

بهینه‌سازی استخراج کیتین و تهیه کیتوسان از پوست میگو: بررسی عوامل مؤثر بر واکنش استیل زدایی کیتین و ارزیابی زیست‌سازگاری

Optimization of Chitin Extraction from Shrimp's Shell and Chitosan Preparation: Study of Parameters
Influence on Chitin Deacetylation Reaction and Biocompatibility Evaluation (In vitro)

نکیسا یعقوبی^{*}، حمید میرزاده، فرزین هرمزی

تهران، پژوهشگاه پلیمر ایران، صندوق پستی ۱۴۹۶۵/۱۱۵

دریافت: ۸۰/۹/۲۸، پذیرش: ۸۱/۱/۲۴

چکیده

در فرایند خالص سازی کیتین از املاح، پروتئین و رنگدانه شرایط فرایند استخراج از جمله دما، زمان و خلطت مواد بکار رفته مؤثرند. در این مطالعه، کیتین از روشهای مختلف از ماده اولیه پوست میگوی آبهای خلیج فارس استخراج شده و شرایط فرایند استخراج کیتین بهینه سازی شد و کیتینی با درصد نیتروژن ۶/۸ درصد، خاکستر ۳۴ درصد و وزن مولکولی $3/22 \times 10^4$ بدست آمد. بازدهی استخراج کیتین از پوست میگو ۲۵-۳۰ درصد بود. میزان استیل زدایی و وزن مولکولی از مشخصات مهم و مرتبط با مصرف کیتوسان در کاربردهای مختلف از جمله پزشکی است. در این مطالعه، اثر برخی عوامل بر میزان استیل زدایی مانند زمان واکنش، دما و منبع پوست میگو بررسی و حدود مناسب این عوامل معین شد. نتایج نشان می‌دهد که در محدوده دمایی 90°C و مدت واکنش ۵ ساعت از پوست میگوی تازه می‌توان کیتوسان با درجه استیل زدایی ۸۶ درصد و وزن مولکولی $3/57 \times 10^4$ بدست آورد. بازدهی تهیه کیتوسان از کیتین ۷۵-۸۰ درصد است. آزمون In vitro انجام شده روی این نمونه کیتوسان نشان دهنده زیست‌سازگاری آن است.

واژه‌های کلیدی: کیتین، پوست میگو، کیتوسان، درجه استیل زدایی، عامل بندآورنده

Key words: chitin, shrimp shell, chitosan, degree of deacetylation, hemostasis agent

است. سالیانه مقدار زیادی از این آبریان در ایران صید می‌شود که این صید، انبوهی از ضایعات را به همراه دارد و کیتین بخش عمده ضایعات پوسته‌ای سخت پوستان دریایی را تشکیل می‌دهد. کیتوسان یک پلی (آمینو ساکارید) است و از استیل زدایی

مقدمه

کیتین فراوانترین پلی ساکارید طبیعی بعد از سلولوز است و مهمترین منبع آن پوسته سخت پوستان دریایی و دیواره سلولی برخی گیاهان

*مسئول مکاتبات، پیام‌نگار: N. Yaghoobi@proxy.ipi.ac.ir

(Gibco BRL Lab) و سرم جنین گوساله (FCS, Gibco BRL) و ظروف مخصوص کشت از نوع پلی استیرن ساخت کارخانه NUNC (حفره ای) مورد استفاده قرار گرفتند.

دستگاهها

در این پژوهش، برای مطالعه ساختاری و بررسی وجود گروههای عاملی در ساختار محصول و همچنین مقایسه این نتایج با طیفهای استاندارد کیتین و کیتوسان [۹] طیفهای FTIR به وسیله دستگاه طیف سنج بروکر مدل IFS ۴۸ برداشت شد. همچنین به کمک این طیفها درجه استیل زدایی (DD) کیتین محاسبه شد.

برای نمونه های کیتین بدست آمده از سه روش مختلف استخراج و همچنین برای نمونه های کیتوسان بدست آمده از شرایط مختلف واکنش استیل زدایی، طیف سنجی FTIR انجام شد.

برای بررسی ساختار بلوری کیتین و کیتوسان از دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD) مدل Siemens D ۵۰۰۰ استفاده شد. نوع و میزان بلورینگی عامل مهمی برای کیتوسان است و هر دو بستگی به فرایند اعمال شده روی نمونه، درجه استیل زدایی و وزن مولکولی دارد.

برای بررسی زیست سازگاری از میکروسکوپ نوری Humd ساخت ژاپن با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر استفاده شد.

(Deacetylation) شیمیایی یا بیوشیمیایی کیتین بدست می آید [۱]. کیتین پلیمری از N-استیل گلوکوز آمین است و در کیتوسان بسیاری از گروههای استیل برداشته شده اند. کیتوسان مشتق N-استیل زدایی شده کیتین است و در آن گروههای آمین آزاد وجود دارد.

کیتین و کیتوسان در شاخه های مختلف صنعتی و علوم پزشکی کاربرد زیادی دارند [۶-۲]. در این مطالعه، کاربرد کیتوسان در زمینه های پزشکی به عنوان عامل بندآورنده خون (هموستاز) مورد نظر بوده است. میزان استیل زدایی، نسبت واحد ۲- استامید و ۲- دیبوکسی - دی گلیکو پیرانوز به ۲- آمینو - دی گلیکو پیرانوز است. این نسبت در واقع مهمترین ویژگی کیتوسان است و تأثیر بسیاری بر خواص مختلف و کاربرد های آن دارد. در واکنش استیل زدایی با اضافه کردن محلول سدیم هیدروکسید غلیظ و گرما، گروههای استیل آمینو در کیتین $(\text{CH}_3-\text{CO}-\text{NH})$ به عاملهای آمین $(-\text{NH}_2)$ تبدیل می شود. تهیه کیتین طی دو مرحله اصلی انجام می گیرد [۷]:

- ۱- معدنی زدایی: زدودن مواد معدنی با اسید معدنی رقیق،
- ۲- پروتئین زدایی: برطرف کردن مواد آلی.

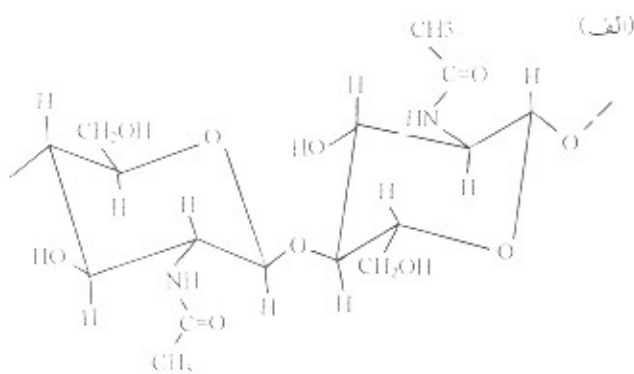
کیتین در مجاورت محلول قلیا و گرما، طی واکنش استیل زدایی به کیتوسان تبدیل می شود.

ارتباط ساختاری بین کیتین و کیتوسان در شکل ۱ نشان داده شده است. در این پژوهش، شرایط واکنش استیل زدایی و تأثیر شرایط عملیاتی (دما، زمان و منبع پوست میگو) بر خواص محصول نهایی مطالعه شده است. به همین علت تأثیر این شرایط روی درجه استیل زدایی (Degree of Deacetylation, DD) کیتین مورد مطالعه قرار گرفت. در خصوص بررسی عوامل مؤثر بر میزان استیل زدایی کارهای تجربی مختلفی انجام شده است [۷، ۸]. در این مطالعه شرایط عملیاتی با هدف حصول کیتوسان با درجه استیل زدایی مناسبی که خواص بندآورنده مطلوبی را بدست دهد بهینه شده است.

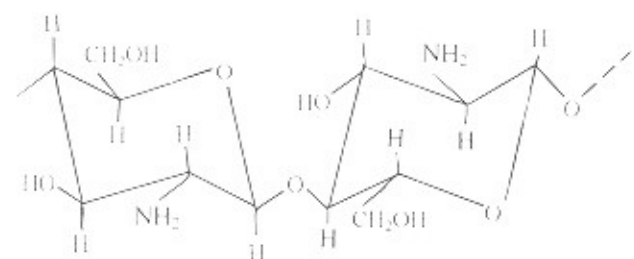
تجربی

مواد

پوست میگو به صورت ضایعات شلاتی میگوی صید شده از آبهای خلیج فارس تهیه شد. متانول، اتانول، استیک اسید، سدیم کلرید، سدیم هیدروکسید، هیدروکلریک اسید و استون همگی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. همچنین سلولهای فیبرولاست ۹۲۹ با تهیه شده از بانک سلولی انسیتو پاسفور ایران، ستروپنوماسین



(ب)



شکل ۱- ارتباط ساختاری بین کیتین (الف) و کیتوسان (ب).

استخراج کیتین از پوست میگو

برای استخراج کیتین (CC)، سه روش مختلف گزارش شده بکار گرفته شد.

در روش اول که توسط ناولک در ۱۹۹۰ ارائه شد از هیدروکلریک اسید ۰/۵ نرمال و سدیم هیدروکسید ۱۰ درصد وزنی به ترتیب برای معدنی زدایی و پروتئین زدایی استفاده می‌شود و در ادامه عملیات خالص سازی، کیتین حاصله در محلول سدیم کلرید ۱ درصد وزنی گرما می‌بیند و محصول در دمای 80°C به مدت ۲ ساعت خشک می‌شود. نمونه CC-I از این روش بدست آمده است. در روش دوم که توسط لیو در سال ۱۹۷۹ ارائه شد، عملیات استخراج کیتین در مرحله معدنی زدایی به کمک کلریدریک اسید ۶ نرمال و برای پروتئین زدایی با استفاده از سدیم هیدروکسید ۵ نرمال انجام می‌شود. سپس با استفاده از سدیم کلرید ۱ درصد وزنی در دمای جوش کیتین بدست می‌آید. محصول در 80°C و به مدت ۲ ساعت خشک می‌شود. نمونه CC-II از این روش بدست آمده است. در روش سوم به پوست میگوی خشک و آسیاب شده استیک اسید ۴۰ درصد اضافه می‌شود و به مدت ۲ ساعت در دمای 25°C می‌ماند. بعد از مراحل صاف کردن و شستشو با متانول و آب مقطر، نمونه با سدیم هیدروکسید ۲ نرمال به مدت ۲۴ ساعت در 65°C عمل آوری می‌شود. سپس با کلریدریک اسید ۱۰ درصد حجمی خنثی و با آب مقطر شسته می‌شود. در مرحله بعدی با کلریدریک اسید ۱۰ درصد در 30°C به مدت ۳ ساعت عمل آوری می‌شود. در مرحله آخر نمونه بدست آمده با استون تحت رفلاکس به مدت ۲ ساعت رنگدانه زدایی می‌شود [۸]. نمونه CC-III از این روش بدست آمده است.

استیل زدایی کیتین

در این پژوهش، برای انجام واکنش استیل زدایی کیتین از محلول سدیم هیدروکسید ۵۰ درصد وزنی در دماهای ۸۵، ۹۰، ۹۴، ۱۰۰، 110°C به مدت ۳، ۴، ۵ ساعت استفاده شد. واکنش زیر جو نیتروژن انجام شد و از راکتور مجهز به همزن استفاده شد که در آن دما به کمک سیستم حمام روغن کنترل می‌شد.

کیتوسان تهیه شده (CS) چند مرحله با آب مقطر شستو داده شد تا سدیم هیدروکسید اضافی با آب شسته و از آن خارج شود. همچنین، گروه‌های استیل جدا شده نیز با یون هیدروکسید، استیک اسید تولید می‌کند و مقداری از این ماده در مجاورت یون سدیم، سدیم استات محلول در آب می‌دهد که همه این ناخالصیها با شستو به وسیله آب مقطر از کیتوسان خارج می‌شود.

تعیین وزن مولکولی

متوسط وزن مولکولی کیتوسان و کیتین از روش اندازه گیری گرانروی ذاتی بدست آمد. اساس این روش بر معادله زیر است که رابطه بین گرانروی ذاتی پلیمر و ضرایب ثابت مارک-هوینگ (Mark-Houwink) و جرم مولکولی متوسط گرانروی را نشان می‌دهد:

$$[\eta] = K M^{\alpha} \quad (1)$$

که در آن $[\eta]$ گرانروی ذاتی و ضرایب α و K برای هر پلیمر - حلال و در دمای ثابت گزارش شده است. محلول مورد استفاده برای کیتین ۵% DMAC/LiCl است که در آن $K = 2/4 \times 10^{-1} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ و $\alpha = 0/69$ است. برای کیتوسان از محلول سدیم استات ۰/۳ مولار و استیک اسید ۰/۲ مولار استفاده شده است که مقادیر ثابت $K = 0/078 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ و $\alpha = 0/76$ برای آن گزارش شده است [۹].

درصد استیل زدایی

برای محاسبه میزان استیل زدایی روشهای متعددی وجود دارد [۱۱، ۱۰]. در این پژوهش، روش مورد استفاده جهت محاسبه DD، طیفهای FTIR نمونه‌های کیتوسان است که در این روش از میزان جذب ناحیه‌های 1550 cm^{-1} که مربوط به آمین نوع II و 2878 cm^{-1} که مربوط به پیوند C-H است، استفاده می‌شود [۱۲].

تعیین درصد خاکستر

هدف از این آزمایش بررسی املاح معدنی باقیمانده در کیتین است. برای این منظور ۱ گرم کیتین و ۱ گرم پوست میگو به یک بوتله چینی منتقل و در کوره‌ای به دمای 900°C به مدت ۲/۵ ساعت گرما داده می‌شود. سپس، نمونه در داخل دسیکاتور دارای مواد جاذب رطوبت قرار داده می‌شود و بعد از سرد شدن، وزن نمونه و درصد خاکستر بدست می‌آید. محاسبه درصد خاکستر بر مبنای تفاوت وزن ماده اولیه (lg) و وزن نمونه بعد از گرما دیدن در کوره انجام می‌گیرد.

میزان جذب آب

ظرفیت جذب آب فیلم کیتوسان از طریق میزان تورم فیلم و پودر کیتوسان در محلول بافری فسفات (Phosphate buffered saline, PBS) در دمای معمولی و $\text{PH} = 7/4$ به مدت ۲۴ ساعت معین شد [۱۳]. فیلمهای کیتوسان با حل کردن پودر در محلول لاکتیک اسید ۱ درصد تهیه شد.

مقدار ۲۰۰ میلی گرم از فیلم کیتوسان در محلول PBS به مدت

در حالت تعادلی و W_e وزن فیلم کیتوسان مرطوب و W_i وزن اولیه فیلم است.

هر آزمایش تورم انجام شده در این پژوهش سه بار تکرار شده و متوسط مقدار به صورت درصد جذب آب گزارش شده است.

تجزیه عنصری CHN

میزان نیتروژن در ساختار کیتوسان بسته به میزان استیل زدایی افزایش می یابد و با تبدیل کیتین به کیتوسان درصد استیل گروهها کاهش می یابد، ولی درصد نیتروژن زیاد می شود. بسته به میزان استیل زدایی، درصد نیتروژن بین ۵ تا ۸ درصد وزنی است [۵].

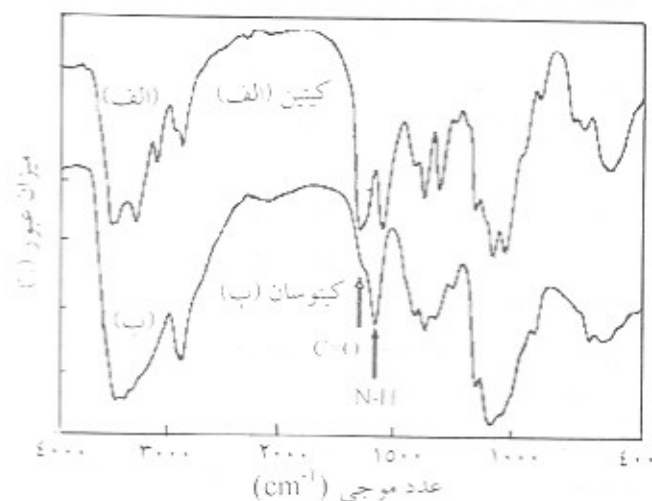
هدف اصلی از این آزمایش تعیین درصد نیتروژن با استفاده از روش تجزیه عنصری CHN و تعیین درصد عناصر موجود در ساختار پلیمر است.

برای این منظور نمونه های مورد نظر انتخاب شد و بعد از انجام آزمایشها درصد عناصر در هر نمونه معین گردید.

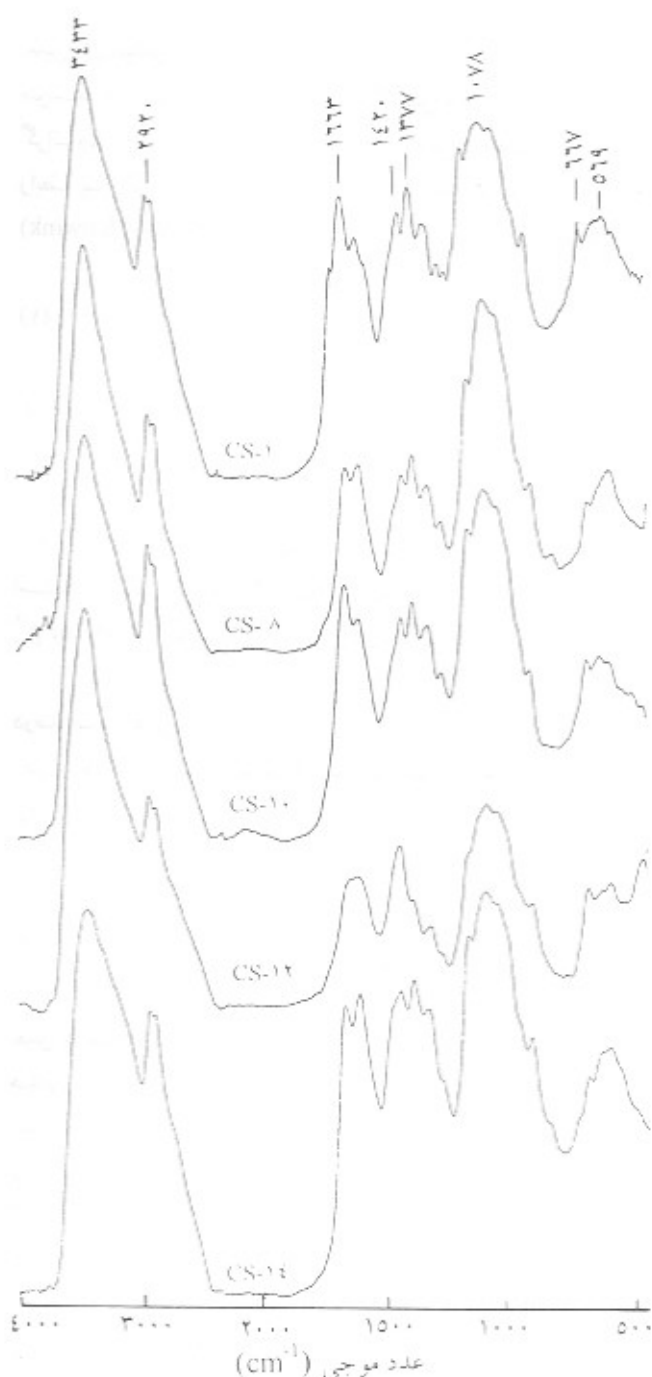
نتایج و بحث

بررسی شرایط فرایند استخراج کیتین

از جمله عواملی که مستقیماً بر خلوص کیتین بدست آمده اثر می گذارد غلظت مواد بکار رفته، دما و زمان است. اشاره می شود که در تهیه کیتین با روشهای مختلف استخراج منبع اولیه پوست میگو ثابت بود. برای بررسی ساختار و شناسایی گروههای عاملی از روش FTIR استفاده شد و طیف محصولات بدست آمده با طیف استاندارد کیتین در شکل ۲ مقایسه شد.



شکل ۳- طیف FTIR کیتین و کیتوسان استاندارد.



شکل ۲- طیفهای FTIR نمونه های مختلف کیتوسان

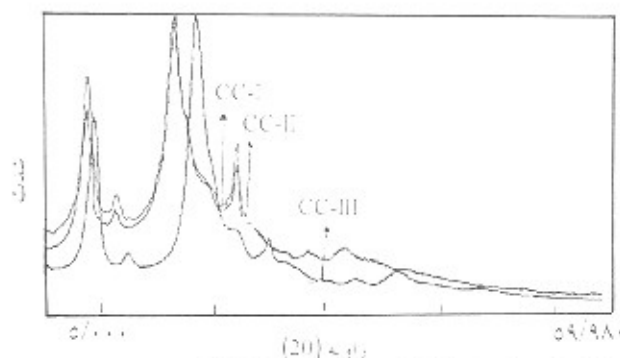
لازم فرار داده شد و وزن فیلم مرطوب کیتوسان معین شد. فیلم پس از خشک کردن این فیلم به کمک کاغذ صافی توزین شد. درصد آب جذب شده فیلمهای کیتوسان به وسیله معادله زیر محاسبه می گردد:

$$E_{\%} = [(W_e - W_i) / W_i] \times 100 \quad (2)$$

که در آن $E_{\%}$ درصد آب جذب شده به وسیله فیلمهای کیتوسان

جدول ۲- درصد نیتروژن در نمونه‌های مختلف کیتوسان.

کیتوسان	کیتین	دما (°C)	زمان (h)	درصد نیتروژن
CS-۱۲	CC-۵	۹۰	۵	۷/۶
CS-۸	CC-۲	۱۰۰	۵	۷/۴۹
CS-۱۳	CC-۶	۹۰	۵	۷/۰۲
CS-۱۴	CC-۷	۹۰	۵	۷/۴۵



شکل ۴- طیف‌های NRD نمونه‌های مختلف کیتین

میزان کلسیم باقیمانده در این نمونه که به وسیله نورسنجی شعله (Flame Photometry) معین شد نیز در پایینترین حد ۰/۰۹ درصد است که مقادیر استاندارد کلسیم برای کیتین ۰/۰۹-۰/۱ درصد گزارش شده است [۱۴]. همچنین، درصد خاکستر بدست آمده برای نمونه کیتین منتخب (CC-III) ۰/۳۴ درصد است که قابل مقایسه با مقدار استاندارد (۰/۲۲ <) است [۱۲].

نتایج حاصل از تجزیه عنصری CHN برای نمونه‌های کیتین در جدول ۱ نشان داده شده است. در مقایسه درصد عناصر مختلف این سه نمونه کیتین با مقادیر استاندارد ملاحظه می‌شود که نمونه CC-III با بالاترین درصد نیتروژن (۶/۸ درصد) دارای محدوده قابل قبول و مناسبتری در مقایسه با دو نمونه دیگر است. از این رو، روش سود به عنوان روش بهینه استخراج کیتین از پوست میگو انتخاب شد.

جدول ۲ درصد نیتروژن در نمونه‌های مختلف کیتوسان را نشان می‌دهد. این نمونه‌ها در شرایط مختلف واکنش استیل زدایی بدست آمده‌اند.

اثر زمان

زمان واکنش استیل زدایی عامل بسیار موثر و مهم در فرایند تهیه کیتوسان است. از این رو، مجموعه دوم آزمایشها در سه زمان ۳ و ۴ و ۵ ساعت انجام گرفت. در همه این واکنشها دما ۹۰ °C و منع پوست میگو و کیتین نیز یکسان بود. نتایج بدست آمده در سه

جدول ۳- تغییرات درصد استیل زدایی با زمان واکنش.

کیتین: CC-۵ و دمای ۹۰ °C		
کیتوسان	زمان (h)	درجه استیل زدایی (درصد)
CS-۲	۳	۸۵
CS-۱۱	۴	۶۸
CS-۱۲	۵	۸۶

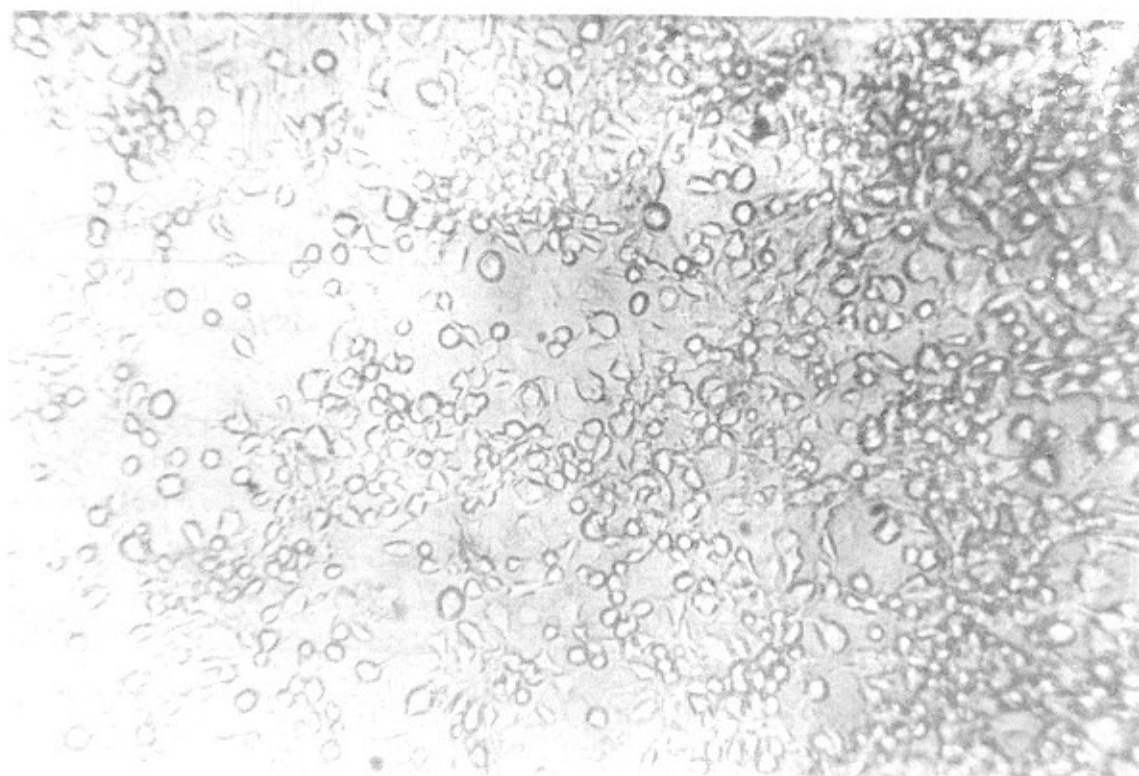
در همه این صیفها وجود گروههای آمیدی (پیکهای $3437, 3403, 3356, 3323, 3275, 3230$ cm^{-1}) آمین (پیکهای $3275, 3230$ cm^{-1}) تأیید شد. از این رو، هر سه روش پاکیزه شده در این عملیات منجر به تولید محصولاتی شد که طیف FTIR آنها منتهی طیف استاندارد بود (شکل ۴).

در آزمون NRD روی سه نمونه مختلف، پیک بدست آمده در محل ۱۹۵ پیک شاخص سدختر بسوری کیتین را در شکل ۴ نشان می‌دهد. با مقایسه ارتفاع پیکهای ایجاد شده مشخص می‌شود که نمونه CC-III دارای سدختر بسوری بیشتری است. بنابراین، مشخص می‌شود شرایط استخراج تأثیر مستقیم روی میزان بلورینگی محصول نهایی دارد.

نتایج تجزیه عنصری CHN نشان دهنده این است که کیتین حاصل از روش سود CC-III دارای مقادیر C و H و N مضبوطی در درصد نیتروژن بیشترا در مقایسه با دو روش دیگر است. از این رو، CC-III به عنوان کیتین با خواص مناسبتر از جهت کاربردهای پزشکی انتخاب شد. زیرا بر اساس گزارشهای موجود افزایش DD تأثیر مهمی در خواص و کاربردهای کیتوسان در مصارف پزشکی دارد [۱۲]. از وزن مولکولی نمونه منتخب کیتین CC-III در آزمایش گرانروی سنجی معین شد و برابر 3.22×10^6 بدست آمد.

جدول ۱- نتایج تجزیه عنصری نمونه‌های مختلف کیتین.

نمونه کیتین	درصد وزنی نیتروژن	درصد وزنی کربن	درصد وزنی هیدروژن
نمونه استاندارد	۶/۸۹	۴۷/۲۶	۶/۴۵
CC-I	۶/۶۶	۴۴/۶۴	۶/۶۳
CC-II	۶/۵۴	۴۴/۶۸	۶/۵۷
CC-III	۶/۸۶	۴۴/۸۴	۶/۴۰



شکل ۵- تصویر میکروسکوپی نوری سلولهای فیبروبلاست روی فیلم کیتوسان با ۸۶ (DD) (X=۱۰۰)



شکل ۶- تصویر میکروسکوپی نوری سلولهای فیبروبلاست روی پلی استیرن (TCPS-NUNC) (X=۱۰۰)

کیتوسان	دما (°C)	درجه استیل زدایی
CS-۱	۸۵	۷۴
CS-۲	۹۰	۸۵
CS-۳	۹۴	۷۵
CS-۴	۱۰۰	۶۸
CS-۵	۱۱۰	۷۰

مشخصات	کیتین	کیتوسان
متوسط گرآتری و وزن مولکولی	3.22×10^6	3.07×10^6
درجه استیل زدایی	۷۲۰	۷۸۶
پیکهای XRD	19° و 10°	19° و 10°
خاکستر در $900^\circ C$	۰.۳۴	—
درصد کلیم (W%)	۰.۰۹	—
میزان جذب در محلول PBS	—	۲۰ (فیلم) ۲۱۰ (پودر)
جذب آب	—	۸۲ (پودر)

زمان مختلف در جدول ۳ گزارش شده است.

اثر دما

برای بررسی اثر دما بر واکنش استیل زدایی در چهار دمای ۸۵، ۹۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰°C واکنش انجام شد. در هر ۴ آزمایش منبع کیتین مورد استفاده (کیتین بدست آمده از روش بهینه فاز ۱) و منبع پوست میگو یکسان بود. نتایج این مجموعه آزمایشها در جدول ۴ گزارش شده است.

اثر منبع پوست میگو

در این پژوهش مشخص شد که منبع پوست میگوی اولیه بر خواص محصول نهایی اثر دارد. بنابراین کیتین از پنج منبع مختلف استخراج و در پی آن کیتوسان تهیه شده از منابع مختلف با هم مقایسه شد. همه کیتینها از روش بهینه شده، روش سوم، استخراج شد. نتایج بدست آمده از منابع پوست میگوی مختلف در جدول ۵ گزارش شده است.

در بررسی اثر زمان بر میزان استیل زدایی، همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود، افزایش زمان استیل زدایی باعث افزایش DD، ولی کاهش وزن مولکولی می شود که دلیل آن هیدرولیز

جدول ۵ - اثر منبع پوست میگو بر درصد استیل زدایی.

کیتوسان	کیتین	درجه استیل زدایی (درصد)
CS-۱۰	CC-۳	۷۲
CS-۱۲	CC-۵	۸۶
CS-۱۳	CC-۶	۶۶
CS-۱۴	CC-۷	۶۵
CS-۱۵	CC-۸	۶۶

زنجیرهاست. بنابراین، باید شرایط به گونه ای اعمال شود تا ضمن رسیدن به DD منطبق با زمینه کاربردی کیتوسان، از هیدرولیز زنجیرهای پلیمری جلوگیری شود. در هر حال، افزایش زمان استیل زدایی کاهش زیادی در گرآتری ایجاد می کند و باعث تخریب زنجیرها می گردد.

کیتوسان بدست آمده با شرایط بهینه شده واکنش استیل زدایی دارای ویژگیهایی است که در جدول ۶ آمده است.

کشت سلولی (In vitro)

سلولهای فیرو بلاست ۹۲۹ - ۱ در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ همراه با 100 IU/ml پنی سیلین و 100 mg/ml استروپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله نگهداری شدند. عملیات کشت سلولی معمولی برای نگهداری خط سلولی مذکور مورد استفاده قرار گرفت و سلولها در محیط انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد گاز CO_2 در $37^\circ C$ نگهداری شدند. پس از یک هفته لایه سلولی با تریپسین برداشت شد و تعلیق سلولی به سه میبران $10^6 \times 4$ سلول در واحد حجم تهیه گردید. نمونه های کیتوسان در اتو کلاو استریل شد و پس از انحلال آنها در محلول لاکتیک اسید ۱

سازگاری خوبی برخوردار است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری دکتر مرتضی شمشیری (آزمایشگاه *In vitro* پژوهشگاه پلیمر ایران)، مهندس فرشاد مقدم و مهندس فهیمه عسگری تشکر و قدردانی می‌شود.

مراجع

- 1- Koji K.; Inoue N.; Katsuhiko and Shigeru M.: "Process for the production of chitin fibers": U.S. Patent. 4 431 601, 1984.
- 2- Rao S. B.; Sharmam C. P.: "Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential": *J. Biomed. Mater. Res.*; **34**, 21-28, 1997.
- 3- Madhally S. V.; Matthew H. W. T.: "Porous chitosan scaffolds for tissue engineering": *Biomaterials*; **18**, 1133, 1999.
- 4- Hoekstra A.; Struszyk H.; Kiuckas O.: "Percutaneous microcrystalline chitosan application for sealing arterial puncture site": *Biomaterials*; **19**, 1467, 1998.
- 5- Vasudev S C.; Chandy T.; Sharma C P.: "Development of chitosan/polyethylene vinyl acetate co-matrix: controlled release of aspirin-heparin for preventing cardiovascular thrombosis": *Biomaterials*; **18**, 375-81, 1997.
- 6- Muzzarelli R.A.A.; Biagini G.; Bellardini M.; Simonelli L.; Castaldini C.; Fratto G.: "Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery": *Biomaterials*; **14**, 39, 1993.
- 7- Rhazi M.; Desbrieres J.; Tolaimate A.; Alagui A. and Vottero P.: "Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan": *polym. Int.*; **49**, 337-344, 2000.
- 8- بهرامی سید بهرام، "بهبود سازی استخراج و حلالیت کیتین و

درصد در ظروف مخصوص کشت فرار داده شد تا یک فیلم در هر حفره تشکیل شود. سپس، به هر حفره ۵ میلی لیتر تعلیق سلولی منتقل شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها برای مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند و پس از آن نمونه‌ها خارج شده و با محلول نمکی بافر فسفات (PBS) شست‌شوداده شدند. سلولها با الکل‌های طبی با درجات انکلی ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۶ درصد تثبیت شده و با محلول ۵ درصد گیسا (Gimsa) رنگ آمیزی و برای آزمون میکروسکوپ نوری آماده شدند [۱۳، ۱۵].

شکل ۵ سلولهای فیروبلاست روی فیلم کیتوسان با درجه استیل زدایی ۸۶ درصد را نشان می‌دهد. همان‌طور که از شکل پیداست وضعیت چسبندگی و رشد سلولهای فیروبلاست روی فیلم مذکور قابل مقایسه با رشد همان سلولها روی پلی استیرن (TCPS) NUNC به عنوان کنترل منفی است (شکل ۶) که نشان دهنده زیست سازگاری خوب فیلم کیتوسان است.

نتیجه گیری

در آزمایشهای استخراج کیتین از سه روشی که توسط پژوهشگران دیگر گزارش شده بود، هدف انتخاب روشی با دما و زمان عمل و غلظت بهینه بود. محصول بدست آمده از روش سوم با ۶/۸ درصد نیتروژن دارای خلوص بهتر و ویژگیهای مناسب به عنوان نمونه مطلوب و منتخب شناسایی شد.

با استفاده از نتایج این پژوهش می‌توان از راه کنترل دما و غلظت و زمان در طی مراحل تولید، کیتوسانهای با وزن مولکولی و درجه استیل زدایی متنوع تهیه کرد.

منبع پوست میگو، زمان و دما به عنوان سه عامل اصلی مؤثر بر خلوص محصول نهایی بررسی شد.

بررسیهای انجام شده نشان می‌دهد که ویژگیهای پوست میگوی اولیه از لحاظ درصد نیتروژن و نازگی منبع عامل بسیار مهمی در درجه استیل زدایی محصول نهایی و میزان عنصر نیتروژن است. مقدار رطوبت، خاکستر، جریسی و پروتئین پوسته در گونه‌های مختلف متفاوت است. در بررسی اثر دما و زمان، دمایی که بتوان در آن به جرم مولکولی مناسب توأم با میزان استیل زدایی مورد نظر رسید 90°C به مدت ۵ ساعت است. البته، دماهای بالاتر، DD بیشتری بدست می‌دهد. ولی باعث کاهش وزن مولکولی می‌شود. از آنجا که هدف اصلی صنعتی شدن این فرایند است، برای آسانی کنترل دما در 90°C کلیه آزمونها در این دما انجام شد. نتایج آزمون *In vitro* نشان می‌دهد که محصول کیتوسان حاصل با $\text{DD} = 86\%$ از زیست

کیتوسان به منظور تهیه محلول قابل رسیدن"، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی امیرکبیر؛ ۱۳۷۵.

9- George A.F.; Roberts E. d.; *Chitin Chemistry*; Macmillan; London, 85-110, 1992.

10- Thomas D. Rothke and Samuel M. Hudson.; "Determination of degree of N-deacetylation in chitin and chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy", *J. Polym. Sci.: Part A: Polymer Chemistry*; **31**, 794-753, 1993.

11- Kurita K.; Tomita K.; Tada T.; Ishii S.; Nishimura S. I.; and Shimoda K.; "Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behaviour and characteristic properties"; *J. Polym. Sci.: Part A: polymer chemistry*; **31**, 485-491, 1993.

12- Sannan T., Kurita K., Ogura K., and Iwakura Y., "

Studies on Chitin: 7.I.R. spectroscopic determination of degree of deacetylation"; *Polymer*; **19**, 458-459, 1978.

13- Mi F.L., Shyu S. S., Wu Y.B., Lee S.T., Shyong J.Y., Huang N. ; " Fabrication and characterization of sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing"; *Biomaterials*; **22**, 165-173, 2001.

14- Riccardo A.; Muzzarelli A.; " Chitin (metal ion chelation and enzyme immobilization)", in *Polymer materials encyclopedia*, Joseph C.; Salamone, Ed.; 2, 1200, CRC press, U.S.A., 1996.

15- Chatelet C., Damour O., and Domard A., " Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films"; *Biomaterials*; **22**, 261-268, 2001.