

Physicochemical Characterization of Biopolymer Chitosan Extracted from Shrimp Shells

Nezamaddin Mengelizadeh¹, Nematollah Jafarzadeh Haghighifard^{2*}, Afshin Takdastan²,
and Mina Hormozinejad³

1. School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, P.O. Box: 73461-81746, Isfahan, Iran
2. Environmental Technologies Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, P.O. Box: 15751-61357, Ahvaz, Iran
3. School of Health, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, P.O. Box: 15794-61357, Ahvaz, Iran

Received: 24 November 2013, accepted: 30 September 2014

ABSTRACT

Chitosan is a deacetylated derivative of chitin, which is a naturally abundant mucopolysaccharide, supporting the matter of crustaceans, insects, and fungi. Because of its unique properties, such as non-toxicity, biodegradability, and biocompatibility, chitosan has a wide range of applications in various fields. The objective of the present work is to extract the polymer chitosan from Persian Gulf shrimp shells. In order to determine the physicochemical characteristics of the extracted chitosan, degree of deacetylation, molecular weight, water and fat binding capacities extraction rate, and apparent viscosity were measured using a variety of techniques including viscometry, weight measurement method and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The results of the study of the physicochemical properties, molecular weight (6.7×10^5 Da), degree of deacetylation (57%), ash content as well as yield (0.5%) of the prepared chitosan indicated that shrimp processing wastes (shrimp shells) are a good source of chitosan. The water binding capacity (521%) and fat binding capacity (327%) of the prepared chitosan are in good agreement with the other studies. The elemental analysis showed the C, H and N contents of 35.92%, 7.02%, and 8.66%, respectively. In this study, the antimicrobial activity of chitosan was evaluated against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results indicated the high potential of chitosan as an antibacterial agent. Moreover, the results of the study indicated that shrimp shells are a rich source of chitin as 25.21% of the shell's dry weight.

Keywords:

shrimp waste,
chitin,
deacetylation,
chitosan,
infrared spectrometry.

(*)To whom correspondence should be addressed.
E-mail: Jaafarzadeh-n@ajums.ac.ir

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی زیست‌پلیمر کیتوسان استخراجی از پوسته میگو

نظام‌الدین منگلی‌زاده^۱، نعمت‌الله جعفرزاده حقیقی‌فرد^{۲*}، افشین تک‌دستان^۱، مینا هرمزی‌نژاد^۳

۱- اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده بهداشت، صندوق پستی ۸۱۷۴۶-۷۳۴۶۱

۲- اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، مرکز تحقیقات فناوری‌های محیط زیست، صندوق پستی ۶۱۳۵۷-۱۵۷۵۱

۳- اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، دانشکده بهداشت، صندوق پستی ۶۱۳۵۷-۱۵۷۹۴

دریافت: ۹۲/۹/۳، پذیرش: ۹۳/۷/۸

چکیده

کیتوسان مشتق استیل‌زدایی شده کیتین بوده که به‌طور طبیعی فراوان‌ترین موکوپلی‌ساکارید موجود در پوسته سخت‌پوستان، حشرات و قارچ‌هاست. کیتوسان به‌دلیل داشتن ویژگی‌های منحصر به‌فردی همچون سمی‌نبودن، تجزیه‌پذیری و زیست‌سازگاری به‌طور گسترده در زمینه‌های مختلف به‌کار می‌رود. در مطالعه حاضر، استخراج کیتوسان از پوسته میگو خلیج فارس بررسی شد. برای تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کیتوسان استخراجی، درصد استخراج، درجه استیل‌زدایی، وزن مولکولی، ظرفیت اتصال آب و چربی و گرانیوی ظاهری به روش‌های مختلفی همچون گرانیوی‌سنجی، وزن‌سنجی و طیف‌سنجی زیرقرمز اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی همچون وزن مولکولی ($1.0^5 \times 6/7$ Da)، درجه استیل‌زدایی (۵۷٪)، درصد خاکستر (۰/۵٪) و نیز درصد استخراج (۱۶/۵٪) نشان داد، ضایعات پوسته میگو منبع خوبی از کیتوسان است. ظرفیت اتصال آب (۵۲۱٪) و ظرفیت اتصال چربی (۳۲۷٪) کیتوسان تهیه شده مطابقت خوبی با سایر مطالعات دارد. تجزیه عنصری کیتوسان نشان داد، مقدار کربن، هیدروژن و نیتروژن کیتوسان به ترتیب ۳۵/۹۲، ۷/۰۲ و ۸/۶۶٪ است. در این مطالعه، فعالیت ضد میکروبی کیتوسان در برابر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* ارزیابی شد. نتایج نشان داد، کیتوسان به‌عنوان ماده ضد میکروبی پتانسیل زیادی دارد. همچنین نتایج مطالعه نشان داد، پوسته میگو منبع غنی از کیتین است، به‌طوری که ۲۵/۲۱٪ وزن خشک پوسته از این ماده تشکیل شده است.

واژه‌های کلیدی

ضایعات میگو،
کیتین،
استیل‌زدایی،
کیتوسان،
طیف‌سنجی زیرقرمز

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

Jaafarzadeh-n@ajums.ac.ir

مقدمه

می‌شود [۷-۹]. این پلیمر به دلیل داشتن ویژگی‌های چون زیست‌سازگاری، تجزیه‌پذیری، سمی نبودن، خواص ضدباکتریایی و ضداکسندگی و کی‌لیت‌کردن فلزات، در صنایع مختلفی از جمله صنعت داروسازی، کشاورزی، صنایع غذایی، تصفیه آب، زیست‌فناوری، پزشکی، تصفیه فلزات سنگین و نساجی به کار می‌رود [۱،۴].

چند فناوری برای استخراج کیتین و کیتوسان (طرح ۱) در منابع مختلف گزارش شده است. از میان آنها، روش شیمیایی رایج‌ترین روش است. در این روش، برای جداسازی کیتوسان از پوسته سخت‌پوستان، پوسته‌ها به ترتیب در تماس با محلول قلیایی همچون سدیم هیدروکسید یا پتاسیم هیدروکسید و محلول کلریدریک اسید قرار می‌گیرند. سپس، کیتین حاصل در مجاورت محلول قلیای غلیظ و گرما، طی واکنش استیل‌زدایی به کیتوسان تبدیل می‌شود [۱].

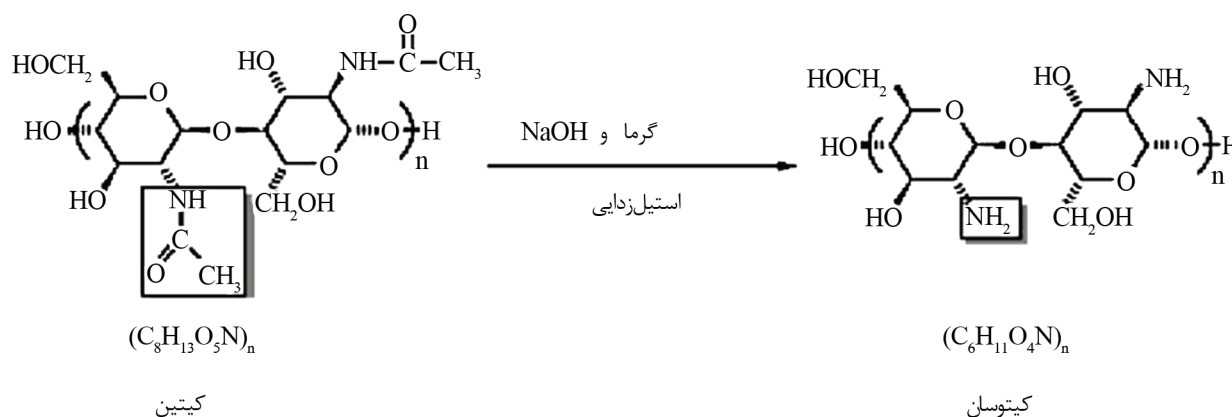
هدف از مطالعه حاضر، تعیین ویژگی‌های کیتوسان استخراجی از پوسته میگوی ببری به روش شیمیایی به همراه تعیین اثر ضد میکروبی کیتوسان روی رشد باکتری‌های گرم منفی و مثبت است. همچنین ویژگی‌های کیتوسان، درصد استخراج، درصد رطوبت و خاکستر، درجه استیل‌زدایی، کدورت، گرانروی ظاهری، وزن مولکولی و ظرفیت اتصال چربی و آب اندازه‌گیری شد.

تجربی

مواد

پوسته میگو (*Parapenopsis semisulactus*) از بازار ماهی‌فروشان شهر اهواز به شکل ضایعات جمع‌آوری شد. محلول‌های سدیم هیدروکسید، کلریدریک اسید، ۳۷٪ اتانول، ۹۶٪ استون، سدیم استات و استیک اسید از شرکت Merck آلمان تهیه شد.

بیش از ۴۵٪ از فرایندهای فراوری میگو، شامل ضایعاتی هستند که از اسکلت خارجی تشکیل شده و جزء مشکلات مهم محیط زیست به‌شمار می‌آیند. این ضایعات غذایی و شیلاتی ۷۰-۵۰٪ از وزن ماده خام را تشکیل می‌دهند و دارای ترکیبات با ارزشی همچون کیتین و پروتئین هستند [۱]. کیتین با ساختار شیمیایی N-استیل-β-D-گلوکوزآمین، دومین پلی‌ساکارید طبیعی فراوان پس از سلولوز روی زمین است. این پلیمر ماده‌ای سفید، سخت و انعطاف‌ناپذیر است که در پوشش خارجی سخت‌پوستانی همچون خرچنگ، خرچنگ دریایی، لابستر، آرتمیا، میگو و برخی سرپایان (سفالوپودا) و نیز در مواد غذایی رایج همچون غلات، مخمر، موز و قارچ وجود دارد [۲،۳]. کیتین، پلیمری طبیعی و بسیار شبیه موکوپولی‌ساکاریدهایی نظیر هپارین و هیالورونیک اسید با تحمل زیستی زیاد است که به سه شکل α، β و γ-کیتین وجود دارد. α-β-کیتین به ترتیب ساختاری موازی ناهمسو و همسو هستند که بیشتر در پوسته میگو، خرچنگ و سرپایان دیده می‌شوند. اما، برخلاف این دو γ-کیتین ترکیبی از α و β-کیتین است و بیشتر در قارچ‌ها و مخمرها دیده می‌شود [۱،۴-۶]. کیتین ماده‌ای بلوری و گاهی در حالت طبیعی درخشان بوده و مانند سلولوز در حلال‌های معمولی نامحلول است. انحلال‌ناپذیری این ماده نشان‌دهنده مشکل مهم ذاتی است. در سال‌های اخیر برای فائق‌آمدن بر این مشکل، اصلاح شیمیایی کیتین پیشنهاد شده است. در اصلاح شیمیایی، این ماده در مجاورت محلول سدیم هیدروکسید غلیظ قرار می‌گیرد و گروه‌های استیل آمینو (-ACNH) به عامل‌های آمینی (-NH₂) تبدیل می‌شوند. طی این اصلاح مشتق مهم و بنیادی به دست می‌آید که کیتوسان نام دارد. کیتوسان، پلیمری خطی با ساختار شیمیایی α-(۱-۴)-۲-آمینو-۲-داکسی-β-D-گلوکوپیرانوز است و به آسانی با N-استیل‌زدایی به کوپلیمری از N-استیل گلوکوزآمین و گلوکوزآمین تبدیل



طرح ۱- ساختار مولکولی کیتین و کیتوسان [۱۰].

دستگاه‌ها

برای انجام آزمون بررسی کیفی مقایسه‌ای و تعیین درجه استیل‌دار کردن کیتوسان تولید شده، طیف‌سنج زیرقرمز Tensor مدل 47IFS Bruker ساخت آلمان، خردکن مدل 7SJU-142 ساخت ژاپن، دستگاه تجزیه عنصری CHNSO مدل ECS4010، ساخت شرکت LECO آمریکا و گرانروی‌سنج مدل DVII+PRO، ساخت آمریکا به کار گرفته شد.

روش‌ها

استخراج کیتین از پوسته میگو

تهیه ماده خام: ابتدا پوسته‌ها با آب به‌طور کامل شست‌وشو داده شدند و سپس به مدت یک روز زیر آفتاب قرار گرفتند تا خشک شوند. پس از آن، پوسته‌های خشک شده با خردکن آسیاب شدند. پس از آسیاب شدن پوسته میگو، پودر حاصل به وسیله الک با مش ۱۶ غربال و در نهایت ۱۰۰ g پودر برای استخراج کیتین و کیتوسان طبق طرح ۲ بررسی شد. گفتمنی است، آزمون‌های مراحل استخراج کیتوسان از پوسته میگو و آزمون‌های مربوط به تعیین ویژگی‌های کیتوسان دوبار تکرار هستند و متغیرهای طی دو مرحله بررسی شدند [۱۱].

استخراج کیتین و کیتوسان: استخراج کیتین از پوسته میگو طبق روش پیشنهادی Chang و همکاران [۱۲] همراه با بعضی از تغییرات انجام شد. در این مطالعه، ابتدا ۱۰۰ g پوسته میگوی (میگوی ببری) آسیاب شده به مدت ۲-۴ روز برای خودکافت (autolysis) بقایای گوشت و احشای داخل پوسته میگو در هوای آزاد قرار گرفته و سپس برای آسان کردن جداسازی مواد معدنی و مواد پروتئینی به مدت ۴ h در سالیسیلیک اسید قرار داده شد. پس از این، پوسته‌ها در ۱۰۰۰ mL کلریدریک اسید ۷٪ (w/w/.) در دمای محیط به مدت ۲۴ h غوطه‌ور شدند. پس از عبور محلول دارای پوسته از کاغذ صافی، باقی‌مانده با

آب مقطر تا حد خنثی شدن شست‌وشو داده شد. سپس، باقی‌مانده پوسته‌ها برای پروتئین‌زدایی درون ۱۰۰۰ mL سدیم هیدروکسید ۱۰٪ (w/w/.) در دمای محیط به مدت ۲۴ h قرار داده شدند. پس از این مدت، محلول حاوی پوسته با صافی Watman صاف شده و با آب مقطر تا خنثی شدن شست‌وشو شد. پس از خنثی‌سازی برای حذف مواد محلول در چربی و به دست آوردن کیتین خالص، پوسته در ۲۵۰ mL اتیل‌الکل ۹۵٪ به مدت ۶ h قرار گرفت و باقی‌مانده دوباره با آب مقطر شسته شد. کیتین حاصل برای خشک شدن به مدت ۶ h در گرم‌خانه با دمای ۶۰°C قرار گرفت. پس از این مرحله، برای تهیه کیتوسان از کیتین، ۱۰ g کیتین در محلول ۵۰٪ سودسوزآور در دمای جوش به مدت ۴ h قرار داده شد. در نهایت، زیست‌پلیمر مشتق شده تا خنثی شدن شست‌وشو داده شده و سپس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن بررسی شد [۱۱، ۱۲].

تعیین خواص کیتوسان تولیدی

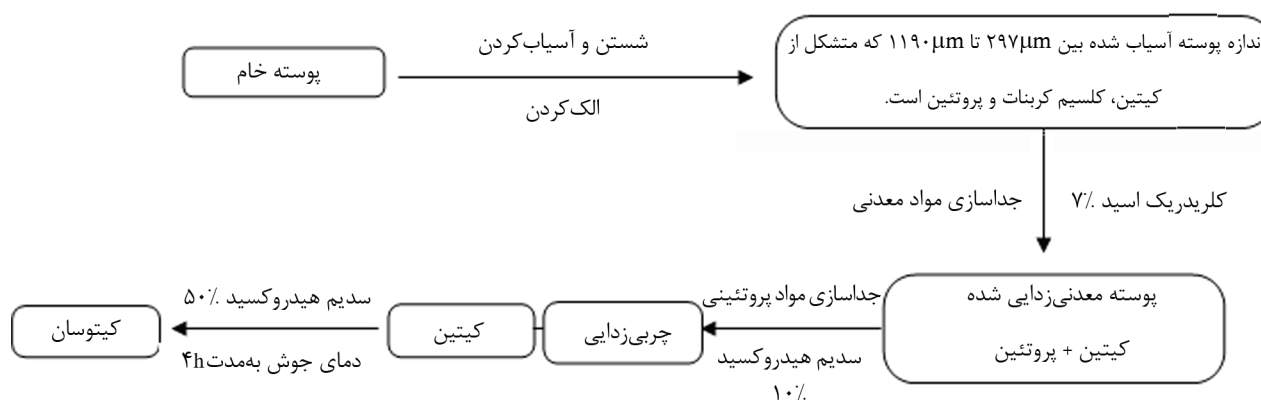
درصد استخراج و رطوبت و خاکستر

درصد استخراج نمونه از مقایسه وزن خام با کیتوسان استخراج شده محاسبه شد. درصد رطوبت هم پس از خشک شدن نمونه در دمای ۱۰۵°C به مدت ۲۴ h معین شده و درصد خاکستر با گرمادادن نمونه استخراجی در دمای ۵۵۰°C به مدت ۲۴ h معین شد [۱۱].

تعیین درجه استیل‌زدایی

درجه استیل‌زدایی به روش طیف‌سنجی زیرقرمز (FTIR) به دست آمد. در این روش، درجه استیل‌زدایی کیتوسان با توجه به طیف FTIR از معادله (۱) محاسبه شد [۴]:

$$DD = 100 - \left[\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 100 \right] / 1.33 \quad (1)$$



طرح ۲- روش کلی برای جداسازی کیتین و تهیه کیتوسان.

خشک و وزن شد تا مقدار مواد انحلال‌ناپذیر با وزن‌سنجی محاسبه شود. ظرفیت اتصال آب (WBC) و ظرفیت اتصال چربی (FBC) کیتوسان به روش Wang و Kinsla معین شد [۱۳].

طیف‌سنجی FTIR کیتین و کیتوسان

گروه‌های عاملی موجود در ساختار کیتین و کیتوسان تولید شده به روش FTIR بررسی شدند. در این روش، نمونه کیتین و کیتوسان به شکل قرص به ضخامت ۰/۲۵ mm مخلوط با پتاسیم برمید آماده‌سازی و سپس در شرایط یکسان از آنها طیف تهیه شد [۱].

تعیین چگالی و سطح ویژه

چگالی زیست‌پلیمر تولید شده با ظرف ۲۵ mL اندازه‌گیری شد. در این روش، ظرف چگالی با نمونه کیتوسان طوری پر شد که فضای خالی در آن باقی نماند. سپس، چگالی کیتوسان از کم کردن وزن ظرف خالی از مجموع وزن ظرف و کیتوسان موجود در ظرف ۲۵ mL به دست آمد [۱۵]:

$$(4) \quad \rho = \frac{W - W_0}{V} \quad (\text{وزنی ظرف خالی} - \text{وزن ظرف و پودر}) = \text{چگالی}$$

برای اندازه‌گیری سطح ویژه جاذب از روش جذب، آبی متیلن استفاده شد. در این روش، ابتدا غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ mg/L از آبی متیلن برای تهیه نمودار کالیبره کردن تهیه و غلظت آنها با دستگاه طیف‌نورسنج (UV) اندازه‌گیری و ثبت شد. سپس، مقداری از جاذب در محلول آبی متیلن ریخته شد و اختلاط به وسیله تکاننده با سرعت ۱۰۰ rpm به مدت ۱ h انجام شد. پس از آن، محلول حاصل برای ته‌نشینی داخل دستگاه مرکزگریز با سرعت ۳۶۰۰ rpm قرار گرفت. سپس، سطح ویژه جاذب از معادله (۵) محاسبه شد:

$$(5) \quad SA = \frac{N_m \times a_{MB} \times N \times 10^{-20}}{M}$$

در این معادله، SA سطح ویژه (m²/g)، N_m تعداد مولکول‌های آبی متیلن که در لایه سطحی جاذب قرار دارد، a_{MB} سطح اشغال شده با مولکول‌های آبی متیلن برابر با ۱۹۷/۲ Å، N عدد آوگادرو و M وزن مولکولی کیتوسان است [۱۵].

تعیین نقطه ایزوالکتریک

نقطه ایزوالکتریک (pHzc) جاذب کیتوسان به روش Serkan [۱۶] معین شد. در این روش ابتدا، pH ارلن‌های حاوی ۴۵ mL پتاسیم

$$(2) \quad A = -\log T$$

در این معادله، DD درجه استیل‌زدایی، A₁₆₅₅ پیک جذب آمید نوع اول در ۱۶۵۵ cm⁻¹، A₃₄₅₀ پیک جذب گروه هیدروکسیل در ۳۴۵۰ cm⁻¹ و A و T به ترتیب مقدار جذب و نشر است.

تجزیه عنصری

مقدار کربن، نیتروژن و هیدروژن کیتوسان به روش تجزیه عنصری معین شد. در این روش، حدود ۲ mg از کیتوسان در داخل کپسول نقره‌ای قرار داده شد و به داخل کوره دستگاه انتقال یافت. در این دستگاه، عناصر کربن، هیدروژن و نیتروژن در مجاورت اکسیژن طی فرایندهایی به ترتیب به CO₂، H₂O و N₂ تبدیل می‌شوند. در این دستگاه مقدار درصد کربن، هیدروژن و نیتروژن به ترتیب با تشخیص زیرقرمز و رسانی الکتریکی معین شدند [۴، ۱۳].

گرانروی ذاتی و وزن مولکولی

متوسط وزن مولکولی کیتوسان از روش اندازه‌گیری گرانروی ذاتی به دست آمد. اساس روش معادله (۳) است که رابطه بین گرانروی ذاتی پلیمر، ضرایب ثابت مارک - هوینگ و وزن مولکولی متوسط گرانروی را نشان می‌دهد:

$$(3) \quad [\eta] = kM^a$$

در این معادله، η گرانروی ذاتی و ضرایب a و k برای هر پلیمر - حلال و در دمای ثابت گزارش شده است. محلول استفاده شده برای کیتوسان، سدیم استات ۰/۳ مولار و استیک اسید ۰/۲ مولار است که مقادیر ثابت k و a به ترتیب ۰/۰۷۸ cm³/g و ۰/۷۶ گزارش شده است. در این روش، مقداری از کیتوسان استخراجی در محلول استیک اسید و سدیم استات حل شد و با گرانروی سنج مقدار گرانروی ذاتی برحسب سانتی‌پواز به دست آمد. با قراردادن گرانروی به دست آمده در معادله (۳) مقدار وزن مولکولی به دست می‌آید [۱۲، ۱۴].

انحلال‌پذیری کیتوسان و تعیین ظرفیت اتصال آب و چربی

انحلال‌پذیری کیتوسان به روش تبادل گلوکوزیدی (transglucosidase) اندازه‌گیری شد. در این روش، ابتدا pH مقدار ۵۰ mL محلول کیتوسان ۱٪ (w/v) با سدیم استات ۳٪ (w/v) روی ۴/۸ تنظیم شد. سپس، تبادل گلوکوزیدی ۵۰۰-L به آن اضافه شد. محلول حاصل در دمای ۶۰°C به مدت ۲۴ h داخل آنکوباتور قرار گرفت. آنگاه محلول با صافی Watman GF/C صاف شد. کاغذ صافی پس از این مرحله

لازم است، چرا که حذف تکرار مرحله معدنی‌زدایی نه تنها در کاهش زمان و هزینه‌های تولید بلکه روی کاهش اسید مصرفی در آزمون و کاهش آلودگی محیط زیست مؤثر است [۱۳، ۱۹]. افزون بر این، درصد استخراج کیتین از پوسته میگو ۲۵/۲۱٪ بود که با گزارش Muzarli مطابقت دارد. وی بیان کرده بود، پوسته میگو به‌طور عمده متشکل از ۲۵٪ کیتین، ۳۵٪ کیتین - پروتئین و ۴۰٪ کلسیم کربنات است [۲۰].

درجه استیل‌زدایی

درجه استیل‌زدایی که نسبت گروه‌های استیل گلوکوزآمین به گروه‌های آمین موجود در ساختار کیتوسان را نشان می‌دهد، از پارامترهای مهم در تعیین ویژگی کاربردی کیتوسان همچون مقدار انحلال‌پذیری آن است. درجه استیل‌زدایی به‌عنوان مهم‌ترین ویژگی شیمیایی است که می‌تواند در عملکرد کیتوسان در بسیاری از موارد کاربرد داشته باشد. از این‌رو، برخی از پژوهشگران پیشنهاد کردند، اصطلاح کیتوسان، باید زمانی استفاده شود که درجه استیل‌زدایی آن بیش از ۷۰٪ باشد [۱]. اما در کل بیشتر پژوهشگران، کیتوسان را به‌عنوان ماده کیتینی با درجه استیل‌زدایی بیش از ۵۰٪ می‌شناسند.

در مطالعه حاضر، درجه استیل‌زدایی کیتوسان محاسبه شده با طیف‌سنجی زیرقرمز ۵۶٪ بود که این مقدار نسبت به کیتوسان تجاری کم است. علت کاهش مقدار درجه استیل‌زدایی را می‌توان به نبود شرایط مناسب برای انجام مرحله استیل‌زدایی کیتین به کیتوسان (شرایط نیتروژن زیاد) نسبت داد. چرا که استیل‌زدایی کیتین به کیتوسان در شرایط هوای آزاد انجام شد، در حالی که در بیشتر پژوهش‌ها برای تسهیل شکست گروه‌های زنجیر پلیمر و به‌دست آوردن درجه استیل‌زدایی زیاد از محیط با نیتروژن زیاد استفاده شده است [۱۰، ۲۱].

وزن مولکولی و گرانیوزی وزن مولکولی (MW) کیتوسان از دیگر ویژگی‌های بسیار مهم و مؤثر به‌عنوان عامل عملکردی و فیزیکوشیمیایی است. وزن مولکولی کیتین طبیعی به‌دست آمده از پوسته سخت‌پوستان و میگو معمولاً بزرگ‌تر از 10^6 دالتون بود، در حالی که محصولات کیتوسان تجاری با توجه به روند و درجه محصول در محدوده وزن مولکولی $10^6 \times 12 - 10^6$ Da است. در این مطالعه، وزن مولکولی کیتوسان استخراجی (6×10^5 Da) نسبت به کیتوسان تجاری زیاد است. این اختلاف وزن مولکولی از اختلاف درجه استیل‌زدایی، نوع منبع کیتوسان استخراجی، دما، اکسیژن محلول، غلظت قلیا، زمان واکنش و اندازه ذره به‌وجود می‌آید. به‌عنوان مثال، در دمای بیش از 280°C ، تخریب گرمایی کیتوسان رخ می‌دهد و

نیترات $0/01$ مولار با افزودن HCl و $0/1$ NaOH مولار بین ۲ تا ۱۲ تنظیم شد. سپس، به هریک از ارلن‌ها $0/1$ g کیتوسان اضافه و اختلاط به مدت ۴۸ h روی تکاننده انجام شد. پس از اختلاط، pH نهایی محلول معین شده و نقطه ایزوالکتریک کیتوسان از اختلاف pH اولیه و نهایی که برابر صفر شده، به‌دست آمد.

تعیین اثر ضدباکتریایی کیتوسان استخراج شده از پوسته میگو

برای بررسی اثر ضدباکتریایی کیتوسان، محلول کیتوسان با غلظت‌های $0/5$ و 1% از حل کردن مقداری کیتوسان در مخلوط هیدروکلریدریک اسید و نیتریک اسید (۱٪) تهیه و سپس به صفحه‌های شاهد تلقیح شد. پس از خشک‌شدن صفحه‌های مدنظر در دمای محیط نمونه باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس (شاخص گرم مثبت) و اشرشیاکلی (شاخص گرم منفی) از آزمایشگاه میکروبیولوژی تهیه شده و در محیط کشت مربوط کشت داده شدند. سپس صفحه‌های کیتوسانی تهیه شده با فاصله روی محیط کشت تلقیح شده مزبور قرار داده شدند. محیط کشت حاصل در اتوکلاو به مدت ۲۴ h در دمای 37°C نگه داشته شده و در انتها مقدار حذف باکتری‌ها از معادله (۶) محاسبه شد [۱۷]:

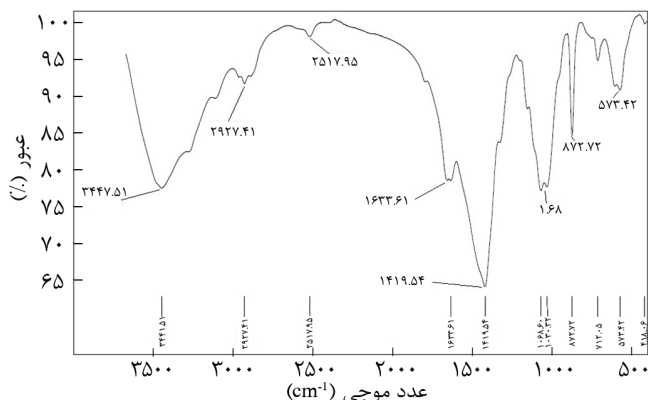
$$\text{حذف درصد} = \frac{N_1 - N_2}{N_3} \times 100 \quad (6)$$

در این معادله، N_1 و N_2 به ترتیب تعداد کلنی باکتری‌ها پیش و پس از تماس با پودر کیتوسان است.

نتایج و بحث

درصد استخراج کیتین و کیتوسان

در این پژوهش، درصد استخراج کیتوسان از پوسته میگو ۱۶/۵٪ بود که این مقدار با درصد استخراج کیتوسان گزارش شده توسط Chang و همکاران [۱۲] و مصباحی و برزگر [۱۸] مطابقت دارد. زمانی که مقدار کیتوسان استخراجی در کار حاضر با مقادیر استخراج‌شده از پوسته میگو در سایر مطالعه‌ها مقایسه شد، به‌طور مشابه درصد رطوبت به ترتیب $1/03$ و $1/25$ و درصد خاکستر به ترتیب $0/59$ و $1/2$ حاصل شد. این نتایج نشان داد، تقریباً درصد رطوبت و خاکستر کیتوسان استخراجی از پوسته میگو با سایر منابع مختلف مشابه است. همچنین، مقدار خاکستر به‌دست آمده این موضوع را تأیید می‌کند که برای جداسازی مواد معدنی فقط یک مرحله جداسازی

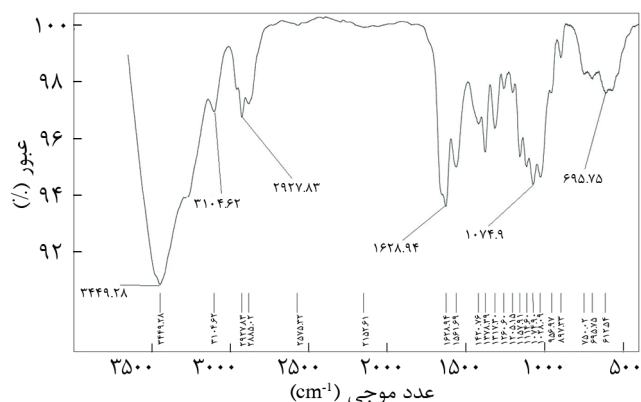


شکل ۱- طیف FTIR کیتین.

ترکیبات آنیونی و نیز ترکیبات دارای بار مثبت واکنش دهد و باعث حذف آنها از محلول‌های آبی شود. همچنین، این مسئله می‌تواند ساختار و بافت محصولاتی را که کیتوسان در تولید آنها به‌کار می‌رود، تحت تأثیر قرار دهد.

طیف سنجی FTIR کیتین و کیتوسان

طیف FTIR از کیتین و کیتوسان برای اطمینان از انجام استیل‌زدایی طی فرایند گرفته شد که در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است. نتایج طیف‌های به‌دست آمده در این شکل‌ها، اطلاعات کلی از ماهیت گروه‌های عاملی درگیر در نمونه را نشان می‌دهد. بررسی طیف‌های FTIR در نمونه کیتین جذب‌هایی در ناحیه $3447/51 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه‌های N-H و O-H، $2729/41 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه C-H، 1633 cm^{-1} تا 1660 cm^{-1} مربوط به گروه‌های C=O و ارتعاشی کشیده NH_2 - (اشاره شده به‌عنوان پیوند آمید I)، $1419/54 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوندهای CH_3 - و $1068/60 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه C-O را نشان می‌دهد. افزون بر این جذب‌ها، جذب در ناحیه‌های بین $1000-650 \text{ cm}^{-1}$



شکل ۲- طیف FTIR کیتوسان.

زنجیرهای پلیمری به‌سرعت تجزیه می‌شوند. در نتیجه، وزن مولکولی کاهش می‌یابد [۲،۲۲].

انحلال‌پذیری از پارامترهای بحرانی دیگر برای کیتوسان است. چرا که بهبود آن می‌تواند باعث افزایش کاربرد کیتوسان در سایر زمینه‌ها شود. از عوامل مؤثر بر انحلال‌پذیری، وزن مولکولی است. تغییر وزن مولکولی ماده، مقدار انحلال‌پذیری آن را در آب و محلول‌های اسیدی نشان می‌دهد. به‌عنوان مثال، با افزایش وزن مولکولی مقدار انحلال‌پذیری کیتین و کیتوسان در آب کاهش می‌یابد [۲]. در این مطالعه، انحلال‌پذیری کیتین و کیتوسان به ترتیب ۱۰٪ و ۶۷٪ به‌دست آمد. افزون بر نتایج پیش‌گفته، آزمون‌های دیگری همچون تجزیه عنصری CHN برای تعیین مقدار عناصر موجود در کیتوسان، آزمون تعیین سطح ویژه، چگالی و گرانشی کیتوسان نیز انجام شد. نتایج حاصل نشان داد، مقدار کربن، هیدروژن و نیتروژن در کیتوسان استخراجی به ترتیب برابر $35/92$ ، $7/02$ و $8/66$ ٪ بود و سطح ویژه، چگالی و گرانشی به ترتیب $4/23 \text{ m}^2/\text{g}$ ، $15/28 \text{ g}/\text{cm}^3$ و 250 cP است.

ظرفیت اتصال چربی و آب و pHzc کیتوسان

در این پژوهش، ظرفیت اتصال آب (WBC) و ظرفیت اتصال چربی (FBC) کیتوسان آماده شده به ترتیب 521 و 327 ٪ به‌دست آمد. طبق مطالعه Cho و همکاران [۲۳]، WBC و FBC پنج کیتوسان تجاری تولید شده به ترتیب بین $458-805$ ٪ و $314-537$ ٪ بوده است. همچنین No و همکاران [۲۴]، در مطالعه خود محدوده WBC برای کیتوسان را $611-355$ ٪ و محدوده FBC را $477-217$ بیان کرده است. برای تعیین بار سطحی زیست‌پلیمر کیتوسان، آزمون تعیین نقطه ایزوالکتریک (مقدار مشخصی از pH که در آن نقطه بار الکتریکی خالص برابر صفر شود) یا آزمون پتانسیل زتا در محدوده pH بین $12-2$ انجام شد. نتایج حاصل نشان داد، نقطه ایزوالکتریک از $6/7$ برای کیتین پوسته میگو به $6/5$ برای کیتوسان کاهش می‌یابد. این اختلاف و کاهش در pH نقطه ایزوالکتریک (pHzc) کیتوسان استخراج شده به دلیل زیادبودن مقدار کلسیم کربنات در کیتین پوسته میگو است. بار سطحی کیتین و کیتوسان استخراجی از پوسته میگو در هر مقداری از pH بیش از pHzc، به دلیل حذف پروتون از گروه‌های استامید و آمین‌ها دارای بار خالص منفی است. این بار در هر مقدار pH کمتر از pHzc به دلیل پروتون‌دار شدن گروه‌های آمین و استامید، بار خالص مثبت پیدا می‌کند. این ویژگی زیست‌پلیمر کیتین و کیتوسان باعث می‌شود تا کیتوسان در محلول‌های آبی با ترکیبات دارای بار منفی، مثل پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدهای آنیونی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدها و

همکاران [۲۹] مشخص شد، کیتوسان با درجه‌های استیل‌زدایی مختلف اثر مثبتی بر کاهش رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی داشته است. همچنین، نتایج حاصل از این مطالعه با سایر مطالعات در توافق است [۱۷،۳۰].

نتیجه‌گیری

مشخصات فیزیکوشیمیایی کیتوسان استخراج شده از پوسته میگو بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، درصد استحصال، درصد رطوبت و خاکستر کیتوسان استخراجی از پوسته میگو با سایر مطالعات مطابقت دارد و دارای سطح ویژه، چگالی و گرانروی به ترتیب $4.23 \text{ m}^2/\text{g}$ ، $1.5/2.8 \text{ g/cm}^3$ و 250 cP است. همچنین، نتایج آزمون FTIR روی کیتین و کیتوسان استخراج شده از پوسته میگو نشان داد، حذف مواد پروتئینی، معدنی و چربی‌ها با به‌کارگیری کلریدریک اسید، کلیسم هیدروکسید و اتانول مناسب بوده است. از نتایج حاصل از آزمون تعیین خاصیت ضدباکتریایی کیتوسان مشخص شد، با افزایش غلظت کیتوسان استخراج شده مقدار رشد باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. وزن مولکولی و درجه استیل‌زدایی پارامترهای مهمی در تعیین کیفیت نمونه کیتوسان است. از یافته‌های به‌دست آمده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت، نمونه کیتوسان استخراج شده نسبت به سایر مطالعات دارای وزن مولکولی بیشتر ($10^5 \times 6/7 \text{ Da}$) و درجه استیل‌زدایی کمتر (۵۷٪) است که این موضوع به بررسی‌های مختلف همچون واپلیم‌شدن کیتوسان استخراج شده نیاز دارد.

قردانی

از مرکز تحقیقات فناوری زیست‌محیطی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که از لحاظ مالی از این طرح حمایت کردند و نیز از همکاران محترم آزمایشگاه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی اهواز برای همکاری در انجام آزمون‌ها سپاسگزاری می‌شود.

مراجع

1. Sagheer F.A., Al-Sughayer M.A., Muslim S., and Elsabee M.Z., Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Marine Sources in Arabian Gulf, *Carbohydr. Polym.*, 77, 410-

پیوند C-H را نشان می‌دهد که حاکی از احتمال وجود گروه‌های عاملی همچون هیدروکسیل، آمین و کربوکسیل در کیتین است. پس از استیل‌زدایی کیتین به وسیله سدیم هیدروکسید غلیظ (۵۰٪) در دمای 100°C ، بررسی طیف FTIR نشان می‌دهد، این روش اثر بیشتری روی پیک‌های O-H، N-H، و C-H داشته است. این تغییرات در جذب نشان می‌دهد، قلیا و گرما باعث حذف گروه استیل از نمونه کیتین و تولید کیتوسان شده است. طبق مطالعات Kousalya و همکاران [۲۵] و Longhinotti و همکاران [۲۶] کیتین از گروه‌های OH، NHCOCH_3 و NH_2 تشکیل شده و به روش استیل‌زدایی گروه‌های استیل کیتین حذف شده و کیتوسان با گروه‌های عاملی OH و NH_2 به‌دست می‌آید.

اثر ضدباکتری کیتوسان

اثر ضدباکتری کیتوسان در دو غلظت ۰/۵ و ۱٪ کیتوسان روی رشد باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. نتایج حاصل از این مرحله نشان داد، اثر ضدباکتری کیتوسان رابطه مستقیمی با افزایش غلظت کیتوسان دارد، به‌طوری که با افزایش غلظت از ۰/۵٪ به ۱٪ مقدار حذف اشرشیاکلی از ۳۵٪ به ۷۰٪ و مقدار حذف استافیلوکوکوس اورئوس از ۶۵٪ به ۸۷٪ افزایش می‌یابد. این افزایش را می‌توان برپایه دو سازوکار زیر توضیح داد:

- کیتوسان روی سطح سلول باکتری غشایی پلیمر تشکیل داده و از نفوذ مواد غذایی (nutrient) به داخل سلول جلوگیری می‌کند.
- کیتوسان از راه فرایند نفوذ، وارد سلول باکتری می‌شود و فعالیت زیستی باکتری را با لخته‌سازی مواد درونی مختل می‌کند. همچنین، با تشکیل پیوند با آنیون‌های دیواره سلولی باکتری‌ها منجر به تخریب دیواره سلولی باکتری‌ها و خارج کردن عناصر ضروری و مواد مورد نیاز باکتری می‌شود. Lio و همکاران [۲۷] گزارش کردند، کیتوسان با غلظت زیاد و وزن مولکولی کم کارایی بسیاری در حذف اشرشیاکلی دارد. همچنین، آنها سازوکار حذف باکتری به‌وسیله کیتوسان را برپایه سازوکار انعقاد و تخریب دیواره سلولی روی باکتری سازوکار توضیح دادند. در مطالعه Bhatt و همکاران [۲۸] و Du و

419, 2009.

2. Ak Kalut S., *Enhancement of Degree of Deacetylation of Chitin in Chitosan Production*, MSc Thesis, Faculty of Chemical

- Engineering and Natural Resources Universiti Malaysia Pahang, May 2008.
3. Park B.K. and Kim M.M., Applications of Chitin and Its Derivatives in Biological Medicine, *Int. J. Molecul. Sci.*, **11**, 5152-5164, 2010.
 4. Yen M.T., Yang J.H., and Mau J.L., Physicochemical Characterization of Chitin and Chitosan from Crab Shells, *Carbohydr. Polym.*, **75**, 15-21, 2009.
 5. Kong N., Allan G.G., and Fox J.R., Marine Polymers. Part 8. Critical Evaluation of the Potential Sources of Chitin and Chitosan, *Proc. Int. Conf. Chitin Chitosan*, **1**, 64-78, 2004.
 6. Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Argüelles-Monal W., Desbrières J., and Rinaudo M., An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization, *Polymer*, **42**, 3569-3580, 2001.
 7. Kean T. and Thanou M., Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **62**, 3-11, 2010
 8. Pillai C.K.S., Paul W., and Chandra P., Sharma, Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation, *Prog. Polym. Sci.*, **34**, 641-678, 2009,
 9. Dutta P., Dutta J., and Tripathi V., Chitin and Chitosan: Chemistry, Properties and Applications, *J. Sci. Indus. Res.*, **63**, 20-31, 2004.
 10. Bajaj B., Winter J., and Gallert C., Effect of Deproteination and Deacetylation Conditions on Viscosity of Chitin and Chitosan Extracted from Crangon Crangon Shrimp Waste, *Biochem. Eng. J.*, **56**, 51- 62, 2011.
 11. Barwin Vino A., Ramasamy P., and Vairamani S., Physicochemical Characterization of Biopolymers Chitin and Chitosan Extreced from Squid Doryteuthis Sibogae Adam, *Int. J. Pharma Res. Developm.*, 181-190, 2012.
 12. Chang K.L. and Tsai G., Response Surface Optimization and Kinetics of Isolating Chitin from Pink Shrimp (*Solenocera melantho*) Shell Waste, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1900-1904, 1997.
 13. Aygul Kucukgulmez M.C., Yanar Y., Sen D., Polat H., and Eslem Kadak A., Physicochemical Characterization of Chitosan Extracted from *Metapenaeus Stebbingi* Shells, *Food Chem.*, **126**, 1144-1148, 2011.
 14. Mahdavi H., Taghizadeh M., Mivehchi H., and Ahmadkhan F., The Effect of Chitosan Molecular Weight on the Rate of Drug Release of Prednisolone Sodium Phosphate from Chitosan Microspheres Prepared by Spray Dryer, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **3**, 225-232, 2005.
 15. Ofomaja A.E. and Naidoo E.B., Biosorption of Lead(II) onto Pine Cone Powder: Studies on Biosorption Performance and Process Design to Minimize Biosorbent Mass, *Carbohydr. Polym.*, **82**, 1-39, 2008.
 16. Serkan K., *Comparative Adsorption Studies of Heavy Metal Ions on Chitin and Chitosan Biopolymers*, MSc Thesis, Engineering and Science of Izmir, 2007.
 17. Khanafari A. and Sanati Koupaei S., Growth Inhibition of *Pseudomonas Aeruginosa* by Degree of Deacetylation Values of Chitosan, *J. Mazand. Univ. Med. Sci. (In Persian)*, **19**, 10-19, 2009.
 18. Karbassi A., Barzegar H., and Mesbahi G., Comparison of Chitosan Produced from Shrimp Shell as a Mayonnaise Stabilizer with Commercial Chitosan and CMC, *Food Sci. Technol. (In Persian)*, **2**, 67-78, 2005.
 19. Monarul Islam M., Mahbubur Rahman M., Ashraful Islam Molla M., and Shaikh S.K.R., Preparation of Chitosan from Shrimp Shell and Investigation of Its Properties, *Int. J. Basic. Appl. Sci.*, **11**, 116-130, 2011.
 20. Kim S.K., *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and their Derivatives*, Taylor and Francis Group, USA, 11-21, 2011.
 21. Bastos D.S., Barreto B.N., Souza H.K.S., Bastos M., Rocha-Leão M.H.M., Andrade C.T., and Gonçalves M.P., Characterization of a Chitosan Sample Extracted from Brazilian Shrimps and Its Application to Obtain Insoluble Complexes with a Commercial Whey Protein Isolate, *Food Hydrocolloid.*, **24**, 709-718, 2010.
 22. Muzzarelli R., Baldassarre V., Conti F., Ferrara P., and Biagini G., Biological Activity of Chitosan: Ultrastructural Study, *Biomaterials*, **9**, 247-252, 1998.
 23. Cho Y.I., No H.K., and Meyers S.P., Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products, *Agri. Food Che.*, **46**, 3839-3843, 1998.
 24. No H.K., Lee K.S., and Meyers S.P., Correlation between Physicochemical Characteristics and Binding Capacities of Chitosan Products, *J. Food Sci.*, **65**, 1134-1137, 2000.
 25. Kousalya G.N., Gandhi M.R., Viswanathan N., and Meenakshi S., Preparation and Metal Uptake Studies of Modified Forms of Chitin, *Int. J. Biolog. Macromol.*, **47**, 583-589, 2010.
 26. Longhinotti E., Pozza F., Furlan L., Nazaré M., Sanchez., Klug M., Laranjeira M.C.M., and Fávere V.T., Adsorption of Anionic Dyes on the Biopolymer Chitin, *J. Brazilian Chem. Soc.*, **9**, 435-

- 440, 1998.
27. Liu N., Chen X.G., Park H.J., Liu C.G., Liu C.S., Meng X.H., and Yu L.J., Effect of MW and Concentration of Chitosan on Antibacterial Activity of Escherichia Coli, *Carbohydr. Polym.*, **64**, 60-65, 2006.
28. Bhatt L.R., Nam S.M., and Chai K.Y., Antimicrobial Activity of Water Soluble Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights, *J. Chitin Chitosan*, **14**, 179-181, 2009.
29. Du Y., Zhao Y., Dai S., and Yang B., Preparation of Water-soluble Chitosan from Shrimp Shell and Its Antibacterial Activity, *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.*, **10**, 103-107, 2009.
30. Naimian F., Khoylou F., and Beteshobabrud R., The Role of Solvent on Radiation Degradation and Antibacterial Activity of Chitosan Against Pectobacterium Carotovorum, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **23**, 305-310, 2010.