Nova Biologica Reperta 4 (3): 255-263 (2017)

یافته‌های نوین در علوم زیستی، جلد ۴، شمارهٔ ۳: ۲۶۳-۲۵۵

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 15:57 IRST on Tuesday December 26th 2017

استخراج کیتوزان α، β و γ از خرچنگ *Portunus segnis*، سپیا *Sepia pharaonis* و قارچ *Aspergillus niger* و مقایسهٔ خواص ضد میکروبی آنها

محمد صادق خاکشور و جمیله پازوکی*

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲/ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۰/ چاپ: ۱۳۹۶/۹/۳۰

گروه بیوتکنولوژی و زیست فناوری آبزیان، دانشکدهٔ علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: j-pazooki@sbu.ac.ir

چکیده. سه نوع کیتین به نام α (اسکلت خارجی سخت پوستان)، β (اسکلت داخلی سرپایان) و γ (دیوارهٔ سلولی برخی قارچ‌ها) در طبیعت وجود دارد. کیتوزان مهم‌ترین مشتق کیتین است که فعالیت‌های زیستی مختلفی دارد. در این مطالعه سه نوع کیتوزان α، β و γ به ترتیب از پوستهٔ خرچنگ *Portunus segnis*، صدف داخلی *Sepia pharonis* و دیوارهٔ سلولی قارچ *Aspergillus niger* استخراج شد. نمونه‌های سخت پوست و نرم‌تن در تابستان ۱۳۹۳ از آب‌های بندر عباس و سویهٔ قارچی *Aspergillus niger* (PTCC 5223) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه شد. مقدار کیتوزان استخراج شده از پوستهٔ خرچنگ به‌طور معنی‌داری بیشتر از کیتوزان سپیا و کیتوزان قارچ محاسبه شد. خواص ضدمیکروبی سه نوع کیتوزان به روش انتشار دیسک در آگار روی نه سویهٔ باکتریایی و دو سویهٔ قارچی بررسی شد. به‌طور میانگین، کیتوزان α بیشترین و کیتوزان γ کمترین فعالیت ضد میکروبی را نشان دادند. در برابر ۳ نوع کیتوزان حساسیت باکتری‌ها بیشتر از سویه‌های قارچی بود. باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی حساسیت یکسانی در برابر انواع کیتوزان از خود نشان دادند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، ۳ نوع کیتوزان استخراج شده خواص ضدمیکروبی قابل توجهی را از خود نشان دادند. مطالعات بیشتر در این زمینه نیز پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی. ترکیبات زیستی، سخت پوستان، نرم‌تنان، میکرو ارگانیسم‌ها

Extraction of α-, β- and γ-chitosan from *Portunus segnis*, *Sepia pharaonis* and *Aspergillus niger*, and comparison of their antimicrobial activities

Mohammad Sadegh Khakshoor & Jamileh Pazooki*

Received 21.02.2016/ Accepted 10.06.2017/ Published 21.12.2017

Department of Aquatic Biology and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G. C, Tehran, Iran

*Correspondent author: j-pazooki@sbu.ac.ir

Abstract. Three types of chitin as α (exoskeleton of crustaceans), β (cuttlebone of cephalopods) and γ (some fungal cell wall) exist in nature. Chitosan is the most important derivative of chitin, which has various biological activities. In this study, α, β and γ-chitosans were extracted from *Portunus segnis* exoskeleton, *Sepia pharonis* cuttlebone and *Aspergillus niger* cell wall, respectively. Samples of crab and sepia from Bandar Abbas coastal waters were gathered in the summer of 2014 and samples of *Aspergillus niger* (PTCC 5223) were obtained from the Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST). The amount of chitosan extracted from the Crab was significantly higher than other samples. Antimicrobial properties of these three types of chitosan were explored against 9 bacterial and 2 fungal strains using disc diffusion method. On average α chitosan and γ chitosan revealed to have highest and lowest antimicrobial activities, respectively. Antibacterial properties of chitosan extracts were more than their antifungal properties. Gram negative bacteria as well as gram positive bacteria were sensitive to three types of chitosan. According to observed results, all three types of chitosans have good antimicrobial activities, and further investigations are suggested.

Keywords. biological compounds, crustaceans, mollusks, microorganisms

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 15:57 IRST on Tuesday December 26th 2017

مقدمه

کیتین پلیمری است که از واحدهای β-1, 4-N-acetylgl-ucoseamine ساخته شده و پس‌از سلولز فراوان‌ترین پلیمر طبیعی است (Yen *et al*., 2009). سه نوع کیتین در طبیعت وجود دارد: کیتین نوع α که از زنجیره‌های موازی ناهم‌سو تشکیل شده و در اسکلت خارجی سخت‌پوستان وجود دارد (Enstar *et al*., 2008). کیتین نوع β که از زنجیره‌های موازی و هم‌سو تشکیل شده و در اسکلت داخلی سرپایان وجود دارند. کیتین γ که با وجود زنجیره‌های موازی هم‌سو و ناهم‌سو ترکیبی از نوع α و β است که در دیوارهٔ سلولی برخی از قارچ‌ها و مخمرها وجود دارد (Palpandi *et al*., 2009). از آنجایی که کیتین ساختار فشرده‌ای دارد در بیشتر حلال‌ها نامحلول است. بنابراین، با روش‌های شیمیایی ساختار کیتین دستکاری می‌شود (Palpandi *et al*., 2009). کیتوزان که با داستیله شدن نسبی کیتین به‌دست می‌آید، از واحدهای 2-amino-2-deoxy-D-glucose و 2-acetamido-2-deox-y-D-glucose تشکیل شده است (Bolat *et al*., 2010; Ya-maguchi *et al*., 2003). کیتین و کیتوزان دو پلیمر زیستی هستند که در علوم مختلف دارویی، پزشکی و درمانی، زیست‌فناوری، غذایی، کشاورزی، بهداشتی و آرایشی و... کاربردهای فراوانی دارند (Manni *et al*., 2010). به‌خاطر ویژگی‌های زیستی مختلف از جمله خواص ضدمیکروبی، این دو پلیمر از ارزش اقتصادی بالایی برخوردارند (Pranee *et al*., 2002). باوجود این، اطلاعات جامع و مقایسه‌ای برای انواع کیتوزان محدود است. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه استحصال و مقایسهٔ کمی انواع کیتوزان از منابع مختلف و مقایسه خواص ضدمیکروبی آنها با یکدیگر است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه‌های خرچنگ و سپیا به عنوان صید ضمنی و با استفاده از تور ترال از آب‌های دور از ساحل بندر عباس در تابستان ۱۳۹۳ جمع‌آوری و به‌صورت منجمد به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شست‌وشوی نمونه‌ها اسکلت خارجی خرچنگ و اسکلت داخلی سپیا جدا و پس‌از خشک کردن در آون در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد با آسیاب پودر شد و از الک ۲۵۰ میکرون عبور داده شد. تا زمان آزمایش، نمونه‌ها در پلاستیک‌های زیپ‌دار و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شد. قارچ *Aspergillus niger* نیز از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی (IROST) روی محیط جامد و شیب‌دار پوتیتو دکستروز آگار (PDA, Germany) تهیه شد.

استخراج کیتوزان از اسکلت خارجی خرچنگ و اسکلت داخلی سپیا

کیتوزان با حذف ترکیبات معدنی، پروتئینی و رنگ‌دانه‌ای از پودر اسکلت و در نهایت حذف گروه‌های استیل از روی کیتن حاصل می‌شود. حذف ترکیبات معدنی با استفاده از اسید کلریدریک ۱ نرمال، به مدت ۶۰ دقیقه، در دمای محیط و با نسبت پودر به اسید (w/v) ۱:۲۰ صورت گرفت. ترکیبات پروتئینی محصول دمینرال شده نیز با استفاده از هیدروکسید سدیم ۵ درصد، به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو (15 psi/121°C) و با نسبت (w/v) ۱:۱۵ حذف شد. پس از حذف ترکیبات رنگ‌دانه‌ای، با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۳۲/ درصد به مدت ۲ دقیقه و با نسبت (w/v) ۱:۱۵، پلیمر کیتین حاصل شد. برای تبدیل کیتین به کیتوزان، کیتین به‌دست آمده با محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و به نسبت (w/v) ۱:۱۵ اتوکلاو (15 psi/121°C) شد. در این مرحله، حذف گروه های استیل از روی کیتین و تبدیل کیتین به کیتوزان صورت گرفت (Lee *et al*., 2013). جهت تهیهٔ کیتوزان با خلوص بیشتر، کیتوزان α و β به‌دست‌آمده به مدت ۱۲ ساعت در معرض اسید استیک ۱۰ درصد قرار گرفت. با رساندن pH محلول اسیدی به ۱۰ با استفاده از هیدروکسید سدیم ۴۰ درصد کیتوزان رسوب داده و سپس با سانتریفیوژ ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جدا شد. در انتهای هر مرحله، مواد باقی‌مانده روی کاغذ فیلتر (Whatman No. 3) صاف شد، با آب مقطر برای رسیدن به pH خنثی شست‌وشو و در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک و سپس توزین شد (Yen *et al*., 2009).

استخراج کیتوزان از دیوارهٔ سلولی قارچ *A. niger*

کشت اولیهٔ قارچ *A. niger* در محیط کشت شیب دار پوتیتو دکستروز آگار در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۷ روز کشت شد. از قارچ‌های هفت روزه و با روش رقیق سازی با آب مقطر سوسپانسیون قارچی با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچی (10^7 اسپور در میلی لیتر) در

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 15:57 IRST on Tuesday December 26th 2017

۹۹ میلی‌لیتر محیط کشت مایع پوتیتو دکستروز براث (PDB, Merk Germany) تلقیح و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد، دور شیکر ۱۸۰ rpm و به مدت ۲۰ روز انکوبه شد. پس از ۲۰ روز، مسیلیوم‌های قارچی رشدکرده در محیط مایع، با استفاده از کاغذ صافی صاف شده و پس از خشک کردن در آون، دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد وزن آن اندازه‌گیری شد (Antonio *et al*., 2008). کیتوزان قارچی بر اساس روش Zamani و همکاران (2007) استخراج و مقدار وزنی آن اندازه گیری شد. ترکیبات پروتئینی مسیلیوم *A. niger* با استفاده از هیدروکسیدسدیم سه درصد (۳۰ میلی‌لیتر به ازای هر گرم وزن مسیلیوم) در دمای ۹۰ درجهٔ سانتی-گراد و به‌مدت سه ساعت حذف شد. مواد رسوبی با استفاده از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه و ۴۰۰۰ rpm) جدا و با آب مقطر شسته شد. برای استخراج کیتوزان، مواد صاف‌شده در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی گراد و به مدت ۶ ساعت در معرض اسیداستیک ۱۰ درصد (۱۰۰ میلی‌لیتر به ازای هر گرم) قرار گرفت. با رساندن pH محلول اسیدی به ۱۰ با استفاده از هیدروکسید سدیم ۲ مولار مواد محلول در اسیداستیک رسوب داده شد. مواد ته‌نشین شده با استفاده از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه و ۴۰۰۰ rpm) جدا و تا رسیدن به pH خنثی با آب مقطر شست‌وشو شد و در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگه-داری شد.

بررسی خواص فیزیکوشیمیایی انواع کیتوزان

در صد رطوبت و خاکستر کیتوزان‌های استخراج شده با استفاده از روش Alishahi و همکاران (2011) اندازه‌گیری شد. روش Hajji و همکاران (2014) نیز برای محاسبهٔ درصد پروتئین (DP%) و مواد معدنی (DM%) کیتوزان‌های استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت. درصد داستیله شدن (DDA%) کیتوزان ها نیز با استفاده از تحلیل Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR) تعیین شد (Yen *et al*., 2009).

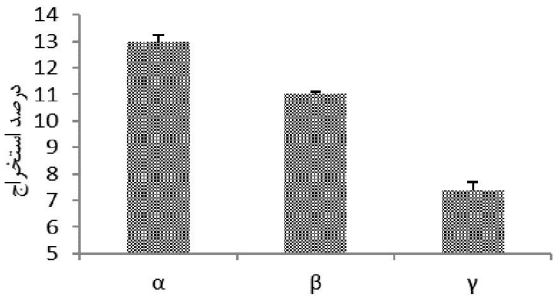
آزمایش ضدمیکروبی

خواص ضدمیکروبی انواع کیتوزان استخراج‌شده روی نه سویهٔ باکتریایی ازجمله *Staphylococcus aureus* (PTCC 1189)، *Bacillus subtilis* (PTCC 1154)، *Bacillus cereus* (PTCC 1156)، *Escherichia coli* (PTCC 1176)، *Pseudomonas aeroginosa* (PTCC 1310)، *Proteus mirabilis* (PTCC 1076)، *Serattia marcescens* (1621 PTCC)، *Klebsiella Pneumonia* (PTCC 1053)، *Salmonella enterica* (PTCC 1709) و ۲ سویهٔ قارچی *Candida albicans* (PTCC 5027) و *A. niger* (5223 PTCC) تحت بررسی قرار گرفت. سویه‌های قارچی و باکتریایی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی (IROST) تهیه شدند. مطالعهٔ ضدمیکروبی به‌روش انتشار دیسک در آگار انجام شد (Chio *et al*., 2001). با استفاده از کلنی‌های باکتریایی که به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد روی محیط مولر هینتون آگار (Merk, Germany) کشت شده‌اند، سوسپانسیونی با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند در محیط کشت مایع مولر هینتون براث (Merk, Germany) تهیه شد. این غلظت باکتریایی تهیه‌شده برای کشت روی محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. همچنین ۰/۱ میلی‌لیتر از سویه‌های قارچی کشت شده در محیط پوتیتو دکستروز براث (Merk, Germany) به مدت ۷۲ ساعت برای کشت روی محیط پوتیتو دکستروز آگار (Merk, Germany) استفاده شد. محلول ۱ درصد کیتوزان (w/v) در اسید استیک ۱ درصد جهت افزودن به دیسک تهیه شد. pH محلول کیتوزان با استفاده از هیدروکسید سدیم دو مولار روی ۵/۵ تنظیم و پس‌از یک شب قرار دادن محلول در دمای محیط به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد اتوکلاو شد. مقادیر مشخصی از کیتوزان (۵۰۰ µg/ml) به دیسک‌های بلانک استریل (۶ mm) تلقیح شد. از دیسک های آغشته به اسید استیک ۱ درصد و دیسک های بلانک به تنهایی به عنوان شاهد منفی استفاده شد. همچنین دیسک‌های آمادهٔ آنتی‌بیوتیک Amoxicillin (25 µg/disc) به‌عنوان شاهد مثبت برای باکتری‌های گرم مثبت، دیسک‌های آمادهٔ آنتی‌بیوتیک Penicillin (25 µg/disc) به-عنوان شاهد مثبت برای باکتری‌های گرم منفی و دیسک‌های آمادهٔ آنتی‌بیوتیک Nystatin (30 µg/disc) به‌عنوان شاهد مثبت برای قارچ‌ها استفاده شد. پلیت‌های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و پلیت‌های قارچی به‌مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. پس‌از زمان‌های مذکور هاله‌های فقدان رشد باکتریایی و قارچی در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد (Sania *et al*., 2012). مقادیر MIC و MBC برای انواع کیتوزان براساس روش Chellaram و همکاران در سال 2009 بین ۱۰۰۰-۷۵ µg/ml اندازه‌گیری شد.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 15:57 IRST on Tuesday December 26th 2017



شکل ۱- درصد کیتوزان به‌دست‌آمده از خرچنگ (α)، سپیا (β) و دیوارهٔ سلولی قارچ (γ).

Fig. 1. The percentage of chitosan obtained from crab (α), sepia (β) and fungal cell wall (γ).

جدول ۱- ویژگی فیزیکوشیمیایی انواع کیتوزان α (خرچنگ)، β (سپیا) و γ (دیواره سلولی قارچ).

Table 1. The physiochemical properties of different chitosan α (crab), β (sepia) and γ (fungal cell wall).

نوع کیتوزان	محصول(٪)	رطوبت(٪)	خاکستر(٪)	حذف ترکیبات معدنی(٪)	حذف ترکیبات پروتئینی(٪)	داستیله شدن(٪)
αکیتوزان	۱۳ ± ۰/۲۴	۷/۴۵± ۰/۱	۱/۸± ۰/۰۶	۹۵/۸۸ ± ۴/۹۸	۹۲/۴۶± ۱/۷۵	**۷۰-۷۵**
βکیتوزان	۱۱ ± ۰/۱۱	۸/۴ ± ۰/۵۵	۳/۹۳ ± ۰/۶	۹۳/۲ ± ۰/۱۵	۹۰ ± ۰/۲	**۷۰-۷۵**
γکیتوزان	۷/۳۸ ± ۰/۳۱	۵/۰۱ ± ۰/۱۷	۴/۵ ± ۰/۱۵	۹۰/۹ ± ۰/۲۵	۸۸/۱۲ ± ۰/۳۳	**۷۰-۷۵**

نتایج

مقدار کیتوزان استخراج شده از خرچنگ (۰/۲۴ ±۱۳ درصد) بیشتر از کیتوزان سپیا (۰/۱۱ ±۱۱ درصد) و کیتوزان قارچی (۰/۳۱ ±۷/۳۸٪) بود (شکل ۱). نتایج مندرج در جدول ۱ نشان می‌دهد که کیتوزان α به‌دست‌آمده دارای خلوص نسبی بیشتری از دیگر انواع کیتوزان است. نتایج آزمایش‌های ضدمیکروبی نشان داد که انواع کیتوزان استخراج‌شده دارای خاصیت بازدارندگی رشد روی اکثر سویه‌های باکتریایی و قارچی مورد استفاده در این مطالعه هستند. رنج هالهٔ عدم رشد بین ۰/۲±۱۱/۵ تا ۰/۵±۱۶/۶۶ میلی‌متر برای کیتوزان α، ۰/۴ ±۹/۴ تا ۰/۶۷ ±۱۳ میلی‌متر برای کیتوزان β و ۰/۲±۸/۵ تا ۰/۵۲±۱۲/۶۶ میلی‌متر برای کیتوزان γ اندازه‌گیری شد. همچنین، کیتوزان آلفا بیشترین و کیتوزان گاما کمترین فعالیت ضدمیکروبی را از خود نشان دادند (جدول ۲ و ۳). فعالیت بازدارندگی رشد هر سه نوع کیتوزان به‌طور معنی‌داری روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر بود. شاهدهای منفی فاقد خاصیت ضدمیکروبی و فعالیت انواع کیتوزان کمتر از شاهدهای مثبت به‌دست آمد. بیشترین هالهٔ عدم رشد روی *S. aureus* (۰/۵±۱۶/۶ میلی‌متر) و در برابر کیتوزان α به‌دست آمد. همچنین کمترین حساسیت نیز از *S. enterica* (۰/۲±۸/۵ میلی متر) و *P. mirabilis* (۰/۶±۹/۳ میلی متر) در برابر کیتوزان γ مشاهده شد. تنها سویهٔ *A. niger* در برابر هر سه نوع کیتوزان استخراج شده مقاومت نشان داد. سویه‌های قارچی نسبت به سویه‌های باکتریایی مقاومت بیشتری دربرابر هر سه نوع کیتوزان از خود نشان دادند (جدول ۴). نتایج تحلیل MIC و MBC نیز با آزمایش‌های ضدمیکروبی هم‌خوانی داشت (جدول ۵). مقادیر MIC و MBC هر سه نوع کیتوزان روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی کمتر بود. همچنین، کیتوزان آلفا مقادیر کمتری از غلظت‌های بازدارنده و کشندهٔ باکتری را نسبت به کیتوزان بتا و گاما از خود نشان داد.

بحث

کیتوزان نوع آلفا فرم رایج این پلیمر در طبیعت است که به مقدار بیشتری در دسترس است (Rodrigo *et al*., 2007). باوجوداین به خاطر ساختار فشردهٔ کیتوزان آلفا، اخیراً دیگر شکل‌های کیتوزان نیز در کانون توجه محققان قرار گرفته است (Tolaimate *et al*., 2000). همچنین صدف داخلی سرپایان و دیوارهٔ سلولی قارچ‌ها نیز مقادیر کمتری کیتین در خود دارند که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. مقدار کیتوزان α در این مطالعه ۰/۲۴±۱۳ درصد محاسبه شد که نسبت به کیتوزان α استخراج شده در مطالعهٔ Bolat و همکاران (2010)، Rhazi و همکاران (2000) و Hajji و همکاران (2014) بیشتر است. در برخی

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 15:57 IRST on Tuesday December 26th 2017

جدول ۲- هالهٔ عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت توسط کیتوزان α، β و γ برحسب میلی‌متر (Mean±SD).

Table 2. Inhibition of gram positive bacterial growth by α, β and γ chitosan (Mean±SD).

نوع کیتوزان	*Bacillus subtilis*	*Bacillus cereus*	*Staphylococcus aureus*
کیتوزان α	۱۵/۱±./۱۷	۱۵/۶±./۲	۱۶/۶±./۵
کیتوزان β	۱۳±./۶۷	۱۲/۶±./۲۱	۱۱/۵±./۴۴
کیتوزان γ	۱۱/۵±./۲	۱۲±./۵	۱۲/۶۶±۱/۵۲
Amoxicillin (25 µg/disc)	۲۱/۸±./۷۵	۱۷/۸±./۷۶	۱۸/۶±./۵۷

جدول ۳- هاله‌های عدم رشد باکتری‌های گرم منفی توسط کیتوزان α، β و γ برحسب میلی‌متر (Mean±SD).

Table 3. Inhibition of gram negative bacterial growth by α, β and γ chitosan (Mean±SD).

نوع کیتوزان	*Pseudomonas aeroginosa*	*Escherichia coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Serratia marcescens*	*Proteus mirabilis*	*Salmonella enterica*
کیتوزان α	۱۲/۹±./۰۸	۱۳/۵±./۲	۱۳/±./۸	۱۱/۵±./۲	۱۲±./۶۸	۱۳±./۴
کیتوزان β	۹/۶±./۵	۱۱/۱±./۲۸	۹/۴±./۴	–	–	–
کیتوزان γ	۱۰±./۵	۱۱±۱/۱۵	–	۹/۵±./۶۲	۹/۳±./۶	۸/۵±./۲
Penicillin (25 µg/ml)	۱۸/۵±./۲	۱۷/۴±./۵	۱۹/۳±./۷	۱۸/۵±./۳	۲۰/۱±./۵۶	۱۸/۵±./۱۶

(–) نبود هالهٔ رشد.

جدول ٤- هالهٔ عدم رشد قارچی توسط کیتوزان α، β و γ برحسب میلی‌متر (Mean±SD).

Table 4. Inhibition of fungal growth by α, β and γ chitosan (Mean±SD).

نوع کیتوزان	*A. niger*	*C. albicans*
کیتوزان α	–	۱۳/۳۳±./۳
کیتوزان β	–	۱۳±./۱۶
کیتوزان γ	–	۱۲/۵±./۵
Nystatin (30µg/disc)	۹/۲±۱/۰۵	۱۴±./۰۹

(–) نبود هالهٔ رشد.

جدول ۵-مقادیر MIC و MBC (µg/ml) کیتوزان α، β و γ روی میکروارگانیسم‌های تحت مطالعه.

Table 5. MIC and MBC values (µg/ml) of α, β and γ chitosan on test microorganisms.

میکروارگانیسم	کیتوزان α		کیتوزان β		کیتوزان γ	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Bacillus subtilis	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	–	–
Bacillus cereus	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	–	۱۰۰۰	–
Staphylococcus aureus	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	–	۱۰۰۰	–
Pseudomonas aeroginosa	۵۰۰	۱۰۰۰	–	–	–	–
Escherichia coli	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	–	–	–
Klebsiella pneumoniae	۱۰۰۰	–	–	–	–	–
Serratia marcescens	۱۰۰۰	–	–	–	–	–
Peoteus mirabilis	۱۰۰۰	–	–	–	–	–
Salmonella enterica	۵۰۰	۱۰۰۰	–	–	–	–

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 15:57 IRST on Tuesday December 26th 2017

مطالعات نیز مقادیر بیشتری از کیتوزان α گزارش شده است (Tipparat & Oryphan, 2008; Sasikala & Chitra, 2009). مقدار کیتوزان β به‌دست‌آمده از *Sepia prashadi* (۱۵ درصد) (Yen & Mau, 2007)، *Sepiella inermis* (۱۸/۷۵٪) (Yen & Mau, 2006)، *Sepioteuthis lessoniana* (۱۴/۵۷ درصد) (Natarajan *et al*., 2011) و *Doryteuthis sibogae* (۱۵ درصد) (Pochanavanich & Suntorsuk, 2002) بیشتر از مقدار کیتوزان β به‌دست آمده از *Sepia pharaonis* در این مطالعه (۱۱ درصد) بود. در مطالعهٔ Yen و Mau (2007) مقدار کیتوزان از سویه‌های مختلف قارچی بین ۲۱/۸ تا ۲۴ درصد گزارش شده است و این در حالی است که در مطالعهٔ حاضر بیشترین مقدار کیتوزان به‌دست آمده از قارچ *A. niger* (۷/۵۸٪) محاسبه شد. مقدار کیتوزان γ به‌دست آمده در مطالعهٔ حاضر نسبت به مطالعات Natarjan و همکاران (2011) (۱۰ درصد)، Pochanavanich و Suntomsuk در سال 2002 (۱۱ درصد)، Nadarjah و همکاران (2001) (۱۱/۲٪) و Tao و همکاران (2005) (۱۱ درصد) کمتر است. در مطالعهٔ Yen و Mau (2007) مقدار کیتوزان خرچنگی بیشتر از کیتوزان قارچی گزارش شده است که با نتایج این مطالعه هم‌سو است. البته مقدار کیتوزان با توجه به منبع، گونه، فصل، شرایط محیطی منطقه و روش استخراج متغیر است (Yamaguch *et al*., 2003).

یکی از اولین و مهم‌ترین مسائل در مطالعات ضد میکروبی این است که خواص ضدقارچی نسبت به خواص ضد باکتری ضعیف‌تر است (Selvin & Lipton, 2004). در مطالعهٔ حاضر، فقط *A. niger* در برابر هر سه نوع کیتوزان حساسیتی از خود نشان نداد. خواص ضدقارچی ضعیف‌تر می‌تواند به‌دلیل تأثیر کمتر ترکیبات ضدمیکروبی روی دیوارهٔ سلولی محکم قارچ‌ها دانست که شامل کیتین و گلوکان است (Chellaram *et al*., 2009; Qaralleh *et al*., 2010). در این مطالعه نیز فعالیت ضد میکروبی انواع کیتوزان روی باکتری‌ها نسبت به سویه‌های قارچی بیشتر بود. با وجود این مقادیر متفاوتی از فعالیت ضد قارچی انواع کیتوزان در تحقیقات مختلف گزارش شده است (Antonio *et al*., 2008). در مطالعهٔ Lim و Hudson (2003) فعالیت ضدقارچی ضعیفی برای کیتوزان α گزارش شده است. اما Cuero (1999) فعالیت ضد قارچی کیتوزان α بیش از فعالیت ضدباکتریایی آن محاسبه شده است.

طبق نتایج این مطالعه، به‌طور معنی‌داری فعالیت ضدباکتریایی انواع کیتوزان استخراج شده روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به دلیل حضور یک غشای محافظ در اطراف دیوارهٔ سلولی دانست که آن را از دسترسی ترکیبات ضدمیکروبی به ترکیبات و بخش‌های حساس داخلی تا حدودی محافظت می‌کند (Raafat *et al*., 2008). نتایج مطالعهٔ Sugumar و Ramesh (2010) نشان داد که تمام باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به کیتوزان α از خود حساسیت نشان دادند. فعالیت قوی‌تر کیتوزان α روی باکتری‌های گرم مثبت No و همکاران (2002) گزارش vnihkn;. این موضوع توسط نتایج مطالعات Sasikala و Chitra (2009) و Manni و همکاران (2010) تأیید می‌شود. به‌طورکلی، طبق مطالعات صورت‌گرفته فعالیت ضدمیکروبی کیتوزان روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر است (Tolaimat *et al*., 2000). اما در مطالعهٔ Varadharajan و Ramesh (2012) حداکثر بازدارندگی رشد کیتوزان α روی باکتری *E. coli* بود که با نتایج این مطالعه هم خوانی ندارد. تفاوت میزان فعالیت ضدمیکروبی کیتوزان بین مطالعات مختلف ممکن است به چهار دلیل باشد: نوع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کیتوزان، منبع کیتوزان و وضعیت استخراج (No *et al*., 2002; Kong *et al*., 2008).

کیتوزان β به‌دست‌آمده در این مطالعه فعالیت بازدارندگی درخور توجهی روی رشد برخی از سویه‌های باکتریایی از جمله *B. subtilis*، *B. cereus* و *C. albicans* از خود نشان داد. کیتوزان β استخراج شده از بین دو سویهٔ قارچی تحت مطالعه تنها در برابر *C. albicans* از خود فعالیت نشان داد. اما Patterson و Murugan (2000) فعالیت ضدقارچی مقبولی از کیتوزان β استخراج‌شده از *D. sibogae* و *L. duvauceli gladius* در برابر *A. niger*، *A. fumigatus* و *A. flavus* را گزارش کردند. این موضوع مشابه یافته‌های Shanmugam و همکاران (2008) است که در مطالعهٔ آنان فعالیت ضدقارچی کیتوزان β استخراج شده از *S. aculeate* و *S. brevimana* در برابر برخی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا تحت بررسی قرار گرفت. در مطالعهٔ

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 15:57 IRST on Tuesday December 26th 2017

Nadarajah و همکاران (2001) سویه‌های *B. cereus*، *S. aureus* و *E. coli* درمقابل کیتوزان β حساس بودند که تا حدودی با نتایج این مطالعه مقایسه‌پذیر است. در بین سویه‌های قارچی فعالیت بازدارندگی رشد انواع کیتوزان در این مطالعه فقط روی *C. albicans* مشاهده شد. در مطالعات Tajdini و همکاران (2010)، Seyfarth و همکاران (2008) و Shaaban و همکاران (2013) نیز فعالیت قابل توجهی از کیتوزان روی سویه‌های *C. albicans* گزارش شده است که با نتایج مطالعهٔ حاضر هم‌خوانی دارد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، می‌توان گفت که به دو دلیل سخت پوستان دریایی بهترین و مقرون به صرفه ترین منبع برای استخراج کیتوزان هستند؛ اول اینکه این منابع در دسترس‌ترند و ازلحاظ کمی نیز کیتوزان بیشتری در خود دارند؛ دیگر اینکه خواص ضدمیکروبی کیتوزان آلفا با توجه به ساختار آن بیشتر از خواص ضدمیکروبی کیتوزان بتا و گاما است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از دکتر محسن صفایی جهت کمک در تهیهٔ نمونه‌های تحت مطالعه تشکر می کنیم.

REFERENCES

Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M.R., Farahmand, H. and Shojaosadati, S.A. 2011. Enhancement and characterization of chitosan extraction from the wastes of shrimp packaging plants. − J. Polym. Environ. 19: 776-783.

Antonio, M, Susan, E., Sonia, P. and Maria, L.N. 2008. In vitro antimicrobial activity of garlic, oregano and chitosan against *Salmonella enterica*. – World. J. Microbiol. Biotechnol. 24: 2357-2360.

Bolat, Y., Sengul, B., Ali, G., Levent, L., Seval, B.K., Soner, C. and HabilUgur, K. 2010. Chitin-chitosan yield of freshwater crab (*PotamonPotamios*, Oliver 1804) shell. – Pak. Vet. J. 30: 227-231.

Chellaram, C., Sreenivasam, R.S., Jonesh, S., Anand, T. P. and Edward, J.K.P. 2009. Bioactive potential of coral associated gastropod, *Trochus tentorium* of gulf of Mannar, Southeastern India. − Biotech. 8: 456-461.

Chio, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., OH, S.J., Chio, J.H. and Kim, C.Y. 2001. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixrure against *Actonobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. – Int. J. Antimicrob. Agents. 18: 553-557.

Cuero, R.G. 1999. Antimicrobial action of exogenous chitosan.− Exs. 87: 315-333.

Entsar, S.A., Khaled, S.A.N. and Maher, Z.E. 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. – Bioresour. Technol. 99: 1359–1367.

Entsar, S.A., Khaleh, S.A.N. and Maher, Z.E. 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. – Bioresour. Technol. 99: 1359-1367.

Hajji, S., Islem, Y., Olfa, G.B., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M. and Jellouli, K. 2014. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. – Int. J. Biol. Macromol. 65: 298-306.

Kong, M., Chen, X.G., Liu, C.S., Liu, C.G., Meng, X.H. and Yu, LJ. 2008. Antibacterial mechanism of chitosan microsphers in a solid dispersing system against *E. coli* Colloids and Surfaces B. – Biointerface. 65: 197-202.

Lee, K.M., Shim, H., Lee, G.S., Park, H., Lee, O.S., Lim, S.C. and Kang, T.J. 2013. Chitin from the extract of cuttlebone induces acute inflammation and enhances MMP1 expression. – Biomol. Technol. 21: 246-250.

Lim, S. and Hudson, S.M. 2003. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. – J. Macromol. Sci. 43: 223-269.

Manni, L., Olfa, G.B., Jellouli, K., Younes, I., Nasri, M. 2010. Extraction and characterization of chitin, chitosan and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. – Appl. Biochem. Biotechnol. 162: 345-357.

Archive of SID

www.SID.ir

Nadarajah, K., Kader, J., Mazmira, M. and Paul, D.C. 2001. Production of chitosan by fungi. – Pak. Vete. J. 4: 263-265.

Natarajan, K., Riyaz, A.B. and Rengarajan, S. 2011. Production and evaluation of chitosan from *Aspergillus niger* MTCC strains. – Iranian J. Pharm. Res. 10: 553-558.

No, Kh., Park, Y.N., Lee, H.S. and Meyers, P.S. 2002. Antimicrobial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. – Int. J. Food. Microbiol. 74: 65-72.

Palpandi, C., Shanmugam, V. and Shanmugam, A. 2009. Extraction of chitin and chitosan from shell and operculum of mangrove gastropod Nerita (Dostia) crepidularia Lamarck. International Journal of Medicin and Medical Science 1: 198-205.

Patterson, E.J.K. and Murugan, A. 2000. Screening of cephalopods for bioactivity. – Phuket. Mar. Bio. Cent. Spec. Pubi. 21: 1253- 1256.

Pochanavanich, P. and Suntornsuk, W. 2002. Fungal chitosan production and its characterization. – Lett. Appl. Microbiol. 35: 17-21.

Pranee, L., How, N.C. and Chandrkrachang, S. 2002. Effect of chemical treatment on the characteristics of shrimp chitosan. – Journal of Metals Materials and Minerals 12: 11-18.

Qaralleh, H., Idid, S., Saad, S., Susanti, D., Taher, M. and Khleifat, K., 2010. Antifungal and antibacterial activities of four malaysian sponge species (Petrosiidae). – J. Med. Mycol. 20: 315-320.

Raafat, D., Bargen, K.V., Haas, A. and Sahl, H.G. 2008. Insights in to the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. – Appl. Environ. Microbiol. 74: 3764-3773.

Rhazi, M.J.D., Tolaimate, A., Alagui, A. and Vottero, P. 2000. 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.

Rodrigo, L., Odilio, B.G. and Sergio, P.C. 2007. B-chitin from the pens of *Loligo* sp: extraction and characterization. – Bioresour. Technol. 98: 2465- 2472.

Sânia, M.B., Andrade, R.L., Brismak, G., Rocha, D.B. and Alcione, O.G. 2012. The Use of exoskeletons of shrimp (*Litopenaeus vanammei*) and crab (*Ucides cordatus*) for the extraction of chitosan and production of nanomembrane. – Material Sci. Appl. 3: 495-508.

Sasikala, S.L. and Chitra, S. 2009. Antibacterial activity of prawn exoskeleton extract against marine and estuarine pathogenic bacteria. – J. Cell. Tissue. Res. 9: 1975-1979.

Selvin, J. and Lipton, A. 2004. Dendrilla nigra, a marine sponge, as potential source of antibacterial substances for managing shrimp diseases, India. Aquaculture 236: 277-283.

Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P. and Hipler, U.C. 2008. Antifungal effect of high-and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucoseamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. – Int. J. Pharm. 353: 139-148.

Shaaban, H.M., Ahmed, A.T., Ahmed, A.H. and Farouk, A. 2013. Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. – J. Mycol. 2013: 1-7.

Shanmugam, A., Mahalakshmi, T.S. Barwin, V.A. 2008. Antimicrobial activity of polysaccharide isolated from the cuttlebone of *Sepia aculeats* (Orbingy, 1848) and *Sepia brevimana* (Steenstrup, 1875): an approach to selected antimicrobial activity for human pathogenic microorganisms. – J. Fish. Aquat. Sci. 3: 268-274.

Sugumar, G. and Ramesh, U. 2010. Susceptibility of crab chitosan against *Staphylococcus aureus*. – Bioresearch Bulletin 1: 7-9.

Tajdini, F., Amini, M.A., Nafissi-Varcheh, N. and Faramarzi, M.A. 2010. Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. – Int. J. Biol. Macromol. 47: 180-183.

Tao, W., Svetlana, Z., Draughon, F.A., William, S.C. and Carl, E.S. 2005. Physiochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. – J. Agri. Food. Chem. 53: 3888-3894.

Tipparat, H. and Oraphan, R. 2008. Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeusmonodon*). – Songklanakarin J. Sci. Technol. 30: 1-9.

Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., Vincendom, M. and Votteri, P. 2000. On the influence of the deacetylation process on the physiochemical characteristics of chitosan from squid chitin. – Polymers 41: 2463-2469.

Varadharajan, D. and Ramesh, S. 2012. Antibacterial activity of commercially important aquaculture candidate shrimp chitin extracts against estuarine and marine pathogens from Parangipettai coast, south east coast of India. – J. Microbiol. Biotechnol. Res. 2: 632-640.

Yamaguchi, I., Itoh, S., Suzuki, M., Sakane, M.A. and Tanaka, J. 2003. The chitosan prepared from crab tendon I: the characterization and the mechanical properties. – Biomaterials 24: 2031-2036.

Yen, M.T. and Mau, J.L. 2006. Preparation of fungal chitin and chitosan from shiitake stipes. – Fungal Sci. 21: 1-11.

Yen, M.T. and Mau, J.L. 2007. Physiochemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes. – LWT- J. Food Sci. Technol. 40: 472-479.

Yen, M.T., Yang, J.H. and Mau, J.L. 2009. Physiochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. – Carbohydr. Polym. 75: 15-21.

Zamani, A., Lars, E., Bjorn, S. and Mohammad, J.T. 2007. Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of Zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. – Biomacromolecules 8: 3786-3790.

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 15:57 IRST on Tuesday December 26th 2017

Archive of SID

www.SID.ir

*****

How to cite this article:

Khakshoor, M.S. and Pazooki, J. 2017. Extraction of α-, β- and γ-chitosan from *Portunus segnis*, *Sepia pharaonis* and *Aspergillus niger*, and comparison of their antimicrobial activities. – Nova Biologica Rep. 4: 255-263.

خاکشور، م.ص و پازوکی، ج. ۱۳۹۶. استخراج کیتوزان α، β و γ از خرچنگ *Portunus segnis*، سپیا *Sepia pharaonis* و قارچ *Aspergillus niger* و مقایسهٔ خواص ضد میکروبی آنها. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۲۶۳-۲۵۵.

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 15:57 IRST on Tuesday December 26th 2017

Archive of SID

www.SID.ir