

## تأثیر درجه داستیلاسیون کیتوزان بر مهار رشد سودومونا آئروژینوزا بیمارستانی

آینتا خانفاری، شیوا صنعتی کویابی

### چکیده

**سابقه و هدف:** کیتین بعد از سلولز یکی از فراوانترین مواد آلی موجود در طبیعت است که کاربردهای زیادی در صنایع غذایی، آرایشی، کشاورزی، پزشکی و محیط دارد. منابع طبیعی این پلیمر، ساختار اسکلتی سخت پوستان، حشرات و دیواره سلولی برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها را تشکیل می‌دهد. مشتق داستیله کیتین، کیتوزان نامیده می‌شود که قابلیت انحلال آن از کیتین بیشتر است. هدف از انجام این تحقیق بررسی تغییر در خواص ضد میکروبی مشتق داستیله کیتوزان استخراج شده از ضایعات میگوی غالب خلیج فارس *Penaeus semisulcatus*، روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بعنوان یک فرصت طلب بیمارستانی است.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا کیتین و کیتوزان به روش شیمیایی و میکروبی از ضایعات میگو *Penaeus semisulcatus* تحت شرایط بهینه استخراج شد. به منظور دستیابی به ترکیبات داستیله کیتوزان، محلول قلیاییی ترکیبات استخراج شده در دوره زمانی ۱۵، ۲۰، ۴۵ دقیقه و ۱۰ ساعت در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد حرارت داده شد و با اتانل مطلق آبدگیری گردید. جهت ارزیابی درصد میزان داستیلاسیون کیتوزان حاصله، از روش FT-IR استفاده شد و ساختار آن با میکروسکوپ الکترونی نگاره بررسی شد. سپس از ترکیبات فوق دیسک تهیه شد و خواص ضد میکروبی آن روی سودومونا آئروژینوزا بیمارستانی با روش انتشار در آگار بررسی گردید. در انتها از ترکیبات فوق، باند زخم تهیه شد و اثر ضد میکروبی آن در محیط کشت بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از این تحقیق، تولید کیتوزان با حداکثر میزان داستیلاسیون ۶۵ درصد را با روش FT-IR تایید نمود. مدت زمان حرارت دهی از ۱۵ دقیقه تا ۱۰ ساعت، تغییر محسوسی در کاهش میزان داستیلاسیون ترکیبات استخراج شده نشان نداد. با افزایش مدت زمان حرارت دهی قطر منافذ غشایی کیتین از ۱/۵- میکرون به ۰/۲۵-۰/۶۵ میکرون کاهش یافت. افزایش میزان ماده موثره روی دیسک تا سه برابر، سبب افزایش ۵۰ درصدی مهار رشد روی سودومونا آئروژینوزا بیمارستانی شد.

**استنتاج:** نتایج حاصله، رابطه افزایشی بین افزایش زمان حرارت دهی و افزایش میزان داستیلاسیون را نشان نداد. افزایش میزان داستیلاسیون و حضور یون کلسیم سبب بسته شدن منافذ غشایی و افزایش اثر ضد میکروبی گردید. بنابراین روش انجام شده در این تحقیق، دستیابی مناسب و ارزان قیمت به غشاءهای کیتوزانی با قطر منافذ متفاوت را امکان پذیر می‌سازد. با توجه به عدم سمیت ترکیبات کیتینی و کیتوزانی، به کارگیری تراکم‌های بیشینه آن می‌تواند اثرات ضد میکروبی بهتری را نشان دهد.

**واژه‌های کلیدی:** کیتین، کیتوزان، داستیلاسیون، سودومونا آئروژینوزا، ضایعات میگو، طیف سنجی مادون قرمز

### مقدمه

کیتین با ساختار تعریف شده N-استیل-β-D-گلوکز آمین، یکی از فراوانترین مواد آلی موجود در طبیعت بعد از سلولز است. این ماده، پلی ساکاریدی با ساختمان بلوری است که اجزای آن یک شبکه فیبری را

E-mail: khanafari\_a@yahoo.com

مؤلف مسئول: آینتا خانفاری - تهران: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۸/۲/۹ تاریخ تصویب: ۸۸/۴/۱۷

کیتین موجود در ساختار میکروارگانسیم هایی نظیر *Phycomyces spp* و *Mucor spp*, *Aspergillus oryzae* کاندید مناسبی برای استفاده در پانسمان زخم ها است. نمک های کیتوزان نظیر کیتوزان لاکتات و متیل پیرولیدینون کیتوزان بهترین پانسمان کننده های زخم هستند. کیتین موجود در این قارچ ها جهت ازدیاد تکثیر فیروبلست های  $F_{1000}$  انسانی و تهیه یک ماتریکس به منظور بهبود تدریجی تورم های پوستی نیز کاربرد دارد (۶).

کیتین و مشتقات آن، عامل مؤثری در به دام انداختن فلزات هستند که مسئول بروز بسیاری از آلرژی ها می باشند. بنابراین ماده ای مؤثر و عالی برای پوست های حساس و آلژیک است. از این پلیمرهای طبیعی در محافظ های پوست و مو، مرطوب کننده ها، کرم های دست و صورت و بدن، لوسیون های حمام، کرم پودرها، لاک ها و خمیر دندان بسیار استفاده می شود (۵).

در این راستا هدف از انجام تحقیق حاضر، تعیین میزان داستیلاسیون کیتین و کیتوزان استخراج شده به روش های شیمیایی و میکروبی از ضایعات پوست، سر و کاراپاس میگوی غالب خلیج فارس *Penaeus semisulcatus*، تغییر این میزان به روش های شیمیایی و تعیین خواص ضد میکروبی درصدهای مختلف ترکیبات داستیله آن بعنوان یکی از کاربردهای معدود این ترکیب با ارزش است.

## مواد و روش ها

### آماده سازی نمونه:

به این منظور، از ضایعات پوست، سر و کاراپاس *Penaeus semisulcatus*، گونه میگوی غالب صید شده در خلیج فارس واقع در سواحل استان هرمزگان و شهر بندرعباس استفاده شد. ضایعات میگو توسط کارگران کارخانه تولید غذای کنسرو میگو به صورت دستی از گوشت جدا شده و روی یخ به آزمایشگاه منتقل و در فور  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک گردید. سپس ضایعات را پودر نموده و

تشکیل می دهند. این ساختمان سبب استحکام و مقاومت ساختمانی موجودات واجد کیتین می شود (۱).

کیتین در طبیعت معمولاً به حالت کمپلکس با دیگر پلی ساکاریدها و پروتئین ها دیده می شود (۲). این پلیمر طبیعی بسیار شبیه موکوپلی ساکاریدهایی نظیر هپارین و هیالورونیک اسید با تحمل بیولوژیکی زیاد است که به دو صورت  $\alpha$  و  $\beta$ - کیتین وجود دارد. پیوندهای درون مولکولی  $\beta$ - کیتین ضعیف تر از نوع  $\alpha$  می باشد، به همین دلیل  $\beta$ - کیتین قابلیت انحلال بیشتری از نوع  $\alpha$  دارد. کیتین پوست میگو و خرچنگ ها بیشتر از نوع  $\alpha$  است. نوع  $\beta$  بیشتر در سرپایان دیده می شود (۳). فراوانترین مشتق طبیعی کیتین، کیتوزان است که از واحدهای D- گلوکز آمین تشکیل شده است. به عبارت دیگر ترکیب استیل گلوکز آمینی، کیتین و ترکیب گلوکز آمینی، کیتوزان نامیده می شود (۴).

کیتوزان از نظر شیمیایی و خواص فیزی مشابه سلولز موجود در گیاهان است. گرچه از فیبر گیاهی متمایز است، با این حال قابلیت اتصال به چربی و هضم آن در دستگاه گوارش وجود دارد (۵).

کیتین و مشتقات آن کاربردهای زیادی در صنایع غذایی، آرایشی، کشاورزی و محیط دارند. خصوصیات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی، این ترکیبات آنها برای مصارف پزشکی مناسب می سازد. از کیتین و مشتقات آن در جداسازی محصول و بازیافت، تفکیک غشایی، کوآگولاسیون ستون های کروماتوگرافی، جاذب های کپسولی و همچنین در نفوذپذیری غشاها و فشار اسمزی معکوس استفاده می شود. در ضمن در صنایع کاغذسازی، نساجی و ساخت کاغذهای عکاسی کاربردهای فراوان دارند (۵، ۶). کربوکسی متیل کیتین به عنوان یک حامل در کنترل و تقویت تولید متابولیت در تریقات زیرجلدی کارایی دارد. پوشش کیتوزانی جهت تسهیل در انتشار برای تولید داروهای مختلف نظیر استامید، نیکوتینامید، سدیم بنزوات، سدیم سالیسیلات، فنوباریتون سدیم و سدیم سفازولین مطالعه شده است (۶).

در شیشه‌های تیره و دربسته در فریزر در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - تا زمان مصرف نگهداری شدند.

#### استخراج شیمیایی کیتین و کیتوزان:

به ۵ گرم از پودر ضایعات خشک شده میگو، ۲۵ میلی لیتر سود ۲ مولار اضافه شد و در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه به منظور دپروتئینه کردن نمونه، گرمخانه‌گذاری شد. سپس مخلوط فوق در  $2000\text{rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع قلبایی سطحی جدا و دور ریخته شد. رسوب حاصل با آب مقطر چندین بار شستشو شد. ۲۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۰/۵ مولار به رسوب افزوده و در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۶ ساعت به منظور زدودن املاح معدنی قرارداد شد. پس از آن نمونه در  $2000\text{rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب با آب مقطر برای چندین بار شستشو داده شد.

به منظور خالص سازی کیتین استخراج شده، پوست میگوی خشک شده با محلول هیدروکسید سدیم ۲ درصد به نسبت (۱:۳۰) به مدت ۲ ساعت در دمای  $90^{\circ}\text{C}$  دپروتئینه شد. سپس مخلوط قلبایی و رسوب حاصله شسته شد. برای استخراج کیتوزان از رسوب مخلوط فوق، در مجاورت اسید استیک ۱۰ درصد به نسبت  $(V/W) 40:1$  در  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۶ ساعت قرار گرفت و سپس کیتین خام و خالص توسط سانتریفوژ با دور  $4000\text{rpm}$  به مدت ۱۵ دقیقه جدا شد. pH فاز رویی که حاوی کیتوزان محلول در اسید استیک است، با سود ۴ مولار به حدود ۹ رسانده شد. در این هنگام، کیتوزان بصورت معلق در محلول در آمده و سپس ته نشین شد. هر دو رسوب حاصل یعنی کیتین خام و کیتوزان با آب مقطر، اتانول و استون شسته و در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  خشک شدند. رسوب حاصل در دستگاه فور با دمای  $105^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و وزن نمونه خشک تعیین گردید (۷).

#### استخراج میکروبی کیتین و کیتوزان:

سویه *Lactobacillus plantarum* PTCC (1058) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت استخراج میکروبی کیتین و کیتوزان، محیط کشت ۱۰ درصد پودر ضایعات میگو در آب مقطر تهیه و به نسبت ۱ درصد به آن نیترات آهن افزوده شد تا استخراج کیتین به حداکثر برسد (۸). سپس محیط کشت فوق در دمای  $121^{\circ}\text{C}$  درجه سانتیگراد و فشار  $1/4$  اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. پس از سرد شدن تدریجی ارلن های حاوی محیط کشت میگو در شرایط آزمایشگاه، به هر ارلن به نسبت ۱۰ درصد از کشت تلقیح *Lactobacillus plantarum* PTCC (1058) که در MRS broth (عصاره گوشت ۸ گرم، پپتون استخراج شده از کازئین ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۴ گرم، توئین ۸۰ یک گرم، گلوکز ۲۰ گرم، دی آمونیوم هیدروژن سترات ۲ گرم، سترات سدیم ۵ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۴ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر) کشت شده بودند و در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذبی معادل ۱-۰/۸ را نشان می‌داد (معادل  $10^8 \times 5$  CFU/ml)، اضافه گردید. محیط‌های کشت به مدت یک هفته در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شدند. پس از طی این زمان، محیط کشت فوق، با دور  $4000\text{rpm}$  به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد، سپس رسوب حاصل با آب مقطر و یا MRS broth شسته شد (۹).

برای زدودن پروتئین‌ها و املاح معدنی پوست میگو از روش شیمیایی ذکر شده استفاده گردید.

#### تهیه مشتق داستیل:

کیتین استخراج شده از ضایعات میگو به روش‌های شیمیایی و میکروبی با محلول ۴۵ درصد هیدرواکسید سدیم به نسبت ۱:۱۰ مخلوط شد. نمونه‌های فوق به بن ماری ۸۵ درجه سانتیگراد با دوره زمانی ۱۵، ۲۰، ۴۵ دقیقه و

یک میلی لیتر مخلوط اسید هیدروکلریدریک، اسید نیتریک به نسبت ۱:۳ اضافه گردید و تا زمان حل شدن کامل در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس محلول حاصل به دیسک‌های بلانک تلقیح گردید. پس از خشک شدن دیسک‌های مورد نظر در دمای اتاق، وزن خشک نمونه جذب شده روی هر دیسک تعیین شد.

نمونه سبویه مقاوم بیمارستانی *Pseudomonas aeruginosa* از بیمارستان مرکز طبی کودکان تهیه شد. نمونه از لوله تراشه یک نوزاد یک ماهه بستری در بخش ICU جداسازی شد. این نمونه سودوموناس جدا شده، مقاومت بسیار بالایی نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌داد. سوسپانسیونی از باکتری فوق در محیط کشت مولر هینتون برات تهیه و کدورت آن با شاهد ۰/۵ مک فارلند مقایسه گردید. سپس یک میلی‌لیتر از کشت تلقیح فوق به صورت جداگانه به محیط کشت مولر هینتون آگار افزوده شد و به روش آنتی‌بیوگرام کشت متراکم تهیه گردید. سپس دیسک‌های کیتوزانی تهیه شده با فاصله روی محیط کشت تلقیح شده فوق قرار داده شد. بعد از گرمخانه گذاری نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، قطر هاله عدم رشد برای هر دیسک با خط کشت اندازه‌گیری و ثبت گردید. به منظور جلوگیری از تداخل اثر حلال‌های شیمیایی ذکر شده، نمونه دیسک شاهد برای هر حلال و مخلوط آنها نیز در هر مرحله در نظر گرفته شد. به منظور مقایسه اثر ضد میکروبی ترکیبات فوق از دو باکتری *E. coli* بعنوان شاخص گرم منفی و *Staphylococcus aureus* بعنوان شاخص گرم مثبت استفاده گردید.

بررسی اثر ضد میکروبی غلظت‌های افزایشی کیتوزان/داستیله شده:

به منظور دستیابی به اثرات ضد میکروبی قوی تر، درصد‌های افزایشی تا غلظت سه برابر از پودر کیتوزان

در نهایت ۱۰ ساعت انتقال داده شد. سپس نمونه‌ها به سرعت با قرار دادن در آب سرد، خنک شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفوز شدند. فاز رویی حذف گردید و روی رسوب تا زمان خنثی شدن pH، با اتانل ۷۰ درصد شستشو داده شد. در پایان، نمونه‌ها جهت آب‌گیری با اتانل مطلق مجدداً شسته شدند و به منظور خشک شدن ابتدا در فور ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت و سپس به دسیکاتور منتقل شدند (۱۰).

ارزیابی درصد میزان داستیلایون کیتوزان:

نمونه‌های کیتوزان داستیله شده به روش تیتراسیون قلیایی با استفاده از دستگاه FT-IR با مشخصات Thermo Nicolet, 870FT\_IR ساخت آمریکا انتقال داده شدند و گراف‌های بدست آمده مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت (۱۱).

میزان استیلایون نمونه‌های کیتوزان با استفاده از فرمول زیر تعیین شد (۱۲، ۱۳، ۱۴):

$$DA = 100 \times [1 - (A_{1655} \div A_{3450}) \div 1/33]$$

که در آن:

DA: درصد استیلایون

$A_{1655}$ : میزان جذب در ناحیه ۱۶۵۵

$A_{3450}$ : میزان جذب در ناحیه ۳۴۵۰

می‌باشد. با سنجش درصد استیلایون نمونه با استفاده از فرمول فوق و تفاضل آن از عدد ۱۰۰، درجه داستیلایون نمونه تعیین شد.

بررسی ساختار کیتوزان داستیله با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM):

مورفولوژی نمونه‌های داستیله شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره LEO 440i پس از پوشش دهی با طلا مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

بررسی خاصیت ضد میکروبی ترکیبات داستیله:

به منظور بررسی خواص ضد میکروبی مشتقات داستیله شده کیتوزان، ۰/۱ گرم از نمونه‌های فوق در

داستیل شده با روش مشابه فوق تهیه گردید و اثرات ضد میکروبی آنها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

تهیه باند زخم از نمونه کیتوزان داستیل شده:

از آنجائیکه یکی از مشکلات اصلی در مراکز سوانح سوختگی، آلودگی‌های ثانویه به باکتری‌های بیمارستانی به خصوص *Pseudomonas aeruginosa* می‌باشد و از سوی دیگر به کارگیری باندهای زخم متداول برای اینگونه بیماران موجب چسبندگی باند به بخش‌های سوخته می‌شود، در این مرحله اثر ضد میکروبی باند کیتوزانی روی محیط کشت حاوی باکتری فوق مورد بررسی قرار گرفت.

برای این منظور پس از خمیری نمودن پودر کیتوزان داستیل شده، خمیر فوق روی باند استریل قرار داده شد و پس از آلوده نمودن محیط کشت مولر هیتون آگار با باکتری *Pseudomonas aeruginosa* به روش ذکر شده، باند

فوق روی محیط کشت قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. به منظور مقایسه، محیط کشت شاهد فاقد باند نیز در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری:

به منظور بررسی اختلاف در میزان هاله عدم رشد ترکیبات داستیل کیتوزان استخراج شده بر باکتریهای شاهد، در مقادیر ثابت پارامترهای محیطی، از برنامه SPSS ویرایش ۱۱ و آزمون ANOVA استفاده شد و ضریب معناداری پارامترها بر مبنای  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

## یافته ها

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان استیلاسیون نمونه کیتین (شاهد) از ۷۵ درصد به ۳۵ درصد در نمونه حرارت دیده کاهش یافت (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه نوع ترکیبات کیتوزان استخراج شده به روش میکروبی و شیمیایی بر اساس طیف FT-IR

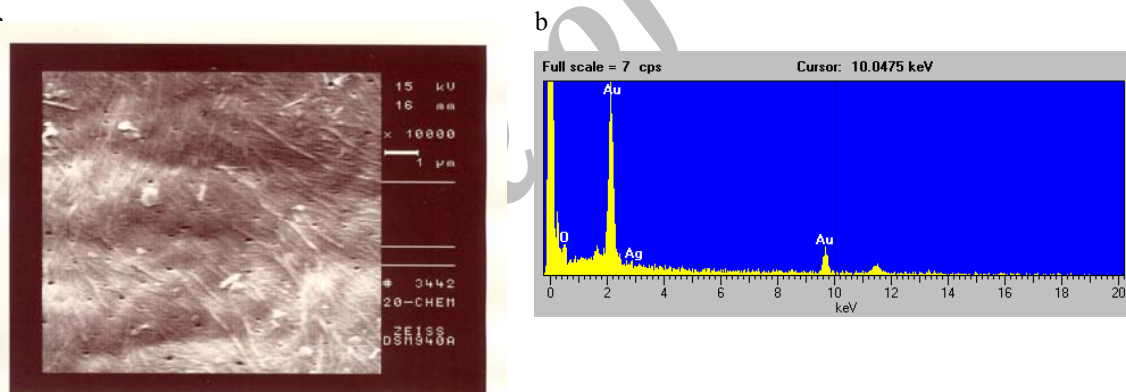
نوع ترکیب و شدت جذب آن بر حسب طول موج ها	O-H الکل ها و فول ها	C-H الکن ها	C-H حلقه های آروماتیک	C-H الکن ها	O-H اسیدهای کربوکسیلیک	C≡C الکین ها	C=C الکن ها	-NO2 ترکیبات نیترو	C-N آمین ها	C-O اسیدهای کربوکسیلیک، استرها، الکل ها، اتراها	DA درجه استیلاسیون	نمونه
cm <sup>-1</sup>	۳۳۰۰-۳۶۰۰	۳۰۲۰-۳۰۸۰	۳۰۰۰-۳۱۰۰	۲۸۵۰-۲۹۶۰	۲۵۰۰-۳۰۰۰	۲۱۰۰-۲۲۶۰	۱۶۴۰-۱۶۸۰	۱۵۱۵-۱۵۶۰	۱۱۸۰-۱۳۶۰	۱۰۸۰-۱۳۰۰	درصد %	
کیتین	۳۴۵۱/۳۳			۲۹۲۸/۵۶			۱۶۵۶/۱۰	۱۵۶۲/۰۲	۱۳۱۳/۴۹	۱۲۰۵/۳۲	۷۵	
کیتوزان استخراج میکروبی ۱۵ دقیقه حرارت دهی	۳۴۴۷/۷۰	۹۵۴/۳۵		۲۸۹۱/۵۲		۲۱۳۵/۶۸	۱۶۵۹/۶۵	۱۵۵۸/۲۴	۱۳۱۶/۴۹	۱۱۵۸/۳۹	۳۶/۱۹	
کیتوزان استخراج میکروبی ۲۰ دقیقه حرارت دهی	۳۴۴۶/۱۶	۹۵۳/۸۶		۲۸۹۱/۵۳		۲۱۳۵/۸۷	۱۶۶۰/۱۹	۱۵۵۸/۱۲	۱۳۱۶/۴۵	۱۲۰۵/۳۸	۳۶/۲۲	
کیتوزان استخراج میکروبی ۴۵ دقیقه حرارت دهی	۳۴۸۹/۹۲	۸۹۶/۵۵		۲۸۹۱/۴۲		۲۱۳۲/۵۲	۱۶۵۶/۱۰	۱۵۵۸/۷۵	۱۳۱۶/۷۵	۱۱۵۸/۷۵	۳۵/۶۷	
کیتوزان استخراج میکروبی ۱۰ ساعت حرارت دهی	۳۴۴۷/۱۱	۹۵۴/۵۵	۳۱۰۶/۸۸	۲۸۹۱/۷۲		۲۱۳۲/۳۶	۱۶۵۶/۱۶	۱۵۶۲/۱۶	۱۳۱۶/۷۹	۱۲۰۵/۲۰	۳۶/۱۲	
کیتوزان استخراج شیمیایی ۱۵ دقیقه حرارت دهی	۳۴۵۲/۳۱	۹۵۴/۳۸		۲۹۳۳/۱۵		۲۱۳۲/۰۸	۱۶۵۶/۰۸	۱۵۶۲/۰۲	۱۳۱۶/۳۹	۱۲۰۵/۳۱	۳۶	
کیتوزان استخراج شیمیایی ۲۰ دقیقه حرارت دهی	۳۴۵۲/۱۶	۹۵۴/۴۸		۲۹۳۳/۴۰	۳۳۴۷/۰۱	۲۱۳۲/۱۹	۱۶۶۷/۱۹	۱۵۶۲/۰۹	۱۳۱۷/۱۹	۱۲۰۵/۱۲	۳۵/۸	
کیتوزان استخراج شیمیایی ۴۵ دقیقه حرارت دهی	۳۴۵۲/۳۸	۹۵۴/۵۴		۲۹۶۲/۰۵		۲۱۳۱/۹۳	۱۶۵۶/۱۸	۱۵۶۵/۹۷	۱۳۱۶/۹۰	۱۲۰۵/۲۴	۳۶	
کیتوزان استخراج شیمیایی ۱۰ ساعت حرارت دهی	۳۴۵۱/۳۹	۹۵۴/۳۰		۲۸۹۲/۰۱		۲۱۳۱/۱۳	۱۶۵۹/۱۳	۱۵۵۸/۰۴	۱۳۱۵/۵۲	۱۲۰۵/۳۲	۳۶/۱۴	

میکروسکوپ الکترونی نگاره، تشکیل غشاءهای کیتوزانی با قطر منافذ ۰/۳۱۲-۰/۰۶۲ میکرون را در مقایسه با نمونه کیتین نشان داد (اشکال شماره ۱ تا ۳).

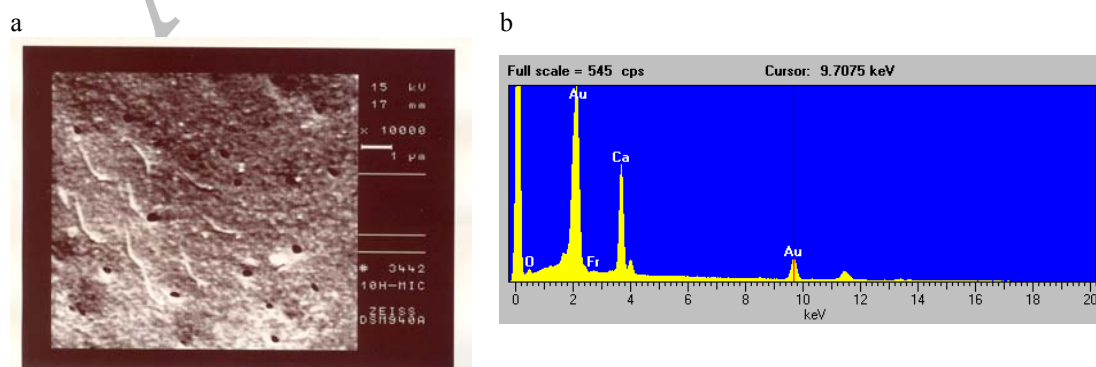
نتایج آنالیز عناصر توسط میکروسکوپ الکترونی کاهش قطر منافذ کیتوزانی را در حضور یون کلسیم در محیط نشان داد (اشکال شماره ۱ تا ۳).

نتایج حاصل از سنجش اثرات ضد میکروبی ترکیبات داستیله استخراج شده، تشکیل قطر هاله عدم رشد روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بیمارستانی را در بیشترین حالت ۱۷ و در کمترین حالت ۱۲ میلی متر نشان داد. این نتایج براساس میزان ۳ میلی گرم پودر داستیله جذب شده روی هر دیسک محاسبه شد (جدول شماره ۲).

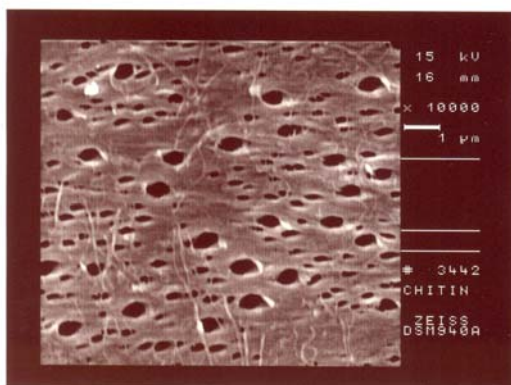
با حرارت دادن نمونه کیتین تعداد باندهای مربوط به ترکیبات آلکن C-H(Alkenes) در موقعیت  $\text{cm}^{-1}$  ۱۳۸۰-۱۳۲۰ و ۱۰۰۰-۶۷۵ در نمونه‌های کیتوزان میکروبی و شیمیایی هر دو مشاهده شد که نمونه شاهد، فاقد آن بود. از سوی دیگر با افزایش مدت زمان حرارت دهی از ۱۵ دقیقه تا ۱۰ ساعت، ابتدا تعداد این باندها کاهش و سپس در نمونه ۱۰ ساعته، مشابه با نمونه ۱۵ دقیقه شد. همچنین ظهور باند مربوط به ترکیبات آلکین C≡C(Alkynes) در موقعیت  $\text{cm}^{-1}$  ۲۲۶۰-۲۱۱۰ در نمونه میکروبی با افزایش زمان حرارت دهی مشاهده شد که نمونه شاهد و شیمیایی (به جز نمونه ۴۵ دقیقه حرارت دیده شده) فاقد آن بودند (جدول شماره ۱). همچنین نتایج داستیلاسیون کیتوزان با استفاده از



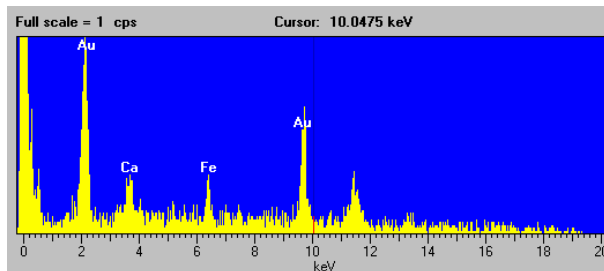
شکل شماره ۱: میکروگراف الکترونی و آنالیز عناصر مربوط به کیتوزان استخراج شده به روش شیمیایی و داستیله شده با دوره زمانی ۲۰ دقیقه. (a) میکروگراف الکترونی نگاره (b) آنالیز عناصر. اندازه منافذ ۰/۰۶۲ میکرون (بزرگترین). اکثر منافذ بسته شده است



شکل شماره ۲: میکروگراف الکترونی و آنالیز عناصر مربوط به کیتوزان استخراج شده به روش میکروبی و داستیله شده با دوره زمانی ۱۰ ساعت. (a) میکروگراف الکترونی نگاره (b) آنالیز عناصر. افزایش قطر منافذ به ۰/۳۱۲ میکرون



b



شکل شماره ۳: میکروگراف الکترونی و آنالیز عناصر مربوط به کیتین. (a) میکروگراف الکترونی نگاره (b) آنالیز عناصر. اندازه اکثر منافذ بین ۰/۵ تا ۱ میکرون می باشد.

جدول شماره ۲: اثر ضد میکروبی مشتقات داستیله کیتوزان بر حسب قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر)

		قطر هاله عدم رشد (mm)						
		۱۵ دقیقه		۲۰ دقیقه		۴۵ دقیقه		۱۰ ساعت
		شیمیایی	میکروبی	شیمیایی	میکروبی	شیمیایی	میکروبی	شیمیایی
E. coli	۱۱	۱۴	۱۱	۱۴	۱۳	۱۵	۱۰	۱۰
S. aureus	۱۹	۱۷	۱۲	۱۷	۱۸	۱۷	۱۹	۱۸
Pseudomonas sp.	۱۶	۱۵	۱۱	۱۵	۱۲	۱۷	۱۶	۱۲

گرم مثبت *S.aureus* با میانگین قطر حداقل ۱۲ و حداکثر ۱۹ میلیمتر دیده می شود. زمانیکه میزان ماده موثره روی دیسک تا سه برابر (۹ میلی گرم) افزایش یافت، هاله مهار رشد این باکتری از ۱۷ میلی متر به ۳۰ میلی متر افزایش نشان داد. نتایج حاصل از تهیه خمیر کیتوزان و تهیه باند آن نشان داد تا زمانیکه این باند روی محیط کشت تلقیح شده با باکتری *Pseudomonas aeruginosa* قرار داده شود، جلوی رشد باکتری مورد نظر گرفته می شود (نتایج این آزمون تا یک هفته گرمخانه گذاری مورد بررسی قرار گرفت). درحالیکه در محیط کشت شاهد (فاقد باند) باکتری پس از ۲۴ ساعت کاملاً رشد نمود.

## بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تولید ترکیبات داستیله کیتین استخراج شده از ضایعات پوست،

نتایج آنالیز آزمون آماری جهت بررسی میزان تاثیر ضد میکروبی مشتقات داستیله کیتوزان بر حسب قطر هاله عدم رشد، اختلاف معنی داری بین روش های استخراج شیمیایی و میکروبی پس از حرارت دهی در زمان های متفاوت، در سطح  $P < 0/05$  نشان نداد. چنانچه در جدول شماره ۲ آمده است، حداقل قطر هاله عدم رشد، ۱۰ میلی متر و مربوط به استخراج میکروبی و شیمیایی کیتوزان، با مدت زمان حرارت دهی ۱۰ ساعته، روی باکتری شاهد *E.coli* است و حداکثر ۱۹ میلی متر مربوط به استخراج میکروبی با مدت زمان حرارت دهی ۱۵ دقیقه و ۱۰ ساعته روی باکتری شاهد *S.aureus* بوده است. نتایج آماری بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین تشکیل قطر هاله عدم رشد بر حسب مدت زمان حرارت دهی مشتقات داستیله کیتوزان و نوع باکتری های شاهد در  $P < 0/05$  می باشد. صرف نظر از مدت زمان حرارت دهی، بیشینه قطر هاله عدم رشد روی باکتری

با کاربردهای متعدد ارائه شده است (۱۹). یکی از متداولترین روش‌های تهیه این غشاءها استفاده از استراتژی لیوفلیزاسیون می‌باشد که روش گرانقیمتی است. غشاءهای منفذدار کیتین و کیتوزانی تهیه شده به این روش در مهندسی کشت بافت (۲۳-۲۰)، تهیه باندهای زخم (۲۴، ۲۵) و حاملین انتقال دارو (۲۶، ۲۷) استفاده می‌شود. Chow و Khor از روش IBP (internal bubbling process) برای تهیه ماتریکس کیتینی با قطر منافذ بزرگ (۱۰۰-۱۰۰۰ میکرومتر) استفاده نمودند (۲۸). Zeng و همکاران غشاهایی از کیتین و کیتوزان با قطر منافذ بزرگ با کنترل سایز منافذ با استفاده از ذرات سلیکا تهیه کردند (۲۹، ۳۰). در این روش سوسپانسیونی از ذرات سلیکا با سایز مورد نظر به محلول اسیدی کیتوزان اضافه می‌شود. Steenkamp و همکاران (۳۱) از کامپوزیت آلومینیوم/ کیتوزان جهت حذف مس دو ظرفیتی از آبهای آلوده استفاده نمودند.

روش داستیلاسیون انجام شده در این تحقیق نیز می‌تواند روش مناسب و ارزان قیمتی جهت دستیابی به غشاءهای کیتینی و یا کیتوزانی با اندازه متفاوت باشد. در آنالیز عناصر توسط میکروسکوپ الکترونی ارتباط معنی‌داری بین حضور یون کلسیم در نمونه، تعداد و اندازه منافذ مشاهده گردید. در روش‌های شیمیایی و میکروبی استخراج کیتین و داستیلاسیون آن به روش فوق، در گراف‌های الکترونی آنالیز عناصر، در نمونه‌هایی که یون کلسیم دیده نمی‌شود افزایش تعداد و بزرگی اندازه منافذ مشاهده می‌شود و برعکس در گراف‌هایی که حضور یون کلسیم تایید شده منافذ کم و یا بسته شده‌اند.

ارتباط خطی مشابهی میان افزایش مدت زمان حرارت دهی (میزان داستیلاسیون) با قطر هاله عدم رشد روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی مشاهده نگردید. با افزایش میزان ماده موثره روی دیسک تا سه برابر (۹ میلی گرم) قطر هاله عدم رشد روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بیمارستانی، افزایش ۵۰ درصدی را نشان داد.

سر و کارا پاس *Penaeus semisulcatus* در گونه میگوی غالب صید شده در خلیج فارس در مقایسه با نمونه شاهد (کیتین) پس از آماده‌سازی به روش Zhang و همکاران با استفاده از روش FT-IR را به ترتیب ۶۵ درصد و ۳۰ درصد است. این روش باعث کاهش میزان استیلاسیون نمونه‌های کیتوزان حرارت دیده شده تا ۳۵ درصد گردید.

استفاده از روش FT-IR جهت تعیین میزان داستیلاسیون کیتوزان اولین بار توسط Moore و Roberts انجام شد (۱۴). این روش مزایای زیادی داشت: زیرا روش سریعی بود و نیازی به حل نمودن نمونه کیتوزان در حلال نداشت (۱۵، ۱۶). کیتوزان طبیعت رطوبت پذیر دارد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که توانایی رطوبت‌پذیری کیتوزان با افزایش خاصیت داستیلاسیون کاهش می‌یابد (۱۷).

با افزایش میزان حرارت دهی تراکم پیک  $1320 \text{ cm}^{-1}$  که مربوط به گروه استیل می‌باشد، کاهش نشان می‌دهد (جدول شماره ۱) که دلیل عمده داستیلاسیون می‌باشد. اما مدت زمان حرارت دهی، تغییر چندانی در کاهش میزان استیلاسیون نشان نداد. بطوریکه در ۱۵ دقیقه اول حرارت دهی، میزان استیلاسیون نسبت به نمونه شاهد ۴۰ درصد کاهش نشان داد که این میزان تا پایان مدت زمان ۱۰ ساعت تغییر چندانی نکرد. Acharya و همکاران نیز نشان دادند که افزایش مدت زمان حرارت دهی به منظور ایجاد ترکیبات داستیله حاصل از پوست خرچنگ تاثیر محسوسی در افزایش درصد داستیلاسیون ایجاد نمی‌کند (۱۸).

با افزایش مدت زمان حرارت دهی جهت داستیلاسیون نمونه کیتوزان، قطر منافذ از ۱-۰/۵ میکرون (در نمونه شاهد) به ۰/۲۵-۰/۰۶۲ میکرون کاهش یافت. به عبارت دیگر افزایش داستیلاسیون سبب بسته شدن منافذ شد.

پژوهش Xiaoli و همکاران قطر منافذ غشایی کیتوزان را ۷۰-۰/۳ میکرومتر و متوسط قطر را ۱۵/۵۴۲-۰/۵۶۰ میکرومتر گزارش کرده است. گزارش‌های متعددی مبنی بر تهیه غشاءهای کیتینی و یا کیتوزانی با قطر منافذ مختلف



شده به کارگیری تراکم‌های بیشینه آن می‌تواند اثرات ضد میکروبی بهتری نشان دهد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی جهت تصویب طرح تحقیقاتی حاضر و اختصاص بودجه، کمال تقدیر و تشکر را ابراز می‌داریم.

اثرات ضد میکروبی کیتوزان تا حدود زیادی وابسته به درجه پلیمریزاسیون مولکولی آن است (۳۲). انواع اولیگو مریک کیتوزان اثر ضد میکروبی چندانی ندارند. کیتوزان روی باکتری‌های گرم مثبت موثرتر از انواع گرم منفی است و این اثر تا حدود زیادی تحت تاثیر pH محیط قرار دارد. بیشترین اثر ضد میکروبی این ترکیب در pH های اسیدی بخصوص pH معادل ۴/۵ مشاهده شده است (۳۲). با توجه به عدم سمیت ماده استخراج

### References

1. Robert T, Takako N. Interaction of stearylamine liposome with erythrocyte ghosts: Analysis of membrane lipid mixing and aqueous contents mixing and the effect of carboxymethyl chitin on the interaction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 1995; 4(1): 55-63.
2. Spindler KD, Rapp C. Detection of chitin degrading enzymes on gels. In *Chitin Handbook* 2003; 243-247.
3. Kong N, Allan GG, Fox JR. Marine polymers. Part 8 critical evaluation of the potential sources of chitin and chitosan. *Proc Int Conf Chitin Chitosan* 2004 a; 1: 64-78.
4. Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea FM, Argüelles-Monal W, Desbrières J, Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization *Polymer* 2001; 42(8): 3569-3580.
5. YouJia Zhong. Isolation, Characterization of Beta-Chitin from Squid Pens and Calcium Carbonate Crystallization on the Chitin. *Scaffold Intel International Science and Engineering Fair Intel ISEF* 2005.
6. Felse Arthur P, Panda T. Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioproc Eng* 1999; 20: 505-512
7. Mahmoud NS, Ghaly AE, Arab F. Unconventional Approach for Demineralization of Deproteinized Crustacean Shells for Chitin Production. *Am J Biochem Biotech* 2007; 3(1): 1-9.
8. Khanafari A, Marandi R, Sanatei Sh. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iran. J Environ Health Sci Eng* 2008; 5(1): 19-24.
9. Jung W J, Kuk J H, Kim KY, Park RD. Demineralization of red crab shell waste by lactic acid fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 67: 851-854.
10. Zhang Y, Xue C, Xue Y, Gao R, Zhang X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydr Res* 2006; 340: 1914-1917.
11. Weitschies W, Ramirez LP, Hilger I, Kaiser WA, Magn J. The FTIR spectra of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan composite nanoparticles as well as chitosan, Elsevier 2007; P 434-435, P 633-636.
12. Domard A, Rinaudo M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int J Bio Macromolecules* 1983; 5: 49-52.
13. Duarte ML, Ferreira MC, Marvao MR, Rocha J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *Int J Bio Macromolecules* 2002; 31: 1-8.

14. Moore GK, Roberts GAF. in Muzzarelli RAA, Pariser ER (eds). Proceedings of the first International Conference on chitin/chitosan. MIT Sea Grant Report 78-7. 1978; P 421.
15. Baxter A, Dillon M, Taylor KDA, Roberts GAF. Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. Intl J Biol Macromol 1992; 14: 166-169.
16. Sabnis S, Block L H. Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan. Polym Bull 1997; 39: 67-71.
17. Blair HS, Guthrie J, Law TK, Turkington P. Chitosan and Modified chitosan Membranes I. Preparation and Characterization. J Appl Polym Sci 1987; 33: 641-656.
18. Vishu Kumar AB, Varadaraj MC, Gowda LR, Tharanathan RN. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against Bacillus cereus and Escherichia coli. Biochem J 2005; 391: 167-175.
19. Xiaoli Ma, Zihua Yao, Dagang Shi. Preparation and characterization of porous chitosan membranes and the localization of the activity of urease immobilized on it by SEM and X-ray microanalysis. CJI 2005; 7(6): 45.
20. Ma J B, Wang H J, He B L. A preliminary in vitro study on the fabrication and dermal fibroblasts. Biomaterials 2001; 22: 331-336.
21. Woong T, Chunga, Yang J. Preparation and characterization of porous chitosan membranes and the localization of the activity of urease immobilized on it by SEM and X-ray microanalysis. Biomaterials 2002; 23: 2827-2834.
22. Li J L, Pan J L, Zhang L G. Preparation and characterization of porous chitosan membranes and the localization of the activity of urease immobilized on it by SEM and X-ray microanalysis. Biomaterials 2003; 24: 2317-2322.
23. Mi FL, Shyu SS, Wu YB. Chitosan membrane as a wound dressing. Biomaterials 2001; 22: 165-173.
24. Mi F L, Wu Y B, Shyu S S. The endotoxin binding and antioxidative properties of ceramic granules. J Membr Sci 2003; 212: 237-254.
25. Oungbho K, Müller BW. Chitosan sponges as sustained release drug carriers. Int J Pharm 1997; 156: 229-237.
26. Leffler CC, Müller BW. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. Int J Pharm 2000; 194: 229-237.
27. Chow KS, Khor E. Novel fabrication of open-pore chitin matrixes. Biomacromolecules 2000; 1: 61-67.
28. Zeng X F, Ruckenstein E. Control of pore sizes in macroporous chitosan. Ind Eng Chem Res 1998; 37: 159.
29. Zeng X F, Ruckenstein E. Powder sampling and particle size determination. J Membr Sci 1999, 156: 97-107.
30. Steenkamp G C, Keizer K. J Membr Sci 2002; 197: 147-156.
31. Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. In vitro antimicrobial activity of a chitoooligosaccharide mixture against Actinobacillus actinomycetemcomitans and Streptococcus mutans. Int J Antimicrob Agents 2001; 18: 553-557.
32. Begin A, Calsteren MRV. Antimicrobial films produced from chitosan. Int J Biol Macromol 1999; 26: 63-67.