encouraged researchers with benefits such as lower costs for extraction, elimination of heavy metal contamination and mass production at the commercial level to extract this bioactive substance from Sources of fungi.

Therefore, in the present study, the production of chitin and chitosan from the native Iranian fungus *Trametes Versicolor*, isolated from the northern forests of Iran, was performed to extract chitosan from in vitro and extract chitin from biomass. Also, by studying the conditions of chitosan extraction, factors affecting the production of chitosan from this fungus were selected and optimized by the Taguchi method. Then chitosan FTIR analysis was performed and the chitosan deacetylation rate was calculated. Finally, the amount of chitosan antibacterial activity was calculated by disk diffusion method.

Materials and Methods

The materials used in this study include the *Trametes Versicolor* fungus isolated from the forests of Mazandaran in collaboration with Sari University of Agriculture. The identification of this fungus has been confirmed by mycologists based on morphology, kept at 4°C. Medium molecular weight commercial chitosan, Potato dextrose agar culture, Potato dextrose broth medium of Merck Germany, sodium hydroxide, Merck Germany. Distilled water were used.

Mushroom Cultivation and Extraction of Chitin and Chitosan

Fungi were cultured in PDA (Potato dextrose agar) in vitro and kept in an incubator at 28 ° C for 7 days. Chitin and then chitosan were extracted from the biomass obtained (10). For chitin production, dried mycelium powder with 1:20 W / V ratio was mixed with NaOH 4 M and placed in a water bath at 90°C for 3 hours. The remaining sediment is the same chitin by freeze-drying, dehydration and weight were measured (11). For extraction of chitosan, chitin was exposed to 45% concentrated sodium hydroxide for 4 hours at 90 ° C with a 1: 15 W / V ratio. The remaining sediment was washed to neutral. Finally, chitosan was dehydrated by freeze drying method and weight was measured (12).

Optimization of Environmental Variables Affecting the Process of Chitosan Separation and Production from *Trametes versicolor*

According to the commonly used methods for designing experiments at different levels, the Taguchi method was chosen. To find the optimum conditions for further production of chitosan, some of the effective parameters in chitosan extraction such as temperature, process time, biomass to NaOH ratio and NaOH concentration were investigated. In this study, experiments were evaluated with 4 factors at three levels. The L9 array was used for this purpose.

Factors and levels are listed in Table 1. Table 2 also shows the Taguchi L9 array.

Table 1. Factors and levels investigated in this study by the Taguchi method.

Factor		level		
		1-	0	1+
NaOH (M)	A	2	4	6
Time (hour)	B	1	3	5
Temperature (°C)	C	30	60	90
NaOH/Biomass	D	1.15	1.20	1.25

Table 2. Taguchi L9 array layout for chitosan production.

Run	Conditions			
	NaOH	Time	Temperature	NaOH/Biomass
1	1	3	3	3
2	2	2	3	1
3	2	1	2	3
4	3	3	2	1
5	1	2	2	2
6	3	2	1	3
7	2	3	1	2
8	1	1	1	1
9	3	1	3	2

Characterization of Chitosan by Fourier Transform Infrared Spectrometry Analysis

Using FTIR to investigate chemical bonds and functional groups, the chitosan powder produced was prepared for FTIR test and the following equation was used to determine the degree of deacetylation of the samples (13).

$$\text{(Equation 1):} \quad DD = [(A_{1655} \div A_{3450})] \times 115$$

In this formula A1655 is the first type of Amide absorption peak at 1655 cm⁻¹ as the amount of N-acetyl groups and A3450 is the Hydroxyl group (OH) absorption peak at 3450 cm⁻¹ (14).

Evaluation of Antibacterial Properties of Chitosan

Disk diffusion method was used to evaluate the antibacterial activity of chitosan produced and two bacteria *E. coli* and *S. aureus* were studied (15).

Statistical Analysis

According to the data obtained from ANOVA in Table 4 and the results obtained from the experiments, a very high degree of similarity and agreement was observed ($p < 0/05$). Therefore, the variables listed in Table 4 are important and effective in producing more chitosan.

Results

Chitosan Extracted from the Native *Trametes versicolor* Fungus of Iran

After 10 days of cultivation of *Trametes versicolor* in PDB medium, the biomass (dry -weight) was 2.25 g/L.

The obtained biomass of 0.18 gr of chitin and the obtained chitin of 0.09 gr were finally extracted. Table 3 shows the amount of chitosan produced in each experiment. The purpose of the design of the experiment was to achieve the maximum chitosan content.

Optimization of Parameters Affecting the Production of Chitosan from the Medicinal Fungus *Trametes versicolor*

Four factors of NaOH, time, temperature and biomass / NaOH ratios were selected to investigate the factors affecting chitosan growth. After selecting the factors, the experiments were designed and implemented using the Taguchi method in three levels with four factors. Chitosan production was then expressed in g/L.

According to the data obtained from ANOVA, a high degree of similarity and agreement is observed. Contour (C) shows a comparison chart of the results obtained from the amount of chitosan from the fungus in each experiment with data predicted by the software. As shown in Figure 1, the results of the experiments are highly consistent with the data predicted by the software, with R2 producing chitosan 0.9993 and R2 adjusted 0.9971, all of which indicate high accuracy of the experiments. Factors affecting p-value are less than 0.05. The final equation for chitosan production is:

$$\text{(Equation 2):} \quad \text{chitosan} = +0.27 - 0.050 \text{ NaOH} - 0/0656 \text{ Time} + 0.000878 \text{ temperature} + 0.0197 \text{ NaOH} \times \text{Time}$$

Table 3. Data obtained from Taguchi method of chitosan production test

Run	conditions				Response	
	NaOH (M)	Time (h)	Temperature °C	NaOH/Biomass	Actual chitosan (g/l)	Predicted chitosan (g/l)
1	1	3	3	3	0.12	0.1207
2	2	2	3	1	0.135	0.1337
3	2	1	2	3	0.137	0.1377
4	3	3	2	1	0.23	0.237
5	1	2	2	2	0.156	0.1547
6	3	2	1	3	0.157	0.1557
7	2	3	1	2	0.172	0.1727
8	1	1	1	1	0.115	0.1157
9	3	1	3	2	0.11	0.1107

Table 4. ANOVA data for the variables used in the experiment

Respond	Level	Degree of release	F-value	P-value	R ²	Obtained R ²	Predicted R ²
Chitosan	A-NaOH	1	468.17	0.00211	0/999	0/9971	0/809
	B-Time	1	1066.17	0.00091			
	C-Temperature	1	260.04	0.00381			
	D- Biomass/NaOH	2	198.05	0.0050			
	AB	1	780.12	0.0013			
model		6	460.17	0.0022			

According to Cantor Figure 1: A) 2D and B) 3D chart shows the amount of chitosan production due to the interaction of the test factors, which increased with increasing NaOH concentration and the time of

production of chitosan. The optimum test conditions for NaOH concentration, time, temperature and biomass to NaOH ratio were 5.94 M, 4 h and 40 min, 65.6°C and 1: 25 w / v ratio (Table 5).

Table 5. Optimized results of software Taguchi analysis

The optimal value of run conditions	NaOH (M)	Time (h)	Temperature (C)	NaOH/Biomass	Chitosan (g/l)
	5.94	4 h and 40 min	65.6	1: 25 w / v	0/261

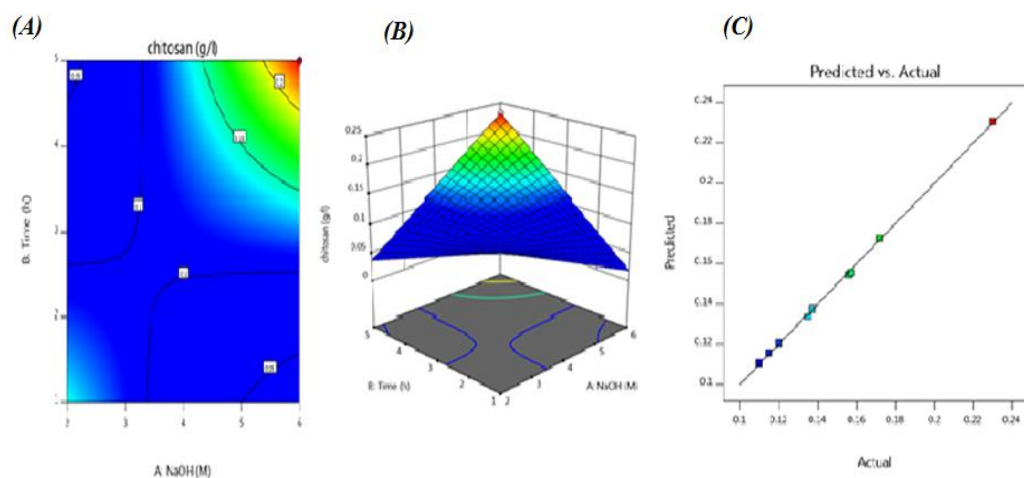


Figure 1. (A) two-dimensional diagram and (B) three-dimensional diagram of chitosan production with respect to the interaction of two time parameters and NaOH, (C) Comparison diagram of the amount of chitosan produced and predicted.

FTIR Spectrum

For a closer look, the FTIR spectrum was taken from the commercial chitosan sample and compared with the chitosan sample produced from the fungus. Figure 2, shows the FTIR spectra of chitin and fungal chitosan. In the process of deacetylation of the chitin, the bonds of the 1655-cm^{-1} region are gradually reduced while the band-area of 1558-cm^{-1} is increased due to the presence of -NH_2 groups. The band of 1558-cm^{-1} shows

higher adsorption than 1655-cm^{-1} , indicating an effective deacetylation of chitin. To determine the degree of deacetylation the first type amide bands in the 1655-cm^{-1} region and the -OH tensile bands in the 3450-cm^{-1} regions are crucial. The peak in the 1250-cm^{-1} region corresponds to the amino groups present in the chitosan structure.

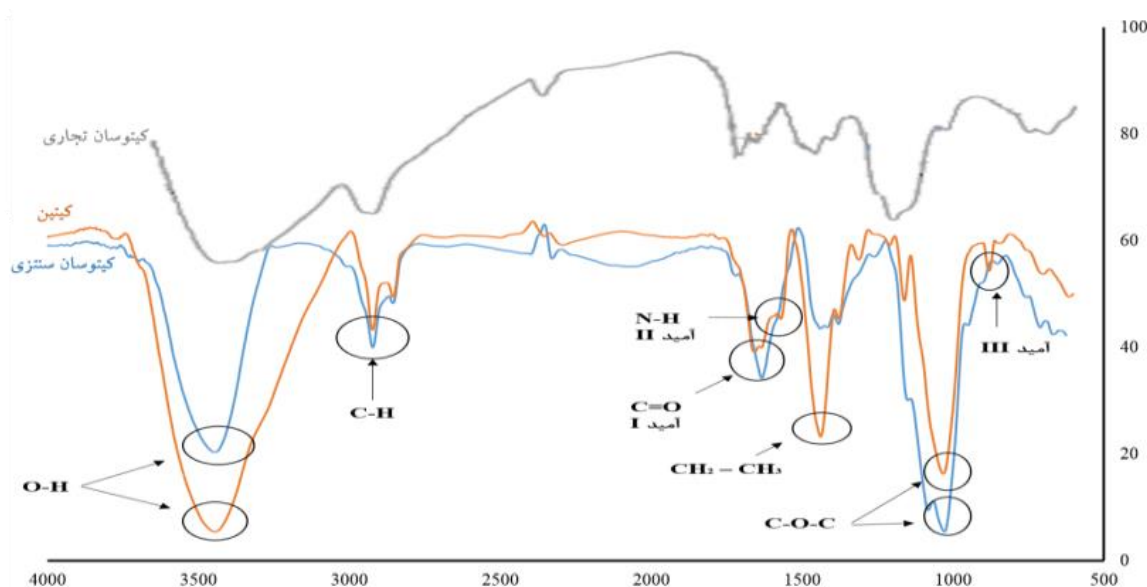


Figure 2. FTIR spectrum of chitin and extracted chitosan with commercial chitosan

Determination of the Degree of Chitosan Deacetylation Extracted

Based on the infrared curves obtained, equation 1 degree of commercial chitosan deacetylation, 76% was obtained, and the degree of produced chitosan deacetylation was 78%.

Evaluation of the Antibacterial Activity of Chitosan Produced from Native *Trametes versicolor*

Antibacterial disk test was performed against Gram-positive *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria *Escherichia coli* after chitosan production from

Trametes versicolor. To do this, chitosan extracted from the fungus was compressed into a tablet of the specified size. The aura created on the margin of the chitosan tablet indicates its antibacterial activity. Chloramphenicol antibiotics were used to control the test. All steps were performed with three replications. The antibacterial activity against *S. aureus* is higher than that of *E. coli*, indicating a higher chitosan efficacy than Gram-positive bacteria. The results of bacterial immunity in the disk diffusion test are presented in Table 6. Compared with chloramphenicol, *S. aureus* showed a greater inactivation in the application of chitosan synthesized from fungi than in *E. coli*.

Table 6. Bacterial non-growth rate in mm in disk diffusion test

Samples	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Fungal chitosan	1(mm)±12	2(mm)±18
Chloramphenicol	2(mm)±23	3(mm)±21

Discussion

In this study, the chitosan of the medicinal fungus *Trametes versicolor* was optimized by the Taguchi

method. The optimum conditions for NaOH concentration, time, temperature and biomass to NaOH ratio were 5.94 M, 4 h and 40 min, 65.6°C and ratio of 1 to 25 w/v, respectively. After chitin deacetylation by

concentrated sodium hydroxide at 90°C, FTIR spectroscopy shows that this method had more effect on N-H, O-H, and C-H peaks. These changes in absorption indicate that alkaline and heat have eliminated the acetyl group from the chitin sample and the production of chitosan. Chitin is composed of OH, NHCOCH₃, and NH₂ groups and is eliminated by deacetylation so chitosan is obtained with OH and NH₂ functional groups (16). Increasing the amount of alkali to 5.9 M concentration at 65°C increased protein degradation and more effective interactions on mycelium and chitin and ultimately more chitosan production.

Based on some researchers in optimizing chitin and chitosan production and comparing with the results of the present study, most of the work done on PDB medium has been used to grow fungi. In 2008, Wang *et al.* investigated the physical properties of chitosan fungi on *Absidia coerulea*, *Mucor rouxii*, *Rhizopus oryzae*, with chitosan acetylation rates of these fungi above 80% (17). This difference in the degree of deacetylation can be explained by the structure of the extracted chitosan, the degree of purity and the molecular weight of the chitosan which can be varied in other fungi. The results of bacterial inhibition in the disk diffusion assay show that in general the gram-negative bacteria have more sequence in the membrane itself than the cell membrane layers and consequently have thicker membrane than the Gram-positive bacteria. Increased membrane strength of Gram-negative bacteria and consequently increased resistance to antibacterial agents. In 2001, Kim WJ and colleagues extracted and optimized Chitosan from the fungus *Absidia coerulea*, with an optimum value of 2.3 g/L (18). Also in 2009, Andipan *et al.* from *Mucor rouxii* increased chitosan production by adding molasses salt from 14.7% to 36.4% chitosan levels with deacetylation degree: 12.8% and molecular weight: 2.48×10⁴ (19). In 2017, Abdel-Gawad and his colleagues obtained *Aspergillus niger* chitosan with an acetylation degree of 83.64% (14).

In 2018, Ahamed MIN and *et al.*, investigated the production of chitosan from crab bark using sonicate waves to antibacterial activity in the resulting chitosan disc diffusion test, the growth zone diameter for *S. aureus* and *E. coli*, respectively, 12 mm and 14 mm were obtained (24). In 2019, Kulawik *et al.*, in a review article on the role of chitosan on seafood found that higher deacetylate chitosan showed the best adsorption on Gram-negative and Gram-positive bacteria and lower pH of chitosan by bacterial cells were improved (25).

Conclusion

In this study, the Iranian fungus *Trametes versicolor* was used and the Taguchi method was used to optimize chitosan from this fungus, which is a reason for its innovation. The results showed a high percentage of similarity of chitosan produced by fungi and commercial specimens purchased and samples in research papers. Bacterial immunity against *E. coli* and *S. aureus* in millimeters were 12±1 and 18±2, respectively, indicating a greater efficacy on Gram-positive bacteria. Chitosan extraction from fungi, optimum test conditions for NaOH concentration, time, temperature and biomass to NaOH ratio were 5.94 M, 4 h and 40 min, 65.6°C and 1:25 ratio, respectively. The chitosan concentration in this condition was 0.261 g/L.

Acknowledgment

The results obtained from a Master thesis with identification code 15730560962049 at Islamic Azad University North Tehran Branch.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



بهینه سازی تولید کیتوسان از قارچ دارویی ترامیتیس ورسیکالر بومی ایران به روش تاگوچی و بررسی خاصیت ضدباکتریایی

نگین یثربی^۱، اشرف السادات حاتمیان زارمی*^۲، محدثه لاری پور^۳

۱. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: کیتوسان پلیمری طبیعی با خواص ویژه است که در صنعت از سخت پوستان دریایی تهیه و خالص سازی می شود. در این پژوهش از قارچ *ترامیتیس ورسیکالر* که از جنگل های شمال ایران به دست آمده به دلیل خواص دارویی استفاده گردید و کیتوسان استخراجی از این قارچ، بهینه سازی و خواص ضد میکروبی آن بررسی شد.

مواد و روش کار: برای افزایش کیتوسان، چهار پارامتر تأثیرگذار NaOH، زمان، دما و نسبت زیست توده به NaOH به روش تاگوچی انجام شد. کیتوسان تولید شده با FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometry) مشخصه یابی گردید، و خاصیت ضدباکتریایی از روش انتشار دیسکی در برابر باکتری *اشرشیا کلی* و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و هاله عدم رشد باکتری بر حسب میلی متر بررسی شد.

یافته ها: شرایط بهینه متغیرها به ترتیب: ۵/۹۴ مولار، ۴ ساعت و ۴۰ دقیقه، ۶۵/۶ درجه سلسیوس و نسبت ۱/۲۵ به دست آمد که تحت این شرایط میزان کیتوسان تولیدی برابر با ۰/۲۶۱ گرم بر لیتر و درجه استیل زدایی ۰/۷۸ به دست آمد. خواص ضد باکتریایی در برابر باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب برابر با ۱۲±۱ و ۱۸±۲ به دست آمد.

نتیجه گیری: شواهد نشان داد چهار پارامتر بر تولید بیشتر کیتوسان تأثیر مثبت دارد و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به کیتوسان حاصل حساس تر است.

کلید واژه ها: ترامیتیس ورسیکالر، بهینه سازی، کیتوسان، تاگوچی، انتشار دیسکی

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۹

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۳/۲۹

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

نویسنده مسئول:

اشرف السادات حاتمیان زارمی، استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

ایمیل: hatamian_a@ut.ac.ir

کپی رایت © مجله میکروپزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

بیماری های قلبی اشاره کرد. همینطور منبع با ارزشی از ترکیبات ضدالتهابی، آنتی اکسیدان، ضدسرطان، پروبیوتیک، ضد میکروب و ضد دیابت به شمار می روند (۲). قارچ *ترامیتیس ورسیکالر* که با اسامی *کوربولوس ورسیکالر* یا *پلیپوراس ورسیکالر* در کشورهای شرق آسیا از گذشته تا به امروز به دلیل خواص دارویی، در درمان های طب سنتی استفاده شده است، در حال حاضر نیز در طب نوین استفاده دارد. این قارچ در سراسر جهان به خصوص در نیمکره شمالی یافت می شود. *ترامیتیس ورسیکالر* جزء شاخه بازیدیومایکوتها و خانواده *پلی پوراسه/آ* است. این قارچ دارای اجزای

قارچها به دلیل ویژگی های منحصر به فرد خود در بین محققان و جوامع علمی مورد توجه هستند. همینطور گونه هایی از قارچ های وحشی در برخی جوامع به صورت تجاری کشت داده می شود. از ویژگی های ممتاز قارچها می توان به عنوان منبع مهم از ترکیبات فعال زیستی با ارزش دارویی اشاره کرد که توجه بسیاری از محققان سراسر دنیا را به خود معطوف کرده است (۱). از جمله این خواص دارویی فیزیولوژیکی می توان به افزایش سطح ایمنی، تنظیم ضربان قلب، درمان و پیشگیری از بیماری های مختلف، بهبود بیماری های تهدیدکننده زندگی مثل سرطان، سکنه مغزی و

ترامیتیس ورسیکالر بومی ایران که از جنگل‌های شمال ایران جداسازی شده است در دستور کار قرار گرفت. قارچ ابتدا در محیط آزمایشگاه کشت داده شد، سپس کیتوسان از کیتین زیست توده کشت داده شده، استخراج شد. همچنین با بررسی شرایط استخراج کیتوسان عوامل مؤثر بر استخراج هرچه بیشتر کیتوسان از این قارچ انتخاب و با روش تاگوچی بهینه‌سازی شد. سپس آنالیز مربوط به FTIR کیتوسان انجام و میزان استیل‌زدایی کیتوسان محاسبه گردید. در نهایت میزان فعالیت ضد باکتریایی کیتوسان به دست آمده با استفاده از روش انتشار دیسکی محاسبه گردید.

روش پژوهش

مواد استفاده شده در این پژوهش شامل قارچ ترامیتیس ورسیکالر جداسازی شده از جنگل‌های مازندران با همکاری دانشکده کشاورزی ساری است؛ این قارچ بر اساس ریخت‌شناسی توسط قارچ‌شناسان شناسایی و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شده است. کیتوسان تجاری با وزن مولکولی متوسط، محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار، محیط کشت پوتیتو دکستروز براث مرک آلمان، هیدروکسید سدیم مرک آلمان، آب مقطر مورد استفاده قرار گرفت.

کشت قارچ و استخراج کیتین و کیتوسان

قارچ ترامیتیس ورسیکالر برای نگهداری در شرایط آزمایشگاهی، در محیط PDA (Potato dextrose agar) (تولید شده در شرکت مرک کشور آلمان) کشت داده شد و به مدت ۷ روز در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای تهیه مایه تلقیح (Seed culture) اولیه، ابتدا یک قطعه ۵×۵ میلی‌متر مربع از قارچ رشد کرده در پلیت PDA، به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط (Potato dextrose broth) (PDB) (تولید شده در شرکت مرک آلمان) استریل‌شده در فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد. این محیط به مدت ۴ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دور rpm ۱۸۰ در شیکر انکوباتور قرار داده شد. سپس برای آماده کردن مایه تلقیح ثانویه یک درصد از محیط اولیه را به محیط جدید اضافه کرده و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دور rpm ۱۸۰ در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. در روز دهم برای به دست آوردن پودر میسیلیوم خشک شده، از محیط کشت نمونه‌گیری شد. پس از سانتریفیوژ با دور rpm ۱۱۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه، رسوب حاصل دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و با روش انجماد خشک، خشک و توزین شد. از زیست‌توده به دست آمده کیتین و سپس کیتوسان استخراج گردید (۱۰).

فعال زیستی مختلفی بوده که از بین آن‌ها می‌توان به پلی‌ساکاروپپتید، پلی‌ساکاریدکرتستین اشاره کرد که خواص ضدتوموری و ضدسرطانی آن‌ها ثابت شده است. همچنین سبب محافظت از کبد حیوانی در مقابل آفاتوکسیب می‌شوند (۳). کیتین به‌عنوان یک پلی‌ساکارید به‌دست آمده از قارچ ترامیتیس ورسیکالر است که به‌عنوان ماده خام تجاری برای تولید کیتوسان و گلوکزآمین در نظر گرفته می‌شود. کیتوسان از طریق داستیل‌شدن بازی کیتین به پلیمر انعطاف‌پذیر و محلول تبدیل می‌شود. کیتوسان یک ماده فیبر مانند و هموپلیمری است که اولین بار به‌عنوان فلوکولانت کاتیونی طبیعی برای تصفیه پساب در سال ۱۹۷۵ به‌طور صنعتی مورد استفاده قرار گرفت (۴). کیتوسان همچنین در بعضی از قارچ‌ها یافت می‌شود و به دلیل خصوصیات ویژه خود از قبیل ساختار شیمیایی متفاوت، خصوصیت پلی‌کاتیونی، غیرسمی بودن، زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری با بسیاری از ارگان‌ها، بافت‌ها و سلول‌ها، فعالیت‌های فیزیکی و شیمیایی، تغییرپذیری فیزیکی و شیمیایی خودش و پردازش به شکل‌های مختلفی مثل بیدها، پودر، غشا، ژل، اسفنج و فیبر موردتوجه بسیاری در زمینه‌های گوناگون قرار می‌گیرد (۵،۶).

این خصوصیات منحصربه‌فرد، موجب شد تا کیتوسان توجه زیادی را نه‌تنها از نظر فراوانی در منابع طبیعی بلکه به دلیل پتانسیل بالا، برای تهیه مواد کاربردی، به سمت خود معطوف کند. در سال ۲۰۱۵، Gustavo Muoz و همکاران برای تولید هیدروژل از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* کیتوسان استخراج کردند (۷). در سال ۲۰۱۷، Sathiyaseelan و همکاران مطالعه‌ای مبنی بر تولید اسفنج‌های نانوکامپوزیتی مبتنی بر کیتوسان قارچ داشتند که به‌عنوان جایگزین برای پوشش زخم استفاده شد (۸). در سال ۲۰۱۸، Mokhtari و همکاران، از قارچ ایرانی *گنودرما لوسیدوم* برای تولید بیوپلیمر، کیتین و کیتوسان استخراج و بهینه کردند (۹). در حال حاضر کیتوسان تجاری از منابع دریایی از جمله سخت‌پوستان تهیه می‌شود؛ مشکلاتی از قبیل آلودگی محیط زیست طی فرایند سختی‌زدایی، هزینه بالای استخراج کیتوسان از این منابع، آلودگی آب‌ها با فلزات سنگین در پی ورود مواد نفتی ناشی از صدمه دیدن کشتی‌های حاوی مواد نفتی و سرانجام آلودگی موجودات سخت‌پوست که منبع اصلی تولید کیتوسان هستند، موجب شد محققان با در نظر گرفتن مزایایی از قبیل هزینه پایین‌تر برای استخراج، حذف آلودگی فلزات سنگین و تولید انبوه در سطح تجاری به استخراج این ماده زیست‌فعال از منابع قارچی روی آورند. از همین رو در این پژوهش، تولید کیتین و کیتوسان از قارچ دارویی

حالتی خنثی پیدا کند. در نهایت کیتوسان حاصل همانند کیتین با روش انجماد خشک، آبیگری و وزن آن اندازه گیری شد (۱۲).

بهینه سازی متغیرهای محیطی مؤثر بر فرایند جداسازی و تولید کیتوسان از ترامیتیس ورسیکالر

با توجه به روش های رایج مورد استفاده برای طراحی آزمایش در سطوح مختلف، روش تاگوچی انتخاب شد. برای یافتن شرایط بهینه تولید بیشتر کیتوسان، برخی از پارامترهای مؤثر در استخراج کیتوسان از قبیل دما، زمان فرآیند، نسبت زیست توده به NaOH و غلظت NaOH مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش آزمایش ها با ۴ فاکتور در ۳ سطح مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور از آرایه L9 استفاده شد. فاکتورها و سطوح در جدول ۱ آورده شده است. جدول ۲ نیز آرایه L9 تاگوچی را نشان می دهد.

برای تولید کیتین، پودر میسیلیوم خشک شده با نسبت ۱:۲۰ W/V با NaOH ۴ مولار مخلوط و به مدت ۳ ساعت در دمای ۹۰°C داخل حمام آب قرار داده شد. بعد از ۳ ساعت مخلوط با دور ۱۰۰۰۰ rpm و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و قسمت رویی دور ریخته و رسوب باقی مانده دو بار توسط آب مقطر شسته و سانتریفیوژ شد. رسوب باقی مانده که همان کیتین است با روش انجماد خشک، آبیگری و وزن آن اندازه گیری شد (۱۱). برای استخراج کیتوسان، کیتین به مدت ۴ ساعت در دمای ۹۰ درجه سلسیوس تحت تأثیر سدیم هیدروکسید غلیظ ۴۵٪ با نسبت ۱:۱۵ W/V قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه، محلول رویی دور ریخته شد و ماده ته نشین شده دو مرتبه توسط آب مقطر شسته و سانتریفیوژ شد تا

جدول ۱. فاکتورها و سطوح مورد بررسی در این تحقیق با استفاده از روش تاگوچی

فاکتور	سطح		
	-۱	۰	+۱
NaOH (مولار)	A	۴	۶
زمان (ساعت)	B	۳	۵
دما (درجه سلسیوس)	C	۶۰	۹۰
NaOH زیست توده /	D	۱/۲۰	۱/۲۵

جدول ۲. چیدمان آرایه L9 تاگوچی برای تولید کیتوسان

آزمایش	شرایط آزمایش			
	NaOH	زمان	دما	زیست توده/NaOH
۱	۱	۳	۳	۳
۲	۲	۲	۳	۱
۳	۲	۱	۲	۳
۴	۳	۳	۲	۱
۵	۱	۲	۲	۲
۶	۳	۲	۱	۳
۷	۲	۳	۱	۲
۸	۱	۱	۱	۱
۹	۳	۱	۳	۲

برای تعیین درجه استیل زدایی مقدار ۱۵ میلی گرم از پودر نمونه ها با مقدار کافی از پودر KBr مخلوط و تحت فشار قرار گرفت و یک قرص با ضخامت ۲ میلی متر تهیه شد. سپس با استفاده از دستگاه طیفسنج مادون قرمز (اسپکترومتر BRUCKER، مدل EQUINOX55، آلمان) مورد بررسی قرار گرفت. طیف IR نمونه ها

مشخصه یابی کیتوسان با آنالیز طیفسنجی مادون قرمز

طیفسنجی مادون قرمز (FTIR) روشی رایج برای مطالعات بیولوژیک است. به منظور بررسی پیوندهای شیمیایی و گروه های عاملی، پودر کیتوسان تولید شده به همراه نمونه تجاری خریداری شده برای آزمون FTIR آماده شد. در نهایت پیک های موجود در محدوده $4000-600 \text{ cm}^{-1}$ بررسی شدند (۱۳).

می‌شود. ($P < 0.05$). بنابراین متغیرهای درج شده در جدول ۴ در تولید بیشتر کیتوسان مهم و اثرگذار هستند.

یافته‌ها

کیتوسان استخراج شده از قارچ *ترامیتیس ورسیکالر*

بومی ایران

ده روز پس از کشت قارچ *ترامیتیس ورسیکالر* در محیط PDB میزان زیست توده (وزن خشک) برابر با ۲/۲۵ گرم بر لیتر به دست آمد. از زیست توده حاصل ۰/۱۸ گرم کیتین و از کیتین به دست آمده در نهایت مقدار ۰/۰۹ گرم کیتوسان استخراج شد. زیست توده هر آزمایش در روز هفتم از محیط کشت غوطه‌ور جداسازی و براساس روش اجرا شده خشک و اندازه‌گیری شد. سپس از زیست توده حاصل کیتین و کیتوسان استخراج شد. جدول ۳ میزان کیتوسان تولید شده در هر آزمایش را نشان می‌دهد. هدف از طراحی آزمایش رسیدن به بیشترین میزان کیتوسان بوده است.

بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر تولید کیتوسان از قارچ

دارویی *ترامیتیس ورسیکالر*

با بررسی‌های صورت گرفته درباره عوامل تأثیرگذار بر افزایش کیتوسان چهار فاکتور NaOH، زمان، دما و نسبت زیست توده/NaOH انتخاب گردید. بعد از انتخاب فاکتورها، آزمایش‌ها با استفاده از روش تاگوچی در سه سطح با چهار فاکتور طراحی و اجرا شد. سپس میزان تولید کیتوسان برحسب g/L به دست آمد.

در محدوده فرکانسی $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ برداشت شد. از معادله زیر برای تعیین درجه استیل‌زدایی نمونه‌ها استفاده شد.

$$\text{معادله (۱)} \quad \text{DD} = [(A_{1655} \div A_{3450}) \times 115]$$

در این فرمول A_{1655} پیک جذبی امید نوع اول در cm^{-1} ۱۶۵۵ به عنوان مقدار گروه‌های N-استیل و A_{3450} پیک جذبی گروه هیدروکسیل (OH) در طول موج cm^{-1} ۳۴۵۰ می‌باشند (۱۴).

بررسی خواص ضدباکتریایی کیتوسان

جهت بررسی خاصیت ضدباکتریایی کیتوسان تولید شده از روش انتشار دیسکی استفاده شد و دو باکتری *شرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان نماینده باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا محلول استاندارد نیم مک‌فارلند (Mc.Farland ۰/۵) برای دو باکتری *شرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تهیه شد (جذب در ۶۰۰ نانومتر حدود ۰/۱۳-۰/۰۸). با استفاده از سواب استریل، باکتری‌های مورد آزمایش در محیط کشت مولر هینتون آگار (شرکت مرک آلمان) به روش چمنی کشت داده شد به طوری که در همه جای پلیت باکتری به صورت یکنواخت پخش شود. حداکثر تا پانزده دقیقه پس از کشت در پلیت، دیسک‌های تهیه شده از کیتوسان روی سطح پلیت قرار داده شد. پس از دیسک‌گذاری، پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس داخل انکوباتور قرار داده شد (۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری

با توجه به داده‌های حاصل از ANOVA در جدول ۴ و نتایج به دست آمده از آزمایش‌ها میزان شباهت و تطابق بسیار بالایی مشاهده

جدول ۳. داده‌های حاصل از انجام آزمایش تولید کیتوسان با روش تاگوچی

آزمایش	شرایط آزمایش				پاسخ	
	NaOH (M)	زمان (h)	دما °C	زیست توده/NaOH	کیتوسان واقعی (g/l)	کیتوسان پیش‌بینی شده (g/l)
۱	۱	۳	۳	۳	۰/۱۲	۰/۱۲۰۷
۲	۲	۲	۳	۱	۰/۱۳۵	۰/۱۳۳۷
۳	۲	۱	۲	۳	۰/۱۳۷	۰/۱۳۷۷
۴	۳	۳	۲	۱	۰/۲۳	۰/۲۳۷
۵	۱	۲	۲	۲	۰/۱۵۶	۰/۱۵۴۷
۶	۳	۲	۱	۳	۰/۱۵۷	۰/۱۵۵۷
۷	۲	۳	۱	۲	۰/۱۷۲	۰/۱۷۲۷
۸	۱	۱	۱	۱	۰/۱۱۵	۰/۱۱۵۷
۹	۳	۱	۳	۲	۰/۱۱	۰/۱۱۰۷

به‌عنوان مثال، R2 تولید کیتوسان ۰/۹۹۹۳ و R2 تنظیم‌شده ۰/۹۹۷۱ گزارش شد. تمام این اطلاعات نشان از دقت بالای آزمایش‌های انجام شده داشت ($P < 0.05$). بنابراین متغیرهای ذیل در تولید بیشتر کیتوسان مهم و اثرگذار هستند. معادله نهایی برای تولید کیتوسان عبارت است از:

$$\text{کیتوسان (معادله ۲)} = \text{زمان} \times 0.197 \text{NaOH} + 0.00878 \text{دما} + 0.0656 \text{زمان} - 0.50 \text{NaOH} - 0.273 = \text{کیتوسان}$$

کانتور (C) نمودار مقایسه نتایج به‌دست‌آمده از میزان کیتوسان به‌دست‌آمده از قارچ در هر آزمایش را با داده‌های پیش‌بینی‌شده توسط نرم‌افزار نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده‌شده است نتایج حاصل از آزمایش‌ها به داده‌های پیش‌بینی‌شده توسط نرم‌افزار شبیه بود.

جدول ۴. داده‌های حاصل از ANOVA برای متغیرهای مورد استفاده در آزمایش

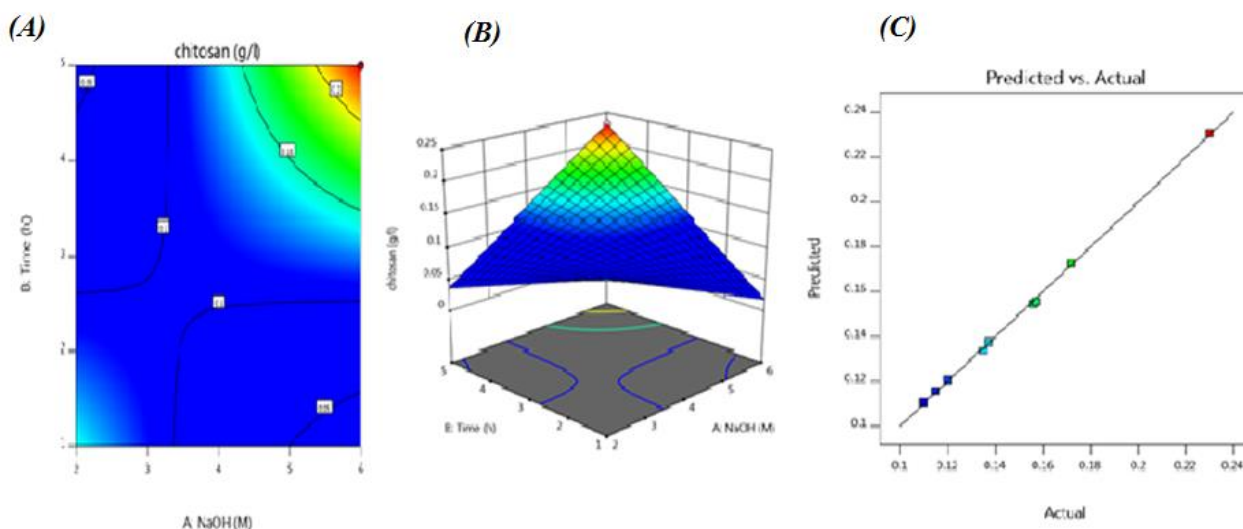
پاسخ	سطح	درجه آزادی	F-value	P-value	R ²	به دست آمده R ²	پیش بینی شده R ²
کیتوسان	NaOH-A	۱	۴۶۸/۱۷	۰/۰۰۲۱۱	۰/۹۹۹	۰/۹۹۷۱	۰/۸۰۹
	زمان-B	۱	۱۰۶۶/۱۷	۰/۰۰۰۹۱			
	دما-C	۱	۲۶۰/۰۴	۰/۰۰۳۸۱			
	NaOH/توده-D	۲	۱۹۸/۰۵	۰/۰۰۵۰			
	AB	۱	۷۸۰/۱۲	۰/۰۰۱۳			
model		۶	۴۶۰/۱۷	۰/۰۰۲۲			

بهینه‌سازی انجام‌شده، شرایط آزمایش بهینه برای غلظت NaOH، زمان، دما و نسبت زیست‌توده به NaOH به ترتیب ۵/۹۴ M، ۴ ساعت و ۴۰ دقیقه، ۶۵/۶ درجه سلسیوس و نسبت ۱:۲۵ w/v به دست آمد (جدول ۵).

طبق کانتور شکل ۱ (A) نمودار دوبعدی و (B) نمودار سه بعدی میزان تولید کیتوسان را با توجه به میانگین فاکتورهای آزمایش نشان می‌دهد، که با افزایش میزان غلظت NaOH و افزایش زمان، میزان کیتوسان تولیدی افزایش یافته است. بر اساس

جدول ۵. نتایج بهینه شرایط حاصل از تحلیل تاگوچی توسط نرم‌افزار

مقدار بهینه شرایط آزمایش	NaOH (M)	زمان (h)	دما (°C)	زیست‌توده/NaOH	کیتوسان (g/l)
آزمایش	۵/۹۴M	۴/۴۰	۶۵/۶	۱:۲۵	۰/۲۶۱



شکل ۱. (A) نمودار دوبعدی و (B) نمودار سه بعدی تولید کیتوسان با توجه به میانگین دو پارامتر زمان و NaOH، (C) نمودار مقایسه میزان کیتوسان تولیدشده و پیش‌بینی‌شده

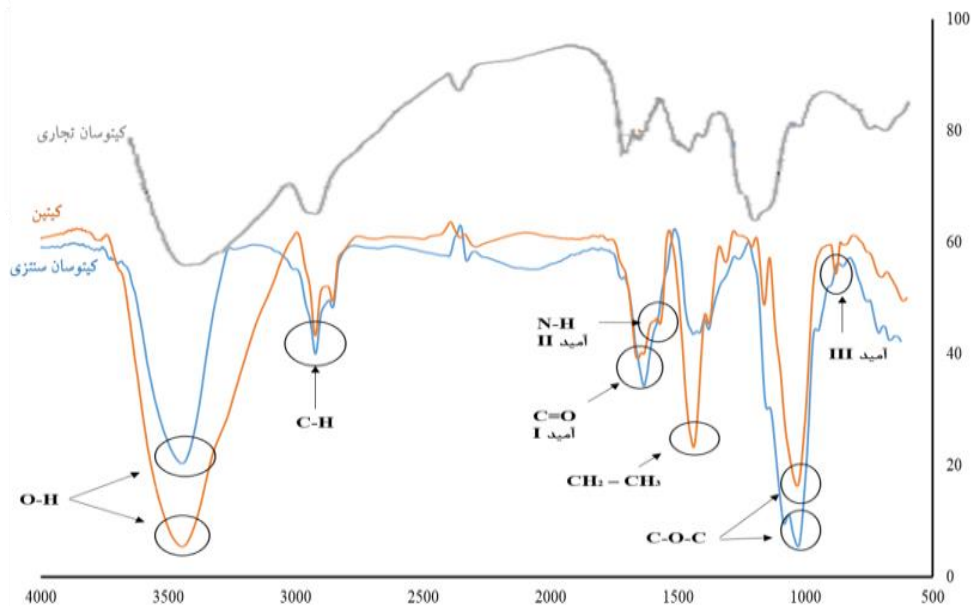
طیف FTIR

برای بررسی پیوندهای شیمیایی و گروه‌های عاملی کیتوسان به‌دست‌آمده از قارچ *ترامیتیس ورسیکالر* بومی ایران از طیف FTIR استفاده شد. برای بررسی دقیق‌تر از نمونه تجاری کیتوسان طیف FTIR گرفته شد و با نمونه کیتوسان تولیدشده از قارچ مقایسه گردید.

شکل ۲ طیف FTIR مربوط به کیتین و کیتوسان قارچی را نشان می‌دهد. در محدوده 3450 cm^{-1} مربوط به لرزش‌های کششی گروه‌های OH- است. پیوندهای کششی C-H در طول موج 2885 cm^{-1} دیده می‌شوند. پیوندهای مشخص کششی گروه کربونیل (C=O) در 1655 cm^{-1} دیده می‌شوند که به آمید I نسبت داده می‌شود. یک پیک تیز در 1427 cm^{-1} دیده می‌شود که با تغییر شکل‌های متقارن CH_3 - مطابقت دارد و طول موج cm^{-1}

1558 با تغییر شکل‌های NH- مربوط به آمید II مطابقت دارد. باندهای لرزشی در 1072 cm^{-1} نشان‌دهنده لرزش‌های داخلی حلقه کیتین است که مربوط به C-O-C می‌باشد. همچنین پیک ناحیه 894 cm^{-1} مربوط به تغییر شکل‌های آمید III است.

در فرآیند استیل‌زدایی از کیتین پیوندهای ناحیه cm^{-1} 1655 به تدریج کاهش می‌یابد درحالی‌که باند ناحیه 1558 cm^{-1} افزایش می‌یابد که به دلیل وجود گروه‌های NH_2 - می‌باشد. باند ناحیه 1558 cm^{-1} جذب بالاتری نسبت به 1655 cm^{-1} نشان می‌دهد که نشان‌دهنده استیل‌زدایی مؤثر از کیتین می‌باشد. برای تعیین درجه استیل‌زدایی باندهای آمید نوع اول در ناحیه cm^{-1} 1655 و باندهای کششی OH- در ناحیه 3450 cm^{-1} بسیار تعیین‌کننده هستند. پیک در ناحیه 1250 cm^{-1} مربوط به گروه‌های آمینی موجود در ساختار کیتوسان است.



شکل ۲. طیف FTIR کیتین و کیتوسان استخراجی همراه با کیتوسان تجاری

تعیین درجه استیل‌زدایی کیتوسان استخراج شده

برای تعیین درجه استیل‌زدایی باندهای آمید نوع اول در ناحیه 1655 cm^{-1} و باندهای کششی OH- در ناحیه 3450 cm^{-1} بسیار تعیین‌کننده هستند. با توجه به منحنی‌های مادون قرمز به‌دست‌آمده و بر اساس معادله ۱ درجه استیل‌زدایی کیتوسان تجاری ۷۶٪ تعیین شد، همچنین درجه استیل‌زدایی کیتوسان تولیدی ۷۸٪ به دست آمد.

بررسی خاصیت ضدباکتریایی کیتوسان تولیدشده از

قارچ *ترامیتیس ورسیکالر* بومی ایران

آزمون ضدباکتریایی دیسکی در برابر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* پس از تولید کیتوسان از قارچ *ترامیتیس ورسیکالر* انجام شد. برای این کار کیتوسان استخراج‌شده از قارچ به صورت قرص با اندازه مشخص فشرده‌سازی شد. هاله ایجادشده در حاشیه قرص کیتوسان

گرم مثبت دارد. نتایج میزان عدم رشد باکتری در آزمون انتشار دیسکی در جدول ۶ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد در مقایسه با کلرامفنیکل، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* هاله عدم رشد بیشتری را در به کاربردن کیتوسان سنتز شده از قارچ نسبت به *اشرشیا کلی* نشان می‌دهد.

نشان‌دهنده فعالیت ضدباکتریایی آن است. برای کنترل مثبت این آزمایش نیز از قرص‌های آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل استفاده شد. تمامی مراحل با سه تکرار انجام شد. فعالیت ضدباکتریایی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از باکتری *اشرشیا کلی* است که نشان از اثر بخشی بیشتر کیتوسان نسبت به باکتری‌های

جدول ۶. میزان عدم رشد باکتری بر حسب mm در آزمون انتشار دیسکی

نمونه	اشرشیا کلی	استافیلوکوکوس اورئوس
کیتوسان سنتزی قارچی	۱±۱۲	۲±۱۸
کلرامفنیکل	۲±۲۳	۳±۲۱

بحث

خصوصیات فیزیکی کیتوسان قارچی را بر روی قارچ‌های *اسیدیا کوئروئلا*، *موکور راکسی*، *ریزوپوس اوریزای* بررسی کردند که درجه استیلاسیون کیتوسان حاصل از این قارچ‌ها بالای ۸۰ درصد محاسبه گردید. این اختلاف در میزان استیل‌زدایی را می‌توان به ساختار کیتوسان‌های استخراج‌شده، میزان خلوص و وزن مولکولی کیتوسان که در قارچ‌های دیگر می‌تواند متغیر باشد، نسبت داد (۱۷). در سال ۲۰۰۱، Kim WJ و همکارانش از قارچ *اسیدیا کورولئا*، کیتوسان استخراج کرده و بهینه‌سازی کردند که مقدار بهینه آن ۲/۳ گرم بر لیتر به دست آمده است (۱۸). همچنین در سال ۲۰۰۹، Andipan و همکارانش از قارچ *موکور راکسی* افزایش تولید کیتوسان داشتند با اضافه کردن نمک مولاس از ۱۴/۷ درصد به ۳۶/۴ درصد میزان کیتوسان رسیدند با درجه استیل‌زدایی: ۱۲/۸٪ و وزن مولکولی: ۲/۴۸×۱۰^۴ (۱۹). در سال ۲۰۱۷، Abdel-Gawad و همکارانش از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* کیتوسان با درجه استیلاسیون ۸۳/۶۴ درصد به دست آوردند (۱۴).

در این پژوهش از قارچ دارویی *ترامیتیس ورسیکالر* بر اساس بهینه‌سازی انجام‌شده با روش تاگوچی کیتوسان به دست آمد. شرایط بهینه حاصله برای غلظت NaOH، زمان، دما و نسبت زیست‌توده به NaOH به ترتیب M ۵/۹۴، ۴ ساعت و ۴۰ دقیقه، ۶۵/۶ درجه سلسیوس و نسبت w/v ۱ به ۲۵ به دست آمد. پس از استیل‌زدایی کیتین به وسیله سدیم هیدروکسید غلیظ در دمای ۹۰°C، بررسی طیف FTIR نشان می‌دهد، این روش اثر بیشتری روی پیک‌های N-H، O-H و C-H داشته است. این تغییرات در جذب نشان می‌دهد، NH₂ و NHCOCH₃ تشکیل شده و به روش استیل‌زدایی گروه‌های استیل کیتین حذف‌شده و کیتوسان با گروه‌های عاملی OH و NH₂ به دست می‌آید (۱۶). با افزایش میزان قلیا تا غلظت ۵/۹ مولار و دمای ۶۵ درجه سلسیوس پروتئین زدایی بیشتر و برهم کنش‌های موثرتری بر روی میسلیم و کیتین و در نهایت تولید بیشتر کیتوسان صورت گرفته است.

نتایج میزان عدم رشد باکتری در آزمون انتشار دیسکی نشان می‌دهد که به صورت کلی باکتری‌های گرم منفی در غشای خود توالی بیشتری از لایه‌های تشکیل‌دهنده غشای سلولی و به پیروی از آن غشای ضخیم‌تری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دارند، که موجب افزایش استحکام غشای باکتری‌های گرم منفی و به تبع آن افزایش مقاومت آن‌ها نسبت به مواد ضدباکتریایی شده است (۱۷). در سال ۲۰۱۰، Tayel A و همکاران روی مهار پاتوژن‌های میکروبی توسط کیتوسان قارچی کار کردند که چهار نوع کیتوسان از قارچ *موکور راکسی* تهیه کردند و خصوصیات فیزیک و شیمیایی آن‌ها و فعالیت ضد میکروبی کیتوسان حاصل را بر روی شش باکتری پاتوژن مطالعه کردند که مؤثرترین کیتوسان با بالاترین درجه داستیلاسیون

بر اساس پژوهش‌های انجام شده توسط برخی از محققین در بهینه‌سازی تولید کیتین و کیتوسان و مقایسه با نتایج پژوهش حاضر، در اکثر کارهای صورت گرفته از محیط کشت PDB برای رشد و تولید قارچ استفاده گردیده است. در سال ۲۰۱۵، Muñoz و همکاران کیتوسان را از زیست‌توده قارچ *آسپرژیلوس نایجر* استخراج و با استفاده از آن یک هیدروژل برای کنترل آزادسازی بتاهیستین تهیه نمودند. میزان استیل‌زدایی کیتوسان به دست آمده در پژوهش ۷۳/۶٪ به دست آمد (۷). در سال ۲۰۱۸، Mokhtari و همکاران میزان استیل‌زدایی کیتوسان حاصل از قارچ *گنودرما لوسیدوم* ایرانی را مورد بررسی قرار دادند. میزان استیل‌زدایی از کیتوسان تولید شده برابر با ۷۹٪ به دست آمد (۹). در سال ۲۰۰۸، Wang و همکاران

با درجه داستیلاسیون بالاتر بهترین جذب در سطح باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت را نشان داده و pH پایین‌تر جذب کیتوسان توسط سلول‌های باکتری را بهبود می‌بخشد (۲۵).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش از قارچ دارویی ترامیتیس وریسکار بومی ایرانی استفاده شده همچنین از روش تاگوچی برای بهینه‌سازی کیتوسان حاصل از این قارچ استفاده گردید که دلیلی بر نوآوری آن است. نتایج حاصل نشان‌دهنده درصد بالایی از شباهت کیتوسان تولیدشده به وسیله قارچ و نمونه تجاری خریداری شده و نمونه‌های موجود در مقالات و تحقیقات است. میزان عدم رشد باکتری در برابر باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بر حسب میلی‌متر به ترتیب برابر با 12 ± 1 و 18 ± 2 به دست آمد که نشان از اثربخشی بیشتر بر باکتری‌های گرم مثبت دارد. بر اساس بهینه‌سازی انجام شده برای افزایش میزان استخراج کیتوسان از قارچ، شرایط آزمایش بهینه برای غلظت NaOH، زمان، دما و نسبت زیست‌توده به NaOH به ترتیب $5/94$ M، ۴ ساعت و ۴۰ دقیقه، $6/65$ درجه سلسیوس و نسبت ۱:۲۵ به دست آمد، که در این شرایط میزان کیتوسان به دست آمده $0/261$ g/l گزارش شد.

سپاسگزاری

نتایج به دست آمده حاصل از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد شناسایی ۱۵۷۳۰۵۶۰۹۶۲۰۴۹ دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال است

تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است و بدون حمایت مالی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

Referance

- Ribeiro B, Guedes de Pinho P, Andrade PB, Baptista P, Valentão P. Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchem J.* 2009 Sep 1;93(1):29-35. [DOI:10.1016/j.microc.2009.04.005]
- Synytsya A, Mičková K, Synytsya A, Jablonský I, Spěváček J, Erban V, et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydr Polym.* 2009;76(4):548-56. [DOI:10.1016/j.carbpol.2008.11.021]
- Ho CY, Lau CBS, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, et al. Differential effect of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on cytokine production by murine lymphocytes in vitro. *B. Int Immunopharmacol.* 2004;4(12):1549-57. [DOI:10.1016/j.intimp.2004.07.021] [PMID]
- Mengelzadeh N, HJ-S and, 2015 U. Physicochemical Characterization of Biopolymer Chitosan Extracted from Shrimp Shells. 19422511592.
- Harish Prashanth KV, Tharanathan RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends Food Sci Technol.* 2007 Mar 1;18(3):117-31. [DOI:10.1016/j.tifs.2006.10.022]

6. Ravi Kumar MN. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000 Nov 1;46(1):1-27. [DOI:10.1016/S1381-5148(00)00038-9]
7. Muñoz G, Valencia C, Valderruten N, Ruiz-Durántez E, Zuluaga F. Extraction of chitosan from *Aspergillus niger* mycelium and synthesis of hydrogels for controlled release of betahistine. *React Funct Polym.* 2015 Jun 1;91-92:1-10. [DOI:10.1016/j.reactfunctpolym.2015.03.008]
8. Sathiyaseelan A, Shajahan A, Kalaichelvan PT, Kaviyaran V. Fungal chitosan based nanocomposites sponges-An alternative medicine for wound dressing. *Int J Biol Macromol.* 2017 Nov 1;104:1905-15. [DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.188] [PMID]
9. Mokhtari-Hosseini Z-B, Hatamian-Zarmi A, Mohammadnejad J, Ebrahimi-Hosseinzadeh B. Chitin and chitosan biopolymer production from the Iranian medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Optimization and characterization. *Prep Biochem Biotechnol.* 2018 Aug 9;48(7):662-70. [DOI:10.1080/10826068.2018.1487847] [PMID]
10. Mesa Ospina N, Ospina Alvarez SP, Escobar Sierra DM, Rojas Vahos DF, Zapata Ocampo PA, Ossa Orozco CP. Isolation of chitosan from *Ganoderma lucidum* mushroom for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(3):1-9. [DOI:10.1007/s10856-015-5461-z] [PMID]
11. Ospina Álvarez SP, Ramírez Cadavid DA, Escobar Sierra DM, Ossa Orozco CP, Rojas Vahos DF, Zapata Ocampo P, et al. Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture. *Biomed Res Int.* 2014 Jan 15;2014:169071. [DOI:10.1155/2014/169071] [PMID] [PMCID]
12. Nitschke J, Altenbach H-J, Malolepszy T, Mölleken H. A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydr Res.* 2011 Aug 16;346(11):1307-10. [DOI:10.1016/j.carres.2011.03.040] [PMID]
13. El-Hefian EA, Nasef MM, Yahaya AH. Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Blended Films: Mechanical, Thermal and Surface Investigations. *E-Journal Chem.* 2011;8(1):91-6. [DOI:10.1155/2011/969062]
14. Abdel-Gawad KM, Hifney AF, Fawzy MA, Gomaa M. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. *Food Hydrocoll.* 2017 Feb 1;63:593-601. [DOI:10.1016/j.foodhyd.2016.10.001]
15. Tajdini F, Amini MA, Nafissi-Varcheh N, Faramarzi MA. Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. *Int J Biol Macromol.* 2010 Aug 1;47(2):180-3. [DOI:10.1016/j.ijbiomac.2010.05.002] [PMID]
16. Kumar HMPN, Prabhakar MN, Prasad CV, Rao KM, Kumar TVA, Rao KC, et al. Compatibility studies of chitosan / PVA blend in 2 % aqueous acetic acid solution at 30 °C. *Carbohydr Polym.* 2010;82(2):251-5. [DOI:10.1016/j.carbpol.2010.04.021]
17. Wang W-P, Du Y-M, Wang X-Y. Physical properties of fungal chitosan. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008 Nov 17;24(11):2717-20. [DOI:10.1007/s11274-008-9755-x]
18. Kim WJ, Lee WG, Theodore K, Chang HN. Optimization of culture conditions and continuous production of chitosan by the fungi, *Absidia coerulea*. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2001 Feb;6(1):6-10. [DOI:10.1007/BF02942243]
19. Andipan, Chatterjee S, Chatterjee BP, Guha AK. Influence of plant growth hormones on the growth of *Mucor rouxii* and chitosan production. *Microbiol Res.* 2009 Jan 1;164(3):347-51. [DOI:10.1016/j.micres.2007.05.003] [PMID]
20. Tayel AA, Moussa S, Opwis K, Knittel D, Schollmeyer E, Nickisch-Hartfiel A. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *Int J Biol Macromol.* 2010 Jul;47(1):10-4. [DOI:10.1016/j.ijbiomac.2010.04.005] [PMID]
21. Jadhav AB, Diwan AD. Studies on antimicrobial activity and physicochemical properties of the chitin and chitosan isolated from shrimp shell waste. *Indian J Geo-Marine Sci.* 2018;47(3):674-80.
22. Prabha AR, Sivakumar K. Antimicrobial Activity of Chitosan Extracted from Prawn Shell. *Indian J Appl Microbiol.* 2017;20(1):1-7.
23. Rakkhumkaew N, Pengsuk C. Chitosan and chitoooligosaccharides from shrimp shell waste: characterization, antimicrobial and shelf life extension in bread. *Food Sci Biotechnol.* 2018;27(4):1201-8. [DOI:10.1007/s10068-018-0332-2] [PMID] [PMCID]
24. Ahamed MIN, Gomathi N, Ragul V, Priya M, Priya R, Rumaan RS, et al. Novel Preparation of Chitosan from Crab Shell using Probe Sonicator and its Antibacterial activity. 2018;6(8):133-6.
25. Kulawik P, Jamróz E, Özogul F. Chitosan role for shelf-life extension of seafood. *Environ Chem Lett.* 2019;(0123456789). [DOI:10.1007/s10311-019-00935-4]