Damascus University Journal
for the Basic Sciences
Vol 39 No.1 (2023): 124-136

مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 39- عدد 1 (2023): 124-136

دراسة بعض الخواص الفيزيائية والكيميائية للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* بالتخمير المغمور وتقييم فعاليته في تثبيط *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*

آلاء مجر[1]   أ.د. محمد فواز العظمة[2]   د. نزار عيسى[3]

[1] ماجستير تقانات حيوية جامعة دمشق.
[2] أستاذ في قسم وقاية النبات كلية الزراعة جامعة دمشق.
[3] أستاذ مساعد في قسم علم الحياة الحيوانية كلية العلوم جامعة دمشق.

الملخص

يُعدّ الجدار الخلوي للفطور مصدراً بديلاً للكيتوزان، ولذلك تمّ استخلاص الكيتوزان من فطر *Rhizopus stolonifer*. بعد تنميته في وسط ممدد من عُصارة ساق الذرة الرفيعة السكرية Sweet Sorghum Juice (SSJ) بطريقة التخمير المغمور Submerged Fermentation (SmF). حيث تمَّ تمديد الوسط بنسبة 7/3 حجماً بالماء المقطر والتخمير على درجة حرارة 25°م لمدة 6 أيام. قيست الانحلالية للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* حيث تبيَّن أنَّ النسبة المئوية لانحلال الكيتوزان المستخلص كانت 70% بالمقارنة مع انحلالية تساوي 100% لكيتوزان قشور القريدس التجاري (sigma aldrish) المستخدم كعياري للمقارنة. وبحساب درجة نزع الأستلة DD% الوزن الجزيئي تبيَّن أنَّ الكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* يملك درجة نزع أستلة 85% ووزنه الجزيئي 3941.85 دالتون مقارنةً مع كيتوزان من قشور القريدس التجاري الذي يملك درجة نزع الأستلة DD≥90% ووزنه الجزيئي 397 كيلو دالتون.

تمَّت دراسة تأثير الكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* في تثبيط نوعين من البكتيريا الممرضة للإنسان *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* حيث تبيَّن أنَّ التركيز الأدنى المثبط (MIC) للكيتوزان الفطري هو 600 و800 ppm لـ *E.coli* و*S.aureus* على التوالي والتركيز الأدنى القاتل (MBC) للكيتوزان الفطري هو 1200 و800 ppm لـ *E.coli* و *S.aureus* على التوالي أي أنَّ فعالية الكيتوزان الفطري المثبطة للبكتيريا أقل من فعالية كيتوزان قشور القريدس المستخدم كعياري في التجربة والذي يملك

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

MIC أقل أو يساوي 200 ppm للبكتيريا المذكورة وMBC 800 و600 ppm ل *E.coli* و*S.aureus* على التوالي، بذلك نجد أنَّ الكيتوزان الفطري كما كيتوزان قشور القريدس يملك قدرة تثبيطية للبكتيريا موجبة الغرام أكثر من البكتيريا سالبة الغرام.

الكلمات المفتاحية: كيتوزان فطري، الخصائص المضادة للبكتيريا، *Rhizopus stolonifer*

Damascus University Journal
for the Basic Sciences
Vol 39 No.1 (2023): 124-136

مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 39- عدد 1 (2023): 124-136

studying some physical and chemical properties of chitosan produced from *Rhizopus stolonifer* by submerged fermentation and estimating its efficacy in inhibiting *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Alaa Majar[1] Dr. Mohammad Fawaz[2] Dr. Azmeh, Nizar Issa[3]

[1] master of biotechnology, Damascus university.
[2]Professor in the Department of Plant Protection, faculty of agriculture, Damascus university.
[3] Assistant Professor in the Department of Animal Biology, faculty of biology, Damascus university

Abstract

Cell wall of fungi is an alternative source of chitosan .chitosan was extracted from the cell wall of *Rhizopus stolonifer* after growing fungus in diluted (3/7 v/v with distilled water) Sweet Sorghum Juice (SSJ) by submerged fermentation under 25º C degree for 6 days. Solubility of chitosan extracted from *Rhizopus stolonifer* was 70% compared to 100% solubility for chitosan from shrimp shells (Sigma Aldrish) that used as standard. Degree of deactylation DD% of chitosan extracted from *Rhizopus stolonifer* was 85% and molecular weight MW was 3941.85 Dalton (D) compared to chitosan from shrimp shells (Sigma Aldrish) that has DD%≥90% and MW 397 Kilo Dalton (KD).

The antimicrobial effect of fungal chitosan extracted from *Rhizopus stolonifer* was studied against two typical human pathogenic microorganism, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* .The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of fungal chitosan was 600 and 800 ppm for *E.coli* and *S.aureus* respectively, and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was 1200 and 800 ppm for *E.coli* and *S.aureus* respectively. The antimicrobial activity of fungal chitosan was lower than that of shrimp shells chitosan, which had MIC equal or less than 200 ppm for the above mentioned bacteria, and had MBC 800 and 600 ppm for *E.coli* and *S.aureus* respectively. Furthermore, fungal chitosan was similar to shrimp shells chitosan exhibited better inhibitory effects against gram- positive compared to gram-negative bacteria.

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Key words: fungal chitosan, crustacean shells chitosan, antimicrobial properties, *Rhizopus stolonifer*.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

المقدمة:

1-1 تعريف وبنية الكيتين والكيتوزان:

الكيتين أو poly (β-(1→ 4)N-acetyl-D-glucosamine) هو مركب عديد سكريد طبيعي وله أهمية رئيسية تم التعرف عليه في عام 1884(شكل1). هذا البلمر الحيوي يتم تخليقه عن طريق عدد كبير من الأحياء، ويعد البلمر الطبيعي الثاني بعد السلولوز من حيث الانتشار(Rinaudo,2006). يغطي الكيتين أجسام القشريات مثل السلطعون، والقريدس (الربيان)، بالإضافة لوجوده في هياكل الحشرات، والجدر الخلوية للفطريات (Elieh *et al*,2016). عند انتزاع مجموعة الأستيل N-deactylation بالطُرق الأنزيمية أو الكيميائية يتحول الكيتين إلى كيتوزان، الذي يُعد من أهم مشتقاته وهو من السكريات الخطية linear ، ويتألف من تتالي جزيئات acetamido-2-deoxy-b-D-glucopyronase مرتبطة معاً بروابط β1→ 4، حيث يصبح بوليمير مشترك من N-acetyl glucosamine وglucosamine (Dutta *et al*, 2009; Vernazza *et al*, 2005).

2-1 أهمية الكيتوزان وتطبيقاته المختلفة:

أظهرت الأبحاث المختلفة أهمية كبيرة واستخدامات واسعة للكيتوزان، فهو عبارة عن بلمر طبيعي غير سام، وقابل للتحلل الحيوي، فهو من البوليميرات المهمة في المجالات الزراعية والصيدلانية والغذائية (Morin *et al*,2019)، إضافة للمجالات الصناعية والنسيج (Lim and Hudson,2004)، واستخدم الكيتوزان في العديد من المجالات الطبية والتجميلية ومعالجة المياه ووقاية النبات. كما يتم إجراء بعض التعديلات على الكيتوزان وأهمها الوزن الجزيئي ودرجة الأستلة لتناسب استخداماته المختلفة.

1-2-1 تأثير الكيتوزان المضاد للجراثيم Antimicrobial:

يعتبر الكيتوزان في العديد من الدراسات قاتل أو مثبط للجراثيم. تشير معظم الدراسات إلى وصف الكيتوزان بأنَّه مثبط للجراثيم بدلاً من قاتل للجراثيم (Coma et al,2002)، على الرغم من أنَّ الآلية الدقيقة ليست مفهومة تمامًا ويوجد عدة عوامل أخرى قد تساهم في تأثيره المضاد للجراثيم (Raafat et al,2008).

هناك ارتباط وثيق بين كل من درجة نزع الأستلة والوزن الجزيئي والفعالية المضادة الميكروبية للكيتوزان حيث أظهرت العديد من الدراسات أن النشاط البيولوجي للكيتوزان يعتمد بشكل كبير على وزنه الجزيئيmolecular weight (MW) ودرجة نزع الأستلة degree of deacetylation (DD)، ويؤثر كلاهما على نشاط الكيتوزان المضاد للميكروبات بشكل مستقل.

في الواقع تم من خلال هذا البحث دراسة تأثير الكيتوزان المثبط لبعض أنواع البكتيريا ليستخدم في مختلف المجالات الغذائية كتغليف الأغذية وحفظها، والطبية كحامل للصادات الحيوية الجهازية والموضعية (drug delivery) كما يمكن للكيتوزان أن يحسن من التأثير المثبط للصادات الحيوية تجاه بعض أنواع البكتيريا حيث يعتبر الكيتوزان مادة حيوية Biomaterial هامة، وغير سامة، وقابلة للتحلل الحيوي.

1- *Rhizopus stolonifer* هو جنس شائع من الفطور الزيجية الرمية يعرف بعفن الخبز الأسود black bread mold، وأبواغ هذا الفطر منتشرة في الهواء في جميع أنحاء العالم خاصة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية، وهو عامل شائع في فساد الأغذية المُخزَّنة، و ينمو هذا الفطر على البقايا النباتية أو على رَوَث الحيوانات، ويُستفاد من هذا الفطر صناعياً في إنتاج العديد من المركبات الكيميائية مثل حمض الفيوماريك، ويوضح الجدول 1 التصنيف العلمي لهذا الفطر(فضول ونفاع،2006).

الجدول 1 التصنيف العلمي لفطر *Rhizopus stolonifer*

Kingdom:	Fungi
PHylum:	Mucoromycota
Order:	Mucorales
Family:	Mucoraceae
Genus:	*Rhizopus*
Species:	*R. stolonifer*

أهداف ومبررات البحث:

أظهر كيتوزان القشريات خصائص مضادة للعديد من الأحياء الدقيقة كالفطور الطحالب وبعض البكتيريا (Zheng and Zhu,2003;Chien and Chou,2006) والتي تعد من أهم الخصائص التي توجه لاستخدامه في التطبيقات الحيوية في عدة مجالات صيدلانية، وغذائية، وزراعية، وبيئية وغيرها. وبسبب ظهور سلالات بكتيرية مقاومة للصادات الحيوية والتي تعد من أكبر المشكلات في العصر الحالي كان من الضروري البحث عن مواد بديلة طبيعية تملك فعالية مثبطة للبكتيريا مثل الكيتوزان. وقد أوضحت الدراسات أن الخصائص المضادة للبكتيريا للكيتوزان تعتمد على وزنه الجزيئي ودرجة نزع الأستلة DD (Zheng and Zhu,2003) حيث تختلف هذه الخصائص باختلاف مصدره وطريقة إنتاجه. وقد تمت دراسة خصائص كيتوزان القشريات المضادة للبكتيريا بشكل كبير بينما يوجد القليل من الدراسات حول الخصائص المضادة للبكتيريا للكيتوزان الفطري. بالإضافة للاستخدامات الواسعة والمهمة للكيتوزان وقلة مصادره التقليدية (الجدار الخارجي للقشريات) في سورية، ظهرت الحاجة للحصول على الكيتوزان من مصادر أخرى غير تقليدية كالجدر الخلوية للفطريات بالنظر إلى أنه يمكن الحصول على المشيجة الفطرية بطرق سهلة، وسريعة ومنخفضة التكلفة، وبغض النظر عن الموقع الجغرافي والفصل. لذا يهدف هذا البحث إلى:

- دراسة بعض الخواص الفيزيائية والكيميائية للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer*.
- دراسة الخواص التثبيطية للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* تجاه نوعين من أنواع البكتيريا الممرضة للإنسان (*Staphylococccus aureus/Echerichia coli*).

2- المواد والطرائق Materials and Methods

تم تنفيذ العمل في مخبر التنوع الحيوي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومخبر البيولوجيا الجزيئية في الجامعة العربية الدولية.

2-1 عزلة الفطر المُستخدمة:

تمّ الحصول على فطر *Rhizopus stolonifer* من ثمرة شمام ناضجة مصدرها (قرية جسرين الغوطة الشرقية، ريف دمشق)، وتمّ زرع العزلة الفطرية على وسط Sabouraud dextrose agar SDA لمدة 3 أيام على درجة حرارة 30^{o} س بعد تعقيم الوسط بالصاد الموصد autoclave على درجة حرارة 121^{o}م درجة مئوية لمدة 15 دقيقة.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

2-2 عزلات البكتيريا الممرضة المستخدمة لدراسة الفعالية المثبطة للبكتيريا للكيتوزان:

تم استخدام عزلتين: بكتيريا موجبة الغرام *Staphylococccus aureus* وبكتيريا سالبة الغرام *Echerichia coli* تم الحصول عليها من مشفى الأسد الجامعي في دمشق وزرعها على وسط الآغار المغذي nutrient agar لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م بعد تعقيم الوسط بالصاد الموصد autoclave بدرجة حرارة 121° م لمدة 15 دقيقة.

3-2 زرع الفطور الدقيقة في وسط عُصارة ساق الذرة الرفيعة السكرية Sweet Sorghum Juice SSJ واستخلاص الكيتوزان منها:

زُرِعَ فطر *Rhizopus stolonifer* على وسط *SDA بعد تعقيمه* على درجة حرارة 121° م ولمدة 15 دقيقة ضمن الصاد الموصد، ثمَّ حُضِنَ لمدة 3 أيام على درجة حرارة 30 °م .ثمَّ تمّ التلقيح بخزعة من المشيجة الفطرية الناتجة ضمن دوارق 250 مل تحوي 50 مل من وسط عُصارة ساق الذرة الرفيعة السكريةSSJ Sweet Sorghum Juice بتمديد 30% (حيث تبيَّنَ من خلال إجراء تجربة أولية بأنه التركيز الأمثل) بعد تعقيمه على درجة حرارة 121° م ولمدة 15 دقيقة ضمن الصاد الموصد وحُضِنَت الدوارق بعدها في الحاضنة الهزازة incubator shaker (INNOVA40) على درجة حرارة 30° م وسرعة دوران 150 دورة في الدقيقة لمدة 6 أيام أي تمَّت تنمية الفطور في هذا الوسط بطريقة التخمير المغمور. بعد ذلك رُشِّحَت المشيجة الفطرية الناتجة وجُففَت في الفرن على درجة حرارة 60 °س لمدة 24 ساعة، ثمَّ وُزِنَت الكتلة الجافة بميزان حساس نوع (sartorius d=0.001g)، بعدها تمّ استخلاص الكيتوزان من فطر *Rhizopus stolonifer*وفق طريقة (Chatterjee *et al*,2005؛Nwe *et al*,2001)، حيث تمّت المعالجة القلوية بهيدروكسيد الصوديوم بتركيز NaOH 2N، 50مل لكل 1 غ من الوزن الجاف للمشيجة الفطرية، وعلى درجة حرارة 95°م لمدة ساعتين، ثمَّ تمّت المعاملة بحمض الخل 2% المضاف بنسبة(W/V% 1:30) أي 30 مل من حمض الخل تركيزه 2% لكل 1 غ من الوزن الجاف للمواد القلوية غير المنحلة (المتبقية بعد المعالجة القلوية بمحلول هيدروكسيد الصوديوم) وتحت ظروف إرجاع لمدة 6 ساعات على درجة حرارة 95 ° م، بعد ذلك تمّ عزل الطافي الحاوي على الكيتوزان من أجل ترسيب الكيتوزان الفطري وضبط درجة الحموضة pH=10 بإضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز NaOH 2N، ثمَّ تمّ ترسيب الكيتوزان المترسب بواسطة المثفلة على سرعة دوران 6000 rpm لمدة 15 دقيقة، تمّ بعدها غسل الكيتوزان المعزول 3 مرات بالماء المقطر لتعديل pH، وكذلك استُخدِم الإيتانول 96% لغسل الكيتوزان، ثمَّ جُفِّف بالفرن على درجة حرارة 60°م.

2-4 تنقية الكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* :

تم تنقية الكيتوزان عن طريق حله بحمض الخل acetic acid بتركيز 1% وبعد الانحلال التام للكيتوزان تم الترشيح بوساطة ورق ترشيح ثم تمت إضافة محلول ماءات الصوديوم بتركيز NaoH 2N للرشاحة لترسيب الكيتوزان تم بعدها التثفيل بالمثفلة على سرعة 6000 rpm والتخلص من الطافي ثم غسل الراسب بالماء المقطر عدة مرات وتمت أيضا إضافة كحول إيتيلي 97% للغسل وكررت هذه العملية مرتين وبذلك تم الحصول على كيتوزان نقي (Nasti *et al*,2009).

2-5 قياس الانحلالية للكيتوزان الناتج عن عزلة فطر *Rhizopus stolonifer*

تم قياس انحلالية الكيتوزان وفق طريقة (Nessa *et al*,2010) حيث وضع 0.1 غ من الكيتوزان ضمن أنبوب تثفيل وأضيف له 10 مل حمض الخل 1% وترك لمدة 30 دقيقة مع التحريك على درجة حرارة 25°س وغمر الأنبوب بعدها في حمام مائي يغلي لمدة 10 دقائق ثم ترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة ثم ثفل المزيج بالمثفلة على سرعة دوران 10000 دورة بالدقيقة لمدة 10 دقائق تم بعدها صب السائل الطافي وغسلت الأجزاء غير المنحلة ب 25 مل من الماء المقطر وثفلت على سرعة دوران 10000 دورة بالدقيقة وتم

التخلص من السائل الطافي وجفف الراسب غير المنحل على درجة حرارة 60°م لمدة 24 ساعة وحسب بعدها وزن البقايا وحددت النسبة المئوية للانحلالية وفق المعادلة التالية

$$\text{Solubility\%}=100\times\frac{(initial\ wieght\ of\ tube+chitosan)-(final\ wieght\ of\ tube+chitosan)}{(initial\ weight\ of\ tube+chitosan)-(initial\ weight\ of\ tube)}$$

2-6 حساب درجة نزع الأستلة DD للكيتوزان الناتج عن عزلة فطر *Rhizopus stolonifer* عن طريق المعايرة حمض/أساس (Czechowska *et al*,2012)

<u>تحضير محلول (HCL(0.1M</u>: $C1\times V1=C2\times V2$ حيث C1 التركيز المولي لحمض كلور الماء المركز والذي يساوي 11.65 M
$11.65\times V1=0.1\times 20$ $V1=0.172ml=172ul$ أي يؤخذ 172 ul من حمض كلور الماء المركز ويكمل الحجم إلى 20 ml بالماء المقطر منزوع الشوارد

<u>تحضير محلول (NaoH(0.1M</u> $g=0.1\times 0.02\times 40=0.08g$ $g=c\times v\times Mw$

أي تم وزن 0.08غ من ماءات الصوديوم وإضافة 20 ml ماء مقطر منزوع الشوارد

تم حل 0.2غ من الكيتوزان الجاف ب 20 مل (HCL(0.1M و25 مل ماء منزوع الشوارد وبعد 30 دقيقة من التحريك المستمر تم إضافة 25 مل ماء منزوع الشوارد مرة أخرى مع التحريك لمدة 30 دقيقة وبعد أن انحل الكيتوزان بشكل كامل تمت معايرة المحلول بمحلول ماءات الصوديوم (NaoH(0.1M بستالة أوتوماتيكية دقتها 0.01 مل وحسبت درجة الأستلة degree of acetylation DA% من المعادلة التالية:

$$DA\%= 2.03\frac{v2-v1}{m+0.0042(v2-v1)}$$

حيث m: وزن العينة بالغرام

v1وv2: حجم NaoH المتوافق مع نقاط الانقلاب

2-7 قياس اللزوجة لحساب الوزن الجزيئي للكيتوزان الناتج عن عزلة فطر *Rhizopus stolonifer*

تم قياس اللزوجة بمقياس Brookfield حيث حضر محلول كيتوزان 0.5% (5 mg/ml) بواسطة حمض الخل 1% وتم القياس مرتين باستخدام spindle رقم 5 و100 دورة بالدقيقة وعلى درجة حرارة 25° م وسجلت القيم بواحدة سنتي بواز cp.(No *et al*,2002)

2-8 دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للكيتوزان الناتج عن عزلة فطر *Rhizopus stolonifer* وفق طريقة اختبار التمديد في الأنابيب (Tube Dilution test)

تم تحضر محلول كيتوزان 1% بحمض الخل 1% ومن هذا المحلول تم تحضير التمديدات المختلفة للمحلول عن طريق التمديد بالسيروم الملحي (NaCL 0.9%) لنحصل على التراكيز التالية من الكيتوزان 200-400-600-800-1000-1200-1400 ppm وبحجم 10 مل في كل أنبوب ومكررين من كل تركيز وشاهدين لكل نوع من أنواع البكتيريا شاهد أول بدون كيتوزان مع حمض خل 1% وشاهد ثاني بدون كيتوزان وبدون حمض خل كما تم تحضير تمديدات مختلفة من كيتوزان قشور القريدس بالتراكيز التالية 200-400-600-800-1000 ppm كعياري للمقارنة. ضبطت درجة حموضة pH المحاليل إلى 5.5 بإضافة محلول من ماءات الصوديوم بتركيز NaOH 2M باستخدام مقياس الحموضة PH meter (Jenway 3510) ثم عقمت المحاليل بالصاد الموصد

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

على درجة حرارة 121^o م لمدة 20 دقيقة. ثم تم زرع كمية محددة وثابتة 0.05 مل من معلقات بكتيرية- محضرة حديثا بالماء المقطر المعقم- في كل من هذه الأنابيب تحت ظروف عقيمة (عزلة *E-coli* وعزلة *S.aureus* مأخوذة من مشفى الأسد الجامعي في دمشق) لنصل إلى تركيز بكتيري نهائي 10^6 cfu/ml بالحضن على درجة حرارة 37^o م لمدة 24 ساعة. تم بعدها حضن الأنابيب المزروعة بالبكتيريا والحاوية على الكيتوزان بتراكيزه المختلفة على حرارة 37 ^{o}م لمدة 24 ساعة وبذلك تم تحديد ال MIC وهو أقل تركيز لم تظهر فيه عكارة واضح ضمن الأنابيب، ثم تم قياس النمو الجرثومي للأنابيب التي لا تحوي عكارة بالعين المجردة بواسطة زراعة 50 ul من كل منها على طبق آغار مغذي nutrient agar والحضن على درجة حرارة 37^o م لمدة 24 ساعة وأقل تركيز لم يعط نمو جرثومي على طبق الآغار المغذي تم اعتباره التركيز الأدنى القاتل MBC.

3 النتائج والمناقشة:

3-1 قياس الانحلالية للكيتوزان الناتج عن عزلة فطر *Rhizopus stolonifer*

قيست الانحلالية وفق طريقة (Nessa *et al*,2010) حيث تبين أن النسبة المئوية لانحلال الكيتوزان المستخلص من فطر *Rhizopus stolonifer* كانت 70%

$$70\% = \text{Solubility}\% = 100 \times \frac{(5.04)-(5.012)}{(5.04)-(5)}$$

وبالمقارنة مع كيتوزان قشور القريدس المُستخدَم كعياري للمقارنة تبيَّن أنَّ انحلاليته تساوي 100% أي أنَّ انحلالية كيتوزان قشور القريدس أفضل من انحلالية الكيتوزان الفطري الناتج وقد يعود سبب ذلك إلى وجود بعض الشوائب البروتينية في الكيتوزان الفطري الناتج أي يحتاج إلى المزيد من التنقية.

3-2 حساب درجة نزع الأستلة DD للكيتوزان الناتج عن عزلة فطر *Rhizopus stolonifer* عن طريق المعايرة حمض/أساس

تم حساب درجة نزع الأستلة للكيتوزان وفق طريقة معايرة حمض أساس (Czechowska *et al*,2012)

حسبت درجة الأستلة DA% degree of acetylation من المعادلة التالية:

$$DA\% = 2.03\frac{v2-v1}{m+0.0042(v2-v1)}$$

حيث m: وزن العينة بالغرام

v1وv2: حجم NaoH المتوافق مع نقاط الانقلاب

بعد حساب متوسط ثلاثة مكررات تبين أن درجة نزع الأستلة DD degree of deacetylation للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* هي:

DD%=85.64%

وبالمقارنة مع الكيتوزان القشري والذي تمّ حساب درجة نزع الأستلة له بنفس الطريقة وُجد أنَّ:

$$DA\% = 2.03\frac{7.4-7.2}{0.05+0.0042(7.4-7.2)} = 7.96\% \qquad DD\% = 100-7.69 = 92.07\%$$

أي أنَّ الكيتوزان الفطري الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* يملك درجة نزع أستلة أقل من كيتوزان قشور القريدس المُستخدَم كعياري للمقارنة.

3-3 تحديد الوزن الجزيئي للكيتوزان:

تم حل الكيتوزان بمزيج 0.1 M حمض خل +0.2 M NaCL وتم قياس اللزوجة بجهاز Brookfield وحسب الوزن الجزيئي وفق معادلة Mark Houwink:

$$K M^{a} = \eta \qquad 4 = 1.81 x 10^{-3} \; x \; M^{0.93}$$

$$a = 0.93 \qquad K = 1.81 x 10^{-3} \; cm^{3} \; /g$$

M=3941.85 Dalton

ويعتبر هذا الوزن الجزيئي منخفض

4-3 الفعالية المضادة للبكتيريا للكيتوزان الناتج عن عزلة فطر *Rhizopus stolonifer* عن طريق اختبار التمديد في الأنابيب (Tube Dilution test)

يوضِح الجدول 2 التركيز الأدنى المثبط MIC للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* (درجة نزع الأستلة 85% والوزن الجزيئي 3941.85 دالتون) بالمقارنة مع كيتوزان من مصدر قشري(درجة نزع الأستلة DD≥90% ووزنه الجزيئي 397 كيلو دالتون) ضد عزلتين من البكتيريا *E-coli* و *S.aureus*.

حيث تمَّ تحديد التركيز الأدنى المثبِط بأنَّه أصغر تركيز لم يظهر فيه عكارة واضح بالعين المجردة ضمن أنابيب الاختبار بعد الحضن لمدة 24 ساعة على حرارة 37°م.

الجدول2 التركيز الأدنى المثبط MIC للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* بالمقارنة مع كيتوزان من مصدر قشري ضد عزلتين من البكتيريا *E-coli* و *S.aureus*

السلالة البكتيرية	تركيز الكيتوزان الفطري ppm	تركيز الكيتوزان القشريppm
E-coli	600±100	200±100
S.aureus	800±100	200±100

وتمَّ تحديد التركيز الأدنى القاتل MBC للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* (درجة نزع الأستلة 85% والوزن الجزيئي 3941.85 دالتون) بالمقارنة مع كيتوزان من مصدر قشري(درجة نزع الأستلة DD≥90% ووزنه الجزيئي397 كيلو دالتون) وذلك بزرع 50 UL من الأنابيب التي لا يظهر فيها عكارة على أطباق بتري تحوي وسط آغار مغذي والحضن على حرارة 37°س لمدة 24 ساعة والتركيز الذي أدى لتثبيط 99.9% من البكتيريا هو التركيز الذي تمَّ اعتباره التركيز الأدنى القاتل MBC كما هو موضَّح بالجدول 3 حيث لم يظهر نمو جرثومي على وسط الآغار المغذي بعد الحضن على درجة حرارة 37° م لمدة 24 ساعة.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

الجدول 3 التركيز الأدنى القاتل MBC للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* بالمقارنة مع كيتوزان من مصدر قشري ضد عزلتين من البكتيريا

السلالة البكتيرية	تركيز الكيتوزان الفطري ppm	تركيز الكيتوزان القشريppm
E.coli	1200±100	800±100
S.aureus	800±100	600±100

الفعالية المضادة للميكروبات للكيتوزان تم توثيقها ضد عدة سلالات من البكتيريا والفطور والخمائر. والفعالية الحيوية للكيتوزان تعتمد على خواصه الفيزيائية والكيميائية كالوزن الجزيئي MW ودرجة نزع الأستلة DD درجة حموضة محلول الكيتوزانpH والميكروب المستهدف(Chung *et al*,2004;Tsai *et al*,2004).

في الدراسات السابقة تم قياس الخصائص المضادة للبكتيريا في أوساط مختلفة تحوي مغذيات متضمنة البروتينات (No *et al*,2002;Chung *et al*,2004;Tsai *et al*,2004).

أظهرت كل هذه الدراسات الخصائص المضادة للبكتيريا لأنواع مختلفة من كيتوزان قشور القريدس. من ناحية أخرى يُعتبَر الكيتوزان عامل تلبُّد flocculating agent لتخثير البروتينات (Roussy *et al*,2005). لذلك يجري في الوقت نفسه تعطيل فعالية البكتيريا وتخثير البروتينات والخصائص المضادة للبكتيريا التي يملكها الكيتوزان يمكن أن تتأثر بعدم توفر المغذيات. ومن جهة أخرى عملية التلبد تنقص تركيز الكيتوزان في المحلول والذي يمكن أن يؤدي لخطأ كبير في تحديد التركيز الأدنى المثبط MIC والتركيز الأدنى القاتل MBC لذلك من الصعب التوصل إلى نتيجة واضحة بأن الفعالية المثبطة للكيتوزان ناتجة عن نقص المغذيات بسبب التلبُد أو عن التثبيط الحقيقي للكيتوزان والذي يقلل حيوية البكتيريا. لهذا السبب تم في هذه الدراسة اختبار الفعالية المضادة للبكتيريا للكيتوزان الفطري بغياب المغذيات أي دون استخدام وسط من المرق المغذي. خلال الدراسة تم استخدام شاهدين لتقييم الفعالية المضادة للبكتيريا شاهد مع حمض الخل بدون كيتوزان وشاهد بدون حمض الخل وبدون الكيتوزان. الشاهد الذي يحوي حمض خل بدون كيتوزان أظهر بأن حمض الخل لم يثبط نمو عزلتي البكتيريا المستخدمتين *E.coli* و*S.aureus* وتم ملاحظة نمو طفيف. يعرف حمض الخل بفعاليته المثبطة للعديد من أنواع البكتيريا (No *et al*,2002) ولكن الذي تم ملاحظته في هذه الدراسة أن حمض الخل بتراكيز أقل من ppm1000 جزء بالمليون يتوافق مع دراسات أخرى أظهرت نمو كائنات دقيقة مختلفة على حمض الخل (Taherzadeh *et al*,1997).

تمَّت دراسة تأثير تراكيز الكيتوزان الفطري مقارنة مع ذات التراكيز من كيتوزان قشور القريدس في تثبيط عزلتي البكتيريا المستخدمتين *E.coli* و*S.aureus*. كما هو متوقع الفعالية المضادة للبكتيريا للكيتوزان الفطري تزداد بازدياد التركيز وهذا متوافق مع نتائج سابقة. ومع ذلك تطلب تثبيط البكتيريا تراكيز أعلى من الكيتوزان الفطري مقارنة بكيتوزان قشور القريدس وكما هو موضح بالجدول 2 مقارنة التركيز الأدنى المثبط MIC للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* (درجة نزع الأستلة 85% والوزن الجزيئي 3941.85 دالتون) بالمقارنة مع كيتوزان من مصدر قشري(درجة نزع الأستلة DD≥90% ووزنه الجزيئي 397 كيلو دالتون) ضد عزلتين من البكتيريا *E-coli* و*S.aureus* وُجِد أنَّ الفعالية المثبطة لكيتوزان قشور القريدس أعلى بثلاثة أضعاف من الفعالية المثبطة للكيتوزان الفطري تجاه نفس عزلة البكتيريا *E.coli* والفعالية المثبطة لكيتوزان قشور القريدس أعلى بأربعة أضعاف من الفعالية المثبطة للكيتوزان الفطري تجاه نفس عزلة البكتيريا *S.aureus*. وكما هو موضح بالجدول 3 تمَّت مقارنة التركيز الأدنى القاتل MBC للكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* (درجة نزع الأستلة 85% والوزن الجزيئي 3941.85 دالتون) بالمقارنة مع

كيتوزان من مصدر قشري(درجة نزع الأستلة DD≥90% ووزنه الجزيئي 397 كيلو دالتون) ضد عزلتين من البكتيريا *E-coli* و *S.aureus* حيث وُجِد أنَّ الفعالية القاتلة للبكتيريا لكيتوزان قشور القريدس أعلى ب 1.3 مرة من الفعالية القاتلة للكيتوزان الفطري تجاه نفس عزلة البكتيريا *S.aureus* والفعالية القاتلة لكيتوزان قشور القريدس أعلى ب 1.5 مرة من الفعالية القاتلة للكيتوزان الفطري تجاه نفس عزلة البكتيريا *E.coli*. ويمكن تفسير ذلك بأنَّ الكيتوزان الفطري الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* يملك درجة نزع أستلة DD أقل من كيتوزان قشور القريدس أي يملك درجة أستلة DA أعلى حيث تتحسَّن الفعالية المضادة للميكروبات للكيتوزان عندما تكون درجة الأستلة DA في الكيتوزان أقل (Andres *et al* ,2007؛Tsai *et al*,2004) حيث أنَّه من المعروف بأن درجة نزع الأستلة DDهي واحدة من أهم الخواص الكيميائية والتي يمكن تؤثر على فعالية الكيتوزان في عدة مجالات (Z.Liu *et al*,2012;P.Taskin *et al*,2014) فكلما كانت درجة نزع الأستلة للكيتوزان أعلى تكون انحلاليته في الأوساط الحمضية أكبر وبشكل عام الكيتوزان الذي يملك درجة نزع أستلة أعلى يملك شحنات موجبة أكثر ويُتوقَّع بأن تكون فعاليته المضاد للبكتيريا أكبر (A.Tolaimate *et al*,2003). وقد تم إجراء العديد من الأبحاث على فعالية الكيتوزان القاتلة للبكتيريا والعلاقة بين هذه الفعالية والوزن الجزيئي للكيتوزان حيث أظهرت بعض الدراسات أنَّ زيادة الوزن الجزيئي للكيتوزان تؤدي إلى انخفاض فعاليته تجاه الإيشيرشيا القولونية *E.coli* بينما بيَّنت دراسات أخرى أنَّ الوزن الجزيئي العالي للكيتوزان يظهر فعالية أعلى من الوزن الجزيئي المنخفض (Yilmaz *et al*,2020).كما وُجِد أنَّ فعالية الكيتوزان متساوية تجاه ال *E.coli* و *Bacillus subtilis* بغض النظر عن الوزن الجزيئي (Tikhonov *et al*,2006). على الرغم من محدودية النتائج المتاحة عن الفعالية القاتلة للبكتيريا للكيتوزان منخفض الوزن الجزيئي والتي تمت مقارنتها بالاعتماد على السلالات البكتيرية والشروط الحيوية للاختبار والوزن الجزيئي للكيتوزان المُستخدَم فإنَّ هذه النتائج لم تكن متوافقة (Yilmaz *et al*,2020). وفي دراسة أخرى تمت على الكيتوزان ذا وزن جزيئي أقل من KD 300 تبيَّن أنَّ الفعالية المضادة لبكتيريا *S.aureus* تزداد مع ازدياد الوزن الجزيئي (Zheng and Zhu,2003) وهذا يتوافق مع نتائج هذه الدراسة، وكذلك هناك احتمالية لوجود الشوائب في الكيتوزان الفطري الناتج. كيتوزان قشور القريدس أظهر فعالية تجاه البكتيريا موجبة الغرام *S.aureus* بشكل أكبر من البكتيريا سالبة الغرام *E.coli* (NO *et al*,2002; Je and Kim,2006) وقد أظهرت هذه الدراسة نفس الفعالية للكيتوزان الفطري. على الرغم من أنَّ الآلية الدقيقة ليست مفهومة تمامًا وأنَّ عدة عوامل أخرى قد تساهم في تأثيره المضاد للجراثيم (Raafat *et al*,2008). تم اقتراح ثلاث آليات لتفسير تأثير الكيتوزان المضاد للبكتيريا الآلية الأكثر قبولاً هو التفاعل بين جزيئات الكيتين / الكيتوزان المشحونة إيجابياً وأغشية الخلايا الميكروبية سالبة الشحنة. حيث يتم التفاعل بين مجموعات NH^{+3} البروتينية والجزيئات السلبية للميكروبات (Tsai *et al*,1999;Jing *et al*,2007). ينتج عن هذا التفاعل تداخل مزدوج: أولاً من خلال تشجيع التغييرات في خصائص نفاذية جدار الغشاء، وبالتالي إثارة اختلالات تناضحية داخلية وبالتالي تثبيط نمو الأحياء الدقيقة (Shahidi *et al*,1999;Goy *et al*,2009)، وثانياً من خلال التحلُّل المائي للببتيدوغلوكان في جدار الأحياء الدقيقة، مما يؤدي إلى تسرب الشوارد داخل الخلايا مثل أيونات البوتاسيوم وغيرها من المكونات (Chen et al,1998;Goy et al,2009). حيث لاحظ العلماء تحت المجهر الإلكتروني، ظهور هياكل "تشبه الفجوات" أسفل الجدار (Raafat et al,2008). من المُحتمَل في حال وجود عدد أكبر من المواقع المشحونة، تميل السلاسل إلى تكوين مجموعات عن طريق تجميع الجزيئات في المحلول (Assis et al,2009).

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

أما الآلية الثانية المقترحة لتفسير فعالية الكيتوزان المضادة للميكروبات فهي ارتباطه بحمضها النووي، مما يؤدي إلى تثبيط الرنا المرسال messenger RNA (mRNA) وتخليق البروتين عن طريق اختراق الكيتوزان لغشاء خلايا الأحياء الدقيقة (Sebti,2005;Assis et al,2009) في هذه الحالة، يُفترض أنَّ جزيئات الكيتوزان قادرة على المرور عبر جدار الخلية البكتيرية. بينما تفترض الآلية الثالثة أنَّ الكيتوزان يتمتع بمقدرة ممتازة على ربط المعادن، حيث تكون مجموعات الأمين في جزيئات الكيتوزان مسؤولة عن امتصاص الكاتيونات المعدنية (Helander *et al*,2001). وبناءً عليه فإنَّ جزيئات الكيتوزان قد تحيط بالمعادن المعقدة وتسدّ تدفُّق بعض العناصر الغذائية الأساسية، مما يُسهم في موت الخلايا البكتيرية (Kumar *et al*,2000).

وبناءً على هذه الدراسة يُعتقد بأنَّ الآلية الأولى المقترحة وهي التفاعل بين جزيئات الكيتين / الكيتوزان المشحونة إيجابياً وأغشية الخلايا الميكروبية سالبة الشحنة هي الآلية الأكثر قبولاً وتفسيراً لفعالية الكيتوزان المُثَبِطة للبكتيريا.

بينما الآلية الثانية غير متوافقة مع نتائج هذه الدراسة لأنَّ كيتوزان قشور القريدس الذي يملك وزن جزيئي أعلى أعطى فعالية مثبطة للبكتيريا أفضل من الكيتوزان الفطري الذي يملك وزن جزيئي أقل، والآلية الثالثة غير مُرجَّحة بسبب زرع البكتيريا في محلول NaCL(0.9%) وليس في وسط المرق المغذي والذي يحوي عادةً معادن هامة لنمو البكتيريا.

4- الاستنتاجات

- يملك الكيتوزان الفطري المستخلص من فطر *Rhizopus stolonifer* فعالية مضادة للبكتيريا لكنها أقل من فعالية كيتوزان قشور القريدس المستخدم كشاهد للمقارنة في هذه التجربة.

5- المقترحات والتوصيات

- اعتماد الفطور كمصدر هام لإنتاج الكيتوزان بسبب توفرها الدائم بغض النظر عن الظروف المناخية والبيئية.
- إجراء المزيد من الأبحاث عن التأثير المضاد للبكتيريا للكيتوزان الفطري وإجراء تعديلات كيمائية عليه لتحسين فعاليته المثبطة والقاتلة للبكتيريا لاستخدامه في الصناعات الدوائية والغذائية.

References المراجع

1) د. جودة توفيق فضول ود. وليد غازي نفاع المرجع في علم الفطريات ومنشورات جامعة دمشق كلية الهندسة الزراعية 2005–2006.

2) Andres.Y, L. Giraud, C. Gerente & P. Le Cloirec (2007) Antibacterial Effects of Chitosan Powder: Mechanisms of Action, Environmental Technology, 28:12, 1357-1363.
3) Assis, Odilio B. G.; Britto, Douglas de; Goy, Rejane C., (2009) A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan Ciência e Tecnologia, vol.19, n3, p.241-247.
4) Chen CS, Liau WY, Tsai GJ(1998). Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. J Food Prot. 1998 Sep;61(9):1124-8.
5) Chung YC, Su YP, Chen CC, et al,(2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. Acta PHarmacologica Sinica. 2004 Jul;25(7):932-936.
6) Coma, V.; Martial-Gros, A.; Garreau, S.; Copinet, A.; Salin, F. & Deschamps, A. J. (2002) Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix
7) Czechowska-Biskup, Renata & Jarosińska, D. & Rokita, Bozena & Ulański, Piotr & Rosiak, Janusz. (2012). Determination of degree of deacetylation of chitosan - Comparision of methods. Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. 2012. 5-20.
8) Dutta, P. K.; Tripath, S.; Mehrotra, G. K. & Dutta, J,(2009) Perspectives for chitosan –based antimicrobial film in food application.*FoodChem*,114:1173-1182.
9) Elieh-Ali-Komi, D., & Hamblin, M. R. (2016). Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *International journal of advanced research*, *4*(3), 411–427.
FoodSci.,67,p.1162-1169.
10) Goy, Rejane C.; Britto, Douglas de; Assis, Odilio B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. Polímeros, 19(3), 241–247.
https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861704000463
11) Jing, Y.; Hao, Y.; Qu, H.; Shan, Y.; Li, D.; Du, R. (2007). Studies on the antibacterial activities and mechanisms of chitosan obtained from cuticles of housefly larvae. Acta Biologica Hungarica, 58(1), 75–86.
12) Kim,D.G.Jeong,Y.I,Choi,C.Roh,S.H,Kang,S.K,Jang,M.K,Nah,J.W,(2006).Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles.*Int.J.PHarm*,319:130-138.
13) Kumar,R.M.N.V.(2000) A review of chitin and chitosan applications .*Reactive and functional polymer*,46:1.27
14) Lim,S.H.and Hudson,S.M.(2004) Application of a fiber-reactive chitosan derivative to cotton fabric as an antimicrobial textile finish .*Carbohydr.polym*,56:227-234.
15) Liu, Zunying & Ge, Xiaojun & Lu, Yuan & Dong, Shiyun & Zhao, Yuanhui & Mingyong, Zeng. January (2012). Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. Food Hydrocolloids. 26. 311–317
16) Morin-Crini N., Lichtfouse E., Torri G., Crini G. (2019) Fundamentals and Applications of Chitosan. In: Crini G., Lichtfouse E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews 35. Sustainable Agriculture Reviews, vol 35. Springer, Cham.
17) Nasti A, Zaki NM, Leonardis PD (2009) Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. Pharm Res 26:1918–1930

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

18) Nessa & Masum, Jahan, Md & Shah & M, Asaduzzaman & SK, Roy & Hossain, Mosharof. January(2010). A process of preparation of chitin and chitosan from prawn shell waste. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research. 45. 323-330.

19) No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P. (2002) Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Int J Food Microbiol. 25 March 2002;74:65–72

20) Raafat, D.; von Bargen, K.; Haas, A. & Sahl, H. G.2 May (2008) Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl.Environ.Microbial*. 74, p.3764-3773 .

21) Rinaudo,M. July (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog.Polym.Sci*,31:603-632https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.22411

22) Sebti, I.; Martial-Gros, A.; Carnet-Pantiez, A.; Grelier, S. & Coma, V. - J. (2005) A_Review_ of_the Antimicrobial_ Activity_of_Chitosan Food Sci., 70, p.M100 M104 (2005)

23) Shahidi, F.; Arachchi, J. & Jeon, Y. J. (1999) Food application of chitin and chitosan Trends Food Sci. Technol., 10, p.37-51 February (1999).

24) Taherzadeh,M.J.C.Niklasson and G.Liden, August (1997).Acetic acid- friend or foe in anerobic batch conversion of glucose to ethanol by saccharomyces cerevisiae .Chem .Eng.Sci,52:2653-2659. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250997000808

25) Tikhonov VE, Stepnova EA, Babak VG, Yamskov IA, Palma-Guerrero J, Jansson HB, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Gerasimenko DV, Avdienko ID, Varlamov VP.(2006) Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/−derivatives. *Carbohydr Polym.* April2006;64:66–72

26) Tsai, G. J., Su, W. H. 1 March (1999) Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Prot*. *62*, 239–243.

27) Tsai, Guo-Jane; Zhang, Shu-Lin; Shien, Pei-Ling. 1 February (2004). Antimicrobial Activity of a Low-Molecular-Weight Chitosan Obtained from Cellulase Digestion of Chitosan. Journal of Food Protection, 67(2),396-398.

28) Yilmaz Atay H. 6 March (2020). Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. *Functional Chitosan: Drug Delivery and Biomedical Applications*, 457–489.

29) Zheng Lian-Ying, Jiang-Feng Zhu(2003) Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights,Carbohydrate Polymers,Volume 54, Issue 4,1 December2003,Pages527-530.