پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره نوزدهم شماره ۷۱ مرداد و شهریور سال ۱۳۸۸ (۱۹-۱۰)

تاثیر درجه داستیلاسیون کیتوزان بر مهار رشد سودومونا آئروژینوزا بیمارستانی

آنیتا خنافری شیوا صنعتی کوپایی

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 ومحیط 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 ضدمیکروبی مشتق داستیله کیتوازن استخراج شده از ضایعات میگوی غالب خلیج فارس Penaeus semisculcatus، روی باکتری Pseudomonas aeroginosa بعنوان یک فرصت طلب بیمارستانی است.

مواد و روش ها : ابتدا کیتین وکیتوزان به روش‌شیمیایی و میکروبی ازضایعات میگو Penaeus semisulcatus تحت شرایط بهینه استخراج شد. به منظور دستیابی به ترکیبات داستیله کیتوزان، محلول قلیایی 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 آبگیری گردید. جهت ارزیابی درصد میزان داستیلاسیون‌کیتوزان حاصله، از روش FT-IR استفاده شد وساختار آن با میکروسکوپ الکترونی نگاره بررسی شد. سپس از ترکیبات فوق دیسک تهیه شد وخواص ضدمیکروبی آن روی سودومونا آئروژینوزا بیمارستانی با روش انتشار در آگار بررسی گردید. در انتها از ترکیبات فوق، باند زخم تهیه شد و اثر ضدمیکروبی آن در محیط کشت بررسی شد.

یافته ها : 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 درکاهش میزان استیلاسیون ترکیبات استخراج شده نشان نداد. با افزایش مدت زمان حرارت‌دهی قطر منافذ غشایی‌کیتین از ۱-۰/۵ میکرون به ۰/۲۵-۰/۰۶۵ 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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

مولف مسئول: آنیتا خنافری- تهران: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
E-mail: khanafari_a @yahoo.com

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

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

تشکیل می‌دهند. این ساختمان سبب استحکام و مقاومت ساختمانی موجودات واجد کیتین می‌شود(۱).

کیتین درطبیعت معمولاً به حالت کمپلکس با دیگر پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها دیده می‌شود(۲). این پلیمر طبیعی بسیار شبیه موکوپلی ساکاریدهایی نظیر هپارین و هیالورونیک اسید با تحمل بیولوژیکی زیاد است که به دو صورت α و β- کیتین وجود دارد. پیوندهای درون مولکولی β- کیتین ضعیف تر از نوع α می‌باشد، به همین دلیل β- کیتین قابلیت انحلال بیشتری از نوع α دارد. کیتین پوست میگو و خرچنگ‌ها بیشتر از نوع α است. نوع β بیشتر در سرپایان دیده می‌شود(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 می‌شود(۴).

کیتوزان از نظر شیمیایی و خواص فیبری 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 درصنایع غذایی، آرایشی، کشاورزی و محیط دارند. خصوصیات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی، این ترکیبات آنها برای مصارف پزشکی مناسب می‌سازد. از کیتین و مشتقات آن در جداسازی محصول و بازیافت، تفکیک غشایی، کوآگولاسیون ستون‌های کروماتوگرافی، جاذب‌های کپسولی و همچنین در نفوذپذیری غشاها و فشار اسمزی معکوس استفاده می‌شود. درضمن درصنایع کاغذسازی، نساجی و ساخت کاغذهای عکاسی کاربردهای فراوان دارند(۶،۵). کربوکسی متیل‌کیتین به عنوان یک حامل در کنترل و تقویت تولید متافتامین در تزریقات زیرجلدی کارایی دارد. پوشش کیتوزانی جهت تسهیل در انتشار برای تولید داروهای مختلف نظیر استامید، نیکوتینامید، سدیم بنزوات، سدیم سالیسیلات، فنوباربیتون سدیم و سدیم سفازولین مطالعه شده است(۶).

کیتین موجود در ساختار میکروارگانیسم هایی نظیر Mucur spp,Aspergillus oryzae و Phycomyces spp کاندید مناسبی برای استفاده در پانسمان زخم‌ها است. نمک‌های کیتوزان نظیر کیتوزان لاکتات و متیل پیرولیدینون کیتوزان بهترین پانسمان کننده‌های زخم هستند.کیتین موجود در این قارچ‌ها جهت ازدیاد تکثیر فیروبلاست‌هایF_{1000} انسانی وتهیه یک ماتریکس به‌منظور بهبود تدریجی تورم‌های پوستی نیز کاربرد دارد(۶).

کیتین و مشتقات آن، عامل مؤثری در به دام انداختن فلزات هستندکه مسئول بروز بسیاری از آلرژی‌ها می‌باشند. بنابراین ماده‌ای مؤثر و عالی برای پوست‌های حساس و آلرژیک است. از این پلیمرهای طبیعی در محافظ‌های پوست و مو، مرطوب کننده‌ها، کرم‌های دست و صورت و بدن، لوسیون‌های حمام، کرم پودرها، لاک‌ها و خمیر دندان بسیار استفاده می‌شود(۵).

در این راستا هدف از انجام تحقیق حاضر، تعیین میزان داستیلاسیون کیتین و کیتوزان استخراج شده به روش‌های شیمیایی و میکروبی از ضایعات پوست، سر و کاراپاس میگوی غالب خلیج فارس Penaeus semisculcatus، تغییر این میزان به روش‌های شیمیایی و تعیین خواص ضدمیکروبی 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 $37^{o}C$ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک گردید. سپس ضایعات را پودر نموده و

Archive of SID
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]
www.SID.ir

در شیشه‌های تیره و دربسته در فریزر در دمای ۲۰°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 ۲۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه به منظور دپروتئینه کردن نمونه، گرمخانه‌گذاری شد. سپس مخلوط فوق در ۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع قلیایی سطحی جدا و دور ریخته شد. رسوب حاصل با آب مقطر چندین بار شستشو شد. ۲۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۵ مولار به رسوب افزوده و در دمای ۵۰°C به مدت ۱۶ ساعت به منظور زدودن املاح معدنی قرارداده شد. پس از آن نمونه در ۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب با آب مقطر برای چندین بار شستشو داده شد.

به منظور خالص‌سازی کیتین استخراج شده، پوست میگوی خشک شده با محلول هیدروکسید سدیم ۲ درصد به نسبت(۱ :۳۰) به مدت۲ ساعت در دمای۹۰°C دپروتئینه شد. سپس مخلوط قلیایی و رسوب حاصله شسته شد. برای استخراج کیتوزان از رسوب مخلوط فوق، در مجاورت اسید استیک ۱۰ درصد به نسبت (V/W) ۱ :۴۰ در ۶۰ °C به مدت ۶ ساعت قرار گرفت و سپس کیتین خام و خالص توسط سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰rpm 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 ۲۰ °C خشک شدند. رسوب حاصل در دستگاه فور با دمای ۱۰۵ °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 ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۴ 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 سیترات ۲ گرم، سیترات سدیم ۵ گرم، سولفات منیزیوم ۰/۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۴ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) کشت شده بودند و در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذبی معادل ۱- ۰/۸ را نشان می‌داد (معادل ۵×۱۰^{۸} CFU/ml)، اضافه گردید. محیط‌های کشت به مدت یک هفته در انکوباتور ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. پس از طی این زمان، محیط کشت فوق، با دور ۴۰۰۰rpm 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 واملاح معدنی پوست میگو از روش شیمیایی ذکر شده استفاده گردید.

تهیه مشتق داستیله:

کیتین استخراج شده از ضایعات میگو به روش‌های شیمیایی ومیکروبی 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

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

www.SID.ir

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 آب گیری 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 داستیلاسیون کیتوزان:

نمونه های 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 استیلاسیون نمونه‌های کیتوزان با استفاده از فرمول زیر تعیین شد(۱۳،۱۲،۴):

$$DA = ۱۰۰ \times [۱-(A_{۱۶۵۵} \div A_{۳۴۵۰}) \div ۱/۳۳]$$

که در آن:

DA: درصد استیلاسیون

$A_{۱۶۵۵}$: میزان جذب در ناحیه ۱۶۵۵

$A_{۳۴۵۰}$: میزان جذب در ناحیه ۳۴۵۰

می‌باشد. با سنجش درصد استیلاسیون نمونه با استفاده از فرمول فوق و تفاضل آن از عدد ۱۰۰، درجه داستیلاسیون 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 پوشش‌دهی با طلا مورد بررسی قرار گرفت(۱۰).

بررسی خاصیت ضدمیکروبی ترکیبات داستیله:

به منظور بررسی خواص ضدمیکروبی مشتقات داستیله شده کیتوزان، ۰/۱ گرم از نمونه‌های فوق در 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 موردنظر در دمای اتاق، وزن خشک نمونه جذب شده روی هر دیسک تعیین شد.

نمونه سویه مقاوم بیمارستانی Pseudomonas aeroginosa 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 براث 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی قوی تر، درصدهای افزایشی تا غلظت سه برابر از پودر کیتوزان

Archive of SID
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]
www.SID.ir

داستیله شده با روش مشابه فوق تهیه گردید و اثرات ضدمیکروبی آنها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

تهیه باند زخم از نمونه کیتوزان داستیله شده:

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

برای این منظور پس از خمیری نمودن پودر کیتوزان داستیله شده، خمیر فوق روی باند استریل قرار داده شد و پس ازآلوده نمودن محیط کشت مولرهینتون‌آگار با باکتری Pseudomonas aeroginosa به روش ذکر شده، باند فوق روی محیط کشت قرار داده شد و در دمای۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری گردید. به‌منظورمقایسه، محیط کشت شاهد فاقد باند نیز در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری:

به منظور بررسی اختلاف در میزان هاله عدم رشد ترکیبات داستیله‌کیتوزان 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 براساس طیف FT-IR

نوع ترکیب و شدت جذب آن برحسب	O-H الکل ها و فنول ها	C-H الکن ها	C-H حلقه های آروماتیک	C-H الکان 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، اترها	DA درجه استیلاسیون
نمونه / cm^{-1}	۳۶۰۰–۳۲۰۰	۳۰۸۰–۳۰۲۰ ۱۰۰۰–۶۷۵	۳۱۰۰–۳۰۰۰ ۶۷۰–۶۷۵	۲۹۶۰–۲۸۵۰ ۱۴۷۰–۱۳۵۰	۳۰۰۰–۲۵۰۰	۲۲۶۰–۲۱۰۰	۱۶۸۰–۱۶۴۰	۱۵۶۰–۱۵۱۵ ۱۳۸۵–۱۳۴۵	۱۳۶۰–۱۱۸۰	۱۳۰۰–۱۰۸۰	درصد %
کیتین	۳۴۵۱/۳۳			۲۹۲۸/۵۶			۱۶۵۶/۱۰	۱۵۶۲/۰۲ ۱۳۷۹/۴۸	۱۳۱۳/۴۹ ۱۳۱۶/۴۵	۱۲۶۱/۳۳ ۱۲۰۵/۳۲ ۱۱۵۸/۳۹	۷۵
کیتوزان، استخراج میکروبی ۱۵ دقیقه حرارت دهی	۳۴۴۷/۷۰	۹۵۴/۳۵ ۸۹۶/۷۳ ۷۰۳/۸۲		۲۸۹۱/۵۲		۲۱۳۵/۶۸	۱۶۵۹/۶۵	۱۵۵۸/۲۴ ۱۳۷۹/۳۲			۳۶/۱۹
کیتوزان، استخراج میکروبی ۲۰ دقیقه حرارت دهی	۳۴۴۶/۱۶	۹۵۳/۸۶ ۸۹۶/۵۷		۲۸۹۱/۵۳		۲۱۳۵/۸۷	۱۶۶۰/۱۹	۱۵۵۸/۱۲ ۱۳۷۹/۶۹	۱۳۱۶/۷۴	۱۲۶۱/۴۲ ۱۲۰۵/۳۸	۳۶/۲۲
کیتوزان، استخراج میکروبی ۴۵ دقیقه حرارت دهی	۳۴۸۹/۹۲	۸۹۶/۵۵		۲۸۹۱/۴۲		۲۱۳۲/۵۲	۱۶۵۶/۱۰		۱۳۱۶/۷۵	۱۲۶۱/۶۹ ۱۲۰۵/۲۳ ۱۱۵۸/۷۵	۳۵/۶۷
کیتوزان، استخراج میکروبی ۱۰ ساعت حرارت دهی	۳۴۴۷/۱۱	۹۵۴/۵۵ ۸۹۶/۷۴ ۷۰۴/۲۴	۳۱۰۶/۸۸	۲۸۹۱/۷۲		۲۱۳۲/۳۶	۱۶۵۶/۱۶	۱۵۶۲/۱۶ ۱۳۷۹/۴۴	۱۳۱۶/۷۹	۱۲۶۱/۲۱ ۱۲۰۵/۲۰ ۱۱۵۷/۲۹	۳۶/۱۲
کیتوزان، استخراج شیمیایی ۱۵ دقیقه حرارت دهی	۳۴۵۲/۳۱	۹۵۴/۳۸ ۸۹۶/۵۲		۲۹۳۳/۱۵ ۲۸۹۱/۹۳			۱۶۵۶/۰۸	۱۵۶۲/۰۲ ۱۳۷۹/۴۰	۱۳۱۶/۳۹	۱۲۶۱/۵۱ ۱۲۰۵/۳۱ ۱۱۵۷/۷۳	۳۶
کیتوزان، استخراج شیمیایی ۲۰ دقیقه حرارت دهی	۳۴۵۲/۱۶	۹۵۴/۴۸ ۸۹۶/۹۷ ۷۵۳/۵۰		۲۹۳۳/۴۰ ۲۸۹۱/۸۸	۲۳۴۷/۰۱		۱۶۴۷/۱۹	۱۵۶۲/۰۹ ۱۳۷۹/۵۴	۱۳۱۷/۱۹	۱۲۶۱/۳۲ ۱۲۰۵/۱۲ ۱۱۵۷/۳۵	۳۵/۸
کیتوزان، استخراج شیمیایی ۴۵ دقیقه حرارت دهی	۳۴۵۲/۳۸	۹۵۴/۵۴ ۸۹۶/۷۷ ۷۵۲/۶۶		۲۹۶۲/۰۵ ۲۹۳۳/۷۹ ۲۸۹۱/۷۸		۲۱۳۱/۹۳	۱۶۵۶/۱۸	۱۵۶۵/۹۷ ۱۴۱۶/۰۳ ۱۳۷۹/۸۹	۱۳۱۶/۹۰	۱۲۶۱/۳۷ ۱۲۰۵/۲۴ ۱۱۵۷/۷۰	۳۶
کیتوزان، استخراج شیمیایی ۱۰ ساعت حرارت دهی	۳۴۵۱/۳۹	۹۵۴/۳۰ ۸۹۶/۵۴ ۷۰۴/۰۶		۲۸۹۲/۰۱			۱۶۵۹/۱۳	۱۵۵۸/۰۴ ۱۳۷۹/۷۳	۱۳۱۵/۵۲	۱۲۶۰/۹۱ ۱۲۰۵/۳۲ ۱۱۵۷/۵۷	۳۶/۱۴

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

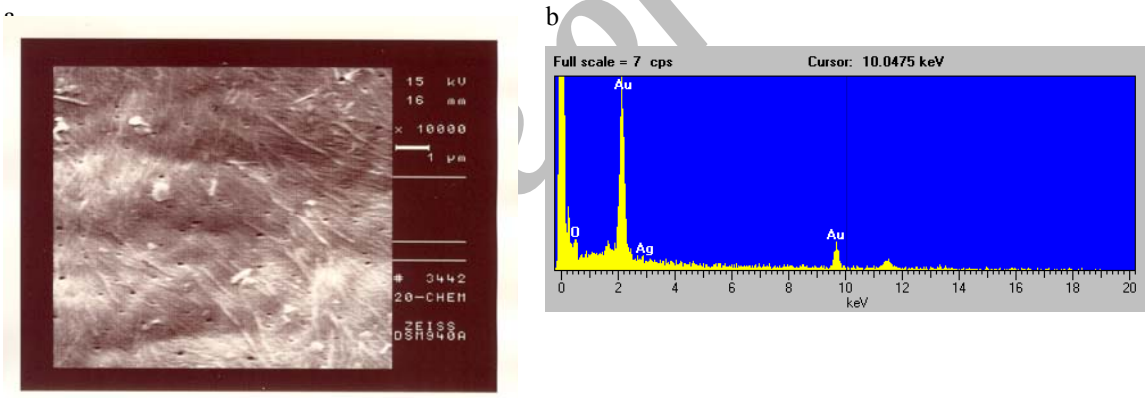
www.SID.ir

با حرارت دادن نمونه کیتین تعداد باندهای مربوط به ترکیبات آلکن C-H(Alkenes) در موقعیت 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 حرارت‌دهی 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 cm^{-1} ۲۱۱۰-۲۲۶۰ 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).

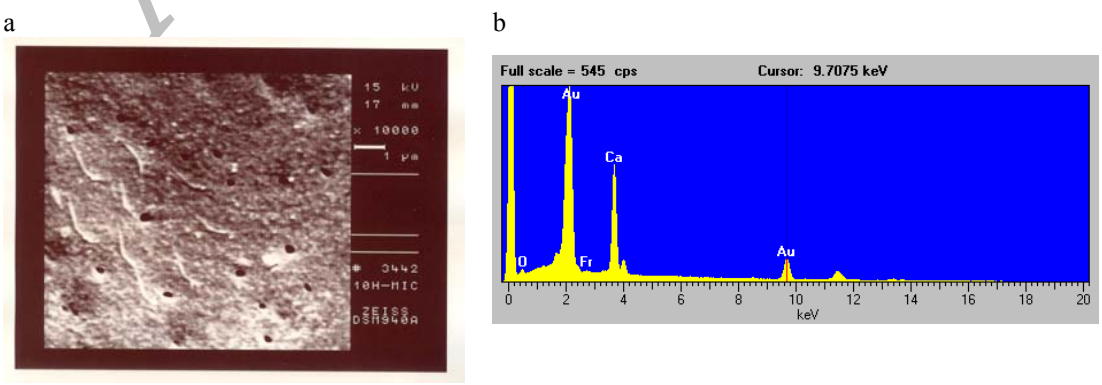
همچنین نتایج داستیلاسیون کیتوزان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره، تشکیل غشاءهای کیتوزانی با قطر منافذ ۰/۳۱۲-۰/۰۶۲ میکرون را در مقایسه با نمونه کیتن نشان داد (اشکال شماره ۱ تا ۳).

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 ضدمیکروبی 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).



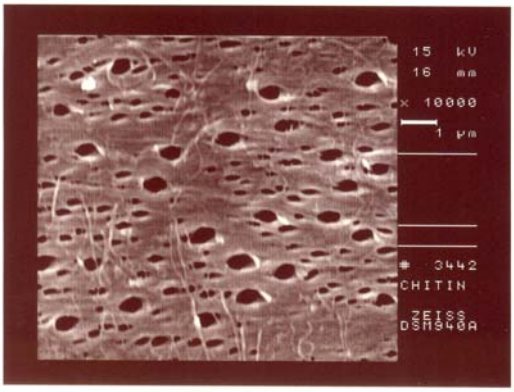
شکل شماره ۱: میکروگراف الکترونی و آنالیز عناصر مربوط به کیتوزان استخراج شده به روش شیمیایی و داستیله شده با دوره زمانی ۲۰ دقیقه. a) میکروگراف الکترونی نگاره b) آنالیز عناصر. اندازه منافذ ۰/۰۶۲ میکرون (بزرگترین) . اکثر منافذ بسته شده است

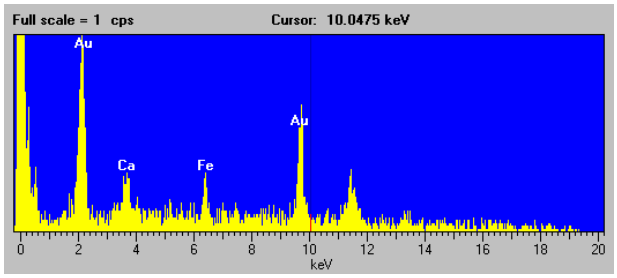


شکل شماره ۲: میکروگراف الکترونی و آنالیز عناصر مربوط به کیتوزان استخراج شده به روش میکروبی و داستیله شده با دوره زمانی ۱۰ ساعت. a) میکروگراف الکترونی نگاره b) آنالیز عناصر. افزایش قطر منافذ به ۰/۳۱۲ میکرون

Archive of SID
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]
www.SID.ir

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 ضدمیکروبی مشتقات داستیله کیتوزان برحسب قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی متر)

قطر هاله عدم رشد (mm) / میکروارگانیسم	۱۵ دقیقه		۲۰ دقیقه		۴۵ دقیقه		۱۰ ساعت	
	میکروبی	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

نتایج آنالیز آزمون آماری جهت بررسی میزان تاثیر ضدمیکروبی مشتقات داستیله کیتوزان برحسب قطر هاله عدم رشد، اختلاف معنی‌داری بین روش‌های استخراج شیمیایی و میکروبی پس از حرارت دهی در زمان‌های متفاوت، در سطح P<۰/۰۵ 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 معنی‌دار بین تشکیل قطر هاله عدم رشد برحسب مدت زمان حرارت‌دهی مشتقات داستیله کیتوزان و نوع باکتری‌های شاهد در P<۰/۰۵ می‌باشد. صرف نظر از مدت زمان حرارت‌دهی، بیشینه قطر هاله عدم رشد روی باکتری گرم مثبت S.aureus با میانگین قطر حداقل ۱۲ و حداکثر ۱۹ میلیمتر دیده می‌شود.

زمانیکه میزان ماده موثره روی دیسک تا سه برابر (۹میلی‌گرم) 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 aeroginosa قرار داده شود، جلوی رشد باکتری مورد نظر گرفته می‌شود (نتایج این آزمون تا یک هفته گرمخانه‌گذاری 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،

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

www.SID.ir

سر و کاراپاس Penaeus semisulcatus در گونه میگوی غالب صید شده در خلیج فارس در مقایسه با نمونه شاهد (کیتین) پس ازآماده‌سازی به روش Zhang وهمکاران با استفاده از روشFT-IR را به‌ترتیب ۶۵ درصد و ۳۰ درصد است. این روش باعث کاهش میزان استیلاسیون نمونه‌های کیتوزان حرارت دیده شده تا ۳۵ درصد گردید.

استفاده از روشFT-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(۱۶،۱۵). 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 $1320\ cm^{-1}$ 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 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(۲۵،۲۴) و حاملین انتقال دارو (۲۷،۲۶) استفاده می‌شود. Chow و Khor از روش IBP (internal bubbling process) برای تهیه ماتریکس کیتینی با قطر منافذ بزرگ(۱۰۰۰-۱۰۰ 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(۳۰،۲۹). 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.

درآنالیز عناصر توسط میکروسکوپ الکترونی ارتباط معنی‌داری بین حضور یون کلسیم درنمونه، 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 درگراف‌هایی 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 (۹میلی گرم) قطر هاله عدم رشد روی باکتری Pseudomonas aeruginosa بیمارستانی، افزایش ۵۰ درصدی را نشان داد.

Archive of SID
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

www.SID.ir

اثرات ضدمیکروبی کیتوزان تا حدود زیادی وابسته به درجه پلیمریزاسیون مولکولی آن است(۳۲). انواع اولیگومریک کیتوزان اثر ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی این ترکیب در pH های اسیدی بخصوص pH معادل ۴/۵ مشاهده شده است(۳۲). با توجه به عدم سمیت ماده استخراج شده به کارگیری تراکم‌های بیشینه آن می‌تواند اثرات ضدمیکروبی 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.

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. Carbohyd Res 2006; 340: 1914-1917.
11. Weitschies W, Ramirez LP, Hilger I, Kaisar WA, Magn J. The FTIR spectra of the Fe3O4–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.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

www.SID.ir

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 chitosanolysis 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 F L, Shyu S S, Wu Y B. 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 chitooligosaccharide 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.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-25]

www.SID.ir